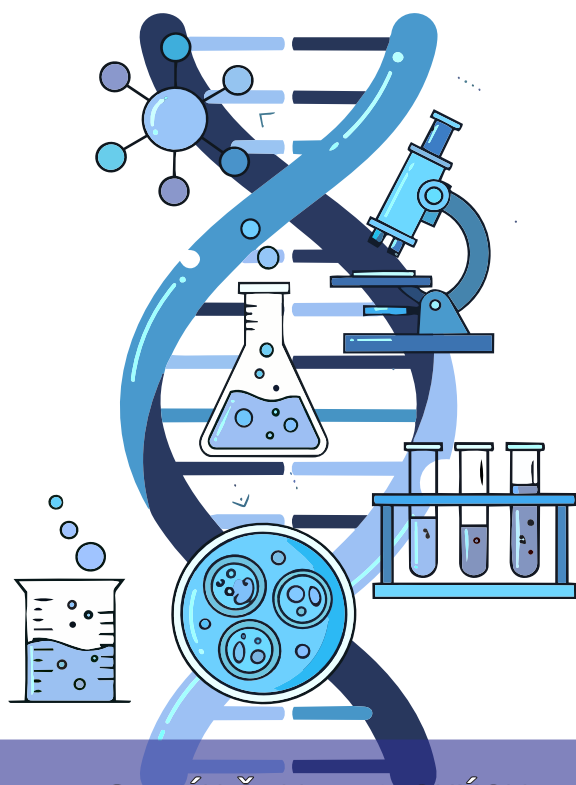


UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA



ZBORNÍK ŠTUDENTSKÝCH
VEDECKÝCH PRÁC
2024



LEKÁRSKA FAKULTA
Univerzita Komenského
v Bratislave

ZBORNÍK ŠTUDENTSKÝCH VEDECKÝCH PRÁC **2024**

62. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
A
XIX. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK

2024
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Zostavovateľ:

doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.

Recenzent zborníka

prof. RNDr. Ivan Varga, PhD.

MUDr. Andrea Janegová, PhD.

Práce boli posúdené v nezávislom recenznom konaní. Zoznam recenzentov prác je uvedený na konci publikácie. Práce neprešli jazykovou korektúrou, za jazykovú úpravu textov zodpovedajú autori príspevkov.

Ilustrácia na obálke

doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.

Ilustrácia bola vytvorená s pomocou DALL-E 2



Publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 (vyžaduje sa: povinnosť uvádzať pôvodného autora, len nekomerčné použitie, nezasahovať do diela). Viac informácií o licencií a použití diela:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Vydavateľ

Univerzita Komenského v Bratislave, 2024



LEKÁRSKA FAKULTA
Univerzita Komenského
v Bratislave

**62. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
XIX. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV**

VYŽIADANÁ PREDNÁŠKA

**Univ.- Prof. Dr. med. univ. Heinrich Resch
Sigmund Freud PrivatUniversität Wien
„Bone Diseases - present and future aspects“.**

VEDECKÉ PRÁCE ŠTUDENTOV

1. Vplyv ruténatých komplexov na viabilitu nádorových a zdravých buniek

Lukáš Balogh

Školiteľ: Mgr. Mária Janubová, PhD.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK

2. Úloha extracelulárnej DNA a neutrofilových extracelulárnych pascí v animálnom modeli alkoholového poškodenia pečene

Anna Farkašová

Školiteľ: doc. RNDr. MUDr. Roman Gardlík, PhD., Mgr. Paulína Belvončíková

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

3. Detection of neutrophil extracellular traps-bound bacteria using immunofluorescent methods

BSc. Tetiana Pidlypska

Školiteľ: assoc. professor Michal Pastorek, MSc., PhD.

Institute of Molecular Biomedicine FM CU

4. Detekcia a charakteristika vlastností depozitu cerebrálneho železa po paracetamolom indukovanom intrakraniálnom krvácaní po 24 hodinách fyzikálnymi a histochemickými metódami

Matúš Pukanec

Školiteľ: doc. RNDr. Martin Kopáni, PhD., Mgr. Jakub Szabó

Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LF UK

5. Flammer syndrome and glaucoma

Iryna Korol

Školiteľ: prof. Nataliia Malachkova, MD, PhD.

Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University, Vinnitsya, Ukraine

6. Oxytocín a vazopresín ako hormóny lásky (Spokojnosť v partnerskom vzťahu nie je spojená s variabilitou AVPR1A génu, ale s prítomnosťou dieťaťa vo vzťahu)

Dorota Bartková

Školiteľ: RNDr. Jaroslava Babková, PhD.

Fyziologický ústav LF UK

7. Skrining diabetickej retinopatie nemydriatickou funduskamerou s využitím softvéru s umelou inteligenciou

Linda Ilavská, MBA

Školiteľ: prof. MUDr. Alexandra Bražinová, PhD., MPH.

Ústav epidemiológie LF UK

8. Kolonizácia nosovej sliznice študentov medicíny kmeňmi Staphylococcus aureus rezistentnými voči antibiotikám

Sylvia Kasanická, Sebastián Kern

Školiteľ: RNDr. Martina Dubinová, PhD., Mgr. Marek Straka, PhD.

Mikrobiologický ústav LF UK a UNB

9. Stresová reakcia a emócie u dojčiat - sú prepojené?

Sebastián Stanko

Školiteľ: prof. PharmDr. Daniela Ježová, DrSc.

Ústav experimentálnej endokrinológie BMC SAV, v. v. i.

10. Niektoré markery srdcového a renálneho zlyhávania u seniorov so sepsou

MUDr. David Čmejrek

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Dúbrava CSc.

II. Interná klinika SZU, FNŠP F.D.Roosevelta

11. Porovnanie mortality medzi ľuďmi bez domova s ľuďmi so stabilným bývaním spárovanými podľa veku a pohlavia akútne hospitalizovanými na internej klinike Univerzitnej nemocnice v Bratislave: retrospektívna case-control štúdia

MUDr. Falat Jakub

Školiteľ: prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP, FEFIM

V. interná klinika Lekárskej fakulty UK a UNB

12. Imunohistochemická detekcia imunitných buniek v ľudskom nadsemenníku – porovnanie s ľudským vajíčkovodom

Mgr. Claudia Feitscherová

Školiteľ: prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD.

Ústav histológie a embryológie LF UK

13. Stav kompenzácie diabetikov na Slovensku - retrospektívna analýza vyšetrení glykovaného hemoglobínu v rokoch 2019 – 2023

MUDr. Martin Jankovský

Školiteľ: doc. MUDr. Peter Jackuliak PhD., MPH, FRCP, FEFIM

V. interná klinika Lekárskej fakulty UK a UNB

14. Liečba alfiberceptom neovaskulárnej VPDM v dvojročnom sledovaní

MUDr. Ján Juhas

Školiteľ: doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD.

Klinika oftalmológie LF UK a UNB

15. Identification of bacteria directly from the whole blood by targeted nanopore sequencing

Mgr. Tomáš Strečanský

Školiteľ: doc. MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH

Institute of Molecular Biomedicine FM CU

16. Morfológia vnútorného ucha pri Branchio-oto-renálnom syndróme

MUDr. Diana Ugorová

Školiteľ: doc. MUDr. RNDr. Lukáš Varga, PhD.

Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNBa; DIABGENE, Biomedicínske Centrum SAV

17. Imuno-zápalový profil a variabilita srdcovej frekvencie u pacientov s karcinómom močového mechúra a zdravých kontrol

Iveta Mikolášková, MSc.

Školiteľ: RNDr. Ľuba Hunáková, CSc.

Imunologický ústav LF UK, Urologické oddelenie, Nemocnica svätého Cyrila a Metoda

18. Komplexné genomické profilovanie pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc

Mgr. Michal Svoboda

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH

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

19. Analýza zloženia črevného mikrobiómu u myšiacich xenograftov s chemorezistentnými a chemosenzitívnymi testikulárnymi nádormi z germinatívnych buniek

Mgr. Aneta Ševčíková

Školiteľ: RNDr. Soňa Čierniková, PhD.

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v. v. i.

20. Modely xenograftov odvodených od pacientov s karcinómom prsníka

MUDr. Minh Tuong Tran

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Boháč, PhD., MPH, MHA FEBOPRAS

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v. v. i.

21. Sacituzumab govitekan a jeho terapeutický účinok na chemorezistentné nádory semenníkov vznikajúce zo zárodočných buniek

Mgr. Natália Udovrková

Školiteľ: Mgr. Lucia Kučerová, DrSc.

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v. v. i.

22. Úloha Klotho proteínu v imunopatogenéze gliómov

Mgr. Eszter Zsemlye

Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.

Imunologický ústav LF UK

23. Vplyv LL37 na dynamiku tvorby a degradácie neutrofilových extracelulárnych pascí

Mgr. Letícia Hudecová

Školiteľ: Mgr. Michal Pastorek, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

24. Vplyv pitia úžitkovej vody na organizmus hlodavcov

Mgr. Kristína Lichá

Školiteľ: Mgr. Barbora Tamášová, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

25. Extracelulárna DNA ako súčasť extracelulárnych pascí neutrofilov v patogenéze reumatoidnej a kolagénom-indukovanej artritídy

Mgr. Kristína Macáková

Školiteľ: doc. RNDr. Barbora Vlková, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

26. Vplyv kyseliny karnózovej a jej kombinácie s metotrexátom na oxidačný stres u potkanov s adjuvantnou aritídou

Mgr. Lucia Pastvová

Školiteľ: prof. RNDr. Jana Muchová, PhD.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK

27. Vplyv inhibície aromatázy na správanie myší v genetickom animálnom modeli porúch autistického spektra

Mgr. Petronela Sušienková

Školiteľ: Mgr. Veronika Borbélyová, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

28. Plazmou aktivovaná tekutina ako liečba infekcií močových ciest?

Mgr. Nadja Šupčíková

Školiteľ: doc. RNDr. Martin Kopáni, PhD.

Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LF UK

29. Štúdium mitochondriálnych ochorení s využitím technológií masívne paralelného sekvenovania

Mgr. Gabriela Bľandová

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH

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

30. Pilotný projekt: Identifikácia patogénnych zárodočných variantov u slovenských rómskych pacientov s malígnym ochorením

Mgr. Nikola Janoštiaková

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH

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

31. Úloha molekuly CD222 v imunopatogenéze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb

Mgr. Michaela Kardoheľyová

Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.

Imunologický ústav LF UK, Ústav molekulárnej biológie SAV

32. Multigénová analýza u pacientiek s prekancerózou a s karcinómom endometria

Mgr. Dominik Kodada

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH

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

33. Identifikácia rizikových polymorfizmov v 5'URR oblasti génu HLAG u pacientov s Alzheimerovou chorobou

Mgr. Agáta Očenášová

Školiteľ: doc. RNDr. Vladimíra Ďurmanová, PhD.

Imunologický ústav LF UK

34. Dynamika extracelulárnej DNA a deoxyribonukleázy po fyzickej aktivite

Mgr. Nikola Tóthová

Školiteľ: doc. RNDr. Barbora Vlková, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

VEDECKÉ PRÁCE ŠTUDENTOV

1. Vplyv ruténatých komplexov na viabilitu nádorových a zdravých buniek

Lukáš Balogh

(všeobecné lekárstvo, 3.ročník)

Školiteľ: Mgr. Mária Janubová, PhD.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK

Úvod

Ruténium patrí k skupine platinových kovov spolu s paládiom, platinou, osmiom, irídiom a ródiom. Už v roku 1965 boli pri výskumoch Barnetta Rosenberga zistené cytotoxické účinky platiny na bunky E.Coli. Pôvodne mal experiment skúmať vplyvy elektrického prúdu na bunkový cyklus, až dodatočné skúmanie preukázalo, že išlo o efekt platiny, ktorá sa nachádzala v elektródach a jej komplexov s amónnymi kationmi, ktoré boli v tlmivom roztoku (3). Tento objav viedol k rozsiahlejšiemu používaniu kovov pri výskume protirakovinových substancií.

Cisplatina, cis-diamin-dichloridoplatinatý komplex, bola ako liečivo prvej generácie používaná na liečbu širokého spektra nádorových ochorení. Avšak jej chemická štruktúra spôsobuje rastúcu rezistenciu a limituje selektivitu, s čím sú spojené vedľajšie účinky ako nefrotoxicita a ototoxicita (4,5).

Práve tento fakt otvára príležitosti na preskúmanie ďalších kovov z tejto skupiny ako potenciálnych liečiv. Výhoda použitia ruténia v terapií oproti použitiu platiny je aj skutočnosť, že okrem interakcie s DNA pôsobí aj na indukciu apoptických dráh, tvorbu reaktívnych produktov kyslíka alebo inhibíciu angiogenézy.

Interakcie s DNA môžeme rozdeliť na reverzibilné a ireverzibilné. Ireverzibilné pôsobia prostredníctvom kovalentne viazaného aduktu, táto väzba vedie k poškodeniu štruktúry v rozsahu, v ktorom opravné mechanizmy neúčinkujú a dochádza k zániku bunky. Liečivá s reverzibilnou interakciou s DNA pôsobia elektrostatickými silami, ako napríklad tvorba vodíkových mostíkov a van der Waalsove sily alebo prostredníctvom hydrofóbných interakcií. Existuje viac mechanizmov účinku podľa miesta a spôsobu naviazania liečiva (1). Nami testované látky majú interkaláciu ako predpokladaný spôsob interakcie (2). Pri interkalácii dochádza k vsunutiu aromatickej časti liečiva medzi bázy dvoch reťazcov DNA. Tendencia hydrofóbnej zložky liečiva interagovať s hydrofóbnymi bázami radšej, ako s polárnym prostredím bunky, je hnacou silou takejto interakcie. Po takomto vsunutí dochádza k zväčšeniu vzdialenosti medzi báзовými pármami, čo vedie k funkčným zmenám, akými môžu byť inhibícia replikácie a transkripcie buniek (1). V našej práci sme sa rozhodli sledovať vplyv potenciálnej cytotoxicity vybraných ruténatých komplexov na bunkových líniiach karcinómu prsníka (MCF-7) a ľudských pľúcnych fibroblastov (MRC-5).

Materiál a metódy

Použité bunkové línie

Ľudské pľúcne fibroblasty MRC-5, bunky karcinómu prsníka MCF-7

Ruténaté komplexy

V práci sme použili 7 koordinačných zlúčenín rozpustených v DMSO (dimetylsulfoxid), kde atóm ruténia vystupoval ako centrálny atóm s oxidačným číslom II a koordinačným číslom 6. Každý komplex obsahoval dva ligandy zo skupiny bidentálnych polypyridínov a jeden ligand zo skupiny nesteroidných antiflogistík (NSAID) (2). Prehľad komplexov je uvedený v tabuľke 1. Na testovanie sme použili komplexy v koncentráciách 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M a 10 μ M.

Tab. 1: Použité rutenaté komplexy

Pracovný komplexu	názov	Označenie v pôvodnej publikácii	Názov
405		2	[Ru(bipy)2(3-Cl-Sal)]
362		3	[Ru(bipy)2(3-Br-Sal)]
370		12	[Ru(bipy)2(6-F-Sal)]
425		13	[Ru(bipy)2(5-CF3-Sal)]
424		14	[Ru(bipy)2(diflu)]
450		15	[Ru(phen)2(4-Br-Sal)]
444		17	[Ru(bichin)2(4-F-Sal)]

Príprava buniek a kultivácia buniek s ruténatými komplexami

Bunky sme nasadili na 96-jamkové platničky v množstve 5000 buniek na jamku a kultivovali ich po dobu 24 hodín pri 37°C a 5% CO₂ v termostate. Po 24 hodinovej kultivácii sme k bunkám pridali ruténaté komplexy vo výslednej koncentrácii 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M alebo 10 μ M. Následne sme bunky kultivovali po dobu 24, 48 alebo 72 hodín.

Stanovenie bunkovej viability pomocou MTT testu

V čase 24 hodín, 48 hodín a 72 hodín od pridania ruténatých komplexov k bunkám sme do jamiek s bunkami pridali 20 μ l roztoku MTT. Následne sme platničku umiestnili na trepačku na 5 minút. Po uplynutí 5 minút sme bunky ďalej inkubovali 2,5 hodiny pri 37°C a 5% CO₂, počas ktorej sa žltý rozpustný MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) redukoval na fialové kryštáliky formazánu (7). Po odstránení média sme na rozpustenie formazánu pridali 200 μ l DMSO do každej jamky, platničku sme umiestnili na 5 minút na

trepачku a následne sme odmerali absorbanciu pomocou mikroplošného spektrofotometra Elisa Reader EL808, Biotek, USA pri 490 nm.

Výsledky

V našich experimentoch sme najskôr sledovali účinky ruténatých komplexov na MRC- 5 ľudských pľúcnych fibroblastov po 24 hodinovej, 48 hodinovej a 72 hodinovej inkubácii. Následne sme sledovali účinky ruténatých komplexov na nádorových bunkách MCF-7 po 24 hodinovej, 48 hodinovej a 72 hodinovej inkubácii. Z výsledkov merania viability zosumarizovaných v grafoch môžeme konštatovať nielen vplyv komplexov na viabilitu buniek, ale aj porovnať intezitu účinku daného komplexu pri daných koncentráciách na obe bunkové línie.

Vplyv ruténatých komplexov po 24h inkubácii

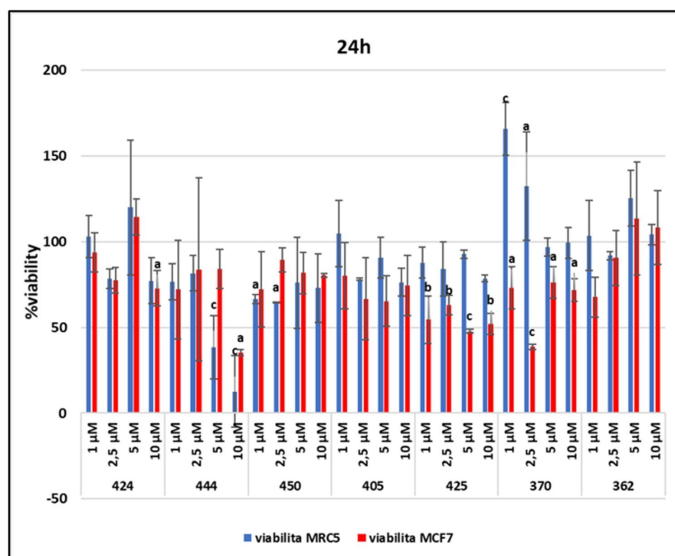
Z prehľadu účinkov jednotlivých komplexov, uvedeného na obrázku 1A možno konštatovať, že komplex 424 v nami použitých koncentráciách nedokázal výrazne znížiť viabilitu ani jednej bunkovej línie. Výnimkou je koncentrácia 10 μM , ktorá viedla k štatisticky signifikantnému poklesu rastu MCF-7 buniek na $72,76 \pm 10,36\%$ (Obr. 1A). Komplexy 444 a 450 znižovali viabilitu výraznejšie, avšak najmä u zdravých buniek MRC-5 (Obr. 1A).

Pri komplexe 405 sme nezaznamenali signifikantný vplyv na viabilitu pri žiadnej bunkovej línii. Zníženie viability s relatívne priaznivou selektivitou vykazoval komplex 425. Viabilita nádorových buniek MCF-7 po inkubácii s komplexom 425 v koncentráciách 1, 2,5, 5 a 10 μM sa signifikantne znížila na $54,5 \pm 13,79\%$, $62,92 \pm 5,8\%$, $47,83 \pm 1,28\%$ a $52,11 \pm 6,11\%$, zatiaľ čo v prípade MRC-5 buniek sme zaznamenali signifikantný pokles viability len v prípade inkubácie buniek s 10 μM komplexom 425 na $78,52 \pm 1,97\%$ (Obr. 1A).

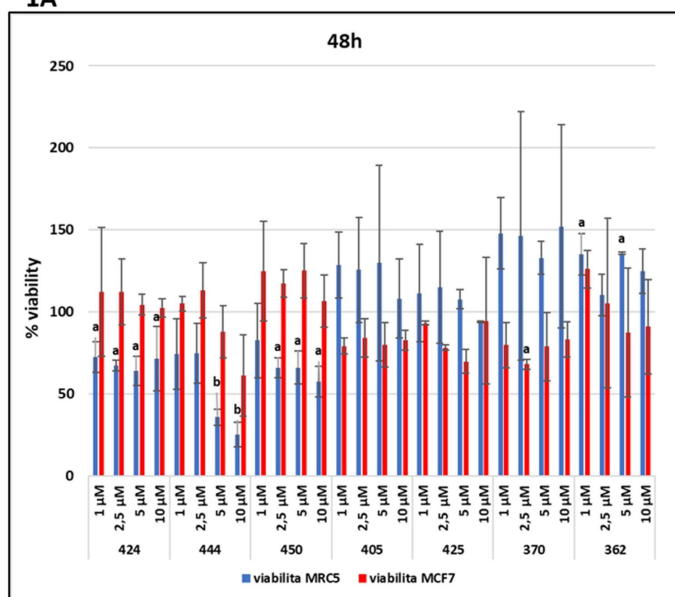
Komplex 370 v koncentráciách 1 a 2,5 μM výrazne zvýšil viabilitu buniek MRC-5 nad 100%, pričom významne znížil viabilitu nádorových buniek MCF-7 na $73,06 \pm 12,38\%$ a $38,71 \pm 1,54\%$ (Obr. 1A). Čo sa týka komplexu 362, nedochádzalo k významnému ovplyvneniu viability MRC-5 a ani MCF-7 buniek (Obr. 1A).

Vplyv ruténatých komplexov po 48h inkubácii

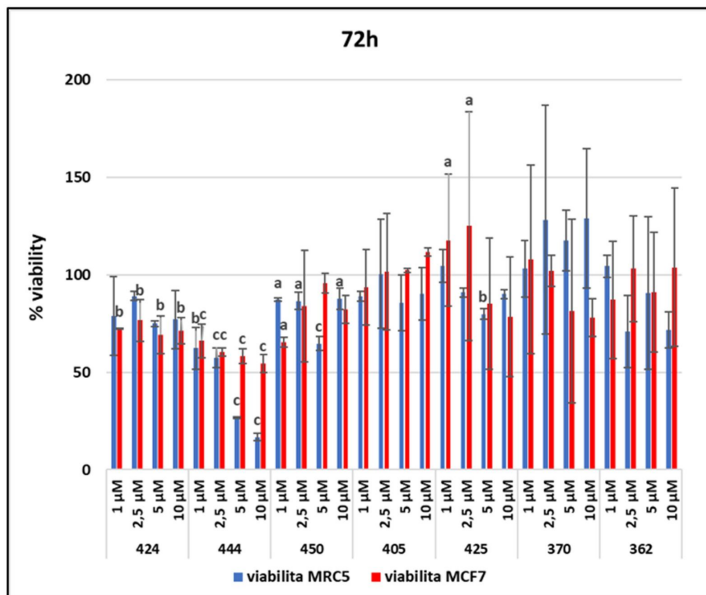
Podľa výsledkov zobrazených na obrázku 1B, možno konštatovať, že počas inkubácie s komplexom 424 v koncentráciách 1, 2,5, 5 a 10 μM viabilita MCF-7 buniek nebola zásadne zmenená, avšak významne sa znížila viabilita MRC-5 buniek na $72,52 \pm 9,27\%$, $67,23 \pm 3,43\%$, $64,14 \pm 8,85\%$ a $71,54 \pm 19,58\%$. Nepriaznivú selektivitu vykazoval aj výsledok inkubácie buniek s komplexom 444, pretože viabilita MRC-5 buniek pri použití koncentrácií 5 a 10 μM významne klesla na $35,68 \pm 5,02\%$ a $25,21 \pm 7,32\%$, pričom pokles viability MCF-7 buniek bol zaznamenaný iba pri koncentrácii 10 μM a to na $61,12 \pm 24,91\%$ (Obr. 1B). Podobne zlú selektivitu preukázal aj komplex 450, ani jedna z koncentrácií neznížila viabilitu buniek MCF-7 pod 100%, pričom však významne znižovala rast MRC-5 buniek (Obr. 1B). Pri komplexoch 405 a 425 sme získali výsledky, ktoré neboli štatisticky významné.



1A



1B



1C

Obr. 1: A. Vplyv ruténatých komplexov na rast MRC-5 a MCF-7 buniek po 24 hodinovej inkubácii. Viabilita MRC-5 buniek je porovnávaná s viabilitou MRC-5 kontrolných buniek, ktoré boli inkubované len s DMSO/24 hodín a predstavuje 100%. Viabilita MCF-7 buniek je porovnávaná s viabilitou MCF-7 kontrolných buniek, ktoré boli inkubované len s DMSO/24 hodín a predstavuje 100%. B. Vplyv ruténatých komplexov na rast MRC-5 a MCF-7 buniek po 48 hodinovej inkubácii. Viabilita MRC-5 buniek je porovnávaná s viabilitou MRC-5 kontrolných buniek, ktoré boli inkubované len s DMSO/48 hodín a predstavuje 100%. Viabilita MCF-7 buniek je porovnávaná s viabilitou MCF-7 kontrolných buniek, ktoré boli inkubované len s DMSO/48 hodín a predstavuje 100%. C. Vplyv ruténatých komplexov na rast MRC-5 a MCF-7 buniek po 72 hodinovej inkubácii. Viabilita MRC-5 buniek je porovnávaná s viabilitou MRC-5 kontrolných buniek, ktoré boli inkubované len s DMSO/72 hodín a predstavuje 100%. Viabilita MCF-7 buniek je porovnávaná s viabilitou MCF-7 kontrolných buniek, ktoré boli inkubované len s DMSO/72 hodín a predstavuje 100%. Výsledky sú priemer 2 nezávislých experimentov, každý z nich bol robený v 3-5 jamkách, jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; a - $p < 0.05$; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$

V prípade komplexu 370, jediný štatisticky významný výsledok vzišiel z testovania komplexu 370 pri koncentrácii 2,5 μM , a to pokles viability MCF-7 buniek na $67,97 \pm 2,93\%$. Komplex 362 nemal významný vplyv na viabilitu ani jednej bunkovej línie, okrem koncentrácie 1 a 5 μM , ktorá štatisticky významne zvýšila viabilitu MRC-5 buniek (Obr. 1B).

Vplyv ruténatých komplexov po 72h inkubácii

Z výsledkov uvedených na obrázku 1C je zrejmé, že pod vplyvom komplexu 424 dochádzalo k miernemu poklesu viability MCF-7 buniek pri každej koncentrácii (1, 2,5, 5 a 10 μM) a to na $72,42 \pm 0,26\%$, $76,68 \pm 10,69\%$, $69,05 \pm 9,71\%$ a $71,32 \pm 6,61\%$.

Komplex 444 v koncentrácii 1 a 2,5 μM viedol k miernemu poklesu viability pri inkubácii s MRC-5 bunkami a aj MCF-7 bunkami. Pri koncentráciách 5 μM a 10 μM prišlo k výraznému zníženiu viability MRC-5 buniek na $26,57 \pm 0,41\%$ a $16,68 \pm 1,94\%$, pričom viabilita MCF-7 buniek sa znížila na $58,35 \pm 3,88\%$ a $54,57 \pm 4,55\%$ (Obr. 1C). Za zmienku stojí najmä výsledok inkubácie buniek s komplexom 450 pri koncentrácii 1 μM , kde viabilita MRC-5 buniek vyšla $87,11 \pm 0,86\%$ a MCF-7 buniek $65,49 \pm 2,54\%$. Komplex 405 výrazne neznížil viabilitu ani jednej bunkovej línie. Inkubácia MCF-7 buniek s komplexom 425 preukázala významný nárast viability pri koncentrácii 1 μM a 2,5 μM na $117,79 \pm 33,85\%$ a $124,97 \pm 58,79\%$. Na rozdiel od MRC-5 buniek kde prišlo k zníženiu viability pri koncentrácii 5 μM na $79,90 \pm 2,72\%$. Komplexy 370 a 362 po 72 hodinovej inkubácii významne neovplyvnili viabilitu ani jednej bunkovej línie (Obr. 1C).

Diskusia

V našej práci sme sledovali vplyv komplexov na viabilitu buniek bunkových línií MRC-5 a MCF-7, pričom u väčšiny komplexov sme v použitých koncentráciách nezaznamenali významný negatívny selektívny účinok voči nádorovým bunkám MCF-7.

Ďalej sme zistili, že kultivácia buniek oboch línií viedla k zmenám viability a to nielen k poklesu, ale aj vzostupu viability nad 100%. Podľa zistení zo skorších vedeckých štúdií vyplýva, že stupeň viability, zistený podľa MTT testu, nemusí priamo korelovať s počtom buniek vo vzorke (8,9). Tento test totiž skúma kapacitu testovanej vzorky redukovať tetrazóliovú soľ (MTT) na nerozpustný formazán (7,10). Avšak nielen počet buniek, ale aj ich metabolická aktivita môže ovplyvňovať kapacitu redukovať MTT (8,9). Je teda možné, že nami pridávané komplexy vyvolávali v bunkách stresovú odpoveď, ktorá zvýšila ich metabolizmus.

Čo sa týka rôznych hodnôt viability nameraných po inkubácii rovnakého typu buniek s ruténatými komplexami, môžeme si ich vysvetliť prítomnosťou rozdielnych ligandov v koordinačných zlúčeninách.

Pozoruhodným zistením našej práce je aj fakt, že inkubácia MCF-7 buniek s niektorými komplexami viedla k nárastu viability v čase. Príkladom tohoto úkazu môže byť komplex 425 pri koncentrácii 2,5 μM , kde sme zistili viabilitu buniek $62,92 \pm 5,80\%$ po 24 hodinách, $78,15 \pm 1,52\%$ po 48 hodinách a $124,97 \pm 58,79\%$ po 72 hodinách. Podobne aj pri komplexoch 370 a 405. Predošlé štúdie preukázali, že príčina môže tkvieť v bunkách, ktoré konštitutívne exprimujú faktory rezistencie (vedúce napríklad k aktívnemu efluxu látky), teda po podaní látky dochádza k vyselektovaniu rezistentných buniek. Druhým a pravdepodobnejším

mechanizmom je rezistencia získaná pomocou mutácii DNA, ktorá môže viesť ku genetickej up-regulácii alebo down-regulácii relevantných mechanizmov vo vzťahu k pôsobiacej látke (11).

Na rozdiel od našich zistení, niektoré vedecké práce odhalili významnú selektivitu účinku ruténových bipyrimidinových komplexov na bunkové línie MRC-5 a MCF-7 (12). Rozdielnosť výsledkov prác je pravdepodobne zapríčinená chemickou štruktúrou látky, ktorá ovplyvňuje interakciu látky s bunkami. Testované komplexy v spomenutej štúdii totiž neinteragovali s DNA prostredníctvom interkalácie, ako tomu bolo pri nami použitých komplexoch.

Zoznam použitej literatúry

1. Lucia Andrežalová, Zuzana Országhová, Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 225, 2021, 111624, ISSN 0162-0134, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111624
2. Martin Schoeller: Syntéza, štruktúra a vlastnosti rutenových komplexov ako potenciálnych protirakovinových liečiv
3. Alderden, R. A. et al. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*, vol. 83, no. 5, s. 728-734. DOI: 10.1021/ed083p728
4. Steyger PS. Mechanisms of Ototoxicity and Otoprotection. *Otolaryngol Clin North Am*. 2021 Dec;54(6):1101-1115. doi: 10.1016/j.otc.2021.08.007. PMID: 34774227; PMCID: PMC8597902.
5. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 2008 May;73(9):994-1007. doi: 10.1038/sj.ki.5002786. Epub 2008 Feb 13. PMID: 18272962.
6. Tatjana Lazarević, Ana Rilak, Živadin D. Bugarčić, Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 142, 2017, Pages 8-31, ISSN 0223-5234, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>.
7. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20. PMID: 21516412.
8. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827. PMID: 34884632; PMCID: PMC8657538.
9. Rai Y., Pathak R., Kumari N., Sah D.K., Pandey S., Kalra N., Soni R., Dwarakanath B.S., Bhatt A.N. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition.
10. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev*. 2005;11:127–152. doi: 10.1016/s1387-2656(05)11004-7.
11. Di Nicolantonio, F., Mercer, S.J., Knight, L.A. et al. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer* 5, 78 (2005). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-78>
12. Katia M. Oliveira, Luna-Dulcey Liany, Rodrigo S. Corrêa, Victor M. Deflon, Marcia R. Cominetti, Alzir A. Batista, Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell

growth by apoptosis, Journal of Inorganic Biochemistry, Volume 176, 2017, Pages 66-76, ISSN 0162-0134 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.019>.

2. Úloha extracelulárnej DNA a neutrofilových extracelulárnych pascí v animálnom modeli alkoholového poškodenia pečene

Anna Farkašová

(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Školitelia: doc. RNDr. MUDr. Roman Gardlík, PhD., Mgr. Paulína Belvončíková

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

Úvod

Alkoholová choroba pečene (ALD) je spektrum ochorení spôsobených nadmernou konzumáciou alkoholu. Postihnutie pečene varíruje od steatózy (stukovatenie) cez hepatitídu (zápal) až po cirhózu a hepatocelulárny karcinóm (rakovina pečene). Mnohé štúdie preukázali zvýšený počet neutrofilov u pacientov s ALD, avšak ich úloha v patogenéze (vzniku a vývoji) ochorenia nie je úplne objasnená (1). Neutrofily sú typom bielych krviniek, ktoré pôsobia ako prvá línia obrany proti patogénom. Eliminujú ich pomocou reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS), fagocytózy a tvorby extracelulárnych pascí (NETy). NETy sú siete pozostávajúce z extracelulárnej DNA (ecDNA), histónov a granulárnych proteínov, ktoré zachytávajú, imobilizujú a/alebo eliminujú patogény. Naproti tomu nekontrolovaná tvorba NETov môže viesť k rozvoju a udržiavaniu zápalu. Deoxyribonukleázy (DNázy) sú enzýmy schopné rozštiepiť hlavnú zložku NETov – ecDNA. NETy predstavujú aj molekulárne vzorce spojené s poškodením (damage-associated molecular patterns - DAMPs), ktoré aktivujú imunitný systém a stimulujú produkciu prozápalových cytokínov. Chronický zápal následne prispieva k progresii ALD a k rozvoju fibrózy, cirhózy a hepatocelulárneho karcinómu (2). Cieľom tejto práce je nadviazať na doterajšie zistenia opisom úlohy a subcelulárneho pôvodu plazmatickej ecDNA a NETov na animálnom modeli alkoholom indukovaného poškodenia pečene.

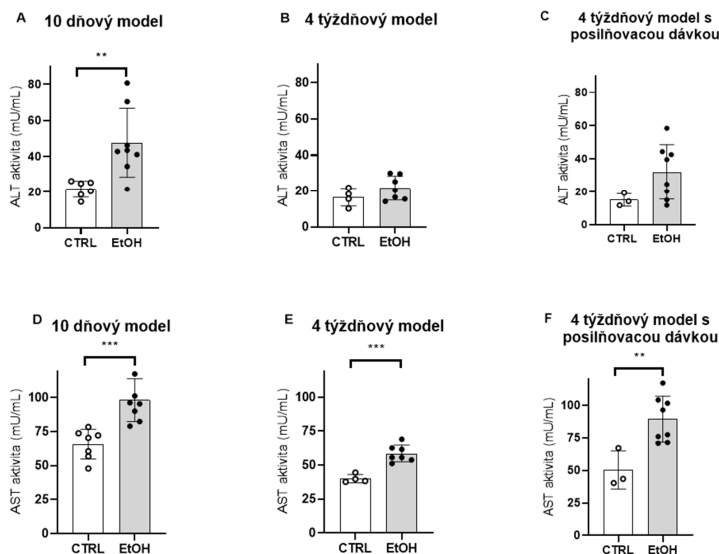
Materiál a metódy

Alkoholové poškodenie pečene bolo navodené podaním komerčne dostupnej Lieber-DeCarli diéty, pozostávajúcej z tekutej stravy s obsahom 31,5% etanolu (Laboratory of Liver Diseases, USA) štyridsiatim piatim samicám kmeňa C57BL/6J (3). Zvieratá boli rozdelené do dvoch experimentov. V prvom experimente bola samicám podávaná strava po dobu 10 dní s posilňovacou dávkou alkoholu formou orálnej gaváže 31,5% etanolu v objeme 300µl na konci experimentu, kontrolnej skupine bol podávaný fyziologický roztok v rovnakom objeme (CTRL n = 5, EtOH n = 10). Druhý experiment trval štyri týždne a mal dve podskupiny: etanolová podskupina bez posilňovacej dávky (CTRL n = 5, EtOH n = 10) a podskupina s posilňovacou dávkou etanolu orálnou gavážou posledné dva týždne experimentu každý druhý deň (CTRL n = 5, EtOH + Binge n = 10). Na konci experimentu bola myšiam z retroorbitálneho venózneho sínusu pomocou kapilárnej trubice odobratá krv do EDTA skúmaviek.

Z EDTA krvi bol pomocou plnoautomatického hematologického analyzátora (Abacus Vet 5, Eurolab lambda a.s., Nemecko) vyhotovený krvný obraz. Ďalej bola krv použitá na prietokovú cytometriu s protilátkami proti neutrofilom (Ly6G; Biolegend, USA), DNA (Cytos; ThermoFischer, USA), citrulinovanému histónu H3 (Abcam, UK) so sekundárnymi zajačmi Brilliant Violet 510 (ThermoFischer, USA) protilátkami. EcDNA bola izolovaná pomocou QIAamp DNA Mini Kitu (Qiagen, Nemecko). Aktivita alanínaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST) bola detegovaná kolorimetricky (Sigma-Aldrich, USA). Koncentrácia celkovej ecDNA bola stanovená pomocou fluorometra (Qubit 3.0, Thermo Fisher Scientific, USA). Pôvod ecDNA (nukleárny vs. mitochondriálny) bol určený metódou real-time PCR (ncDNA s použitím primerov na gén kódujúci β -globín, mtDNA s použitím primerov na gén kódujúci cytochróm b). Dáta boli interpretované graficky s využitím one-way ANOVA, Studentovho t-testu, a Mixed Effects Modelu v softvéri GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software, Inc., USA).

Výsledky

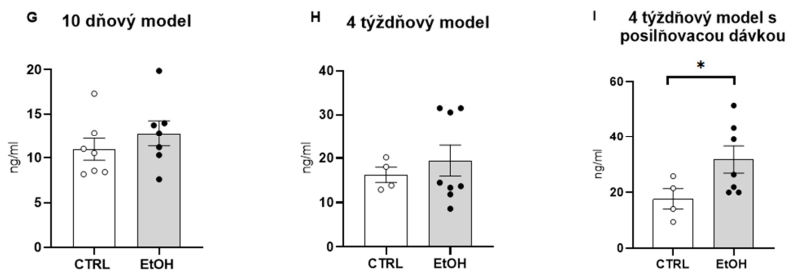
Aktivita ALT ($p < 0,01$) a AST ($p < 0,001$) bola vyššia v skupine s 10-dňovou konzumáciou alkoholu oproti kontrolnej skupine. Vo 4-dňovom modeli bez a s posilňovacou alkoholovou dávkou bola aktivita AST vyššia ($p < 0,001$; $p < 0,01$) oproti aktivite ALT.



Obr. 1: Aktivita ALT (mU/mL) v 10-dňovom modeli (A), aktivita ALT (mU/mL) vo 4-týždňovom modeli (B), aktivita ALT (mU/mL) vo 4-týždňovom modeli s posilňujúcou dávkou alkoholu posledné dva týždne (C) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

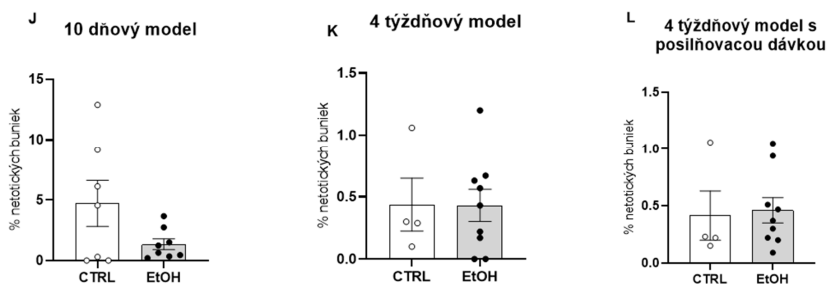
Pomer hmotnosti pečene a telesnej hmotnosti bol signifikantne vyšší v 10-dňovom modeli s posilňujúcou alkoholovou dávkou ($p < 0,01$). Pomer hmotnosti sleziny a telesnej hmotnosti bol signifikantne nižší pri 4 týždňovom alkoholovom modeli ($p < 0,05$) a v 4 týždňovom modeli s posilňujúcou dávkou alkoholu ($p < 0,01$).

Cirkulujúca ecDNA bola zvýšená pri 4 týždňovom modeli s posilňujúcou dávkou alkoholu ($p < 0,05$). V ostatných skupinách bolo mierne zvýšenie pri alkoholových skupinách oproti kontrolám. Rozdiely v koncentrácii ncDNA a mtDNA medzi jednotlivými skupinami neboli významné ($p > 0,05$).



Obr. 2: Koncentrácia ecDNA (ng/ml) v 10-dňovom modeli (G), Koncentrácia ecDNA (ng/ml) vo 4-týždňovom modeli (H), Koncentrácia ecDNA (ng/ml) vo 4-týždňovom modeli s posilňujúcou dávkou alkoholu posledné dva týždne (I) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$.**

Percento buniek podliehajúcich NETóze v periférnej krvi u kontrolných a všetkých troch alkoholových skupinách nebolo zvýšené. S tým koreluje aj absolútny počet neutrofilov v periférnej krvi.



Obr. 3: Percento netotických buniek v 10-dňovom modeli (J), percento netotických buniek vo 4-týždňovom modeli (K), percento netotických buniek vo 4-týždňovom modeli s posilňujúcou dávkou alkoholu posledné dva týždne (L).

Diskusia

Na základe zvýšených aktivít pečenejých enzýmov ALT a AST predpokladáme, že sa nám úspešne podarilo indukovať modely alkoholového poškodenia pečene. Ďalej sme sledovali koncentráciu ecDNA a percento netotických buniek v periférnej krvi, ktorá preukázala len miernu alebo žiadnu štatistickú významnosť. Ani rozdiely v koncentrácii ncDNA a mtDNA medzi kontrolami a alkoholovými skupinami neboli významné. Táto skutočnosť by mohla posilniť teóriu, že neutrofilové tvoriace NETy sa pri ALD nachádzajú v tkanive pečene a nie v periférnej krvi. Aktivita AST v štvortýždňových experimentoch bola významne vyššia ako aktivita ALT, čo sa zhoduje so súčasnou literatúrou podľa ktorej AST sa zvyšuje významnejšie ako ALT pri alkoholickom poškodení pečene (4). Počítali sme AST/ALT pomer, ktorý značí cirhózu ak AST je viac ako dvojnásobok ALT. V našich experimentoch neboli výrazne rozdiely medzi kontrolnými a alkoholovými skupinami, čo sa dalo predpokladať, keďže sme za taký krátky čas nedokázali indukovať cirhózu, ale pravdepodobne len steatózu.

Všetky experimentálne myši konzumujúce tekutú alkoholovú stravu významne schudli oproti kontrolám konzumujúcim tekutú kontrolnú stravu. Potvrďuje to aj nižší príjem stravy najmä pri skupine s posilňujúcou alkoholovou dávkou. Významné chudnutie a dosiahnutie tzv. humane endpoints v skupine myší s posilňujúcou alkoholovou dávkou nás viedli k predčasnému ukončeniu experimentu. Ku chudnutiu mohlo dôjsť v dôsledku poškodenia pečene a tým pádom bol sťažený metabolizmus alkoholu ku koncu 4-týždňového experimentu.

Hmotnosť sleziny bola znížená po 4-týždňovej konzumácii alkoholu. Hyper- ale aj hyposplenizmus bol pozorovaný už vo viacerých štúdiách o chronickom požívaní alkoholu. Tieto zmeny môžu naznačovať ovplyvnenie jej biologickej funkcie zmenou počtu imunitných buniek a červených krviniek (5).

Výsledky z experimentu sa naďalej vyhodnocujú, ako napríklad aktivita DNázy a mikroskopické vyšetrenie vzoriek pečene na prítomnosť steatózy. Zároveň bude opakovaný 4-týždňový model s cieľom získania väčšieho počtu údajov. V budúcnosti sa bude pokračovať v skúmaní patogenézy ALD aj z iného hľadiska, napríklad skúmaním extracelulárnych vezikúl sekretovaných hepatocyty, ktoré predstavujú podľa nových štúdií potenciálny spúšťač mechanizmu NETózy (6).

Podporené čiastočne grantom Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR VEGA 1/0649/21 a grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-21-0370.

Zoznam použitej literatúry

1. Cho Y, Bukong TN, Tornai D, Babuta M, Vlachos IS, Kanata E, Catalano D, Szabo G. Neutrophil extracellular traps contribute to liver damage and increase defective low-density neutrophils in alcohol-associated hepatitis. *J Hepatol.* 2023 Jan;78(1):28-44. doi: 10.1016/j.jhep.2022.08.029. Epub 2022 Sep 5. PMID: 36063965.
2. Waterman CM et al: Cellular Mechanisms of NETosis, *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2020 Oct 6;36:191-218.

3. Guo F, Zheng K, Benedé-Ubieto R, Cubero FJ, Nevzorova YA. The Lieber-DeCarli Diet-A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018 Oct;42(10):1828-1840. doi: 10.1111/acer.13840. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30025151.
4. Tamber SS, Bansal P, Sharma S, Singh RB, Sharma R. Biomarkers of liver diseases. *Mol Biol Rep*. 2023 Sep;50(9):7815-7823. doi: 10.1007/s11033-023-08666-0. Epub 2023 Jul 24. PMID: 37482588.
5. Chadha KC, Stadler I, Albini B, Nakeeb SM, Thacore HR. Effect of alcohol on spleen cells and their functions in C57BL/6 mice. *Alcohol*. 1991 Nov-Dec;8(6):481-5. doi: 10.1016/s0741-8329(91)90187-2. PMID: 1723602.
6. Singal AK, Louvet A, Shah VH, Kamath PS. Grand Rounds: Alcoholic Hepatitis. *J Hepatol*. 2018 Aug;69(2):534-543. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.001. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29753761; PMCID: PMC6258018.

3. Detection of neutrophil extracellular traps-bound bacteria using immunofluorescent methods

Tetiana Pidlypska

(molecular biology, 1st year of Master's, FNS CU)

Supervisor: assoc. professor Michal Pastorek, MSc. PhD.

Institute of Molecular Biomedicine, FM CU, Bratislava

Introduction

Neutrophils are the most prevalent cells in human blood, acting as effector cells of the innate immune system. When a pathogen is detected, they immediately act to trap and eliminate the invasive microorganisms. Neutrophils are known to have three principal antimicrobial processes: phagocytosis, degranulation, and formation of neutrophil extracellular traps (NETs) (1). NETosis is a specific cell death which neutrophils undergo as a response to a whole bacterium, PAMPs, certain cytokines and DAMPs. The main feature of NETosis is chromatin decondensation as well as breakdown of nuclear and granular membranes followed by the release of NETs. NETs are extracellular DNA strands decorated with citrullinated histones and different potent antimicrobial proteins, such as myeloperoxidase and neutrophil elastase (2). These elements are efficient in bacterial degradation; however, they are not pathogen specific, therefore may promote inflammation and damage host tissue, generating more DAMPs. NETs formation is helpful in the early stages to clear the pathogen, but as the infection gets under control, NETs become increasingly more dangerous. Vast NETs generation creates a never-ending cycle of promoting even more inflammation and then inducing even more NETs (3).

Sepsis is a life-threatening condition with a high lethality rate and one of the leading causes of death among critically ill patients worldwide. It is a systemic inflammatory response caused by dysregulated host response to an infection, which may lead to multiple organ dysfunction in a span of a few hours (4). Treatment usually involves administering wide-spectrum antibiotics within the first 3 hours. However, the success of this approach highly depends on the antibiotic selection and does not account that organ failure is caused not directly by the pathogen, but rather by a response of an overwhelmed immune system (5).

A handful of studies showcase that neutrophils and NETs may take part in immune system failure and organ damage in severe sepsis cases. As mentioned earlier, excessive NETs and their components can damage the tissue; for example, endothelium, epithelium, even lung and liver (6). Endothelial dysfunction leads to impaired microcirculation, which in sepsis, is the primary reason for organ failure. This can cause tissue edema, disruption of homeostasis and vasomotor, ultimately resulting in death (6). In addition, it has been shown that NETs are able to activate platelets and induce microvascular coagulation (7).

Methods

Blood collection and neutrophil isolation

Fresh venous blood was obtained from healthy donors under the approval given by the Ethics Committee of the University Hospital Bratislava in EDTA tubes (BD Vacutainer K2 EDTA) and neutrophils were isolated with Polymorphprep cell gradient (AN221725, Accurate Chemical & Scientific Corp, USA). Neutrophils were diluted in RPMI medium (11835030, UK) with 10% FBS (PAN Biotech, Germany) for future use and counted with the LUNA-II Automated Cell Counter (Logos Biosystems, France).

Bacteria cultivation

Escherichia coli CFT073 (ATCC 700928) and *Staphylococcus aureus* subspecies *aureus* Rosenbach (NCTC 8530) were inoculated from frozen stocks into LB Broth (L3022, Sigma, USA) and incubated overnight in aerobic conditions at 37°C. Bacteria were quantified by optical density at 600 nm with spectrophotometer (Eppendorf, Germany); then centrifuged at 5000g for 5 minutes and resuspended in sterile PBS (BR0095, Canvax Reagents SL, Spain).

Fluorescence microscopy

Glass coverslips were covered with poly-L-lysine (R&D systems, USA) for cell adhesion and placed in cell culture plates. Neutrophils were seeded into the plates, 1×10^6 cells per plate. NETs were induced with 400 nM chemical inductor PMA (positive control), Gram-negative *E. coli* (MOI = 100; 10; 1), Gram-positive *S. aureus* (MOI = 100; 10; 1). NETs were induced in RPMI medium with 10% FBS in 2 ml volume for each sample; 37°C, 5% CO₂, in the dark, 3 hours incubation. After the induction samples were fixed with 2% formaldehyde for 10 min at RT; followed by overnight incubation in blocking solution (1% FBS in PBS).

The next day, samples were treated with Human TruStain FcX™ Fc blocker (1:20 dilution per 1×10^6 cells; Biolegend, USA); then *E. coli* samples were stained with primary anti-lipid A antibody (1:200, Invitrogen, USA), followed by secondary anti-goat (1:200, Invitrogen, USA). *S. aureus* samples were stained with primary anti-peptidoglycan antibody (1:200, Merck Millipore, USA), followed by secondary anti-mouse antibody (1:500, Biolegend, USA). Incubations were one hour per antibody, in the dark, RT; each followed with PBS washings. DNA was stained with 200 nM SYTOX Orange (Thermo Fisher, USA) for 30 minutes, RT, in the dark. Stained samples were placed on microscope glass slides adding mounting medium. Samples were visualised at Biotek Cytation 7 Imaging Reader (Thermo Fisher, USA); images were analysed in software ImageJ.

Flow cytometry

NETs formation was induced in 100 µl of whole blood with 1 µl of bacterial culture (approximately MOI = 20); 37°C, 5% CO₂, in the dark, 3 hours incubation. Erythrocytes were lysed using cold ammonium chloride buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA), and then the samples were centrifuged at 400g for 10 minutes at 4°C; pellet was resuspended in FACS buffer (PBS with 1% of FBS) at 1:4 dilution. Bacteria samples were treated with Human TruStain FcX™ Fc blocker (1:20 per 1×10^6 cells). All samples were stained with primary rabbit monoclonal anti-Histone H3 (1:1000, Abcam, UK) antibody, secondary anti-rabbit IgG (1:500, KO525-A, Biolegend, USA); then by anti-CD66b antibody (1:200, PE, eBioscience™, USA) and DNA stain TO-PRO-3 (1:1000, APC, Thermo Fisher, USA). Bacteria were stained live before

added to blood during sample preparation with 1 μ M BacLight Green (Thermo Fisher, USA) or with antibodies after the incubation. *E. coli* samples were stained with primary anti-lipid A antibody (1:200, Invitrogen, USA), followed by secondary anti-goat (1:200, FITC, Invitrogen, USA). *S. aureus* samples were stained with primary anti-peptidoglycan antibody (1:200, Merck Millipore, USA), followed by secondary anti-mouse antibody (1:500, FITC Biolegend, USA). Samples were incubated for 15 minutes in the dark, RT.

Results

Visualisation of bacteria with NETs with fluorescence microscopy

Control samples demonstrate a variety of alive cells, while samples where chemical inductor was used shows a lot of NETs; with both samples having minimal signal in the green channel, therefore creating minimal background for the analysis of bacterial samples. *E. coli* samples demonstrated robust NETs formation, with successful bacteria detection at all MOI. In MOI 10 there is a clear view of bacteria cluster inside dense NETs formation. In *S. aureus* samples we were able to detect bacteria at all MOI, even though at lower MOI there is a minimal NETs formation with much less visible *S. aureus*.

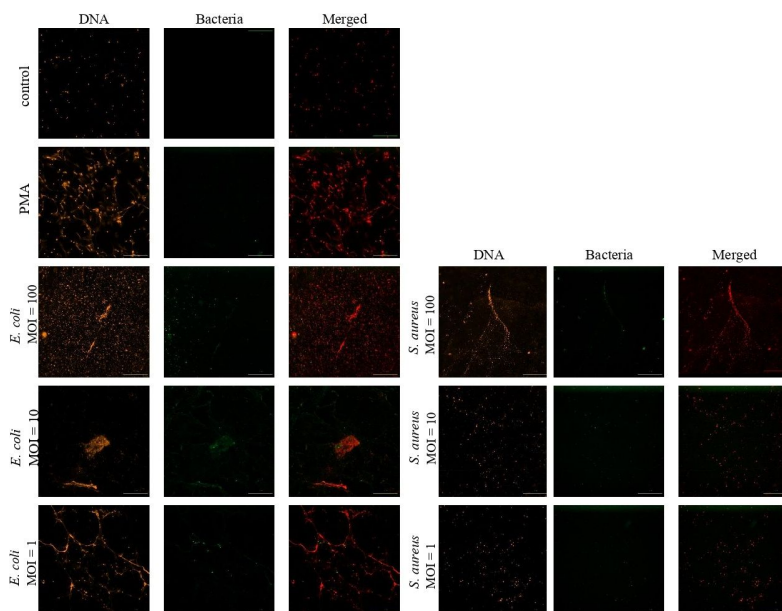


Fig. 1. Images from fluorescent microscopy of NETs induced with chemical inductor PMA, *E. coli* (MOI = 1, 10, 100) and *S. aureus* (MOI = 1, 10, 100).

Detection of bacteria with flow cytometry

In flow cytometry samples there are quite a few challenges in detecting bacteria with NETs. While in microscopy, our strategy of battling with non-specific signal was fruitful, in cytometry this is not easy. At the start, we compared the samples stained with anti-bacteria antibodies, with the ones pre-treated with Fc receptor blocking solution and the ones with live pre-stained bacteria. The first plots demonstrate overall higher positivity at the FITC axis, as if the whole population emits the signal. Using the Fc blocker allows much more clear resolution and definition of bacteria-positive events.

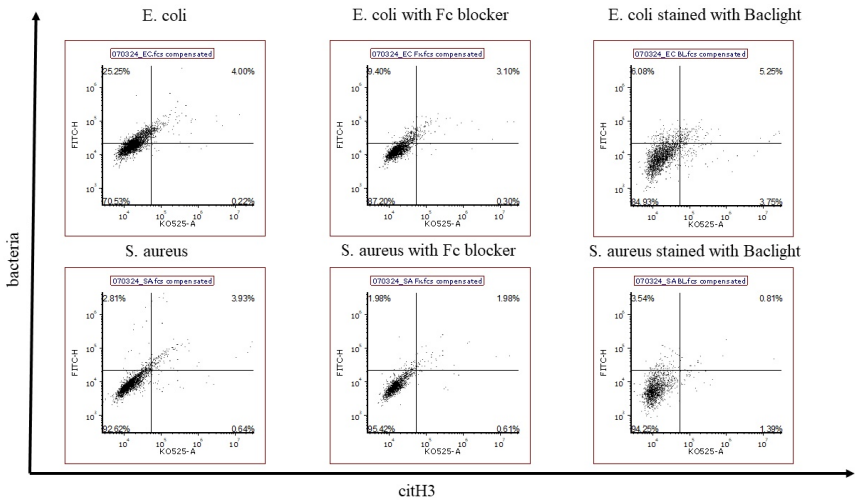


Fig. 2. NETs induced with regular bacteria and the ones that were pre-stained live with BacLight Green before added to blood. BacLight Green stained bacteria are used as a threshold to define the falsely positive population.

Control samples that were stained with both primary and secondary bacterial antibodies do not exhibit extreme levels of positivity; while samples where only secondary antibody was used, demonstrate extreme levels of false positivity on the FITC channel, with anti-goat antibody having much higher affinity, than anti-mouse. Such a pattern repeats with chemically induced samples, the false positive is even higher, suggesting that either antibodies bind to something on the NETs or NETs themselves have a signal.

In bacterial sample, usage of Fc blocker with the mix of primary and secondary antibodies lowers the positivity, getting the numbers closer to reality. However, combining Fc blocker with only secondary antibody, again raises the percentage of presumably falsely positive particles. Staining of bacteria-induced NETs with only secondary antibodies, the same affinity is observed. This goes on in both bacterial samples, again with anti-goat antibody being much less specific.

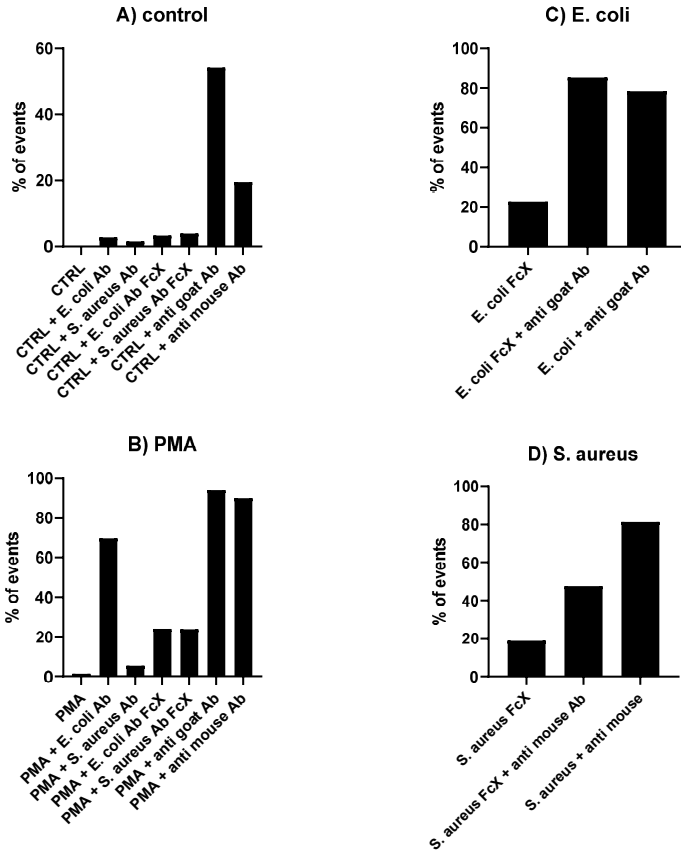


Fig. 3. Graph depicting positivity in different samples at FITC signal. A) control sample stained with anti-E. coli antibodies (with Fc blocker); anti-S. aureus antibodies (with Fc blocker); secondary antibodies; B) PMA sample stained with anti-E. coli antibodies (with Fc blocker); anti-S. aureus antibodies (with Fc blocker); secondary antibodies; C) E. coli sample stained with anti-E. coli antibodies (with Fc blocker); secondary antibodies (with Fc blocker); D) S. aureus sample stained with anti-S. aureus antibodies (with Fc blocker); secondary antibodies (with Fc blocker). Samples were stained with mix of standard primary and secondary antibody and secondary antibody only to verify the non-specific affinity of secondary antibodies to the cells and NETs.

Discussion

For the detection of bacteria inside the NETs, fluorescence microscopy was chosen as a qualitative method, providing visual confirmation of a staining. In the beginning, we faced some non-specific affinity in this method, but using Fc blocking solution to block Fc receptors of the cells, seemed to significantly lower the false signal, creating less noise at the background. We successfully detected *E. coli* at different MOI, freely in the sample and inside the NETs. In *S. aureus* sample, there was a success at MOI = 100 in detecting NETs-bound bacteria, but in lower concentrations it has proven to be complicated.

In this project, *E. coli* had been a much more reliable and stable NETs inductor than *S. aureus*, rarely inducing NETs formation. One of the reasons behind this might be various escaping mechanisms in possession of *S. aureus*. One of the most potent is the release of extracellular adherence protein and nucleases, which bind and cleave the chromatin, destroying the NETs (8-10), which complicates visualisation.

Flow cytometry was chosen as quantitative method to detect the bacteria inside the NETs. We faced the same complications as with the fluorescence microscopy, and then we were able to confirm and quantify the extent of non-specific binding of primary and secondary antibodies to the cells and NETs. Using the Fc receptor blocking solution lowers the interactions, however, it is clear that some of the false signal stems from binding to NETs.

There are multiple factors which present optimisation of flow cytometry for this detection much more complicated than in microscopy. In this protocol we only lyse erythrocytes, therefore sample has not only neutrophils and NETs, but also cellular debris and plasma content, all of which can interfere with the antibodies; while for microscopy samples, we isolate specifically neutrophils. The advantage of microscopy is also a format of work, with sample adhered to glass coverslip, it is easier to perform washings; in suspensions for cytometry, additional washings include centrifugation leading to unnecessary cells agitation, which can promote NETs formation.

This work was supported by grant APVV-21-0378.

References

1. Parker, H. A., Forrester, L., Kaldor, C. D., Dickerhof, N., & Hampton, M. B. Antimicrobial activity of neutrophils against mycobacteria. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12, 5564.
2. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2018; 18(2), 134-147.
3. Mai, S. H., Khan, M., Dwivedi, D. J., Ross, C. A., Zhou, J., Gould, T. J., et al. Delayed but not early treatment with DNase reduces organ damage and improves outcome in a murine model of sepsis. *Shock*. 2015; 44(2), 166-172.
4. Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., & Rhodes, A. Sepsis and septic shock. *The Lancet*. 2018; 392(10141), 75-87.
5. Martínez, M. L., Plata-Menchaca, E. P., Ruiz-Rodríguez, J. C., & Ferrer, R. An approach to antibiotic treatment in patients with sepsis. *Journal of thoracic disease*. 2020; 12(3), 1007.

6. Willemsen, J. F., Wenskus, J., Lenz, M., Rhode, H., Trochimiuk, M., Appl, B., ... & Boettcher, M. DNases improve effectiveness of antibiotic treatment in murine polymicrobial sepsis. *Frontiers in Immunology*. 2024; 14, 1254838.
7. McDonald, B., Davis, R. P., Kim, S. J., Tse, M., Esmon, C. T., Kolaczowska, E., & Jenne, C. N. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2017; 129(10), 1357-1367.
8. Eisenbeis, J., Saffarzadeh, M., Peisker, H., Jung, P., Thewes, N., Preissner, K. T., ... & Bischoff, M. The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein Eap is a DNA binding protein capable of blocking neutrophil extracellular trap formation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018; 8, 235.
9. Stapels, D. A., Ramyar, K. X., Bischoff, M., von Köckritz-Blickwede, M., Milder, F. J., Ruyken, M., ... & Rooijakkers, S. H. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111(36), 13187-13192.
10. Berends, E. T., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., & von Köckritz-Blickwede, M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of innate immunity*. 2010; 2(6), 576-586.

4. Detekcia a charakteristika vlastností depozitu cerebrálneho železa po paracetamolom indukovanom intrakraniálnom krvácaní po 24 hodinách fyzikálnymi a histochemickými metódami

Matúš Pukanec

(všeobecné lekárstvo, 1.ročník)

Školiteľ: doc. RNDr. Martin Kopáni, PhD.,¹ Mgr. Jakub Szabó²

¹ Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LF UK, ² Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

Úvod

Železo predstavuje esenciálny prvok pre väčšinu živých organizmov vrátane človeka. Jeho metabolizmus je komplexný a musí byť prísne regulovaný. Patologický nadbytok spôsobuje tvorbu voľných radikálov, čo vedie k následným mutáciám a celkovým poruchám metabolizmu. Hlavnou úlohou železa je zúčastňovanie sa na transporte dýchacích plynov. Predstavuje centrálny atóm molekuly hemu, ktorý spoločne s bielkovinovými alfa a beta reťazcami vytvára hemoglobín. V bunkách ale nie je skladované vo forme hemoglobínu, ale vo forme hemosiderínu a feritínu. Pred uskladnením v bunke dochádza k oxidácii z Fe^{2+} na Fe^{3+} . Na transfere a regulácii sa podieľa feroportín, transferín, regulačný hormón hepcidín a mnohé ďalšie regulátory.

Mozgové krvácanie spôsobuje primárne škody zväčšením intrakraniálneho tlaku, ale následne dochádza aj k sekundárnemu chemickému poškodeniu vplyvom voľných radikálov. Po cerebrálnom krvácaní sa dochádza v mozgovom parenchýme k uvoľneniu červených krviniek, ktoré obsahujú hemoglobín. Súčasťou hemoglobínu vo vnútri hemoglobínu sú v molekulách hemu ukotvené atómy Fe^{2+} . Degradácia hemoglobínu a tým pádom uvoľňovanie hemového železa v mozgovom tkanive spôsobuje ukladanie hemosiderínu a feritínu vo forme Fe^{2+} aj Fe^{3+} . Nadmerné množstvo železa v bunkách a tkanivách vedie k tvorbe voľných radikálov cez Haber Weissovu a Fentonovu reakciu, a tým k následnému poškodeniu buniek a tkanív vplyvom oxidačného stresu. Na degradácii hemoglobínu a tvorbe hemosiderínu sa podieľajú fagocytujúce mikroglie. Existujú 2 hlavné procesy, ktorými dochádza k zániku erytrocytov pri intrakraniálnom krvácaní, a to je erytrolýza alebo fagocytóza prostredníctvom mikroglií (1). Kvantitatívna biochemická analýza ukázala, že hemosiderín a feritín vzniká min 24 h po krvácaní (2).

Cieľom práce je objasniť pôvod a mechanizmus depozície hemosiderínu a feritínu po intrakraniálnom krvácaní vyvolaným jednorázovým predávkovaním paracetamolom (acetaminofen, APAP).

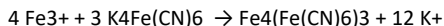
Materiál a metódy

Experimentálne zvieratá

Samce wildtype (WT; n=5) a Shank3b^{-/-} knock-out (KO; n=8) dospelé (1-ročné) myši s C57BL/6 pozadím. Zvieratá boli umiestnené v skupinách (4-6 na kletku) so svojimi mláďatami a boli držané v kontrolovanom prostredí pri 24 ± 2 stupňoch Celzia a $55 \pm 10\%$ vlhkosti, s neobmedzeným prístupom k potrave a vode pri 12-hodinovom svetlo/tma cykle.

Histochemické farbenie Perlsova metóda

Pri histochemickom dokazovaní železa v bunkách, v tkanivách a v orgánoch sa používajú histochemické metódy. Najbežnejšie používanou metódou na zistenie ukladania železa v organizme je jeho dôkaz v histologických rezoch Perlsovou reakciou. Reakcia nastáva v roztoku ferokyanidu draselného. Vzniká modrá soľ ferokyanid železitý (pruská modrá):



Hoci ide o reakciu, ktorá je špecifická pre železo, reakcia nedemonštruje všetko Fe, obzvlášť nie železo, ktoré sa nadväzuje na hemoglobín, na maláriový pigment, na apoferitín a na pigmenty, vznikajúce v kyslom formalíne (3,4).

Magnetická rezonancia

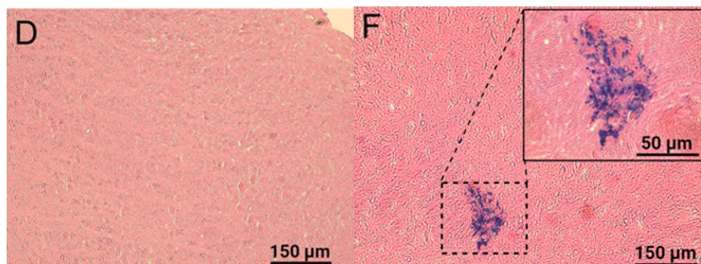
Vzhľad intrakraniálneho krvácania pri zobrazení magnetickou rezonanciou závisí primárne od veku hematómu a typu kontrastného zobrazenia (T1 alebo T2). Ako hematóm starne, hemoglobín prechádza viacerými formami (oxyhemoglobín, deoxyhemoglobín a methemoglobín), nasleduje lýza erytrocytov a Fe^{3+} železo vytvára feritín a hemosiderín. T2* sekvencie sú primárne ovplyvnené stavom hemoglobínu a tým, či došlo alebo nedošlo k lýze buniek. Aj keď je deoxyhemoglobín aj methemoglobín obsiahnutý v červených krvinkách, čo má za následok nerovnomerné rozloženie paramagnetických účinkov, to vedie k strate signálu. Akonáhle bunky lyzujú a methemoglobín je rovnomerne distribuovaný v zrazenine, v obraze pri T2 sa vytvorí kontrast. V konečnom dôsledku sú hemosiderín a feritín (obaja silne paramagnetické) pohltené monocytmi a makrofágmi a výsledkom sú opäť nerovnomerne rozložené paramagnetické účinky a strata signálu v T2. Najmä T2*-vážená MRI sa považuje za citlivú metódu na detekciu ukladania hemosiderínu. Feritín aj hemosiderín spôsobujú výrazné skrátenie T2/T2*, vďaka čomu sú oblasti, kde sa hromadia, na snímkach MR tmavé (5-8).

Ramanova spektroskopia

Na určenie štruktúrnych foriem železa bola využitá Ramanova spektroskopia s laserom s vlnovou dĺžkou 633 nm. Na spracovanie dát získaných Ramanovou spektroskopiou bol využitý softtware OriginLab. Dáta boli spracované formou čiarového grafu.

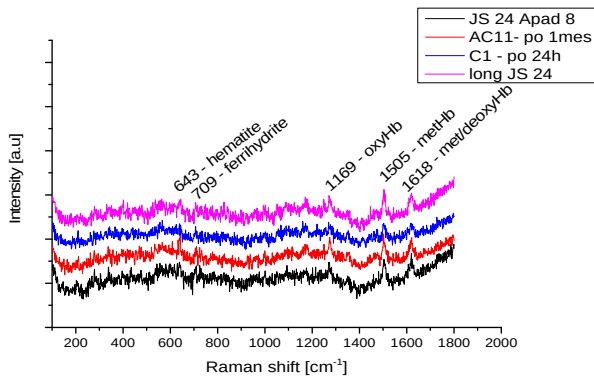
Výsledky

Po podaní paracetamolu boli myši dekapitované po 24 hodinách. Následne boli zhotovené 5 μm hrubé rezy na mikrotóme a farbené Perlsovou reakciou na prítomnosť hemosiderínu. Sfarbenie bolo pozorované u všetkých skupín, ktorým bol podaný paracetamol, u kontroly nebolo prítomné (obr. 1).



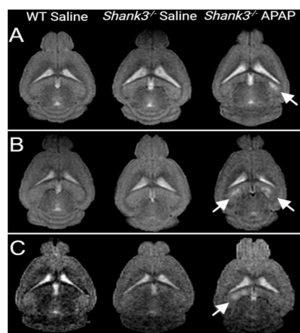
Obr.1 Perlsova reakcia, myši. Vľavo - Wild Type Saline, vpravo - Perlsova reakcia Shanks-/Paracetamol

Takto pripravené vzorky boli následne podrobené analýze Ramanovou spektroskopiou, ktorou boli dokázané rôzne formy Fe^{3+} železa (obr. 2). Využitie boli referenčné hodnoty uvedené v tabuľkách, predovšetkým hodnoty namerané u biologických foriem, keďže väčšina dostupných dát z Ramanovej spektroskopie opisuje minerály, a teda necharakterizuje molekuly v tkanivách. Zo získaných údajov je možné poukázať na prítomnosť Fe^{3+} železa vo forme hematitu (643 cm^{-1}) a ferihydrítu (709 cm^{-1}) a metHb (1505 cm^{-1}). Rovnako je detegované Fe^{2+} železo v oxyHb (1169 cm^{-1}) a deoxyHb (1618 cm^{-1}). Detekcia lepšieho signálu bola pozorovaná pri menších izolovaných kryštáloch ako pri väčších agregátoch. Šum spôsobujú organické zlúčeniny, ktoré obsahuje tkanivo po úprave histologickými technikami, napr. xylén.



Obr. 2 Grafické znázornenie Ramanovej spektroskopie

Pri zobrazovaní MRI bolo rovnako dokázané Fe3+ železo (obr. 3). Šípky ukazujú hyperintenzitu v sivej hmote mozgovej po depozícii hemosiderínu a feritínu.



Obr. 3 MRI mozgov so zameraním na lokalizáciu Fe3+ železa

Diskusia

Niekoľko hodín (24 h) po krvácaní sa oxyhemoglobín premieňa na deoxyhemoglobín. Deoxyhemoglobín, ktorý je prítomný niekoľko dní po jeho uvoľnení z červených krviniek, sa spontánne a neenzymaticky oxiduje na methemoglobín, pričom sa Fe2+ z hemoglobínu oxiduje na Fe3+ (9). Kvantitatívna biochemická analýza odstraňovania železa zo zrazeniny na potkanom modeli ICH s použitím 59Fe značeného hemoglobínu ukázala, že po 24 hodinách v podstate všetko 59Fe zostalo v hemoglobíne (1). Teda Perlsova reakcia na dôkaz Fe3+(hemosiderín) bola počas prvého dňa negatívna. Niekoľko mikroglií vykazovalo

zafarbenie železom 24 hodín po intracerebrálne krvácanie, avšak toto číslo bolo podstatne vyššie po 48 hodinách.

Naše vyšetrenia pomocou histochemického farbenia na hemosiderín, MRI a Ramanovou spektroskopiou ukázali pozitívnu reakciu na hemosiderín 24 h. po krvácaní. Kým väčšina štúdií udáva výraznejší výskyt Fe³⁺ železa po 48 hodinách, u nás bolo detegované už po 24 hodinách.

Ponúkajú sa 2 hypotézy, a to urýchlená fagocytóza alebo narušenie hematoencefalickej bariéry. Hematoencefalická bariéra (HB) vytvára prechod medzi tkanivom mozgu a krvnými kapilárami. Predstavuje najväčšie rozhranie medzi mozgom a krvou, predpokladaná veľkosť povrchu sa udáva u dospelého človeka na 12 – 18 m² na základe priemerného povrchu ciev 150 až 200 cm² na gram tkaniva (10). Vo všeobecnosti zohráva veľmi kľúčovú úlohu pri ochrane mozgového parenchýmu pred látkami obsiahnutými v krvi, rovnako predstavuje prekážku pre vstup liečiv a iných exogénnych látok do centrálnej nervovej sústavy. Štruktúra endotelu krvných mikrokapilár je vysoko špecifická vďaka tesným bunkovým spojením (tight junctions), vďaka čomu je zabránené neregulovanému prenosu polárnych molekúl medzi krvou a mozgom. V takomto prípade by nemohla molekula Fe₂O₃ neregulovane prechádzať cez HB, pretože rozdiel elektronegativity kyslíka a železa je približne 1,6. Ide teda o silne polárnu molekulu a za fyziologických podmienok nemôže dochádzať k jej voľnému prenosu cez HB membránu.

Pri fagocytóze erytrocytov dochádza k oxidácii železa z Fe²⁺ na Fe³⁺. Dochádza k rozkladu hemoglobínu na hem a železo, ktoré je vo forme feroportínu exportované do plazmy. Odtiaľ je prenášané transferínom do buniek, ktoré ho vyžadujú. V nich je skladované vo forme feritínu a hemosiderínu prevažne v pečeni, slezine, kostnej dreni, kostrovom svalstve. K erytrofagocytóze dochádza prevažne v pečeni (Kupfferove bunky) a slezine (makrofágoch červenej pulpy). Gliové bunky v mozgu majú taktiež schopnosť fagocytózy. Erytrofagocytózou bránia erytolýze a vylúčeniu toxického obsahu bunky do extracelulárneho prostredia. Fagocytóza predstavuje hlavný zdroj železa pre bunky.

Pri narušení hematoencefalickej bariéry by pravdepodobne dochádzalo k detekcii železa v celej vzorke a nie len lokálne ako sme pozorovali. Pri fagocytóze by sme očakávali neskoršiu tvorbu molekúl Fe³⁺.

Naším ďalším cieľom bude preskúmať pôvod železa a metabolickú dráhu vzniku agregátov. Tkanivo bude skúmané elektrónovou mikroskopiou za účelom zistenia veľkosti častíc obsahujúcich železo, keďže agregáty feritínu majú odlišnú veľkosť v pečeni a v mozgu. Taktiež bude vhodné pokus zopakovať a overiť či opätovne dôjde k rýchlemu depozitu Fe³⁺ železa do tkaniva, keďže takáto rýchla tvorba agregátov nebola pri iných štúdiách pozorovaná. Rovnako by bolo vhodné pri opakovaní experimentu zmerať hladinu hepcidínu, ktorý sa významne podieľa na regulácii metabolizmu železa (11).

Zoznam použitej literatúry

1. Atlas, S. W., & Thulborn, K. R. (1998). MR detection of hyperacute parenchymal hemorrhage of the brain. *American journal of neuroradiology*, 19(8), 1471-1477.
2. Xia, F., Keep, R. F., Ye, F., Holste, K. G., Wan, S., Xi, G., & Hua, Y. (2022). The fate of erythrocytes after cerebral hemorrhage. *Translational stroke research*, 13(5), 655-664.

3. Perl, D. P., & Good, P. F. (1992). Comparative techniques for determining cellular iron distribution in brain tissues. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 32(1), 76-81.
4. Gōmōri, G. (1936). Microtechnical demonstration of iron: a criticism of its methods. *The American journal of pathology*, 12(5), 655.
5. Gomori, J. M., Grossman, R. I., Hackney, D. B., Goldberg, H. I., Zimmerman, R. A., & Bilaniuk, L. T. (1987). Variable appearances of subacute intracranial hematomas on high-field spin-echo MR. *American journal of neuroradiology*, 8(6), 1019-1026.
6. Kinoshita, T., Okudera, T., Tamura, H., Ogawa, T., & Hatazawa, J. (2000). Assessment of lacunar hemorrhage associated with hypertensive stroke by echo-planar gradient-echo T2*-weighted MRI. *Stroke*, 31(7), 1646-1650.
7. Kwa, V. I., Franke, C. L., Verbeeten Jr, B., Stam, J., & Amsterdam Vascular Medicine Group. (1998). Silent intracerebral microhemorrhages in patients with ischemic stroke. *Annals of neurology*, 44(3), 372-377.
8. Wardlaw, J. M., & Statham, P. F. X. (2000). How often is hemosiderin not visible on routine MRI following traumatic intracerebral haemorrhage? *Neuroradiology*, 42, 81-84.
9. Bradley Jr, W. G. (1993). MR appearance of hemorrhage in the brain. *Radiology*, 189(1), 15-26.
10. Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17, 1-24.
11. Nemeth, E., & Ganz, T. (2023). Heparin and iron in health and disease. *Annual review of medicine*, 74, 261-277.

5. Oxytocín a vazopresín ako hormóny lásky (Spokojnosť v partnerskom vzťahu nie je spojená s variabilitou AVPR1A génu, ale s prítomnosťou dieťaťa vo vzťahu)

Dorota Bartková

(všeobecné lekárstvo, 6.ročník)

Školiteľ: RNDr. Jaroslava Babková, PhD.

Fyziologický ústav LF UK v Bratislave

Úvod

Systém arginin-vasopresinu (AVP) je známy svojím spojením so sociálnym správaním, najmä v kontexte párovej väzby, dôvery a emocionálnej regulácie lásky (Carter 2017; Heinrichs, von Dawans, a Domes 2009). Účinok AVP (arginín vazopresín) je sprostredkovaný cez receptor kódovaný génom AVPR1A. Úroveň expsie AVPR1A v rôznych oblastiach mozgu zvierat sa ukázala byť spojená s rôznymi aspektmi sociálneho správania (Hammock et al. 2005). Zatiaľ čo regulácia expsie AVPR1A je komplexná, polymorfizmus v promotore tohto génu môže byť jedným z faktorov zapojených do jeho regulácie (Hammock a Young 2005). Ľudia majú v tejto oblasti tri opakujúce sa sekvencie, ktoré sú polymorfné: opakovanie dinukleotidu (GT)²⁵, komplexné opakovanie (CT)4-TT-(CT)8-(GT)²⁴ (RS3) a tetranukleotidové opakovanie (GATA)¹⁴ (RS1) (Thibonnier et al. 2000). Predchádzajúce štúdie naznačili prepojenie medzi týmito genetickými variantami v géne AVPR1A a rôznym vzťahovým správaním u ľudí. Štúdia zameraná na 7400 dvojčat a ich súrodencov, ktorí boli vo vzťahu minimálne rok, zistila významné prepojenie medzi variantmi génu AVPR1A a neverou u žien (Zietsch et al. 2015). U mužov existuje spojenie medzi jedným z polymorfizmov opakovania ľudského AVPR1A (RS3) a vlastnosťami odrážajúcimi správanie vo vzťahu, vrátane väzby na partnera, vnímaných manželských problémov a manželského stavu, a preukazuje sa, že genotyp RS3 u mužov tiež ovplyvňuje kvalitu manželstva, ako ju uviedli ich partnerky (Walum et al. 2008a). Okrem genetických faktorov sú rôzne socio-demografické faktory významne spojené s manželskou spokojnosťou (Kowal et al. 2021). Zaujímavo, medzinárodná štúdia ukázala, že vyšší počet detí bol spojený so zníženou manželskou spokojnosťou iba v populácii žien, rodičov s vyšším vzdelaním a nižšími úrovňami náboženskosti (Kowal et al. 2021). Naopak, tá istá štúdia tiež zistila, že v niektorých krajinách bol vyšší počet detí spojený s vyššou manželskou spokojnosťou, ale iba u mužov.

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať, či variabilita v RS3 nachádzajúca sa pred kódovacou sekvenciou génu AVPR1A je spojená so spokojnosťou párov bez ohľadu na rodinný stav. Komplexné správanie vrátane interakcie partnerov je ovplyvnené rôznymi faktormi, vrátane genetiky, sociálneho prostredia a psychológie. Preto sa skúmalo aj ovplyvnenie vzťahovej spokojnosti prítomnosťou detí.

Materiál a metódy

Účastníci

Celkovo sa na tejto štúdii zúčastnilo 53 zdravých dobrovoľníkov, 32 žien a 21 mužov. Priemerný vek bol 28,7 rokov (SD = 8,7, min.-max. 19-50). Účastníci boli väčšinou strednej triedy, všetci boli belosi. Všetci účastníci museli mať vzťah s partnerom trvajúci minimálne jeden rok, bez ohľadu na rodinný status. Priemerná dĺžka vzťahu bola 6,7 rokov (SD = 5,2, min.-max. 1-21). Účastníci boli hodnotení ako jednotlivci, nie ako páry. Odpovedali na otázky ohľadom prítomnosti detí. Štyridsať jeden účastníkov nemalo dieťa, desať účastníkov malo 2 deti a dvaja účastníci mali 4 deti.

Index spokojnosti páru

Na meranie spokojnosti účastníkov v ich vzťahu bola použitá škála spokojnosti páru (CSI) (Funk & Rogge, 2007) v slovenskom jazyku (Šlosáriková 2021). Obsahuje 32 položiek pozostávajúcich z 6-bodovej škály Likert (0-5), s výnimkou jednej položky s 7 bodmi (0-6). Hrubé skóre pre spokojnosť partnerov je vypočítané súčtom všetkých položiek, pričom vyššie skóre naznačuje vyššiu spokojnosť. Maximálny počet bodov je 161. Hodnota 104,5 je cut-off pre určenie spokojnosti partnerov. Dotazník bol vyplnený online formou.

Izolácia DNA

Približne 2 ml slín bolo zozbieraných spontánnym slinením do zberného pohára. Po centrifugácii pri 6797 g po dobu 3 minút sa peliet resuspendoval v 200 µl PBS a DNA bola izolovaná pomocou QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko).

Genotypizácia

Genotypizovaný bol mikrosatelit v promotorovej oblasti AVPR1A (RS3, komplexné opakovanie (CT)4-TT-(CT)8-(GT)24). Mikrosatelit RS3 bol amplifikovaný pomocou primerov 5'-TCCTGTAGAGATGTAAGTGC-3' (forward) a 5'-GTTTCTTTCTGGAAGAGACTTAGATGG-3' (reverse) (Wassink et al. 2004). Tiež sme genotypovali polymorfizmus RS1, ale výsledky sa nedali vyhodnotiť, preto sme ho vynechali z analýzy. Fluorescenčne označené DNA fragmenty boli analyzované podľa veľkosti pomocou kapilárnej elektroforézy pomocou ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Úspešné genotypovanie oboch alel bolo dosiahnuté u 42 jedincov.

Štatistické analýzy

Normálna distribúcia bola testovaná pomocou Shapiro-Wilkovho testu. Rozdiely medzi jednotlivcami s rôznymi alelami génu AVPR1A boli posúdené prostredníctvom Kruskal-Wallisovho testu. Rozdiely vo vzťahovej spokojnosti medzi účastníkmi s a bez detí boli skúmané pomocou t-testu nezávislých vzoriek. Cohenov d bol použitý na určenie veľkosti efektu.

Výsledky

Medián hodnoty dĺžky PCR produktu bola 335 bp (rozsah: 318-346 bp). Na základe dĺžok RS3 boli alely klasifikované ako krátke (S) alebo dlhé (L), čo viedlo k zadefinovaniu troch

genotypových skupín: SS ($n = 6$), LL ($n = 18$) a SL ($n = 18$). Nebol zistený signifikantne významný rozdiel v partnerskej spokojnosti medzi týmito tromi genotypovými skupinami ($p = 0,114$).

Pri testovaní vplyvu prítomnosti dieťaťa na hodnotenie spokojnosti sa preukázalo, že účastníci s deťmi (priemer = 120,2, SD = 20,6, min-max 75-161) uviedli významne nižšie úrovne partnerskej spokojnosti v porovnaní s účastníkmi bez detí (priemer = 136,2, SD = 22,9, min-max 91-150) ($p = 0,032$, Cohenov $d = 0,735$, $t = 2,304$). Prah pre partnerskú spokojnosť podľa CSI (104,5) nebol dosiahnutý u 25 % účastníkov s deťmi a 12 % účastníkov bez detí.

Diskusia

Sociálne správanie, vrátane spokojnosti v partnerských vzťahoch, je komplexný fenomén určený vzájomným pôsobením mnohých genetických a socio-demografických faktorov. Cieľom tejto štúdie bolo skúmať, či je spokojnosť partnera spojená buď s polymorfizmom génu AVPR1A alebo s prítomnosťou detí v partnerskom vzťahu. V našej štúdii sme nepotvrdili vplyv genetickej variability v géne AVPR1 na vzťahovú spokojnosť. Avšak výsledky ukazujú, že účastníci s deťmi dosahujú nižšiu úroveň vzťahovej spokojnosti v partnerskom vzťahu v porovnaní s účastníkmi bez detí.

Systém AVP zohráva významnú úlohu v rôznych sociálnych procesoch, ale jeho vzťah so spokojnosťou partnera ostáva nejasný. AVPR1A sa vyznačuje variabilitou expresie za fyziologických podmienok, ktorá je ovplyvnená, mimo iného, aj polymorfizmami v promotore génu (Hammock et al. 2005; Hammock a Young 2005). Experimentálne zníženie expresie AVPR1A vo ventrálnom pallide monogamného druhu hraboša prispelo k významnému zhoršeniu vykazovania preferencie párovanej samičky jej samcom (Barrett et al. 2013). U ľudí bola jedna z najbežnejších alel pre RS3, alela 334, spojená so signifikantne nižším skóre párovej väzby v porovnaní s nositeľmi iných alel s relatívne malým efektom (Walum et al. 2008b). Ďalšie štúdie skúmali premenné súvisiace so spokojnosťou partnera, ako je sexuálna spokojnosť a schopnosti sociálnej interakcie (napríklad empatie) (Uzefovsky et al. 2015). Tieto štúdie ukázali, že variabilita v géne AVPR1A je spojená s empatiou a inými vlastnosťami, ktoré sú dôležité pre zdravý a pokojný vzťah. Naša štúdia sa teda zdá byť v rozpore s výsledkami uvedených štúdií. Pravdepodobným vysvetlením je, že gén prispieva len malým efektom k spokojnosti partnera a je potrebná väčšia vzorka účastníkov na preukázanie tohto efektu.

Vzťahová spokojnosť v partnerskom vzťahu je komplexný konštrukt ovplyvnený množstvom psychologických a sociodemografických faktorov. Naše zistenia sú v súlade s predchádzajúcimi výskumami, ktoré demonštrovali významný vzťah medzi spokojnosťou partnera a prítomnosťou detí (Kowal et al. 2021; Twenge et al. 2003). Tento vzťah však nemusí byť univerzálne platný a môže vykazovať kultúrne rozdiely. Napríklad štúdia medzi etnickou skupinou Igbo v Nigérii odhalila pozitívny vzťah medzi vyšším počtom detí a zvýšenou manželskou spokojnosťou (Onyishi et al. 2012). Okrem kultúrnych faktorov aj religiozita a úroveň vzdelania ovplyvňujú tento vzťah (Kowal et al. 2021). Existuje mnoho možných vysvetlení pre spojenie medzi spokojnosťou partnera a prítomnosťou detí. Starostlivosť o deti, najmä v ranom detstve, často súvisí s narušením kvality spánku. Nedostatok spánku zasa vedie k zvýšenej únave, podráždenosti a citeľnému poklesu kvality vzťahu (Audigier et al. 2023). Výchova detí vyžaduje významné množstvo rodičovskej pozornosti, čo môže znížiť čas venovaný partnerovi, pričom spoločne trávený čas predstavuje kľúčový faktor pre kultiváciu

spokojného vzťahu (Hogan et al. 2021). Manželská spokojnosť je tiež spojená s finančnou spokojnosťou (Archuleta et al. 2011). Prítomnosť detí kladie dodatočné nároky na finančné prostriedky, čo sa môže kryť s nárastom pracovnej záťaže, stresu a ďalším znížením času venovaného partnerovi.

Táto štúdia, realizovaná na obmedzenom vzorku účastníkov, nepreukázala úlohu genetiky pri vysvetľovaní rozmanitosti vo vzťahovej spokojnosti. Naše zistenia však naznačujú, že prítomnosť dieťaťa ovplyvňuje kvalitu partnerského vzťahu a vzťahovú väzbu. Toto pozorovanie môže slúžiť nielen k behaviorálnemu výskumu, ale aj k osvetovým programom vzdelávania a podpory pre rodičov. Zvýšená informovanosť o výzvach spojených s rodičovstvom vedie k lepšej dostupnosti pomoci a zdrojov, k efektívnejšej starostlivosti o vlastný blahobyt, k formovaniu lepších sociálnych politík. Otvorené diskusie o ťažkostiach rodičovstva môžu pomôcť zmierniť stigmatizáciu a podporiť hľadanie pomoci, keďže duševné zdravie a celkový blahobyt sú čoraz viac spoločnosťou považované za vysoké priority.

Podporené grantom APVV-20-0070, VEGA 1/0068/21, APVV-20-0139. Projekt bol odsúhlasený Etickou Komisiou Lekárskej Fakulty Univerzity Komenského v Bratislave (č.: 40/2022).

Zoznam použitej literatúry

1. Archuleta, Kristy L., Sonya L. Britt, Teresa J. Tonn, a John E. Grable. 2011. "Financial Satisfaction and Financial Stressors in Marital Satisfaction". *Psychological Reports* 108(2):563–76. doi: 10.2466/07.21.PR0.108.2.563-576.
2. Audigier, Alexis, Sara Glass, Erica B. Slotter, a Elizabeth Pantesco. 2023. "Tired, Angry, and Unhappy with Us: Poor Sleep Quality Predicts Increased Anger and Worsened Perceptions of Relationship Quality". *Journal of Social and Personal Relationships* 40(12):3803–31. doi: 10.1177/02654075231193449.
3. Barrett, Catherine E., Elaine C. Keebaugh, Todd H. Ahern, Caroline E. Bass, Ernest F. Terwilliger, a Larry J. Young. 2013. "Variation in Vasopressin Receptor (Avpr1a) Expression Creates Diversity in Behaviors Related to Monogamy in Prairie Voles". *Hormones and Behavior* 63(3):518–26. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.01.005.
4. Carter, C. Sue. 2017. "The Oxytocin–Vasopressin Pathway in the Context of Love and Fear". *Frontiers in Endocrinology* 8:356. doi: 10.3389/fendo.2017.00356.
5. Hammock, E. a. D., M. M. Lim, H. P. Nair, a L. J. Young. 2005. "Association of Vasopressin 1a Receptor Levels with a Regulatory Microsatellite and Behavior". *Genes, Brain and Behavior* 4(5):289–301. doi: 10.1111/j.1601-183X.2005.00119.x.
6. Hammock, Elizabeth A. D., a Larry J. Young. 2005. "Microsatellite Instability Generates Diversity in Brain and Sociobehavioral Traits". *Science* 308(5728):1630–34. doi: 10.1126/science.1111427.
7. Heinrichs, Markus, Bernadette von Dawans, a Gregor Domes. 2009. "Oxytocin, vasopressin, and human social behavior". *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(4):548–57. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.05.005.
8. Hogan, Jasara N., Alexander O. Crenshaw, Katherine J. W. Baucom, a Brian R. W. Baucom. 2021. "Time Spent Together in Intimate Relationships: Implications for

- Relationship Functioning". *Contemporary Family Therapy* 43(3):226–33. doi: 10.1007/s10591-020-09562-6.
9. Kowal, Marta, Agata Groyecka-Bernard, Marta Kochan-Wójcik, a Piotr Sorokowski. 2021. "When and how does the number of children affect marital satisfaction? An international survey". *PLoS ONE* 16(4):e0249516. doi: 10.1371/journal.pone.0249516.
 10. Onyishi, Ernest I., Piotr Sorokowski, Agnieszka Sorokowska, a R. Nathan Pipitone. 2012. "Children and marital satisfaction in a non-Western sample: having more children increases marital satisfaction among the Igbo people of Nigeria". *Evolution and Human Behavior* 33(6):771–74. doi: 10.1016/j.evolhumbehav.2012.06.005.
 11. Šlosáriková, Martina. 2021. "Vzťahová väzba v dospelosti, intimita, Závazok, vášeň v súvislosti s partnerskou Spokojnosťou. [Adult attachment, intimacy, commitment, passion in relation to satisfaction in couple relationship.]". *Československá Psychologie: Časopis Pro Psychologickou Teorii a Praxi* 65(3):300–308. doi: 10.51561/cspsych.65.3.300.
 12. Thibonnier, Marc, Mary K. Graves, Mark S. Wagner, Nathalie Chatelain, Florent Soubrier, Pierre Corvol, Huntington F. Willard, a Xavier Jeunemaitre. 2000. "Study of V1-vascular Vasopressin Receptor Gene Microsatellite Polymorphisms in Human Essential Hypertension". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32(4):557–64. doi: 10.1006/jmcc.2000.1108.
 13. Twenge, Jean M., W. Keith Campbell, a Craig A. Foster. 2003. "Parenthood and Marital Satisfaction: A Meta-Analytic Review". *Journal of Marriage and Family* 65(3):574–83. doi: 10.1111/j.1741-3737.2003.00574.x.
 14. Uzefovsky, F., I. Shalev, S. Israel, S. Edelman, Y. Raz, D. Mankuta, A. Knafo-Noam, a R. P. Ebstein. 2015. "Oxytocin Receptor and Vasopressin Receptor 1a Genes Are Respectively Associated with Emotional and Cognitive Empathy". *Hormones and Behavior* 67:60–65. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.11.007.
 15. Walum, Hasse, Lars Westberg, Susanne Henningsson, Jenae M. Neiderhiser, David Reiss, Wilmar Igl, Jody M. Ganiban, Erica L. Spotts, Nancy L. Pedersen, Elias Eriksson, a Paul Lichtenstein. 2008a. "Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(37):14153–56. doi: 10.1073/pnas.0803081105.
 16. Walum, Hasse, Lars Westberg, Susanne Henningsson, Jenae M. Neiderhiser, David Reiss, Wilmar Igl, Jody M. Ganiban, Erica L. Spotts, Nancy L. Pedersen, Elias Eriksson, a Paul Lichtenstein. 2008b. "Genetic Variation in the Vasopressin Receptor 1a Gene (AVPR1A) Associates with Pair-Bonding Behavior in Humans". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(37):14153–56. doi: 10.1073/pnas.0803081105.
 17. Wassink, T. H., J. Piven, V. J. Vieland, J. Pietila, R. J. Goedken, S. E. Folstein, a V. C. Sheffield. 2004. "Examination of AVPR1a as an Autism Susceptibility Gene". *Molecular Psychiatry* 9(10):968–968.
 18. Zietsch, Brendan P., Lars Westberg, Pekka Santtila, a Patrick Jern. 2015. "Genetic analysis of human extrapair mating: heritability, between-sex correlation, and receptor genes for vasopressin and oxytocin". *Evolution and Human Behavior* 36(2):130–36. doi: 10.1016/j.evolhumbehav.2014.10.001.

6. Skrining diabetickej retinopatie nemydriatickou funduskamerou s využitím softvéru s umelou inteligenciou

Linda Ilavská, MBA

Školiteľka: prof. MUDr. Alexandra Bražinová, PhD., MPH ¹

¹ Lekárska Fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Ústav epidemiológie, ²
Diabetologická a metabolická ambulancia, Medispektrum s.r.o., Bratislava

Úvod

Diabetická retinopatia, hlavná príčina straty zraku u diabetikov, predstavuje narastajúci problém na celom svete. Podľa aktuálnych údajov Svetovej zdravotníckej organizácie (World Health Organization, WHO) sa odhaduje, že postihuje v európskom regióne 950 tisíc ľudí (1). Všetci pacienti s diabetes mellitus (DM), nezávisle od typu DM, sú vystavení riziku vzniku a rozvoja retinopatie. Diabetická retinopatia (DR) je hlavnou príčinou poškodenia zraku a slepoty. DR je spôsobená zmenami v krvných cievach sietnice zadnej časti oka. Navyše, aj keď nie sú prítomné žiadne príznaky, ktoré by upozorňovali jednotlivca na prítomnosť DM, dlhodobé, aj nepoznané, zvýšenie hladiny glukózy v krvi nakoniec môže viesť k poškodeniu tkaniva. DR je liečiteľná komplikácia cukrovky a preto včasný záchyt je nevyhnutný aj na prevenciu rozvoja vážnejších komplikácií a slepoty u diabetikov.

DR je definovaná ako prítomnosť retinálnych mikrovaskulárnych lézií u diabetika - mikroaneuryzmy, krvácania, mäkké exsudáty, tvrdé exsudáty, intraretinálne mikrovaskulárne abnormality, venózne guličky, nové cievy a fibrózne tkanivo, ktoré predstavujú znaky DR. Žiadna individuálna lézia nie je špecifická pre diabetes, môže sa vyskytnúť pri iných chorobných procesoch. Vývoj lézií u pacienta s DM však charakterizuje vznik a progresiu DR.

U každého diabetika, ak žije dostatočne dlho, sa časom rozvinie DR. Pri dvadsiatich rokoch anamnézy DM (poznanej alebo nepoznanej diagnózy) sa odhaduje, že približne 80 % diabetickej populácie má DR a 29% má edém makuly (2, 3, 4).

V súčasnosti dostupná liečba, hlavne ak sa použije včas, je účinná pri prevencii vážnej straty zraku až v 98 % prípadov, stratený zrak však nevráti. Kľúčom k prevencii slepoty zapríčineney očnými komplikáciami DM je ich včasné rozpoznanie a vhodná liečba.

Vekom podmienená degenerácia makuly (VPDM) je vo vyspelých štátoch najčastejšie ochorenie, ktoré vedie k strate centrálného videnia a pacienti udávajú pokrivené a deformované tvary predmetov. Zvyknú pripisovať zhoršený zrak veku a problém neriešia. Pritom včasné podchytenie príznakov a následná liečba vedia zachrániť zrak.

Pri edéme sietnice dochádza k zhrubnutiu sietnice v dôsledku akumulácie exsudatívnej tekutiny z poškodenej vnútornej hematosietnicovej bariéry, čiže extracelulárny edém, alebo v dôsledku hypoxie vedúcej k hromadeniu tekutiny v jednotlivých bunkách sietnice, tzv. intracelulárny edém. Môže byť ohniskový alebo difúzny. Edém centrálnej časti sietnice, makuly, vedie k zhoršeniu videnia. Na jednotlivých snímkach sietnice je makulárny edém ťažko

detekovateľný, často sa prejavuje tvrdými exsudátmi v makule, ktoré majú tendenciu zhlukovať sa okolo mikroaneuryziem. Tvrdý exsudát často vytvára kruhový vzor obklopujúci oblasť opuchu. Makulárny edém sa môže objaviť v ktoromkoľvek štádiu diabetickej retinopatie.

Pravidelné vyšetrowanie je nevyhnutné pre včasný skríning DR a VPDM. Na Slovensku len približne 50 % diabetikov podstupuje pravidelné očné skríningové vyšetrenia. Moderné technológie - nemydriatické kamery a softvér umelej inteligencie - umožňujú rozpoznať lézie, urobiť skríningové vyšetrenie diabetickej retinopatie, znížiť diagnostickú záťaž pre očných špecialistov, časové náklady pre pacientov a zachytiť prípady s novozistenými mikrovaskulárnymi komplikáciami diabetu včas.

S dnešnými digitálnymi farebnými funduskamerami je možné získať jeden alebo viacero snímok od pacienta v priebehu niekoľkých sekúnd a zobraziť ich na obrazovke počítača. Softvérové systémy využívajúce umelú inteligenciu sú schopné obratom vyhodnotiť výsledok.

V tejto štúdii sme sledovali záchyt diabetickej retinopatie v súbore pacientov diabetologickej ambulacie pomocou funduskamery.

Metódy

V prospektívnej observačnej štúdii sme sledovali súbor pacientov s diagnózou diabetes mellitus dispenzarizovaných na Diabetologickej a metabolickej ambulancii Medispektrum v Bratislave. V rámci štúdie boli vyšetrowaní pre prítomnosť príznakov diabetickej retinopatie.

Vyšetrenia boli uskutočnené v období od 1.1.2014 do 31. 3. 2024. Vyšetrenie bolo dobrovoľné, nebolo hradené z verejného zdravotného poistenia, bolo bezplatné. Vyšetrenia boli realizované počas rutinných vyšetrení na diabetologickej ambulancii, rozšírené o vyšetrenie funduskamerou (obrázok 1). Všetci vyšetrení boli starší ako 18 rokov, pred vyšetrením podpísali informovaný súhlas.

Vyšetrujúci boli pred začatím vyšetrowaní vyškolení v metódach štúdie, konkrétne vo vyšetrení diabetickej retinopatie v ordinácii diabetológa. Zaškolenie sa uskutočnilo v garancii Českej diabetologickej spoločnosti, zahrnulo zaškolenie k používaniu prístroja a nácvik praktických zručností v spolupráci s oftalmológom.

Na vyšetrenia sme použili funduskameru s konfokálnym zobrazovacím systémom iCare DRsplus. Plne automatizovaný systém iCare DRsplus, zahŕňujúci automatické zarovnanie, zaostrenie, expozíciu a zachytenie, umožnil zobrazovanie cez zreničky už od 2,5 mm, bez potreby dilatácie a s podporou podrobných 45° snímok sietečky.

U každého vyšetreného sme získali 4 snímky: z každého oka po dve fotografické obrazové polia, jedno centrované na optickom disku a druhé na makule. Všetky fotografie boli urobené bez rozšírenia zreníc. Technológia TrueColor Confocal poskytla obrazy s vysokou ostrosťou obrazu, optickým rozlíšením a kontrastom. Filtrovanie bez červenej farby s vysokým rozlíšením zlepšilo vizualizáciu vaskulatúry sietečky, modré obrázky poskytli lepší pohľad na vrstvu nervových vlákien, červený kanál umožnil svetlu prenikať do hlbokých vrstiev sietečky. Infračervené svetlo poskytlo podrobné informácie zodpovedajúce cievočke. Možnosť

funkcie mozaiky automaticky kombinovala rôzne polia sietnice bez zásahu používateľa a vytvárala panoramatické pohľady až do 80° (5).

Všetky fotografie očného pozadia boli anonymizované a nahrané na cloudovú platformu cez zabezpečené internetové pripojenie, kde bol na obrázky aplikovaný softvér RetCAD v1.3.1 (Thirona, Holandsko). Všetkým obrázkom bolo priradené skóre kvality, skóre DR a VPDM pomocou algoritmu umelej inteligencie (arteficial intelligence, AI). RetCAD™ je softvérový produkt s certifikáciou CE 0344 triedy IIa (senzitivita vyšetrení 95-100%, špecifická 98 %) . Softvér využíva technológiu hlbokého učenia a počítačového videnia na veľkom množstve snímok sietnice, aby poskytol presné výsledky (6). Zjednodušená vizualizácia analýzy skenovania pomocou tepelných máp pomáha zlepšiť zapojenie pacienta pri interpretácii výsledkov. Doba analýzy je približne 1 minútu. Výsledky softvéru RetCAD boli odoslané späť do klientskej aplikácie.

V tomto sledovaní sme použili údaje z rutinných vyšetrení diabetikov na diabetologickej ambulancii. Všetci vyšetrení boli diabetici a s diagnózami podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH), 10. Revízie: E10.* Diabetes mellitus 1. typu (DMT1), E11.* Diabetes mellitus 2. typu (DMT2), O24.4 Gestačný diabetes mellitus vzniknutý v ťarchavosti (GDM) a E13.* a E14.* - špecifické formy DM.

Súbor sme sledovali podľa nasledujúcich charakteristík: typ diabetes mellitus (DMT1, DMT2, GDM, špecifické formy DM), pohlavie (žena/muž), vek. Ďalej sme vyhodnotili výsledky vyšetrení funduskamerou, vyhodnotenú softvérom RetCAD™ pre každé oko zvlášť (ľavé oko, OS – oculi sinistri a pravé oko, OD – oculi dextri).

Každý obrázok bol najprv ohodnotený podľa kvality obrazu a ak sa kvalita obrazu považovala za dostatočnú, obrázok bol ohodnotený skríningom prítomnosti alebo neprítomnosti DR a VPDM. DR bola klasifikovaná podľa klasifikácie ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) a VPDM podľa AREDS (Age-Related Eye Disease Studies).

Použili sme nasledovné hodnotenie DR: 0 až 5 (0 - žiadna DR, 1 - mierna DR (iba mikroaneuryzmy), 2 - stredná neproliferatívna DR (NPDR; mikroaneuryzmy, krvácanie, exsudáty, vatové škvrny), 3 - závažná NPDR (závažné krvácanie zo sietnice, vatové škvrny, žilové guľôčky), 4 - veľmi závažná NPDR (závažné retinálne krvácanie vo všetkých 4 kvadrantoch alebo významné žilové guľôčky aspoň v 2 kvadrantoch alebo stredne závažné intraretinálne mikroaneuryzmy aspoň v jednom kvadrante), 5 - proliferatívna DR. 0 alebo 1 sa označuje ako nereferovateľný DR, zatiaľ čo štádiá DR 2 alebo vyššie sa označujú ako referovateľné DR.

Použili sme nasledovné hodnotenie VPDM: 0 až 3 (0 - žiadna VPDM, 1 - skorá VPDM (stredne rozšírené drúzy > 63 μm až < 125 μm), 2 - stredná VPDM (veľké drúzy > 125 μm), 3 - pokročilá VPDM (neovaskulárna VPDM a /alebo geografická atrofia). Štádium VPDM 0 alebo 1 sa označuje ako nereferovateľná VPDM, zatiaľ čo štádium VPDM 2 alebo 3 sa označuje ako referovateľná VPDM (obrázok 2).

Získané údaje z vyšetrení sme vložili do databázy vytvorenej v programe Excel. Hodnotili sme celkové počty vyšetrených v jednotlivých skupinách, percentuálne zastúpenia, mediány a priemery jednotlivých premenných.

Fotografie, ktoré nespĺňali parametre kvality podľa hodnotenia samotného softvéru neboli vyhodnocované. Všetci pacienti s pozitívnym nálezom boli odoslaní na oftalmologické vyšetrenie. Diabetičkám a diabetikom bez zistenej DR a/alebo VPDM bolo vyšetrenie u oftalmológa odporúčené a boli upozornení, že vyšetrenie funduskamerou nenahrádza kompletne očné vyšetrenie.

Výsledky

Spolu bolo vyšetrených 403 dospelých diabetikov, z nich bolo 183 žien (45,4%) a 220 mužov (54,6%). Medián veku bol 54,9 rokov, vekový priemer 52,8 rokov, vekový rozsah 25 – 85 rokov. Charakteristiku súboru uvádzame v tabuľke 1.

Z vyšetrených bolo diabetičiek a diabetikov 1. typu 19 (4,7%), diabetičiek a diabetikov 2. typu 370 (91,8%), tehotných žien s gestačným diabetom zisteným v ťarchavosti bolo 13 (3,2%), 1 diabetik mal špecifickú formu DM (0,3%) .

V skupine DM1T bolo 7 žien (36,8%) a 12 mužov (63,2%). Vekový priemer 42,4 roka, medián 41 rokov, vekové rozpätie od 30 do 61 rokov.

V skupine DM2T bolo 163 (44,1%) žien a 207 (55,9%) mužov. Vekový priemer 67,4 roka, medián 69 rokov, vekové rozpätie od 30 do 85 rokov.

V skupine GDM bolo 13 (100%) žien a 0 (0%) mužov. Vekový priemer 33,5 roka, medián 35 rokov, vekové rozpätie od 25 do 44 rokov.

V skupine diabetikov so špecifickými formami DM bol 1 muž (100%), vek 68 rokov.

Zistený výskyt očných komplikácií:

V skupine DM1T bez známk DR bolo zistených 8 (42,1%) diabetičiek a diabetikov, miernu DR mali 4 (21,1%) diabetičky a diabetici, stredne závažnú 3 (15,8%), závažnú 3 (15,8%), proliferatívna sa vyšetrením nezaznamenala.

V skupine DM2T bez známk DR bolo zistených 229 (69,1%) diabetičiek a diabetikov, miernu DR malo 69 (18,6%) diabetikov a diabetičiek, stredne závažnú 30 (8,1%), závažnú 9 (2,4%), proliferatívna sa nezaznamenala vyšetrením.

V skupinách s GDM a špecifickými formami DM nebola zistená DR a ani VPDM.

V skupine DM1T vyšetrenie nezistilo DR ani na jednom oku u 42,1% diabetičiek a diabetikov. U 57,9% DM1T bola zachytená minimálne mierna DR minimálne na 1 oku. Mierna DR, označovaná za reverzibilný stav, bola zistená u 21,1% diabetičiek a diabetikov 1. typu. Stredne závažná a závažná DR minimálne na jednom oku sa vyskytla spolu u 31,6%.

V skupine DM2T vyšetrenie nezistilo DR ani na jednom oku u 42,1% V skupine DM1T vyšetrenie nezistilo DR ani na jednom oku u 61,9% diabetičiek a diabetikov. U 38,1% DM2T bola zachytená minimálne mierna DR minimálne na 1 oku. Mierna DR bola zistená u 18,6% diabetičiek a diabetikov 2. typu. Stredne závažná a závažná DR minimálne na jednom oku sa vyskytla spolu u 10,3% diabetičiek a diabetikov.

Tabuľka 1: Charakteristika súboru

Typ DM	Vek	Počet vyšetrených n (%)	Pohlavie	
			Ženy (%)	Muži n (%)
DM 1. typu	41	19 (4,7)	7 (36,8)	12 (63,2)
DM 2. typu	69	370 (91,8)	163 (44,1)	207 (55,9)
Gestačný diabetes mellitus	35	13 (3,2)	13 (100)	0 (0)
Špecifické formy DM	68	1 (0,03)	0 (0)	1 (100)
Spolu	54,5	403 (100)	183 (45,4)	220 (54,6)

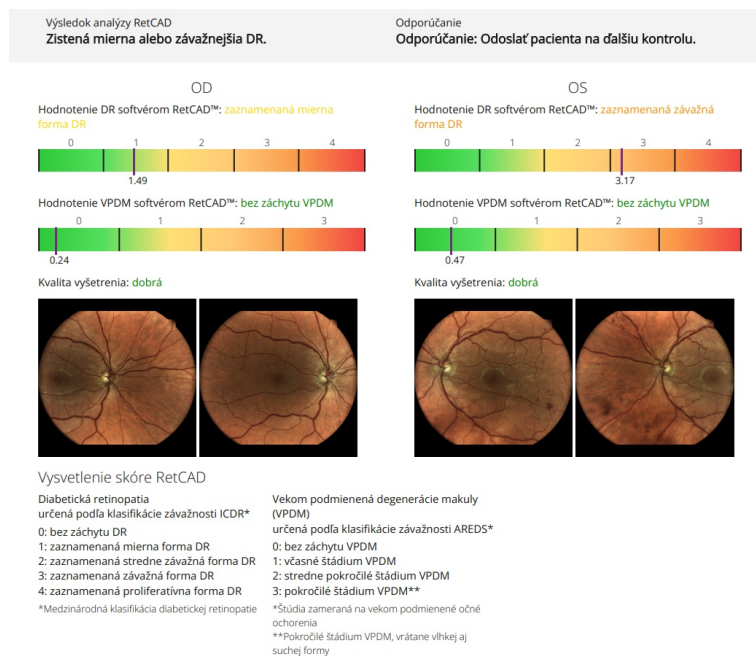
Tabuľka 2: Výsledky skríningového vyšetrenia očných komplikácií DM funduskamerou so seftvérom s využitím umelej inteligencie (AI) – DR a VPDM

Typ DM		DM1T	DM2T	GDM	Špecifické formy DM
Počet vyšetrených podľa typu DM n (%)		19 (100)	370 (100)	13 (100)	1 (100)
DR OS	bez DR	8 (42,1)	229 (61,9)	13 (100)	1 (100)
	mierna DR	4 (21,1)	69 (18,6)	0 (0)	0 (0)
	stredne závažná	3 (15,8)	30 (8,1)	0 (0)	0 (0)
	závažná	3 (15,8)	8 (2,2)	0 (0)	0 (0)
	proliferatívna	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
DR OD	bez DR	10 (52,6)	235 (63,5)	13 (100)	1 (100)
	mierna DR	4 (21,1)	64 (17,3)	0 (0)	0 (0)
	stredne závažná	2 (10,5)	28 (7,6)	0 (0)	0 (0)
	závažná	2 (10,5)	9 (2,4)	0 (0)	0 (0)
	proliferatívna	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VPDM OS	bez VPDM	18 (94,7)	283 (76,5)	13 (100)	1 (100)
	včasné štádium	0 (0)	36 (9,7)	0 (0)	0 (0)
	stredne pokročilé štádium	0 (0)	11 (3,0)	0 (0)	0 (0)
	pokročilé štádium	0 (0)	6 (1,6)	0 (0)	0 (0)
VPDM OD	bez VPDM	18 (94,7)	295 (79,7)	13 (100)	1 (100)
	včasné štádium	0 (0)	25 (6,8)	0 (0)	0 (0)
	stredne pokročilé štádium	0 (0)	12 (3,2)	0 (0)	0 (0)
	pokročilé štádium	0 (0)	4 (1,1)	0 (0)	0 (0)

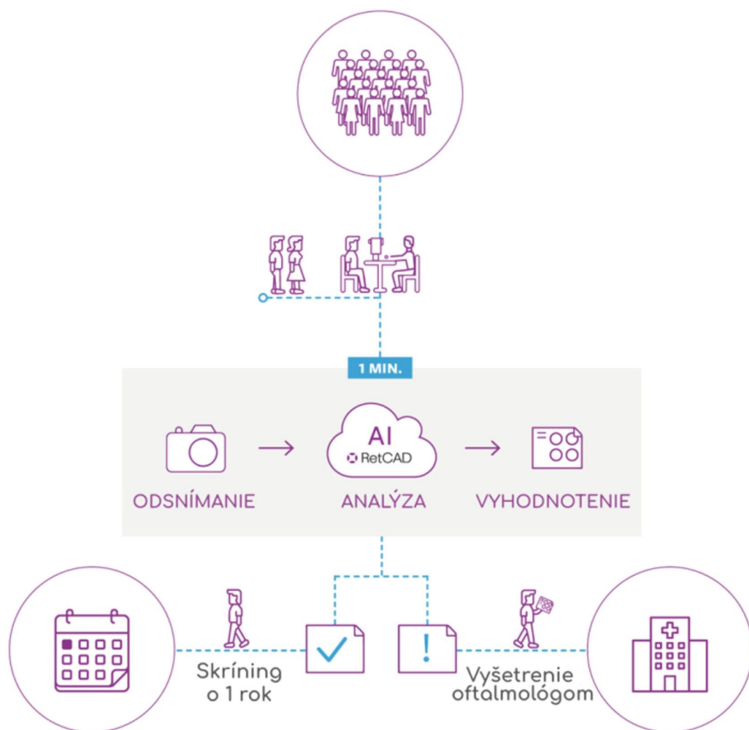
Legenda: DM – diabetes mellitus, DM1T – diabetes mellitus 1.typu, DM2T – diabetes mellitus 2.typu, GDM – gestačný diabetes mellitus, DR – diabetická retinopatia, VPDM – vekom podmienená degenerácia makuly, OS – oculi sinistri, ľavé oko, OD – oculi dextri, pravé oko, AI – artificial intelligence, umelá inteligencia



Obrázok 1: Vyšetrenie funduskamerou



Obrázok 2: Vyhodnotenie DR a VPDM, zachytenie závažnej DR u 41 ročného diabetika 2. typu



Obrázok 3: Program skríningového vyšetrenia diabetickej retinopatie s využitím umelej inteligencie (AI) (6)

V skupine GDM a diabetikov so špecifickými formami DM sa žiadna komplikácia DM - DR ani VPDM - nezistila. Je to dôkazom, že komplikácie DM závisia od metabolickej kompenzácie a od dĺžky trvania DM.

Výsledky vyšetrení sú uvedené v tabuľke 2.

Diskusia

V našom súbore sme uskutočnili skríningové vyšetrenie DR a VPDM u pacientov s DM (tabuľka 1) počas pravidelného vyšetrenia na diabetologickej ambulancii.

Naše zistenia o výskyte DR a VPDM, zachytené v tabuľke 2, sú vyššie, ako je bežný záchyt týchto komplikácií u diabetikov podľa údajov Národného centra zdravotníckych informácií (NCZI). Počet diabetikov s očnými komplikáciami je na Slovensku okolo 70 tisíc za rok 2022, čo

predstavuje prevalenciu 19,55%, z toho výskyt slepoty je 2,2 na 1000 diabetikov. Každoročne je u nás u približne 5 tisíc diabetikov novozistená DR a novozistená slepota je u 70 -140 diabetikov ročne (7).

Naše výsledky svedčia pre vysokú mieru prevalencie komplikácií v sledovanom súbore – vyššiu ako je prevalencia bežne zachytávaná bez vyšetrenia funduskamerou v očnej ambulancii. Tento fakt vysvetľujú údaje zdravotných poisťovní - pravidelné očné skrínigové vyšetrenia podstupuje len približne 50% diabetikov, čo je príčinou poddiagnostikovania DR. Situáciu ovplyvňuje dostupnosť zdravotnej starostlivosti, ochota diabetikov podstupovať ďalšie vyšetrenia z rôznych dôvodov, hlavne pracovných, sociálnych, ekonomických a iných aspektov zo strany pacientov, doba trvania vyšetrenia a následné ovplyvnenie hlavne v prípade mydriázy zrenice oka.

Pravidelné očné vyšetrenie a liečba môžu účinne zabrániť väčšine prípadov slepoty v dôsledku DM. DR nemusí spôsobovať žiadne ťažkosti, kým nie je celkom pokročilá a neovplyvňuje zrak človeka. Niektoré krajiny, už zaviedli skrínigové programy pre populácie so zvýšeným rizikom DR za využitia prístrojového vybavenia s vyhodnotením pomocou AI (obrázok 3). nášmu zdravotnému systému so zavedeným programom skrínigu na diabetologických ambulanciách je najviac podobná Česká republika.

Skrínigové vyšetrenie diabetikov na základe farebnej fotografie fundu nenahrádza kompletne očné vyšetrenie, ale program skrínigu má obrovskú hodnotu pri identifikácii diabetickej retinopatie a včasné odoslanie k oftalmológovi, v závažnejších štádiách k retinálnemu špecialistovi. Nové poznatky a technológie, ako sú digitálne nemydriatické kamery a umelá inteligencia, ponúkajú dôležitú podporu pri skrínigu diabetickej retinopatie. Zvýšenie dostupnosti skrínigu DR a VPMD a efektívne využitie AI v prospech účinnej a včasnej diagnostiky sa stáva realitou, čo potvrdzujú aj naše skúsenosti.

Podakovanie:

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Grantového projektu Zdravotnej poisťovne Dôvera a.s.

Zoznam použitej literatúry:

1. Promoting diabetic retinopathy screening [online]. WHO 2024. [cit. 2.4.2024]. Dostupné na internete: <https://www.who.int/europe/activities/promoting-diabetic-retinopathy-screening>
2. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XXII the twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. Ophthalmology. 2008 Nov;115(11):1859-68. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.08.023. PMID: 19068374; PMCID: PMC2761813.
3. Štefaničková, J.: Diabetická retinopatia [online]. Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava. Publikované: 2.4.2020. [cit. 2.4.2024]. Dostupné na internete: <https://portal.fmed.uniba.sk/clanky.php?aid=417>

4. Diabetic retinopathy grading [online]. The University of Melbourne 2023. [cit. 2.4.2024]. Dostupné na internete: <https://drgrading.iehu.unimelb.edu.au/cera/index.asp>
5. iCare DRSplus TrueColor confocal fundus imaging system [online]. Icare Finland Oy . [cit. 2.4.2024]. Dostupné na internete: <https://www.icare-world.com/product/icare-drsplus/>
6. Fast and reliable screening of big populations for eye disease symptoms [online]. Thirona Retina. [cit. 2.4.2024]. Dostupné na internete: <https://retcad.eu/large-scale-screening-programs-use-case/>
7. Činnosť diabetologických ambulancií v Slovenskej republike 2022 [online]. NCZI 2023 . [cit. 5.4.2024]. Dostupné na internete: https://www.nczisk.sk/Statisticke_vystupy/Tematicke_statisticke_vystupy/Diabetologia/Pages/default.aspx

7. Kolonizácia nosovej sliznice študentov medicíny kmeňmi *Staphylococcus aureus* rezistentnými voči antibiotikám

Sylvia Kasanická, Sebastián Kern

(všeobecné lekárstvo, 4.ročník; všeobecné lekárstvo, 4.ročník)

Spoluautori: RNDr. Lucia Jánošíková¹, MUDr. Iryna Voronkina, PhD.¹, Prof. MUDr. Martin Wawruch, PhD.²

Školiteľ: RNDr. Martina Dubinová, PhD.¹, Mgr. Marek Straka, PhD.¹

¹Mikrobiologický ústav LF UK a UN Bratislava, ²Ústav farmakológie a klinickej farmakológie LF UK

Úvod

S. aureus je ubikvitárna baktéria, ktorá patrí medzi oportúnne patogény. Prirodzene sa vyskytuje ako kolonizátor na koži a slizniciach človeka [1]. Nosičstvo je významný rizikový faktor z hľadiska rozvoja infekcie, predovšetkým u pacientov podstupujúcich chirurgický výkon alebo u pacientov so získanými alebo vrozenými imunodeficitmi. Najvýznamnejším rezervoárom zlatého stafylokoku je nosová sliznica [2]. Schopnosť kolonizácie kože a slizníc mu umožňujú rôzne faktory virulencie. Najdôležitejšia je jeho schopnosť adherovať k povrchom, ktorú zabezpečuje polysacharid A a proteínové adhezíny bunkovej steny. Tieto proteíny interferujú s biomolekulami hostiteľa a umožňujú pretrvávanie adhézie a tým kolonizáciu [3].

Patrí medzi najčastejšie mikroorganizmy podieľajúce sa na svetovej mortalite spôsobenej infekčnými ochoreniami. Je častým pôvodcom kožných infekcií ako furunkul alebo absces, ktoré však nepatria medzi život ohrozujúce ochorenia [4]. Okrem toho spôsobuje kardiovaskulárne infekcie a je významným pôvodcom nozokomialnej pneumónie [2].

V súčasnosti je mu venovaná veľká pozornosť predovšetkým kvôli rozvíjajúcej sa rezistencii na antimikrobiálne látky. *S. aureus* je prirodzene citlivý na beta-laktámové antibiotiká, ale stále viac sa rozširuje rezistencia voči meticilínu, respektíve oxacilínu [4]. MRSA (metícilín rezistentný *S. aureus*) kmene predstavujú riziko rozvoja ťažko liečiteľných infekcií [5].

Cieľom tejto práce bolo zistiť prevalenciu nosičstva *S. aureus* na nosovej sliznici u študentov Lekárskej fakulty a súvislosť nosičstva s vybranými rizikovými faktormi.

Materiál a metódy

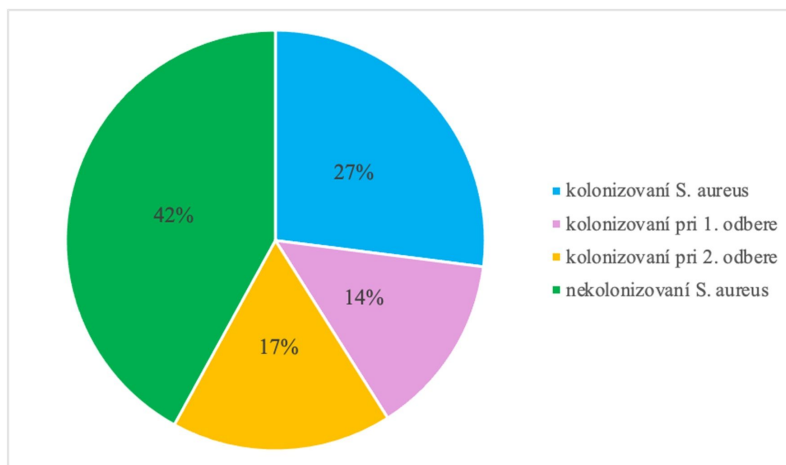
Nosičstvo kmeňov *S. aureus* bolo vyšetrované u študentov medicíny Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Analýza bola vykonávaná počas dvoch odberov, prvý odber bol realizovaný u študentov druhého ročníka a druhý odber po ôsmich mesiacoch. Spolu sme vyšetrili 303 študentov pri prvom odbere a 272 pri druhom, ktorý nasledoval po ôsmich mesiacoch. Študentom bol odoberaný výter z nosovej sliznice. Odobratý materiál bol naočkován na krvný agar a do živného bujónu. Kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C 18-24

h. Kmene *S. aureus* boli izolované a identifikované pomocou štandardizovaných kultivačných a identifikačných metód (rastové vlastnosti, tvorba pigmentov, typ hemolýzy, dôkaz produkcie hyaluronidázy) [6]. Izolované kmene boli otestované z hľadiska citlivosti na cefoxitín, erytromycín, klindamycín, gentamicín, tetracyklín, kotrimoxazol, ciprofloxacín a mupirocín podľa odporúčaní EUCAST-u. Študenti vyplnili dotazník s aktuálnymi údajmi ku dňu realizovaného odberu (pohlavie, fajčenie, alergie (inhalačné alebo iné), chronické alebo opakované infekcie dýchacích ciest (DC), nadmerné užívanie sprejov do nosa, sťažovanie v zdravotníckych zariadeniach, antimikrobiálna terapia tri mesiace pred odberom).

Výsledky boli spracované pomocou štatistického softvéru IBM SPSS pre Windows, verzia 28 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Všetky štatistické testy boli realizované na hladine štatistickej významnosti $\alpha = 0,05$. Distribúcia kategorických premenných medzi dvomi skupinami v 2x2 tabuľkách bola porovnávaná pomocou Pearsonovho χ^2 -testu. Na identifikáciu asociácie medzi charakteristikami študentov a nosičstvom *S. aureus* na nosovej sliznici sa použil model binárnej logistickej regresie. Pre každý faktor sa vypočítalo pomer šancí a zodpovedajúce 95 % intervaly spoľahlivosti [7].

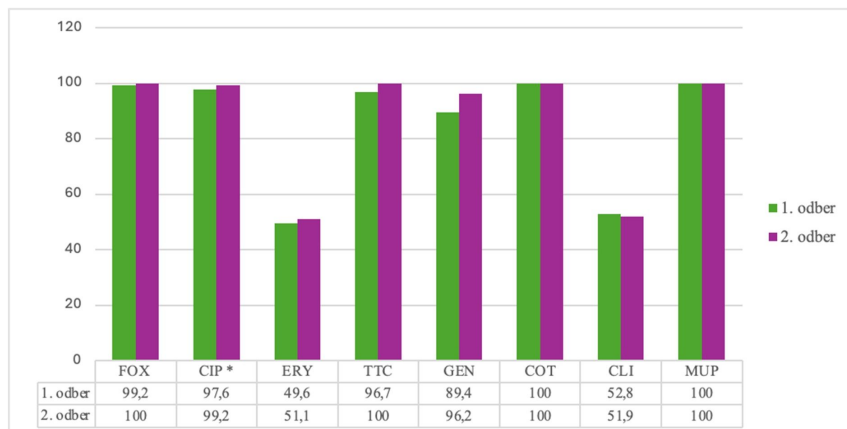
Výsledky

Celkovo bolo odobratých 303 vzoriek pri prvom a 272 vzoriek pri druhom odbere. Pri 1. odbere bolo izolovaných z nosovej sliznice študentov medicíny 123 kmeňov *S. aureus*. Pri 2. odbere bolo izolovaných 133 kmeňov *S. aureus*. U 83 nosičov (27 %) bol zistený kmeň *S. aureus* pri 1. aj 2. odbere, kolonizácia u 41 študentov (14 %) bola potvrdená len pri 1. odbere a u 51 študentov (17 %) len pri 2. odbere. Nekolonizovaných bolo 128 (42 %). Výsledky sú uvedené v grafe 1.



Graf 1 : Podiel nosičov kmeňa *Staphylococcus aureus* izolovaných z nosovej sliznice študentov medicíny.

Citlivosť izolovaných kmeňov na testované antimikrobiálne látky sa pohybovala v rozmedzí 49,6 až 100 %. Na cefoxitín bolo citlivých 99,6-100 % kmeňov. Všetky testované kmene boli citlivé na kotrimoxazol a mupirocín (100 %). Ďalej sme testovali citlivosť na ciprofloxacín (97,6-99,2 %), tetracyklín (96,7-100 %) a gentamicín (89,4-96,2 %). Najnižšiu citlivosť sme zachytili pri erytromycíne (49,6-51,1 %) a klindamycíne (51,9-52,8 %). Výsledky sú uvedené v grafe 2.



Graf 2 : Citlivosť kmeňov *S. aureus* na antimikrobiálne látky. C – citlivý; R – rezistentný; I – intermediárny; FOX-cefoxitín; CIP – ciprofloxacín; ERY – erytromycín; TTC – tetracyklín; GEN-gentamicín; COT – kotrimoxazol; CLI-klindamycín; MUP – mupirocín; *citlivý pri zvýšenom dávkovaní

Ďalej boli výsledky štatisticky spracované pomocou Pearsonovho χ^2 –testu. Počet študentov kolonizovaných kmeňom *S. aureus* pri 1. odbere bol štatisticky významne vyšší v skupine mužov v porovnaní so skupinou žien ($p < 0,001$). Podobné výsledky boli zistené v skupine študentov s alergiou v porovnaní so študentmi, ktorí alergiu nemali ($p = 0,011$). Štatisticky vyšší podiel nosičov bol zaznamenaný zvlášť v skupine študentov s inhalačnou alergiou v porovnaní so zvyškom študentov ($p = 0,001$). Štatisticky významné rozdiely neboli zistené pri porovnaní skupín fajčiarov a nefajčiarov ($p = 0,733$), študentov s chronickými infekciami dýchacích ciest a zdravých študentov ($p = 0,686$), študentov dlhodobo používajúcich spreje do nosa a ostatných študentov ($p = 0,305$), sťažujúcich v zdravotníckych zariadeniach a ostatných študentov ($p = 0,356$) a študentov ktorí užívali antimikrobiálnu terapiu a ostatných študentov ($p = 0,419$). Podobné výsledky boli detegované aj pri druhom odbere. Aj pri 2. odbere sa potvrdila štatistická významnosť mužského pohlavia z hľadiska nosičstva *S. aureus* v porovnaní so ženským ($p < 0,006$). Podobne bol zachytený vyšší počet kolonizovaných študentov, ktorí majú alergie ($p = 0,008$) a inhalačné alergie ($p = 0,019$). Štatisticky nevýznamným faktorom z hľadiska kolonizácie *S. aureus* bolo fajčenie ($p = 0,853$), chronické a opakované infekcie DC ($p = 0,829$), nadmerné používanie sprejov do nosa ($p = 0,822$) a užívanie antimikrobiálnych látok ($p = 0,878$).

Podľa výsledkov multivariačnej analýzy bolo zistené, že významným faktorom, ktorý znižuje riziko nosičstva *S. aureus* je ženské pohlavie pri 1. aj 2. odbere. Ostatné faktory sledované u študentov nemali na výskyt nosičstva *S. aureus* štatisticky významný vplyv (tabuľka 1).

Tabuľka 1: Multivariačná analýza vplyvu charakteristík študentov na pravdepodobnosť nosičstva *Staphylococcus aureus* na nosovej sliznici.

Faktor	Nosičstvo <i>Staphylococcus aureus</i>	
	1. odber	2. odber
Fajčenie	1,164 (0,567-2,355)	1,029 (0,480-2,203)
Alergia	1,260 (0,579-2,742)	1,983 (0,820-4,795)
Alergia inhalačná	2,090 (0,861-5,074)	1,075 (0,403-2,868)
Chronické a opakované infekcie DC	1,340 (0,547-3,286)	1,050 (0,415-2,658)
Nadmerné používanie nosových sprejov	0,456 (0,171-1,213)	1,022 (0,394-2,652)
Stážovanie v zdravotníckom zariadení	0,588 (0,207-1,669)	-
Užívanie antimikrobiálnych látok 3 mesiace pred odberom	-	0,814 (0,428-1,549)
Ženské pohlavie	0,421 (0,253-0,698)	0,490 (0,289-0,830)

Hodnoty predstavujú pomery pravdepodobnosti (95 % intervaly spoľahlivosti). V prípade štatistickej významnosti ($p < 0,05$) sú hodnoty vyjadrené tučným písmom. DC - dýchacie cesty

Diskusia

Táto práca sa zaoberala výskytom nosičských kmeňov *S. aureus* u študentov medicíny a faktormi, ktoré môžu kolonizáciu touto baktériou ovplyvňovať. Nosičstvo *S. aureus* u zdravotníckych pracovníkov je významným rizikovým faktorom pre vznik infekcie u imunokompromitovaných pacientov. Študenti počas stáží v zdravotníckych zariadeniach prichádzajú do kontaktu s takýmito pacientmi a v prípade kolonizácie *S. aureus* môžu byť zdrojom infekcie u týchto pacientov.

V našej práci bolo detegovaných 27 % študentov, ktorí boli testovaní dvakrát v priebehu jedného roka a boli opakovane pozitívni na kolonizáciu kmeňom *S. aureus* na ich nosovej sliznici. Je to výsledok korelujúci so zdrojmi v dostupnej literatúre. Príkladom je štúdia s podobným zameraním na kolonizáciu nosovej sliznice kmeňmi *S. aureus* v USA kde zistili kolonizáciu u 21 % testovaných [8].

31 % našich výsledkov tvorili nosiči pozitívni len pri jednom odbere. 17 % z nich tvoria nosiči, ktorí boli pozitívni v druhom kole odberov, v čase keď mali za sebou semester študentských stáží v nemocničnom prostredí. *S. aureus* je častým pôvodcom infekcií v nemocničnom prostredí. Štatisticky sme však nedokázali súvislosť medzi expozíciou nemocničnemu

prostrediu a kolonizáciou sliznice. Na druhej strane existujú dôkazy, ktoré naopak ukazujú štatisticky významné údaje potvrdzujúce tento predpoklad. V štúdiách, ktoré sa venovali rizikovým faktorom pre nosičstvo bol potvrdený pobyt v alebo kontakt s nemocničným prostredím [9, 10]. Príčinou rozdielných výsledkov môže byť zatiaľ krátky čas trávený v zdravotníckom prostredí (ich prvý semester, len raz do týždňa).

Ďalšími sledovanými rizikovými faktormi boli alergie a používanie sprejov do nosa. V našej práci sme zaznamenali štatisticky významne vyšší podiel nosičov *S. aureus* v skupine alergikov oproti skupine študentov, ktorí alergie nemali. Výsledky multivariačnej analýzy však alergiu ako rizikový faktor pre nosičstvo *S. aureus* nepotvrdili. V tureckej štúdií, ktorá sa zaoberala rizikovými faktormi súvisiacimi s nosičstvom *S. aureus* bol zistený štatisticky významný podiel nosičov *S. aureus* v skupine alergikov a navyše aj v skupine používateľov sprejov do nosa. Dôvodom pre rozdielny výsledok v otázke sprejov môže byť odlišná formulácia v dotazníku, nakoľko turecký tím sa pýtal na nedávne použitie a my sme sa pýtali na nadmerné užívanie [9].

Významným štatisticky preukázaným faktorom z našich výsledkov, ktorý zvyšuje riziko nosičstva *S. aureus* je mužské pohlavie. Tento výsledok nachádza podporu aj v iných prácach. V brazílskej práci z roku 2020 bolo zistené, že mužské pohlavie je významným predispozičným faktorom pre nosičstvo *S. aureus* na nosovej sliznici. Okrem toho v rámci svojej práce testovali vplyv veku na nosičstvo *S. aureus*, ktorý sa im však nepodaril dokázať [10].

Oblasťou s významným klinickým presahom v rámci našej práce je citlivosť izolovaných kmeňov na antimikrobiálne látky. Kmene izolované v tejto práci boli vo veľkej miere citlivé na testované antimikrobiálne liečivá. Najvyššia miera rezistencie bola identifikovaná pri erytromycíne (49,6-51,1 %) a klindamycíne (51,9-52,8 %). Pri porovnaní s prácou z Hartfordskej univerzity v USA z roku 2023 bola zistená vyššia miera citlivosti v prípade cefoxitínu (95,2 %) a tetracyklínu (96,1 %). Naopak pri gentamicíne bola v našej práci zistená vyššia miera rezistencie ako v americkej práci (100 %) [8]. V brazílskej práci z roku 2020 bola obdobne ako v našej práci zaznamenaná veľmi nízka miera citlivosti v prípade erytromycínu (27,3 %) a klindamycínu (39,6 %). Pri tetracyklíne, gentamycíne a kotrimoxazole bola taktiež detegovaná nižšia miera citlivosti testovaných kmeňov (92,8 %; 89,2 %; 88,5 %). V tejto práci bola zistená aj vyššia miera rezistencie na cefoxitín (28,8 %). Je dôležité poukázať na fakt, že kmene analyzované v tejto práci pochádzali nielen od študentov navštevujúcich nemocnicu, ale aj od samotných zamestnancov tejto nemocnice. To je najpravdepodobnejší dôvod vyššieho počtu kmeňov MRSA, v porovnaní s našou prácou a taktiež vyššej miery rezistencie kmeňov aj na ostatné liečivá [10].

Infekcie spôsobené kmeňmi *S. aureus* patria k jedným z vážnych problémov terapie infekčných ochorení [2]. Študenti medicíny sú vo významnej miere kolonizovaní kmeňmi *S. aureus*, a teda predstavujú možný zdroj nákazy pre imunokompromitovaných pacientov. Kmene izolované v našej práci boli vo vysokej miere citlivé na testované antimikrobiálne látky vrátane lokálneho antibiotika mupirocinu. Jediným nami potvrdeným faktorom znižujúcim riziko kolonizácie je ženské pohlavie.

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum a vývoj v lekárskejších vedách – cesta k personalizovanej liečbe závažných

neurologických, kardiovaskulárnych a nádorových ochorení (kód ITMS: 313011T431), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Bola podporená aj grantom KEGA002UK-4/2022.

Zoznam použitej literatúry

1. Bouiller K, Zeggay A, Gbaguidi-Haore H, Hocquet D, Chirouze C and Bertrand X: Epidemiology and risk factors of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* CC398 in two distinct cohorts in France. *Front Microbiol* 2022; 13:1068420.
2. Wolde W, Mitiku H, Sarkar R, Shume T: Nasal Carriage Rate of *Staphylococcus aureus*, Its Associated Factors, and Antimicrobial Susceptibility Pattern Among Health Care Workers in Public Hospitals, Harar, Eastern Ethiopia. *Infect Drug Resist* 2023; 2(16):3477-3486.
3. Liptáková A a spol.: *Lekárska mikrobiológia*, 2. vydanie. Bratislava, Herba. 2023. 792 s.
4. Cheung GYC, Bae JS, Otto M: Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021; 12(1):547-569.
5. Westgeest AC, Hanssen LJ, de Boer MGJ, Schippers EF, Lambregts MMC: Eradication of community-onset Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage a narrative review. *Clin Microbiol Infect*. 2024; 11:S1198-743X(24)00009-0.
6. Jorgensen and Pfaller, Carroll KC, Pfaller MA: *Manual of Clinical Microbiology*, 13. vydanie. ASM Press, 3456 p.
7. Newman SC: *Biostatistical Methods in Epidemiology*. Wiley Chichester, UK, 2001; p. 382.
8. Congdon ST, Guaglione JA, Ricketts OMA: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with a college-aged cohort: life-style factors that contribute to nasal carriage. *Front Cell Infect Microbiol* 2023;13:1195758.
9. Syafinaz AM, Nur Ain NZ, Nadzirahi SN, Fatimah JS, Shahram A, Nasir MD: *Staphylococcus aureus* Nasal Carriers Among Medical Students in A Medical School. *Med J Malaysia*. 2012; 67(6):636-8.
10. Danelli T, Duarte FC, de Oliveira TA a spol.: Nasal Carriage by *Staphylococcus aureus* among Healthcare Workers and Students Attending a University Hospital in Southern Brazil: Prevalence, Phenotypic, and Molecular Characteristics. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2020; 3;2020:3808036.

8. Stresová reakcia a emócie u dojčiat - sú prepojené?

Sebastián Stanko

(všeobecné lekárstvo, 4. ročník)

Spoluautori: MUDr. Annamária Vančová^{1,2}

Školiteľ: prof. PharmDr. Daniela Ježová, DrSc.¹

¹Ústav experimentálnej endokrinológie BMC SAV, v. v. i., ²Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Úvod

Stresory sú faktory, podmienky a udalosti, ktoré sú vnímané ako ohrozujúce, alebo priamo ohrozujú fyziologickú rovnováhu organizmu [1]. Vplyv stresorov a s nimi spojená akútna, a v niektorých prípadoch chronická aktivácia stresovej reakcie, sú v medicíne široko skúmané fenomény. Neslobodno zabudnúť na úlohu stresu pri udržiavaní homeostázy, adaptácii, vývoji a v konečnom dôsledku v prežívaní a zdravom fungovaní ľudského organizmu. Avšak v určitých situáciách, najmä pri chronickej aktivácii stresovej odpovede, môže tento proces zohrávať významnú úlohu pri vzniku alebo progresii rôznych ochorení - somatických aj duševných [2,3]. Desaťročia výskumu nám pomohli porozumieť jeho úlohe vo fyziológii ľudského tela, ale zároveň položili mnoho otázok o chronicky pôsobiacom strese ako potenciálnom faktore, facilitujúcom patologické procesy, ktorých etiológia zostáva dodnes nejasná. Stres ovplyvňuje jedincov vo všetkých vekových skupinách - od novorodencov až po seniorov - a je dôležité nezabudnúť taktiež na perinatálne obdobie. Tým, že stresové mediátory prechádzajú cez placentu, môže dochádzať, najmä pri ich dlhodobom pôsobení, ku spomaleniu vývinu mozgu plodu [4]. Aký je však vzťah medzi stresom a emóciami? Nadväzuje aktivácia neuroendokrinnéj kaskády na emočné prežívanie, alebo je to naopak? Je skoré postnatálne obdobie kľúčové pre zdravý vývin emočnej regulácie? A ako spolu súvisí regulácia emócií a stresová odpoveď? Neuroanatomickou štruktúrou, v ktorej sa nachádzajú centrá pre reguláciu autonómneho nervového systému, ale taktiež aj pre aktiváciu HPA osi, je hypotalamus. Sú to práve jadrá hypotalamu, ktoré riadia aktiváciu alebo útlm neuroendokrinnéj stresovej odpovede. Táto štruktúra je taktiež súčasťou oveľa komplexnejšej formácie, s početnými priamymi a nepriamymi neuronálnymi spojeniami, ktorú nazývame limbický systém. Limbickom systéme sa okrem hypotalamu nachádzajú štruktúry, ktoré sa vo veľkej miere podieľajú na emočnom prežívaní, emočnej rezpozivitě a regulácii. Niekedy by sa nám však mohlo zdať, že všetky štruktúry limbického systému pracujú práve preto, aby došlo alebo nedošlo k aktivácii regulačných centier v hypotalame [5].

Rozhodli sme sa zamerať náš výskum na hľadanie súvislostí medzi emóciami a neuroendokrinnými odpoveďami a vybrali si práve obdobie prvého roku života, ktoré je pre nás veľmi atraktívne nielen kvôli nesmiernemu somatickému rastu a funkčnému zdokonaľovaniu, ale hlavne preto, lebo v ňom dochádza ku dynamickej prestavbe neuronálnych spojení a dráh, neuveriteľnému tempu učenia a formovaniu prvých emočných

a socio-behaviorálnych vzorcov [6]. Veľmi zaujímavým je fakt, ktorý naznačuje určitú dominanciu emócií nad kogníciou u detí do dvoch rokov života. Približne od dvadsiateho piateho gestačného týždňa sú povrchové vlastnosti pravej hemisféry mozgu, teda jej kortex, viac vyvinuté v porovnaní s ľavou hemisférou a tento stav trvá približne do druhého roku života, kedy dochádza k intenzívnej genéze nervových spojení v ľavej hemisfére [8]. Taktiež by bolo vhodné spomenúť tieto dve skutočnosti: Prvou je, že od narodenia do piatich rokov života dochádza ku formovaniu takmer deväťdesiatich percent neuroarchitektonickej štruktúry mozgu [8]. Tou druhou je teória dynamických systémov, ktorá hovorí, že čím je systém dynamickejší a dochádza v ňom v relatívne krátkom časovom úseku ku výrazným zmenám, tým väčší dopad naň majú faktory pôsobiace z vonkajšieho prostredia [9]. Platí toto aj pre mozog dojčiat? Neurobiológia regulácie ľudských emócií je veľmi citlivá na vplyv prostredia. Nadmerný stres v ranom veku je nasledovaný zmenou neurobiológiou regulácie emócií a tým pádom môže dlhodobo vplyvať na duševné a emocionálne blaho jednotlivca. Počas raného vývinu jemná interakcia medzi neuroendokrinnými stresovými osami a limbickým systémom položí základy pre to, ako človek vníma a zvláda stres počas celého života [10]. Neadekvátny stres v ranom veku môže narušiť normálnu funkciu týchto okruhov, čo vedie k deregulácii stresovej odpovede a zmenenej emočnej reaktivity. To môže predisponovať jedinca k rozvoju úzkosti, depresie a iných duševných, ale aj somatických porúch neskôr v živote [11]. Schopnosť matky pochopiť a adekvátne reagovať na potreby svojho dieťaťa môže byť podporovať alebo brániť rozvoju určitého stupňa odolnosti u dieťaťa. Táto schopnosť sa začína rozvíjať už v skorom detstve a rodičia, najmä matky, zohrávajú významnú úlohu pri jej formovaní. V tejto štúdii sme si vybrali kohortu tridsiatich dojčiat, vo veku 7-9 mesiacov, spolu s ich matkami. Ako potenciálny psychosociálny stresor sme zvolili a použili test nehybnej tváre, ktorý bol prvýkrát zavedený do praxe v roku 1978 Edwardom Tronickom [12]. Tento test sa používa ako štandardizovaný postup na štúdium regulácie emócií a stresu. Predpokladáme, že pri pôsobení mierneho stresora, akým je v našom prípade hyporesponzivita matky voči dojčatú, môže dochádzať k aktivácii hypotalamo-pituitarno-adrenokortikálnej osi a s ňou spojenými zvýšenými hladinami kortizolu, ktoré dokážeme neinvazívne odmerať v slinách. V nasledujúcej časti sme sa venovali meraniu času. Merali sme čas, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať, koľko sekúnd plakalo a koľko sekúnd bolo v pokoji. Časy sme merali počas dvojminútovej fázy testu nehybnej tváre, v ktorej matka nereaguje na dieťa. Hľadali sme koreláciu medzi celkovým časom plaču a hodnotami kortizolu v slinách dojčiat a koreláciu medzi hodnotami kortizolu v slinách a časom, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať. Vzorky slín sme odoberali 20 minút po vykonaní testu nehybnej tváre.

Materiál a metódy

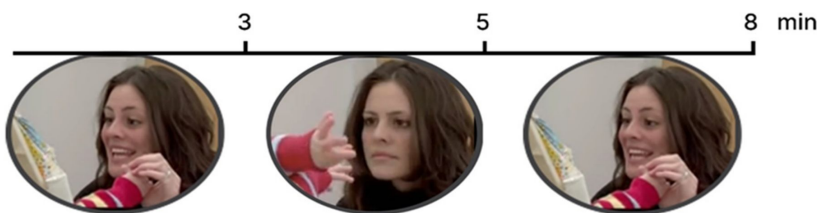
Subjekty

Štúdie sa zúčastnilo 30 matiek a ich detí vo veku 7-9 mesiacov. Kritéria pre začlenenie boli: fyziologický priebeh gravidity, termín pôrodu (37 týždňov 0 dní až 41 týždňov 6 dní gravidity), eutrofický novorodenec s dobrou adaptáciou po pôrode (Apgar skóre 7 alebo viac v prvej minúte, pH v pupočníkovej krvi nad 7,2). Kritériá pre vylúčenie zahŕňajú chronické somatické ochorenia matky pred alebo počas gravidity, psychické poruchy matky, výskyt gestózy, gestačný diabetes mellitus alebo ochorenie pečene v tehotenstve, BMI nad 30 na začiatku tehotenstva, chirurgické vedenie pôrodu (kliešte, vákuum extraktor), drogová závislosť,

asfyxia novorodenca (Apgar skóre <6 v 5. minúte a/alebo pH v pupočníkovej krvi v prvej minúte nižšie ako 7,2).

Test nehybnej tváre

Počas realizácie testu nehybnej tváre bolo dieťa nahrávané pomocou videokamery po dobu ôsmich minút. V prvých troch minútach sa matka aktívne hrá s dieťaťom. Na konci tejto časti a počas nasledujúcich dvoch minút matka prestane verbálne aj neverbálne reagovať na dieťa. Toto vedie k narušeniu emočnej väzby vytvorenej počas prvých troch minút a môže pôsobiť na dojča ako určitá forma stresora. Po skončení dvoch minút matka opäť nadviaže kontakt s dieťaťom a začne sa s ním hrať. Úsek, kedy sa matka snaží opraviť narušenú emočnú väzbu trvá ďalšie 3 minúty. V našej štúdii sme použili práve dvojminútový úsek, v ktorom sme merali čas, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať a celkový čas v sekundách, kedy dieťa plakalo a kedy bolo v pokoji.



Obr. 1. Test nehybnej tváre

Odber slín pre meranie hladín voľného kortizolu

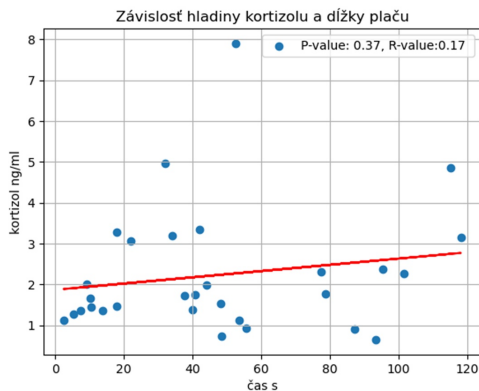
Vzorky slín boli odoberané u dojčiat 20 minút po skončení testu nehybnej tváre. Odbor vzoriek vyšetrovateľ vykonáva pomocou saliva centrifuge tubes so špeciálnymi bavlnenými prúžkami (SalivaBio Infant Swab, Salimetrics, USA). Bavlnený prúžok sa drží v ústach dojčťa 120 s. Vzorky slín sú uložené v mrazničke pri -20°C až do analýzy.

Meranie času, kedy dieťa plače a kedy je v pokoji a meranie času, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať pomocou programu H77+ [13]

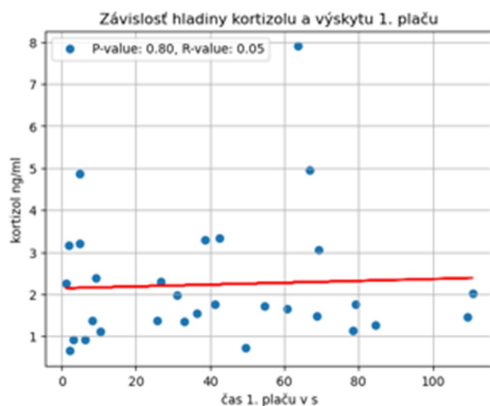
Tento program je používaný pre výskum správania zvierat, avšak v našej štúdii sme ho prednastavili a použili na meranie časových úsekov počas testu nehybnej tváre. Vystrihli sme daný 120 sekundový úsek, kedy matka nereagovala na dieťa a video sme nahrali do programu H77+. Zvolili sme si ľubovoľné klávesy a nastavili príkaz - plač a príkaz - pokoj. Podľa toho, kedy dieťa plakalo a kedy bolo v pokoji, sme stláčaním vopred nastavených kláves merali čas v sekundách. Keď dieťa plakalo, stláčali sme klávesu „P“ a keď bolo v pokoji, klávesu „K“. Program zaznamenával čas, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať a poskytol nám výstup v podobe tabuľky s časovými hodnotami, ku ktorým sme pridali namerané hladiny kortizolu v slinách a následne sme tieto údaje podrobili štatistickej analýze.

Výsledky

Zo štatistického hľadiska sa považuje za signifikantné, ak sa r-hodnoty približujú k -1 alebo 1 a p-hodnota je <0.05 . Metódou lineárnej regresie sme zistili, že hladiny kortizolu v slinách 20 minút po teste nehybnej tváre neboli vo významnej korelácii s celkovou dĺžkou plaču dieťaťa a ani s časom, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať. Štatistická analýza ukázala, že p-hodnota v prípade závislosti hladiny kortizolu od výskytu 1. plaču bola 0.80, r-hodnota 0.05 a v prípade závislosti hladiny kortizolu od celkového času plaču - p-hodnota 0.37, r-hodnota 0.17. Z toho vyplýva, že vzťahy medzi nami sledovanými parametrami neboli štatisticky významné.



Graf 1. Závislosť hladiny kortizolu v slinách od dĺžky plaču v sekundách.



Graf 2. Závislosť hladiny kortizolu od času, kedy dieťa začalo prvýkrát plakať.

Diskusia

Cieľom práce bolo overiť hypotézu, že po pôsobení miernej formy psychosociálneho stresora, v našom prípade to bol test nehybnej tváre, koncentrácie voľného kortizolu dieťaťa korelujú s jeho emočnými prejavmi. Hypotéza sa v tejto štúdii nepotvrdila. Za limitácie nášho výskumného prístupu považujeme viacero faktorov. Jednou z limitácií je, že stresový podnet, ktorý sme zvolili, nebol dostatočne intenzívny. V prostredí, kde sa vykonával test nehybnej tváre, boli prítomné rušivé prvky - tablet, ktorý zobrazoval čas, videokamera a hračky. Rušivé prvky mohli spôsobiť to, že dieťa na ne zameralo svoju pozornosť a kompenzovalo tým určitý stupeň frustrácie (napríklad manipuláciou s hračkami). Taktiež sme neskúmali možné pohlavné rozdiely a stupeň psychomotorického vývinu ako potenciálne faktory, ktoré by mohli spôsobiť rozdiely v stresových a emočných odpovediach. V podobnej štúdii vykonanej na kohorte detí narodených predčasne a v termíne, bol zistený vzťah medzi intenzitou negatívneho afektu počas testu nehybnej tváre a zvýšenou koncentráciou kortizolu v slinách u detí narodených v termíne [14]. V meta-analýze, ktorá posudzovala výsledky 10 publikácií, bolo konštatované, že dojčatá vykazujú pri pôsobení socio-emocionálneho stresu vyvolaného testom nehybnej tváre aktiváciu HPA osi, avšak v špecifických podmienkach. Konkrétne, keď bol test opakovaný 5-krát a následne odobrané sliny pre analýzu hladín kortizolu [15]. Navrhujeme preto rozvinúť metodiku a použiť získané dáta napríklad na tréning umejej inteligencie pri vyhodnocovaní emócií z výrazu tváre novorodencov a dojčiat. Komplexné pochopenie neuroendokrinné stresovej reakcie v tomto kontexte môže byť nápomocné hlavne pre vytváranie podmienok a intervencií, ktoré by podporovali zdravý vývin stresovej a emočnej regulácie od najskorších štádií života.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0644/23 a APVV-18-0283.

Zoznam použitej literatúry

1. Prokopova B, Jezova D: Stres a možnosti jeho farmakologického ovplyvnenia - vieme merať stresovú záťaž? Psychiatr. praxi. 2013;14(4):150-154.
2. Shin SH, Kim YK: Early Life Stress, Neuroinflammation, and Psychiatric Illness of Adulthood. Adv Exp Med Biol. 2023;1411:105-134.
3. O'Connor DB, Thayer JF, Vedhara K: Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. Annu Rev Psychol. 2021;72:663-688.
4. Davis EP, Sandman CA: The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. Child Dev. 2010;81(1):131-148.
5. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H: Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005;29(8):1201-1213.
6. Tierney AL, Nelson CA 3rd: Brain Development and the Role of Experience in the Early Years. Zero Three. 2009;30(2):9-13.
7. Trevarthen C: (1996). Lateral asymmetries in infancy: implications for the development of the hemispheres. Neuroscience and biobehavioral reviews, 20(4), 571–586.

8. Knudsen EI: Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *J Cogn Neurosci*. 2004;16(8):1412-1425.
9. Thelen E, Smith LB: Dynamic systems theories. In: Damon W, Lerner RM: *Handbook of Child Psychology: Theoretical Models of Human Development*. 5th ed. 1998:563-634.
10. Gunnar MR, Barr RG: Stress, early brain development, and behavior. *Infants and Young Children*. 1998;11(1):1-14.
11. Carr CP, Martins CM, Stingel AM, Lemgruber VB, Juruena MF: The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. *J Nerv Ment Dis*. 2013;201(12):1007-1020.
12. Tronick E, Als H, Adamson L, Wise S, Brazelton TB: The infant's response to entrapment between contradictory messages in face-to-face interaction. *J Am Acad Child Psychiatry*. 1978;17(1):1-13.
13. Gulyás M, Bencsik N, Pusztai S, Liliom H, Schlett K: AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program. *Neuroinformatics*. 2016;14(4):479-481.
14. Ginnell L, O'Carroll S, Ledsham V, et al.: Emotion regulation and cortisol response to the still-face procedure in preterm and full-term infants. *Psychoneuroendocrinology*. 2022;141:105760.
15. Provenzi L, Giusti L, Montirosso R: Do infants exhibit significant cortisol reactivity to the Face-to-Face Still-Face paradigm? A narrative review and meta-analysis. *Developmental Review*. 2016; 42:34-55.

9. Niektoré markery srdcového a renálneho zlyhávania u seniorov so sepsou

MUDr. David Čmejrek

(vnútorné choroby)

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Dúbrava, CSc.²

¹ Kardiocentrum SUSCH, Banská Bystrica, ² I. klinika geriatric LF UK a UN, Bratislava

Úvod

Sepsa je život ohrozujúci stav s orgánovou dysfunkciou a dysregulovanou odpoveďou organizmu na infekčné agens. Ide o frekventovanú situáciu - v Európe sa ročne objavuje približne 3,4 milióna prípadov. Zároveň je to veľmi závažný stav – mortalita pri sepe je veľmi vysoká: 30-dňová je 24,4% a 90-dňová 32,2% (1) a má dva vrcholy – u detí do 5 rokov a u seniorov (2). Sepsa nepriaznivo ovplyvňuje aj srdce a obličky, ktoré sú u seniorov v rámci ich zvyčajnej polymorbidity už predtým spravidla postihnuté rôznymi ochoreniami a sú kľúčovými orgánmi aj z hľadiska prognózy. Stav srdca a obličiek v klinickej praxi reflektujú rutinne používané laboratórne parametre: urea, kreatinín, troponín, N-terminálny prohormón mozgového nátriuretického peptidu (NTproBNP), C reaktívny proteín (CRP), prokalcitonín (3). V ostatnom čase intenzívne pribúdajú informácie o vzťahu medzi parametrami renálneho a kardiálneho poškodenia, najmä pri chronickej obličkovej chorobe (CKD a chronickom srdcovom zlyhavaní (SZ) (4). Poznatky o laboratórnom statuse u seniorov so sepsou a kardiorenálnym syndrómom sú však stále limitované. V našej štúdii sme sa snažili prispieť k poznaniu, ako je ovplyvnená kardio-renálna rovnováha aj v teréne silentného / maskovaného renálneho alebo kardiálneho ochorenia pri sepe seniora a ako sa ich vzťah odráža v laboratórnych testoch. Tie sme posudzovali nie stacionárne – prierezovo v jednom čase, ale sústredili sme sa na dynamiku laboratórnych parametrov, pretože podľa aktuálnej medicíny dôkazov je práve ona kruciálnou zložkou priebehu ochorenia – od rozvoja komplikácií (vrátane rozvoja interakcií medzi jednotlivými orgánovými systémami) až po prognózu. Najväčší význam je prikladaný prvým 72-hodinám ochorenia (5). Týmto časovým úsekom sme rámcovali aj našu štúdiu.

Pacienti a metódy

Retrospektívne sme analyzovali všetkých 65-ročných a starších pacientov, ktorí boli hospitalizovaní so sepsou a nenapĺňali exklúzne kritériá (pacienti v chronickom hemodialyzačnom [HD] programe, s chronickým SZ s ejekčnou frakciou ľavej komory [EFĽK] < 35 %, s aktívnym alebo terminálnym onkologickým ochorením, v terminálnom štádiu renálneho alebo kardiálneho ochorenia). Išlo o 32 pacientov (18 žien a 14 mužov) priemerného veku 77 rokov (od 65 do 89 rokov). Zdroje sepsy boli nasledovné: uropoetický systém (14 pacientov), pneumónia (6 pacientov), infekcie mäkkých tkanív a žilových ciest (po

traja pacienti), 6 neidentifikovaných zdrojov. Perhospitalizačne zomrelo 9 pacientov (mortalita 28,1 %).

Sledovali sme koncentrácie šiestich parametrov – kreatinínu, urey, prokalcitonínu, CRP, NTproBNP a troponínu, pričom sme ich sledovali v troch časoch – „nula“ (v intervale do 2 hodín od vyslovenia vysokej suspekcie alebo preukázania sepsy), po 24 hodinách a po 72 hodinách. Následne sme analyzovali vzťah kreatinínémie a ostatných piatich sledovaných parametrov. Kreatinínému sme zaklasifikovali do štyroch skupín – 1. < 100 $\mu\text{mol/l}$, 2. 100 – 199 $\mu\text{mol/l}$, 3. 200 – až 299 $\mu\text{mol/l}$, 4. ≥ 300 $\mu\text{mol/l}$. Na štatistické hodnotenie sme použili analýzu rozptylu (ANOVA) s jej variabilitou, F-štatistikou a p-hodnotou (5).

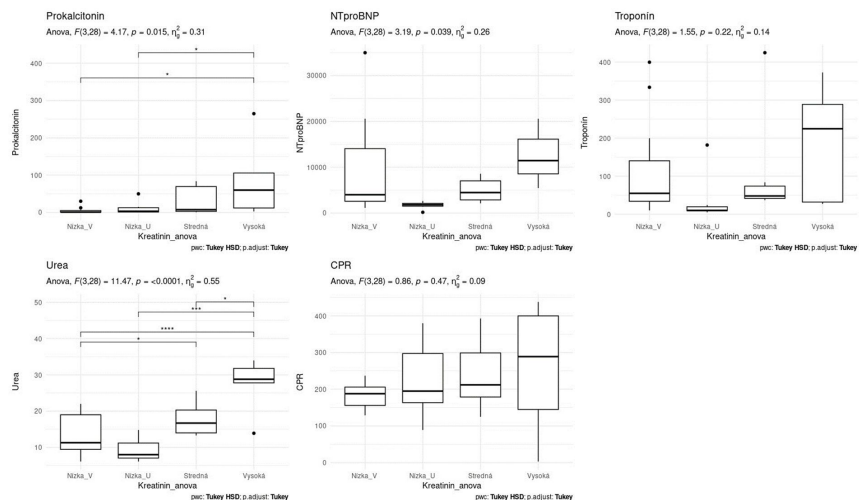
Výsledky

V čase „nula“ sme preukázali signifikantný vzťah kreatinínémie s ureou, prokalcitonínom a NTproBNP, nie však s troponíniou a CRP (Obr. 1).

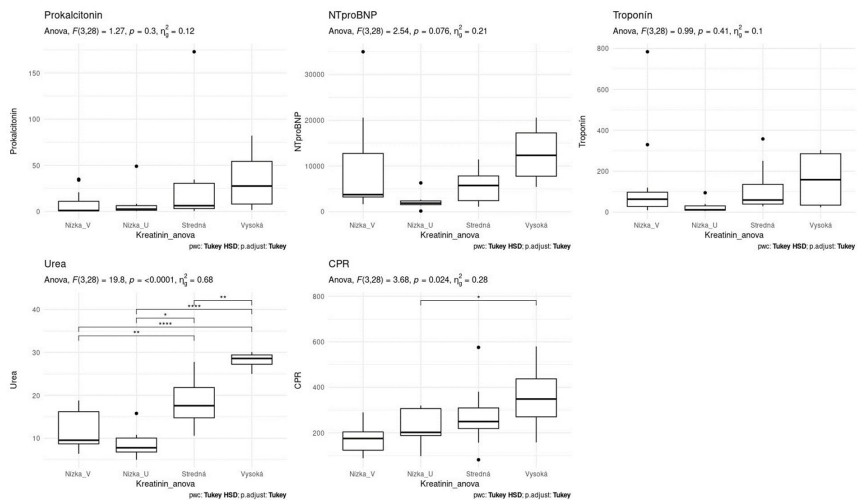
Po 24 hodinách od začiatku inzultu sme preukázali signifikantný vzťah kreatinínémie a s ureou a CPR, ale už nie s prokalcitonínom a NTproBNP, pretrvával nesignifikančný vzťah k troponínii (Obr. 2).

Po 72 hodinách od diagnostikovania sepsy a začatia jej liečby ostal signifikantný vzťah kreatinínémie a urey, s ostatnými sledovanými parametrami už kreatinínémia nemala štatisticky významný vzťah.

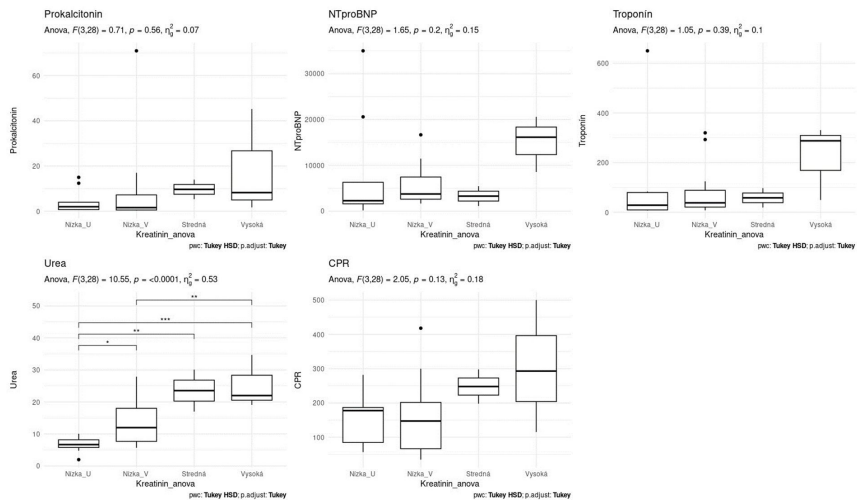
Obr. 1 ANOVA kreatinín v čase 0 hodín



Obr. 2. ANOVA kreatinín v čase 24 hodín



Obr. 3 ANOVA kreatinín v čase 72 hodín



Diskusia

V našej štúdií sme stanovili 3 exklúzne kritériá – EF ĽK menej ako 35%, zaradenie do chronického HD programu a terminálnu fázu kardiálneho alebo onkologického ochorenia.

Hladiny kreatinémie, podľa ktorých sme delili pacientov, sme zvolili ad hoc. Pritom sme vychádzali z toho, že u seniorov treba opatrnejšie interpretovať renálny status, pretože sú jednak hypersenzitívni k patologickým procesom (6), jednak kreatinémia je významne ovplyvnená množstvom svalovej hmoty, ktorá vekom ubúda (7). Naším cieľom bolo, aby sme dokázali zachytiť aj vplyv minimálnej odchýlky renálnej funkcie na celkový stav a prognózu pacientov. S vekom je asociovaná aj chronická renálna insuficiencia, ktorá sa zvykne označovať eponymom – aging kidney.

Medzi najčastejšie príčiny hospitalizácie vo vyššom veku patrí chronické srdcové zlyhávanie. U seniorov vzhľadom k ich polymorbidite je jeho diagnostika častokrát náročná. V súčasnosti z ponuky laboratorného panelu je najpoužívanejším a jediným rutinne dostupným markerom NTproBNP(8). Druhým rozšíreným biochemickým nástrojom využívaným v kardiológii je troponín. Jeho prínos spočíva skôr v predikcii prognózy a potencionálnych komplikácií SZ než pri jeho samotnej diagnostike(9).

Čas zohráva pri seipse, obzvlášť u seniorov, významnú úlohu. Z typického východiskového stavu „imunosescencia a inflammaging“ sa prechádza do štádia imunoparalýzy (v búrlivom období prvých 48-hodín sepsy), ktorá podporuje riziko demarkovania silentnej kardiálnej alebo renálnej insuficiencie. Odporúčania SSC(10) vychádzajúc zo sumarizácie klinických štúdií, toto dramatické obdobie delia na 3 časové zóny („0, 24 a 72 hodín“). Tieto odporúčania hovoria o „časnej fáze“, kedy je absolútne rozhodujúca neodkladná intervencia(do 1 – 3 hodín od počiatku septického infarktu), nasleduje interval 12 – 24 hodín (sleduje sa prvotná odozva na liečbu a realizujú sa nevyhnutné opatrenia – v našej štúdií „čas 24“) a potom štádiom rozhodovania o ďalšom postupe a zhodnocovanie prognózy (po 72 hodinách).

Okrajovo je nevyhnutné spomenúť ešte dva markery neoddeliteľne spojené s našou prácou a sepsou samotnou – CRP a prokalcitonín. Ich význam, využite, obmedzenia a prínos v rámci tohto ochorenia by bol predmetom dlhého pojednania, preto je vhodnejšie zamerať sa „len“ na ich tvorbu z časového hľadiska, čo predstavuje mimoriadne dôležitý aspekt. CRP sa tvorí priemerne 24-72 hodín od počiatku infarktu(11) a prokalcitonín 6-12 hodín od začiatku klinických príznakov(12).

Vychádzali sme z predpokladu, že srdce a obličky nie sú dve oddelené a „len okolnosťami intermitentne prepojené nádoby“, ale sú skôr dva kodominantné elementy existujúce vo vzájomnej unikátnej symbióze. Preto nás zaujímal ich vzájomný vzťah v podmienkach septického stavu. Hodnotili sme kardiorenálne interakcie z dvoch uhlov. Prvým bola samostatná interakcia srdca a obličiek v podmienkach sepsy a druhým analýza prepojenia markerov obličiek, srdca a zápalu.

Pozitívne sa preukázal vzťah medzi kreatinémiou a NTproBNP v „čase 0“. Len vtedy sa preukázala závislosť medzi kardiálnymi a renálnymi markermi. NTproBNP preukazoval koreláciu skôr s vysokými než nízkymi hodnotami kreatinémie. Ako sme predpokladali závislosť bola pozorovaná medzi kardiálnym(NTproBNP a troponínom) a renálnym(urea a kreatinín) spektrom biochemických ukazovateľov. Nepreukázal sa nijaký „vzťah“

troponínu k obličkovým ukazovateľom, aj keď literatúra píše o elevácii jeho hodnôt pri renálnej insuficiencii(13). No jeho interpretácia v podmienkach CKD ako aj pri našej práci je vysoko diskutabilná a je nutné podrobiť tento smer ešte mnohým výskumom. V čase „24“ a „72“ sme nepreukázali signifikantný vzťah medzi kreatinínom a kardiálnymi markermi(NTproBNP a troponínom), preukázateľný bol len logicky vyvodený príbuzenský vzťah s ureou.

Pri ideovom zrode projektu a skúmaní množstva dát a štúdií sme si kládli rovnakú jednoduchú otázku a síce - kedy môžeme hovoriť o KRS 5.typu? Ten je arbitrárne definovaný simultánnym postihnutím srdca a obličiek uniformným inzultom - sepsou. Podľa analýzy v čase „0“ sa ukázala závislosť medzi 3 faktormi – kreatinínom, NTproBNP a prokalcitonínom. Patofyziologickým podkladom tohto tanca „štyroch“ je s najväčšou pravdepodobnosťou syntéza prokalcitonínu včasne pri generalizácii infekcie v organizme, čím je vyvolaná nielen imunitná, ale aj kardio-renálna kaskáda(15, 16). V čase „24“ táto závislosť vymizla a vystal vzťah medzi kreatinínom a CRP, čo môžeme odôvodniť biochemickou podstatou týchto zápalových ukazovateľov(CRP a prokalcitonínu). V čase „72“ už bola prítomná výrazná diskontinuita medzi zápalovými, kardiálnymi a renálnymi ukazovateľmi.

O KRS 5.typu by sme teda mohli hovoriť hneď v úvode, kedy dochádza k prepojeniu týchto troch elementov. Toto tvrdenie je podporené aktuálnym vnímaním sepsy ako dynamického ochorenia s maximálnym dôrazom na možnosť komplikácií v priebehu prvých niekoľkých hodín. Na druhej strane protiargumentom tejto hypotézy je vzťahový rozkol medzi kardiálnymi, renálnymi a inflamatórnymi ukazovateľmi v čase „24“, kedy sa dá hovoriť o pretrvávajúcom vzťahu zápalu(CRP) a obličiek(kreatinín). Tento jav možno vysvetliť 2 okolnosťami – odberom NTproBNP len v čase „0“ a teda jeho správanie v čase „24“ môžeme len odhadovať a predpokladaným poklesom prokalcitonínu(v rámci štatistickej analýzy neboli zvlášť diferencované skupiny preživších pacientov a tých, čo exitovali). Každopádne sa sformovala „silná 4“ – kreatinín, NTproBNP, prokalcitonín a čas. Ich vzájomným interakciám ale úplne nerozumieme ani z pohľadu časovej, ani hodnotovej závislosti. Podľa analýzy nášho súboru by sme mohli taktiež skonštatovať, že urea a troponín by mohli zohrávať význačnú úlohu v stratifikácii obličkovej a srdcovej nedostatočnosti a prispievať k hodnoteniu prognózy, avšak v rámci diagnostiky KRS 5.typu zohrajú zrejme ale len minoritnú úlohu(16, 17).

Výrazným ohraničením našich zistení je rozsah skúmaného súboru, pretože napriek nezanedbateľnému počtu pacientov so sepsou, ktorých sme analyzovali, považujeme ich počet za jednu z najväčších limitácií našej práce.

Radi by sme venovali pár slov aj nomenklatúre kardiorenálnych syndrómov (KRS). Ani podľa ich tvorca, talianskeho profesora Claudia Ronca, nie je táto konštrukcia ideálna a všeobecne uplatniteľná. Očakával, že skôr alebo neskôr sa stane revízia používaných pojmov nevyhnutnou. Z našich zistení nám vyplynula otázka, či máme hovoriť o KRS 5. typu alebo ide skôr o typ 1 či 3. Toto zvažovanie podporuje aj nejednoznačná poznatková báza o dôkazoch uniformného poškodenia myokardu a obličiek počas septického inzultu (priamo mikrobiálnymi štruktúrami alebo nepriamo prostredníctvom ich produktov). Nevieme teda spoľahlivo povedať, či sepsa bola primárny podnet vyvolávajúci srdcovú a obličkovú insuficienciu alebo sa táto nedostatočnosť pri extrémnej záťaži organizmu sepsou len manifestovala. Nateraz sa domnievame, že by sme skôr mohli hovoriť o type 1.Nenavrhujeme, pochopiteľne, zmenu existujúcej nomenklatúry, len chceme na základe konkrétnych zistení

prispieť do diskusie o tom, kedy a či vôbec môžeme hovoriť o KRS 5. typu ako o samostatnej jednotke. Rovnako ako pri diagnostike izolovaných srdcových a obličkových chorôb, aj pri KRS sú laboratórne testy s najväčšou pravdepodobnosťou len supportívnym elementom. Možným additívnym nástrojom schopným dotvoriť komplexnosť obrazu KRS interakcií je neinvazívne spektrum diagnostických modalít (echokardiografia, abdominálna ultrasonografia so zameraním na renálne artérie), no kritériá a rámec ich využitia je zatiaľ len v pracovnej rovine.

Použitá literatúra

1. Bauer M, Gerlach H, Vogelmann T, Preissing F, Stiefel J, Adam D. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019 - results from a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2020; 24(1): 239.
2. Martin-Loeches I, Guia MC, Vallecocchia MS et al. Risk factors for mortality in elderly and very elderly critically ill patients with sepsis: a prospective, observational, multicenter cohort study. *Ann Intensive Care* 2019; 9(1): 26.
3. Vallabhajosyula S, Sakhuja A, Geske JB, Kumar M, Kashyap R, Kashani K, Jentzer JC. Clinical profile and outcomes of acute cardiorenal syndrome type-5 in sepsis: An eight-year cohort study. *PLoS One* 2018; 13(1): e0190965.
4. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021; 47(11): 1181-1247.
5. Ascher SB, Berry JD, Katz R et al. Changes in Natriuretic Peptide Levels and Subsequent Kidney Function Decline in SPRINT. *Am J Kidney Dis* 2023; S0272-6386(23)00933-2.
6. Flint B, Tadi P. Physiology, Aging. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 32310566.
7. Bian Z, Zhu R, Chen S. The predict value of serum/urocystatin C on acute kidney injury in elderly patients with sepsis. *Exp Gerontol* 2021; 155: 111576.
8. Marinescu, M., Oprea, V.D., Nechita, A. et al. The Use of Brain Natriuretic Peptide in the Evaluation of Heart Failure in Geriatric Patients. *Diagnostics* 2023, 13, 1512.
9. Li S, She F, Lv T, Geng Y, Xue Y, Miao G, Zhang P. The prognostic role of high-sensitivity cardiac troponin T over time in ischemic and non-ischemic heart failure. *Postepy Kardiol Interwencyjne*. 2021 Mar;17(1):54-59.
10. Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 47, 1181–1247 (2021).
11. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018 Apr 13;9:754.
12. Cleland DA, Eranki AP. Procalcitonin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
13. Banerjee D, Perrett C, Banerjee A. Troponins, Acute Coronary Syndrome and Renal disease: From Acute Kidney Injury Through End-stage Kidney Disease. *Eur Cardiol*. 2019 Dec 18;14(3):187-190.
14. Chun K, Chung W, Kim AJ, Kim H, et al. Association between acute kidney injury and serum procalcitonin levels and their diagnostic usefulness in critically ill patients. *Sci Rep*. 2019 Mar 18;9(1):4777.

15. Shen K, Jiang S. The value of procalcitonin and brain natriuretic peptide in predicting the prognosis of sepsis. *Am J Transl Res.* 2023 Mar 15;15(3):1921-1927. PMID: 37056803
16. Garcia MA, Rucci JM, Thai KK, Lu Y, et al. Association between Troponin I Levels during Sepsis and Postsepsis Cardiovascular Complications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021 Sep 1;204(5):557-565.
17. Li X, Zheng R, Zhang T, Zeng Z, Li H, Liu J. Association between blood urea nitrogen and 30-day mortality in patients with sepsis: a retrospective analysis. *Ann Palliat Med.* 2021 Nov;10(11):11653-11663.

10. Porovnanie mortality medzi ľuďmi bez domova s ľuďmi so stabilným bývaním spárovanými podľa veku a pohlavia akútne hospitalizovanými na internej klinike Univerzitnej nemocnice v Bratislave: retrospektívna case-control štúdia

MUDr. Falat Jakub

(vnútorné lekárstvo)

Spoluautori: Smaha Juraj¹, Gažová Andrea², Kužma Martin¹, Kyselovič Ján¹, Payer Juraj¹, Jackuliak Peter¹

Školiteľ: Prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP1

¹V. interná klinika, Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitná Nemocnica Bratislava, ²Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Úvod

Ľudia bez domova sú ohrozenou skupinou pacientov, ktorá predstavuje približne 1% populácie, avšak so stúpajúcou incidenciou (1). Odhaduje sa, že v Európskej únii v danú noc spí bez akéhokoľvek prístrešia alebo v provizórnom obydlí minimálne 700 000 ľudí(2). Podľa sčítania obyvateľov, domov a bytov z roku 2011 bolo na Slovensku 23 483 ľudí bez domova (0,4% celkovej populácie). Na základe posledného sčítania obyvateľov z roku 2021 sa počet bezdomovcov zvýšil medzi rokmi 2011-2021 skoro trojnásobne (3). Avšak, toto číslo referuje len ľudí z dlhodobých útulkov. Hlavné kategórie bezdomovectva — ľudia bez akéhokoľvek prístrešia alebo ľudia prespávajúci v krátkodobých nocľahárňach neboli započítaní (4).

Bezdomovectvo je extrémna forma sociálneho odlúčenia a je asociované s vysokou morbiditou. Ľudia bez domova častejšie prichádzajú do nemocníc s chorobou v pokročilejšom štádiu, majú horšie výsledky liečby a horšiu dostupnosť lekárskej starostlivosti (6). Európska Federácia Organizácií pracujúcich s ľuďmi bez domova (FEANTSA) rozoznáva štyri hlavné typy bezdomovectva — bývanie bez prístrešia, bez dlhodobého domova, ohrozené bývanie a neadekvátne bývanie . Typ bezdomovectva bez prístrešia reprezentuje najzávažnejšiu kategóriu. Pozostáva z ľudí žijúcich na verejných priestranstvách alebo z ľudí, ktorí využívajú krátkodobé nocľahárne (9).

Cieľom našej štúdie bolo popísať mortalitu kohorty ľudí bez domova akútne hospitalizovaných na internej klinike Univerzitnej nemocnice v Bratislave a porovnať hlavné charakteristiky tejto skupiny s podľa veku a pohlavia spárovanou kontrolnou skupinou pacientov so stabilným bývaním.

Metódy

Táto štúdia bola realizovaná ako unicentrická retrospektívna case-control štúdia na V. Internéj klinike Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej Nemocnice Bratislava. Mortalitné dáta boli získané z databázy nemocničného informačného systému MEDEA z obdobia od 1.1. 2010 do 31.12.2023 (n=5694). Úmrtné správy boli automaticky prehľadávané pre termín „casus socialis“ (n=166). „Casus socialis“ označuje človeka bez domova, človeka s nízkym hygienickým statusom, abuzéra drog alebo človeka bez stáleho zamestnania. Po pozornom prečítaní zdravotnej dokumentácie bolo pre nesplnenie kritérií bezdomovectva bez prístrešia z štúdie vylúčených 25 pacientov. Konečná skupina bezdomovcov tak pozostávala zo 141 pacientov (118 mužov, 23 žien). K skúmanej kohorte bola vytvorená kontrolná skupina pacientov so zabezpečeným stabilným bývaním. Pozostávala zo 141 zomrelých pacientov (118 mužov, 23 žien) spárovaných podľa veku a pohlavia akútne hospitalizovaných na internej klinike. Párovanie pacientov prebiehalo najskôr podľa pohlavia, následne podľa veku ± 1 rok. Ak vyhovovalo viacero pacientov, tak boli vybraní pacienti s najviac podobnou dĺžkou hospitalizácie.

Zo zdravotnej dokumentácie boli zozbierané demografické charakteristiky, komorbidity, laboratórne markery a príčiny úmrtia pacientov. Úmrtné správy boli preskúmané 2 lekármi štandardizovaným postupom. Najčastejšie príčiny úmrtia boli rozdelené do šiestich hlavných skupín: infekčné, pečeňové, kardiovaskulárne, masívne gastrointestinálne krvácanie, onkologické a iné. Špecifické ochorenia z najpočetnejších skupín boli analyzované podrobnejšie, ich incidencia bola porovnávaná medzi ľuďmi bez domova a kontrolnou skupinou.

Štatistické analýzy boli realizované pomocou softvéru GraphPad Prism version 10.2.1 (GraphPadSoftware, San Diego, California, USA). Kontinuálne variabilné boli prezentované ako priemer $\pm$ štandardná deviácia. Nepárový študentov t-test s Welchovou koreláciou alebo Mann-Whitneyho test boli použité na analýzu signifikantnosti ich rozdielov. Kategorické variabilné boli prezentované ako čísla s percentami. Fisherov exaktný test bol použitý na analýzu signifikantnosti ich rozdielov. P-hodnota $< 0,05$ bola považovaná za štatisticky signifikantnú.

Výsledky

Celkovo bolo analyzovaných 141 bezdomovcov a 141 pacientov kontrolnej skupiny. Priemerný vek kohorty ľudí bez domova bol $56 \pm 10,31$ rokov. Priemerný vek všetkých zomrelých pacientov so stabilným bývaním bol $76,37 \pm 12,20$ rokov. 83% ľudí bez domova boli muži. 6% ľudí bez domova zomrelo v skorej dospelosti (20-39 rokov) a 52% v strednej dospelosti (40-59 rokov). Ľudia bez domova reprezentovali 2,5% všetkých úmrtí na internej klinike počas analyzovaného obdobia (13 rokov). Základné demografické a klinické charakteristiky spolu so štatistickou signifikanciou rozdielu v týchto charakteristikách medzi ľuďmi bez domova a spárovanými kontrolami sú zobrazené v tab.1.

Tab.1.: Základné charakteristiky a rozdiely medzi ľuďmi bez domova a kontrolnou skupinou.

Variabilná	Bezdomovci (n=141)	Kontrolná skupina (n=141)	p- hodnota
Muži/ženy, n (%)	118/23 (84)	118/23 (84)	N/A
Vek úmrtia (roky)	56.30±10.31	56.63±10.45	0.3929
Dĺžka hospitalizácie (dni)	5±6	6±7	0.0349*
Počet komorbidít	2±2	3±2	<0.0001*
Chronické srdcové zlyhanie, n(%)	27 (19)	50 (35)	0.0031*
Koronárna artériová choroba, n(%)	23 (16)	53 (38)	<0.0001*
Diabetes mellitus, n(%)	13 (9)	43 (30)	<0.0001*
Artériová hypertenzia, n(%)	35 (25)	72 (51)	<0.0001*
Fibrilácia predsiení, n(%)	18 (13)	28 (20)	0.1463
Chronická choroba obličiek, n(%)	25 (18)	61 (43)	<0.0001*
Chronické pľúcne ochorenie, n(%)	15 (11)	26 (18)	0.0903
Malignita, n(%)	14 (10)	28 (20)	0.0288
Chronické ochorenie pečene, n(%)	58 (41)	55 (39)	0.8080
Abúzus alkoholu, n(%)	119 (84)	69 (49)	<0.0001*
Fajčenie, n(%)	116 (82)	80 (57)	<0.0001*
Abuzér i.v. drog, n(%)	15 (11)	8 (6)	0.1908
Porucha vedomia pri prijíme, n(%)	67 (48)	62 (44)	0.6326
Porucha mobility pri prijíme, n (%)	90 (64)	69 (49)	0.0162
Hypotermia pri prijíme, n(%)	23 (16)	0 (0)	<0.0001*
Prijímy v teplých mesiacoch (apríl-september)/ chladných mesiacoch (október-marec)	54(38)/87(62)	59(42)/82(58)	0.627
HBV, n(%)	4 (3)	5 (4)	>0.9999
HCV, n(%)	21 (15)	10 (7)	0.0555
HIV, n(%)	1 (1)	0 (0)	>0.9999
Syfilis, n(%)	4 (3)	2 (1)	0.6841
Parazity, n(%)	14 (10)	0 (0)	<0.0001*
Vyšší stupeň oxygenoterapie (HFNV alebo mechanická ventilácia)	15(11)	24(17)	0.17
Vazopresory	70(49)	83(59)	0.15
Intravenózne antibiotiká	116(82)	125(87)	0.18
Hemoterapia	31(22)	39(28)	0.33
Ultrazvuk (brucho, končatiny)	81(57)	82(58)	>0.99
Echokardiografia	17(12)	21(15)	0.60
Počítačová tomografia (hrudník, brucho, hlava)	64(45)	43(30)	0.01
Endoskopia GIT	16(11)	21(15)	0.48
Diagnostická/ terapeutická paracentéza/ torakocentéza	16(11)	25(18)	0.17

Priemerná dĺžka hospitalizácie u ľudí bez domova bola signifikantne kratšia ako u kontrolnej skupiny (5±6 vs. 6±7, p=0,03). Pacienti z kontrolnej skupiny mali vyšší počet komorbidít. Z nich koronárna artériová choroba, diabetes mellitus, artériová hypertenzia a chronická choroba obličiek boli výrazne častejšie v kontrolnej skupine (všetky p<0,0001). Najčastejšou komorbiditou u bezdomovcov bolo chronické ochorenie pečene (41%), nasledované arteriálnou hypertenziou (25%) a chronickým srdcovým zlyhaním (19%). V kontrolnej skupine bola najčastejšou komorbiditou artériová hypertenzia (51%), nasledovaná chronickou chorobou obličiek (43%) a chronickým ochorením pečene (39%). Fajčenie a abúzus alkoholu boli signifikantne častejšie v skupine ľudí bez domova (p<0,0001). V abúze intravenózných drog, chronickom ochorení pečene alebo v chronickom pľúcnom ochorení neboli medzi skupinami signifikantné rozdiely.

Čo sa týka klinického stavu pri prijíme, u ľudí bez domova bol častejší výskyt poruchy mobility (p=0,02) a ektoparazitov (p<0,0001). V pozitívite sérologických vyšetrení na hepatitídu B (HBV), vírus ľudskej imunodeficiencie (HIV) a syfilis neboli štatisticky významné rozdiely. Výskyt hepatitídy C (HCV) bol u bezdomovcov častejší s hraničnou štatistickou signifikantnosťou (p=0,055). Väčšina pacientov z obidvoch skupín (62% vs 58%, p=0,62) bola prijatá počas chladných mesiacov (október-marec). Hypotermia pri prijíme bola častejšia u ľudí bez domova. (p<0,0001). Nebol žiaden rozdiel v poskytnutej zdravotnej starostlivosti medzi ľuďmi bez domova a kontrolnou skupinou v zmysle liečby vazopresormi, i.v. antibiotikami, hemosubstitúcií, v počte realizovaných diagnostických punkcií alebo štandardných zobrazovacích metód až na CT vyšetrenie, ktoré bolo častejšie realizované u ľudí bez domova. (p=0,01).

Tab.2.: Rozdiely v mortalite medzi oboma pohlaviami, mužmi a ženami.

	Všetci (n=282)			Muži (n=236)			Ženy (n=46)		
Príčina úmrtia	Bezdomovci (n=141)	Kontrolná skupina (n=141)	p-hodnota	Bezdomovci (n=118)	Kontrolná skupina (n=118)	p-hodnota	Bezdomovci (n=23)	Kontrolná skupina (n=23)	p-hodnota
Infekčná	68(48)	48(34)	0.0213*	58(49)	39(33)	0.0170*	10(43)	9(39)	>0.9999
Pečeňová	23(16)	33(23)	0.1788	16(14)	30(25)	0.0319	7(30)	3(13)	0.2837
Masívne GIT krvácanie	8(6)	5(4)	0.5719	7(6)	2(2)	0.1713	1(4)	3(13)	0.6078
Kardiovaskulárna	19(13)	25(18)	0.4122	18(15)	23(19)	0.4923	1(4)	2(9)	>0.9999
Onkologická	7(5)	17(12)	0.0528	7(6)	14(12)	0.1693	0(0)	3(13)	0.2333
Iná	16(11)	13(10)	0.6956	12(10)	10(8)	0.8234	4(17)	3(13)	>0.9999

Najčastejšou kategóriou úmrtí v skupine ľudí bez domova boli infekčné príčiny (48%), pečeňové príčiny (16%) a kardiovaskulárne príčiny (13%) (Tab.2.). Bezdomovci mužského pohlavia umierali najčastejšie na infekcie (49%), kardiovaskulárne (15%), a pečeňové (14%)

ochorenia. Ženy bez domova umierali najčastejšie na infekčné (43%), pečeňové (30%), a iné ochorenia (17%). V porovnaní s kontrolnou skupinou, ľudia bez domova častejšie umierali na infekčné príčiny a menej často na onkologické príčiny ($p=0,02$ a $p=0,05$). Vo zvyšných príčinách úmrtí neboli významné rozdiely. Pri rozdelení podľa pohlavia, muži bez domova umierali častejšie na infekčné ochorenia a muži z kontrolnej skupiny umierali častejšie na pečeňové ochorenia ($p=0,02$ a $p=0,03$). Medzi ženami neboli významné rozdiely v príčine mortality.

Čo sa týka špecifických príčin mortality, najčastejšou príčinou infekčnej mortality u ľudí bez domova aj v kontrolnej skupine bola pneumónia (60% a 51%), nasledovaná infekciou močového traktu (16% a 18%) a gangrénou nohy (17% a 18%). Pri špecifických príčinách infekčnej mortality neboli medzi porovnávanými skupinami pacientov žiadne významné rozdiely.

Diskusia

Priemerný vek úmrtia ľudí bez domova v našej štúdií (56 rokov) bol o 20 rokov nižší ako u všetkých zvyšných zomrelých pacientov (76,37 rokov). Priemerný vek úmrtia bezdomovcov bol približne o 8-10 rokov vyšší v porovnaní s kohortami ľudí bez domova z USA (10), Kanady (6) alebo západnej Európy (11) a podobný s ľuďmi bez domova z východnej Európy (12). Muži tvorili väčšinu zomrelých ľudí bez domova (83%) a najčastejšími príčinami úmrtia boli infekčné, pečeňové a kardiovaskulárne príčiny. Bezdomovci muži v porovnaní s kontrolnou skupinou umierali častejšie na infekčné ochorenia. Muži z kontrolnej skupiny častejšie umierali na ochorenia pečene. Avšak obidve skupiny mali tri najčastejšie príčiny úmrtia rovnaké (infekčné, pečeňové a kardiovaskulárne). V podskupine žien neboli nájdené žiadne významné rozdiely v mortalite.

Väčšina štúdií zaoberajúcich sa mortalitou ľudí bez domova bola realizovaná v USA a západnej Európe. V štúdií z USA v kohorte 1302 bezdomovcov (medzi rokmi 2003-08) boli najčastejšími príčinami úmrtia intoxikácia drogami, malignity a kardiovaskulárne ochorenia. V porovnaní s rokmi 1988-1993, predávkovanie drogami v následných rokoch nahradilo HIV infekciu v poste vážneho vznikajúceho zdravotníckeho problému (13). Vo Francúzku boli hlavnými príčinami úmrtia medzi ľuďmi bez domova v rokoch 2008-2010 externé príčiny (násilné napadnutie, samovražda, utopenie) a malignity. Pozoruhodne, 28% príčin úmrtí bolo označených ako „nedostatočne definované a neznáme“ (11). V štúdií z Londýna bolo najviac úmrtí pripísaných abúzu návykových látok, ochoreniam pečene a kardiálnym príčinám (14).

Málo je známe špecificky o mortalite skupiny bezdomovcov bez prístrešia — bezdomovcov žijúcich na verejných priestranstvách alebo tých, ktorí využívajú krátkodobé nocľahárne. Štúdia z Bostonu, Massachusetts ukázala, že miera úmrtnosti zo všetkých príčin u kohorty bezdomovcov bez prístrešia bola skoro trikrát vyššia ako u ostatných skupín bezdomovcov. Najčastejšou príčinou úmrtí v tejto kohorte bezdomovcov boli maligne ochorenia, abúzus alkoholu a chronické ochorenia pečene (15).

Bezdomovci bez prístrešia majú špecifickú kombináciu komorbidít a environmentálnych faktorov, ktoré ich predisponujú pre výrazne vyššiu morbiditu a mortalitu. V našej kohorte sa viac ako 80% bezdomovcov priznalo k abúzu alkoholu a fajčeniu, viac ako 10% užívalo i.v.

drogy. 16% z nich malo pri prijme hypotermiu a 10% ektoparazity — všetko faktory asociované s nehostinným prostredím a nedostatočnou hygienou.

Porovnávanie prežívania akútne hospitalizovaných bezdomovcov s pacientami s domovom vykazuje nejasné výsledky. Dve štúdie, jedna z Kórei (16) a ďalšia z Francúзка (17) ukázali, že akútne chorí bezdomovci aj pacienti s domovom majú rovnakú prognózu. V multivariantných analýzach v týchto štúdiách nebolo samotné bezdomovectvo signifikantne asociované s nemocničnou mortalitou. Avšak, štúdia z Francúзка ukázala, že žitie na ulici je faktor nezávisle asociovaný mortalitou (17). Malá štúdia z Kanady so 63 podľa pohlavia a veku spárovanými akútne chorými bezdomovcami ukázala, že obidve kohorty mali podobné komorbidity okrem zvýšeného abúzu alkoholu a užívania drog, ale kohorta bezdomovcov mala signifikantne vyššiu nemocničnú mortalitu (29% vs. 8%) (6).

Naša štúdia má niekoľko limitácií. Analyzovaná skupina pacientov bola malá. Analyzovali sme len pacientov v jednom meste, prijatých na jednu internú kliniku. Naše výsledky preto nemôžu byť zovšeobecnené na celú populáciu bezdomovcov na Slovensku. Naša štúdia sa zameriavala špecificky na nemocničnú mortalitu ľudí žijúcich najťažšou formou bezdomovectva, preto naše výsledky nemusia byť zovšeobecniteľné pre všetky typy ľudí bez domova. Na druhej strane, analyzovali sme homogénnu, jasne definovanú skupinu akútne chorých pacientov. Naša štúdia môže preto prispieť relevantnými klinickými poznatkami do poľa klinického výskumu, ktoré bolo doteraz veľmi málo skúmané.

Súhrnom, naša štúdia po prvýkrát analyzovala mortalitu bezdomovcov na Slovensku. Je to tiež jedna z mála štúdií skúmajúca nemocničnú mortalitu bezdomovcov v Európe. Ak berieme v úvahu rastúcu prevalenciu bezdomovectva na Slovensku aj celosvetovo, evidencia ohľadne tejto problematiky by mala byť naďalej rozširovaná. Analyzovanie morbiditných a mortalitných dát ľudí bez domova môže pomôcť rozvinúť lepšie klinické postupy a postupy verejného zdravotníctva pre túto vysoko ohrozenú skupinu pacientov.

Zoznam použitej literatúry

1. Taylor O, Loubiere S, Tinland A, Vargas-Moniz M, Spinnewijn F, Manning R, et al. Lifetime, 5-year and past-year prevalence of homelessness in Europe: a cross-national survey in eight European nations. *BMJ Open*. 2019 Nov;9(11):e033237.
2. social-housing-policy-brief-2020.pdf [Internet]. [cited 2023 Oct 31]. Available from: <https://www.oecd.org/social/social-housing-policy-brief-2020.pdf>
3. a.s PP. spectator.sme.sk. 2023 [cited 2024 Apr 4]. They work, they study, but they sleep rough. Homeless figures increase in Slovakia. Available from: <https://spectator.sme.sk/c/23203352/homeless-figures-in-slovakia-rockets.html>
4. ESPN_SK_homelessness and housing exclusion_2019.pdf.
5. europe-and-homelessness-alarming-trends3178124453170261721.pdf [Internet]. [cited 2024 Feb 27]. Available from: <https://www.feantsa.org/download/europe-and-homelessness-alarming-trends3178124453170261721.pdf>
6. Smith OM, Chant C, Burns KEA, Kaur M, Ashraf S, DosSantos CC, et al. Characteristics, clinical course, and outcomes of homeless and non-homeless patients admitted to ICU: A retrospective cohort study. *PLoS ONE*. 2017 Jun 12;12(6):e0179207.

7. Morrison DS. Homelessness as an independent risk factor for mortality: results from a retrospective cohort study. *Int J Epidemiol*. 2009 Jun;38(3):877–83.
8. Brändle G, García O. Measuring housing exclusion using the ETHOS typology. *Hous Care Support*. 2015 Jan 1;18(3/4):113–24.
9. Wadhera RK, Choi E, Shen C, Yeh RW, Joynt Maddox KE. Trends, Causes, and Outcomes of Hospitalizations for Homeless Individuals. *Med Care*. 2019 Jan;57(1):21–7.
10. Vuillermoz C, Aouba A, Grout L, Vandentorren S, Tassin F, Moreno-Betancur M, et al. Mortality among homeless people in France, 2008–10. *Eur J Public Health*. 2016 Dec;26(6):1028–33.
11. Romaszko J, Cymes I, Dragańska E, Kuchta R, Glińska-Lewczuk K. Mortality among the homeless: Causes and meteorological relationships. *PLoS ONE*. 2017 Dec 21;12(12):e0189938.
12. Baggett TP, Hwang SW, O’Connell JJ, Porneala BC, Stringfellow EJ, Orav EJ, et al. Mortality among homeless adults in Boston: shifts in causes of death over a 15-year period. *JAMA Intern Med*. 2013 Feb 11;173(3):189–95.
13. Hassanally K, Asaria M. Homeless mortality data from East London. *Lond J Prim Care*. 2018 Jul 4;10(4):99–102.
14. Roncarati JS, Baggett TP, O’Connell JJ, Hwang SW, Cook EF, Krieger N, et al. Mortality Among Unsheltered Homeless Adults in Boston, Massachusetts, 2000–2009. *JAMA Intern Med*. 2018 Sep;178(9):1242–8.
15. Lee YJ, Yun SY, Lee JK, Heo EY, Kim DK, Chung HS, et al. Comparison of clinical characteristics and outcomes between homeless and non-homeless patients admitted to intensive care units: An observational propensity-matched cohort study in Korea. *J Crit Care*. 2019 Aug;52:80–5.
16. Bigé N, Hejblum G, Baudel JL, Carron A, Chevalier S, Pichereau C, et al. Homeless Patients in the ICU: An Observational Propensity-Matched Cohort Study. *Crit Care Med*. 2015 Jun;43(6):1246–54.
17. Wadhera RK, Khatana SAM, Choi E, Jiang G, Shen C, Yeh RW, et al. Disparities in Care and Mortality Among Homeless Adults Hospitalized for Cardiovascular Conditions. *JAMA Intern Med*. 2020 Mar;180(3):357–66.

11. Imunohistochemická detekcia imunitných buniek v ľudskom nadsemenníku – porovnanie s ľudským vajíčkovodom.

Mgr. Claudia Feitscherová

Spoluautori: MUDr. Simona Polakovičová, PhD.¹

Školiteľ: prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD.¹

¹ Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Ústav histológie a embryológie, Bratislava

Úvod

Reprodukčný systém predstavuje esenciálnu zložku organizmu zodpovedajúcu za sexuálne rozmnožovania a pokračovania druhu. V spolupráci s endokrinným systémom sa prostredníctvom osi hypotalamus-hypofýza-gonády podieľa na produkcii mužských a ženských gamét, spermií a oocytov, ktoré sú zároveň pre organizmus z hľadiska imunitnej odpovede alogénne/alogenými [1].

Neplodnosť párov stále narastá pričom sa odhaduje, že mužské faktory neplodnosti predstavujú 30 až 50% z celkových prípadov infertility. Poruchy plodnosti u mužov majú často rôzne príčiny akými sú napríklad dysfunkcia semenníkov, výskyt vrodených malformácií, endokrinopatií, vplyv životného štýlu alebo sú spôsobené poruchami imunitnej regulácie [1], z toho až 15% príčin mužskej neplodnosti má imunitný charakter [2].

Nadsemenník disponuje vlastným špecifickým imunitným systémom interagujúcim s okolitým prostredím, ktorý umožňuje spermiám ako imunologicky cudzím bunkám dozrievať bez toho aby boli napadnuté týmto systémom. Nadsemeníky sú mnohonásobne stočené kanáliky prepájajúce semenník (testis) so semenovodom (vas deferens). Anatomicky sú zložené z troch častí, hlavy (caupt), tela (corpus) zodpovedných za skorý a neskorý proces maturácie spermií a bičika (cauda), ktorý slúžia ako rezervoár spermií pred ejakuláciou [3].

Za imunitnú toleranciu v nadsemenníku zodpovedajú v najväčšej miere imunitné bunky umiestnené v rámci pseudostratifikovaného epitelu lemujúce intraluminálny kompartment [4]. Ľudský epitel nadsemenníka je zložený z buniek bazálnych, hlavných, tzv. (ang.) “clear” buniek a halo buniek, ktorých funkcia je esenciálna pri zabezpečovaní kontroly zloženia tekutiny obmývajúcej dozrievajúce spermie.

Zatiaľ čo je známe, že makrofágy, ktoré boli dlho popisované ako hlavná leukocytová populácia buniek v myších nadsemenníkoch [4], boli v epididymálnom epitelu detegované okrem B lymfocytov aj T lymfocyty [5]. Prítomnosť a úloha T lymfocytov, tiež známych ako T regulačné (Treg) bunky v nadsemenníkoch sú však menej jasné. T lymfocyty, ktoré sú kľúčovou zložkou adaptívneho imunitného systému, sa vo všeobecnosti podieľajú na rozpoznávaní a eliminácii cudzích patogénov. Avšak v mužskom reprodukčnom trakte, vrátane nadsemenníka, existujú dôkazy, ktoré naznačujú, že regulačné T bunky (Tregs) môžu zohrávať úlohu pri udržiavaní imunitnej tolerance [6].

Väčšina štúdií zameraných na štúdium imunitných buniek v nadsemenníkoch bola uskutočnená prevažne na zvieracích modeloch. Cieľom našej štúdie bolo opísať imunitné bunky v rámci epitelu ľudského nadsemenníka prostredníctvom nepriamej imunohistochemie s detekciou markerov CD3, CD4, CD8, CD 68 a CD20cy. Naším cieľom je predovšetkým morfológická charakteristika imunitných buniek metódami imunohistochemie a na základe ich lokalizácie a distribúcie prispieť aj k bližšiemu pochopeniu mechanizmov imunologickej tolerance u buniek obsiahnutých v rámci steny nadsemenníka. Podobný výskum sme realizovali v našich predchádzajúcich prácach v rámci epitelu ľudského vajčíkovodu.

Materiál a metódy

Na výskum bolo použité nekrotické tkanivo nadsemenníka od šiestich mužov, priemerný vek predstavoval 45 rokov (33-65 rokov).Deparafinované a dehydratované rezy boli spracované v systéme PT link na imunodetekciu primárnych protilátok CD 3, CD 4, CD 8, CD 68 a CD20cy. Po blokovani endogénnej peroxidázovej aktivity a nešpecifickej väzby boli rezy inkubované s primárnymi polyklonálnymi králičími anti-humánymi protilátkami proti CD3 (DAKO, klon 215GKJV, RTU), primárnymi myšacími monoklonálnymi protilátkami proti ľudskému CD 4 (DAKO, klon 4B12) a CD 8 (DAKO, klon C8/144B), primárnymi monoklonálnymi myšacími anti-humánymi protilátkami proti CD68 (DAKO, klon PG-M1) a CD20cy (DAKO, klon L26) počas 20 minút. Rezy boli následne premyté a inkubované s Dako EnVision Flex/HRP Detection System, RTU, SM802, vysoké pH (Link) (kód K8000) počas 20 minút pri izbovej teplote. Nakoniec boli rezy premyté a imunoreakcia sa vizualizovala pomocou 3–3'-diaminobenzidínu ako chromogénu. Následne boli rezy kontrastne zafarbené Mayerovým hematoxylínom a montované zalievacím médiom pomocou Entellan® (Merk, Dramstadt, Nemecko). Ako pozitívna kontrolu boli použité vzorky z ľudskej podnovej mandle. Analýza sa uskutočnila pomocou svetelného mikroskopu Nikon eclipse 80i (objektívy 4x, 10x, 20x, 40x) a snímky sa zachytávali pomocou fotoaparátu Nikon DS-Fi1.

Výsledky

V našej štúdií sme použili vybrané markery na detekciu imunitných buniek v rámci epitelu a intersticiálneho tkaniva ľudského nadsemenníka a porovnali sme ich v rôznych segmentoch (hlava, telo, chvost). Najčastejšie sa vyskytujúci imunitnými bunkami v epiteli nadsemenníka boli CD3+ zrelé T-lymfocyty lokalizované väčšinou v oblasti hlavy a chvosta, CD8+ T-cytotoxické a T-regulačné lymfocyty boli lokalizované vo všetkých 3 častiach nadsemenníka a CD68+ makrofágy boli taktiež detegované vo všetkých 3 častiach. Intraepiteliálne CD3+ a CD8+ pozitívne bunky vykazovali prevažne sférický tvar a boli lokalizované najčastejšie v blízkosti bazálnej membrány. CD3+ pozitívne bunky v rámci intersticiálneho tkaniva vykazovali miernu expresiu a CD4+ a CD8+ pozitívne bunky vykazovali slabú expresiu. Intraepiteliálne CD68+ bunky mali prevažne guľovitý a predĺžený tvar a nachádzali sa najčastejšie v blízkosti bazálnej membrány. V lúmene epididymálneho kanálika v oblasti hlavy boli bunky CD68+ s fagocytovaným materiálom. Bunky, nepravidelného alebo predĺženého tvaru sa väčšinou nachádzali v intersticiálnom priestore. Na základe našich predošlých prác sme potvrdili, že prítomnosť intraepiteliálnych regulačných T-lymfocytov je typická aj pre ľudské vajčíkovody.

Diskusia

Populácia imunitných buniek v nadsemenníku sa súhrnne nazýva ako „halo bunky“ (monocyty/makrofágy a lymfocyty). Tieto bunky sa zúčastňujú na tvorbe dôležitej imunologickej bariéry, ktorá chráni spermie pred patogénmi a vlastným imunitným systémom. Nadsemenník disponuje účinnými mechanizmami vrodenej (monocyty/makrofágy) a adaptívnej (T-lymfocyty) imunity, ktorá reguluje imunitnú odpoveď. Nadsemenník sa tak považuje za imunologicky privilegovaný orgán, ktorý môže prijať alogénne a xenogénne tkanivo alebo orgán bez odmietnutia imunitným systémom, čím umožňuje spermiám dozrieť a získať tak schopnosť oplodniť oocyt [7].

Ochrana spermií pred imunitným systémom je v rámci tohto orgánu zabezpečovaná na dvoch úrovniach. Prvou úrovňou je hemato-epididymálna bariéra zahŕňajúca imunitné bunky, ktoré za normálnych fyziologických podmienok nevstupujú do lúmenu, čo dokazuje účinnosť tejto bariéry. Druhá úroveň ochrany závisí od populácie imunitných buniek obsiahnutých v tkanive nadsemenníka. Jednotlivé bunky v rámci epitelu sa vzájomne ovplyvňujú a komunikujú. Príkladom takejto komunikácie je produkcia imunosupresívnych molekúl epitelovými bunkami, čo vedie k inhibícii aktivity alebo prežívania T-buniek (IL-10, IDO, TGF-beta, aktívín A) [5]. Avšak v mužskom reprodukčnom trakte, vrátane nadsemenníka, existujú dôkazy, že regulačné T bunky (Tregs) môžu zohrávať úlohu pri udržiavaní imunitnej tolerance. Podľa Barrachina a kol. (2023) [6] eliminácia Treg buniek vedie k strate imunologickej tolerance a je príčinou autoimunitných reakcií ovplyvňujúcich reprodukčný systém muža. Narušenie homeostázy medzi epitelom a spermiami môže byť taktiež príčinou mužskej neplodnosti. V našej práci sme v epiteli nadsemenníka detegovali v najväčšom zastúpení CD3+ (zrelé T-lymfocyty), CD8+ (T- cytotoxické a T- regulačné) lymfocyty a CD68+ makrofágy. Podľa týchto zistení sú intraepitelové T-lymfocyty väčšinou zrelé, cytotoxické a regulačné T-lymfocyty. CD68+ makrofágy boli na základe našich výsledkov predĺžené bunky nepravidelného tvaru, ktoré boli lokalizované prevažne v intersticiálnom priestore. Niektoré bunky s veľkosťou viac ako 20 µm boli lokalizovné prevažne v lúmene, sú to pravdepodobne typické aktívne makrofágy, ktoré obsahujú fagocytovaný materiál a viditeľné sekundárne lyzozómy. Mononukleárne fagocyty sú podskupinou tkanivových buniek (dendritické bunky, monocyty a makrofágy) umiestnených v epiteli a interstíciu, ktoré sú zodpovedné za prepájanie vrodenej a adaptívnej imunity. Tieto bunky obsahujú tenké výbežky, ktoré zasahujú až do lúmenu kanálik [8].

Intraepiteliálne CD 20cy+ B- lymfocyty boli v našich vzorkách detegované iba v oblasti hlavy nadsemenníka. V tkanivových vzorkách nadsemenníkov u potkanov sa intersticiálne a intraepiteliálne B-lymfocyty doposiaľ nedetegovali, u ľudí boli prítomné v distálnom segmente v malých množstvách alebo vôbec. Najväčší počet intraepiteliálnych CD4 + T- pomocných lymfocytov guľovitého tvaru sme lokalizovali prevažne v blízkosti bazálnej membrány len v oblasti chvosta nadsemenníka. Vo vzorkách z oblasti hlavy a tela nadsemenníka sme tieto bunky väčšinou nedetegovali. V intersiciálnom priestore vykazovali CD4+ len slabú alebo zriedkavú expresiu.

Podobne ako v nadsemenníku, aj vo vajčkovode je dominantná populácia intraepitelových T-lymfocytov (CD3+, CD4+, CD8+) [9]. Varga a kol. (2019) [7] vo svojej štúdii detegovali prostredníctvom imunohistochemie „bazálne bunky“ lokalizované v rámci epitelu

vajíčkovodu. Išlo o intraepitelové (CD3+, CD8+, CD45RO+, CD4-, CD20-, CD56-, granzým B-) T- lymfocyty, ktoré sú zapojené do procesov imunologickej tolerancie.

Na základe porovnania oboch embryonálnych intermediárnych reprodukčných orgánov mezodermálneho pôvodu predpokladáme, že obidva môžu byť imunologicky privilegovanými orgánmi. Práca bola zameraná na detekciu imunitných buniek obsiahnutých v rámci epitelu ľudského nadsemenníka a na celkovú funkčnú a morfológickú charakteristiku týchto buniek.

Veríme, že porovnanie imunohistochemickej detekcie imunitných buniek v nadsemenníku s vajíčkovodmi napomôže k lepšiemu pochopeniu imunologickej tolerancie v týchto orgánoch.

Táto štúdia bola podporená grantom Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže SR č. VEGA 1/0347/24.

Zoznam použitej literatúry

1. Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, Hotaling JM, Giwercman A, Hwang K, Cheng YS, Lash, G. Male infertility. Nat Rev Dis Primers, 2023 14;9(1):49. doi: 10.1038/s41572-023-00459-w.
2. Voisin A, Saez F, Drevet JR, Guiton R. The epididymal immune balance: a key to preserving male fertility, Asian Journal of Andrology 2019, 21, 531–539.
3. Battistone MA, Elizagaray ML, Barrachina F, Ottino K, Mendelsohn AC, Breton S. Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear phagocytes in the epididymis, Andrology, 2023,12:10.1111/andr.13509. doi: 10.1111/andr.13509.
4. Chen H, Alves MBR, Belleanneé C. Human Reproduction Update, 2022, 28, 1, 51–66, Advance Access Publication on October 7, 2021. doi:10.1093/humupd/dmab029
5. Voisin A, Whitfield M, Soubeyrand ChD, Goubely Ch, Berger JH, Saez F, Kocer K, Drevet JR, Guiton F. Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise J Reprod Immunol 2018, 126:11-17. doi: 10.1016/j.jri.2018.01.003.
6. Barrachina F, Kiera Ottino K, Elizagaray ML, Gervasi MG, Tu LJ, Markoulaki S, Spallanzani RG, Capen D, Brown D, Battistone MA. Regulatory T cells play a crucial role in maintaining sperm tolerance and male fertility, Immunology and inflammation, Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 12;120(37):e2306797120. doi: 10.1073/pnas.2306797120.
7. Varga I, Miko M, Kachlík D, Žišková M, Danihel Ľ. Jr., Babál P. How many cell types form the epithelial lining of the human uterine tubes? Revision of the histological nomenclature of the human tubal epithelium. Annals of Anatomy, 2019, 224, 73–80
8. Battistone MA, Elizagaray ML, Barrachina F, Ottino K, Mendelsohn AC, Breton S. Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear phagocytes in the epididymis, Andrology, 2023,12:10.1111/andr.13509. doi: 10.1111/andr.13509.
9. Visnyaiova K, Varga I, Feitscherová C, Pavlíková L, Záhumenský J, Mikušová R. Morphology of the Immune Cells in the Wall of the Human Uterine Tube and Their

Possible Impact on Reproduction -Uterine Tube as a Possible Immune Privileged Organ.
Frontiers in cell and developmental biology

12. Stav kompenzácie diabetikov na Slovensku - retrospektívna analýza vyšetrení glykovaného hemoglobínu v rokoch 2019 – 2023

MUDr. Jankovský Martin

(vnútorné choroby)

Spoluautori: Nachtmann S.¹, Šmaha J.¹, Fuljer I.¹, Tibenská E.², Jackuliak P.¹, Payer J.¹

Školiteľ: doc. MUDr. Peter Jackuliak, PhD., MPH, FEFIM¹

¹V. interná klinika Lekárskej fakulty UK a UNB, Bratislava, ²Medirex, a. s.

Úvod

Riziko ťažkého priebehu infekcie COVID-19 je výrazne vyššie u pacientov s diabetes mellitus (DM). Vzhľadom na celosvetovú prevalenciu diabetu a neustály vzostup počtu diabetikov predstavuje ochorenie COVID-19 vážnu hrozbu pre početnú a zraniteľnú populáciu. Metabolická kompenzácia diabetikov sa sleduje prostredníctvom glykovaného hemoglobínu (HbA1c). Glykovaný hemoglobín vzniká neenzýmovou reakciou medzi hemoglobínom a glukózou v krvi. V klinickej praxi sa štandardne využíva na monitoring kontroly glykémie za obdobie posledných 2-3 mesiacov. Hodnota HbA1c sa vyjadruje v percentách (podľa DCCT – Diabetes Control And Complications Trial), alebo v mmol/mol (podľa IFCC – International Federation of Clinical Chemistry) (Tabuľka 1). Hladiny HbA1c odrážajú predpokladané riziko vzniku komplikácií spojených s DM. Pokles HbA1c odráža úspešnosť antidiabetickej liečby. V celonárodnom meradle je obrazom kvality poskytovanej zdravotnej starostlivosti o pacientov s DM. Významné zníženie návštev ambulantných pacientov a laboratórnych testov počas pandémie COVID-19 vyvolalo obavy z možných nedostatkov v liečbe cukrovky a kontrole glykémie.

		HbA1c-IFCC (mmol/mol)	HbA1c-DCCT (%)
Diagnostika DM	Bez diabetu	20 - 38	4,0 - 5,6
	Prediabetes	38 - 47,5	5,7 – 6,5
	DM	> 47,5	> 6,5
Kompenzácia DM	výborná	< 42	<6
	uspokojivá	- 58	6 - 7,5
	Neuspokojivá	>58	>7,5

Tab.1. Hodnoty HbA1c pri diagnostike a monitorovaní DM (podľa American Diabetes Association)

Materiál a metódy

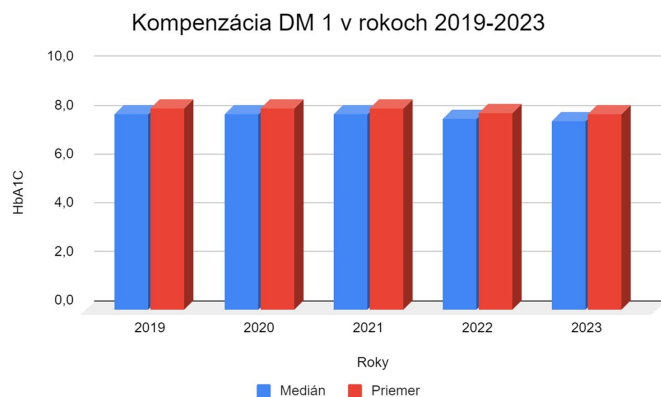
Retrospektívna analýza 425 965 hodnôt HbA1C vyšetrených v laboratóriách Medirex a.s. na celom území Slovenskej republiky (Tabuľka 2). V jednotlivých sledovaných parametroch sa údaje spracovali ako medián a priemer. Všetky získané údaje boli pred spracovaním anonymizované.

Výsledky

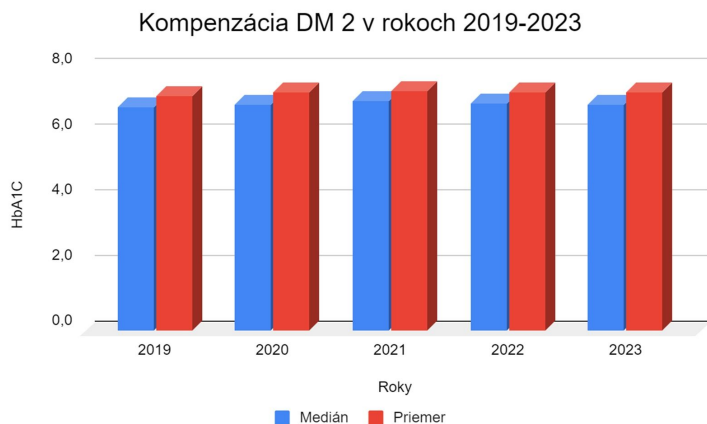
Skupina DM1T zahŕňa pacientov s anamnézou diabetu mellitus 1.typu (DM1T). DM2T zastupuje pacientov liečených pre diabetes mellitus 2.typu (DM2T). V súbore pacientov označených pod non-DM evidujeme pacientov bez známeho ochorenia cukrovky. V liečbe DM1T pozorujeme pokles mediánu HbA1c medzi rokmi 2019 – 2023 z 8% na 7,7% DCCT, priemer HbA1c poklesol z 8,2 na 8,0% DCCT. Najvyššie hodnoty sú vo veku 10-14, 15-19 a 20-24 rokov, s príslušajúcimi mediánmi 8,3, 8,5 a 8,3% a priermi 8,5, 8,8 a 8,6%. Vo veku 45-64 rokov je medián 8,0-8,2% a priemer 8,2-8,4% DCCT (Obrázok č. 1). Hodnoty HbA1c $\leq$ 7% dosahuje 26,77% pacientov, zatiaľ čo hodnoty HbA1c 9-10% resp. $>$ 10% dosahuje 13,44% a 14,33% pacientov. Napriek obdobiu COVID—19 došlo k zvýšeniu percentuálneho podielu pacientov s HbA1c $\leq$ 7%, z 24,44% v roku 2019 na 28,31% v roku 2023. V liečbe DM2T v rokoch 2019 – 2023 pozorujeme mierne zvýšenie mediánu HbA1c z 6,8 % na 6,9% DCCT, priemer HbA1c stúpol z 7,2% na 7,3% DCCT (Obrázok č. 2). Najvyššie hodnoty sú vo vekovej skupine 40 – 64 rokov, medián 7,0%, priemer 7,4 - 7,6% DCCT. Vo zvyšných vekových kategóriách je medián HbA1c $<$ 7,0% DCCT. Až 53,35% pacientov dosahuje HbA1c $\leq$ 7% a len 6,1% dosahuje HbA1c 9-10%, resp. 5,71% má hodnotu HbA1c nad 10% DCCT. Počet pacientov s HbA1c $\leq$ 7% v rokoch 2019 – 2023 je stabilný, 54,45% resp. 51,39% pacientov.

	Počet vyšetrení	Median HbA1C	Priemer HbA1C
DM1T	28 126	7,9	8,2
DM2T	375 219	6,9	7,3
non-DM	22 620	6,2	6,7
Celkový súčet	425 965	6,9	7,3

Tab.2. Medián a priemer hodnôt HbA1C vyšetrených v laboratóriách Medirex v období 2019-2023



Obrázok č. 1: Kompensácia diabetikov 1. typu v sledovanom období (hodnoty HbA1C sú uvedné podľa DCCT).



Obrázok č. 2: Kompensácia diabetikov 2. typu v sledovanom období (hodnoty HbA1C sú uvedné podľa DCCT).

Diskusia

Vďaka špecializovanej zdravotnej starostlivosti vrátane využívania moderných technológií

evidujeme zlepšenie dlhodobej metabolickej kompenzácie u pacientov s DM1T. Napriek pandémie COVID-19 počas celého sledovaného obdobia 2019–2023 malo viac ako 50 % pacientov s DM2T optimálnu metabolickú kompenzáciu s $\text{HbA1c} \leq 7\%$ DCCT. Silnou stránkou našej štúdie je robustná vzorka pacientov a dostupnosť hladín HbA1C. Limitáciou výsledkov je nezohľadnenie eventuality prítomných komplikácií, typu liečby a iných individuálnych faktorov. Naše zistenia sme neporovnávali s výsledkami pacientov bez diabetu. Hladina HbA1C závisí na niekoľkých faktoroch, ktorých zmeny môžu ovplyvniť hodnotu a následnú interpretáciu. HbA1C síce odráža stav kompenzácie v posledných 2–3 mesiacoch, avšak dôležité je či sa obdobie hyperglykémie vyskytovalo na začiatku alebo na konci sledovaného obdobia. [1] Ďalším faktorom, ktorý má vplyv na HbA1C je dĺžka prežívania erytrocytov. Ak sa táto doba skracuje, môžu byť výsledky HbA1C falošne nižšie. S týmto javom sa stretávame pri hematologických ochoreniach, hemolytických a kosáčikových anémiách, talasémiách alebo pri urémii. Naopak falošne vysoké hodnoty HbA1C sa popisujú pri sideropenických anémiách. [2] Vzhľadom na priebeh obidvoch ochorení (DM a COVID-19), ktoré sú významným spôsobom ovplyvnené aj behaviorálnymi faktormi (zníženie pohybovej aktivity, nárast sedavosti, zhoršenie stravovacích návykov, nárast hmotnosti, limitácia selfmonitoringu a menej časté ambulantné kontroly), sme predpokladali zhoršenie dlhodobej metabolickej kompenzácie diabetikov. [3] Odporúčaná postup v ambulantnej starostlivosti o pacientov s cukrovkou zahŕňa niekoľkokrát ročne odber krvi na pravidelné monitorovanie HbA1C. Prerušenia testovania v dôsledku spoločenských zmien, ako sú napríklad lockdowny počas pandémie COVID-19, môžu nepriaznivo ovplyvniť manažment cukrovky. Vynechanie pravidelných kontrol limituje skorú diagnostiku mikro aj makrovaskulárnych komplikácií cukrovky a tým k vyšším nákladom na zdravotnú starostlivosť. Významné zníženie návštev ambulantných pacientov a laboratórnych testov počas pandémie COVID-19 vyvolalo obavy z možných nedostatkov v liečbe cukrovky a kontrole glykémie. Hodnoty glykémie u ľudí s DM1T sa počas lockdownu COVID-19 zlepšili, čo môže súvisieť so zodpovednejším prístupom pacientov pri režimových opatreniach a využívaní moderných technológií. [4]

Zoznam použitej literatúry

1. Osterman-Golkar SM, Vesper HW. Assessment of the relationship between glucose and A1c using kinetic modeling. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2006 Sep 1;20(5):285-94.
2. Schnedl WJ, Liebminger A, Roller RE, Lipp RW, Krejs GJ. Hemoglobin variants and determination of glycated hemoglobin (HbA1c). *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2001 Mar;17(2):94-8.
3. Dicker D, Bettini S, Farpour-Lambert N, Frühbeck G, Golan R, Goossens G, Halford J, O'Malley G, Mullerova D, Ramos Salas X, Hassapiou MN. Obesity and COVID-19: the two sides of the coin. *Obesity facts*. 2020 Oct 8;13(4):430-8.
4. Di Dalmazi G, Maltoni G, Bongiorno C, Tucci L, Di Natale V, Moscatiello S, Laffi G, Pession A, Zucchini S, Pagotto U. Comparison of the effects of lockdown due to COVID-19 on

glucose patterns among children, adolescents, and adults with type 1 diabetes: CGM study. *BMJ Open Diabetes Research and Care*. 2020 Oct 1;8(2):e001664.

13. Liečba alfiberceptom neovaskulárnej VPDM v dvojročnom sledovaní.

MUDr. Ján Juhas

(oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Alena Trtlová²

Školiteľ: doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD. Min. prof.¹

¹Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava, ²Očná klinika, FN Nitra

Úvod

Vekom podmienená degenerácia makuly (VPMD) je hlavnou príčinou slepoty v industrializovanom svete. Je čoraz dôležitejším problémom verejného zdravia v dôsledku starnutia populácie a predlžujúcej sa dĺžky života. VPDM postihuje jedincov starších ako 55 rokov a ohrozuje zrakové funkcie potrebné pre úlohy, ako je čítanie, šoférovanie a rozpoznávanie tvárí. VPDM je charakterizovaná akumuláciou extracelulárnych usadenín, menovite drúz, spolu s progresívnou degeneráciou fotoreceptorov a priľahlých tkanív. Neovaskulárna VPDM je charakterizovaná choroidálnou neovaskularizáciou (CNV). Proliferácia krvných ciev u pacientov s neovaskulárnou VPDM je riadená zložitým procesom. Ktorý zahŕňa signálny proteín nazývaný vaskulárny endotelový rastový faktor A (VEGF-A). V súčasnej dobe sa liečba zameriava na lieky proti VEGF, ktoré blokujú tento proteín. S množstvom pacientov a vyťaženosťou aplikačných centier, dochádza k modifikáciám aj liečebných režimov. Postupne sa prechádza z fixných aplikačných schém k súčasnosti najpoužívanejšej aplikačnej schémy liečiť a predĺžiť, kedy pacient dostane liek pri každej návšteve centra, ale ďalšia návšteva sa plánuje na základe aktivity ochorenia. Nové liečby neovaskulárnej VPDM ponúkajú potenciálne dlhšie trvajúce účinky. (1,2)

Cieľom práce je porovnať funkčné výsledky s výsledkami z registračných štúdií a štúdií z reálnej klinickej praxe.

Materiál a metódy

V retrospektívnej analýze sme zhodnotili funkčný výsledok dvojročnej liečby antiVEGF. Aplikovaný bol aflibercept 2 mg intravitreálne. Fixný terapeutický režim v prvom roku prebiehal v súlade s dávkovaním uvedeným v SPC daného lieku. V druhom roku liečby, bol aplikovaný režim liečiť a predĺžiť.

Zaradení boli všetci pacienti z jednej ambulancie aplikačného centra pre antiVEGF liečbu:

- u ktorých bola liečba iniciovaná v rokoch 2017 – 2021,
- bez predchádzajúcej antiVEGF,
- s dokumentovanou dĺžkou liečby a sledovaním najmenej 24 mesiacov,

- počas doby sledovania nesmel pacient svojvoľne prerušiť liečbu na dlhšie ako 12 týždňov,
- spĺňali inklúzne a neboli prítomné žiadne exklúzne kritériá pre zahájenie liečby afliberceptom. Vstupná najlepšia korigovaná zraková ostrosť bola 20/32 – 20/200, mali prítomnú aktívnu neovaskulárnu membránu, neprekonalí infarkt alebo náhlu cievnu mozgovú príhodu za posledné 3 mesiace.

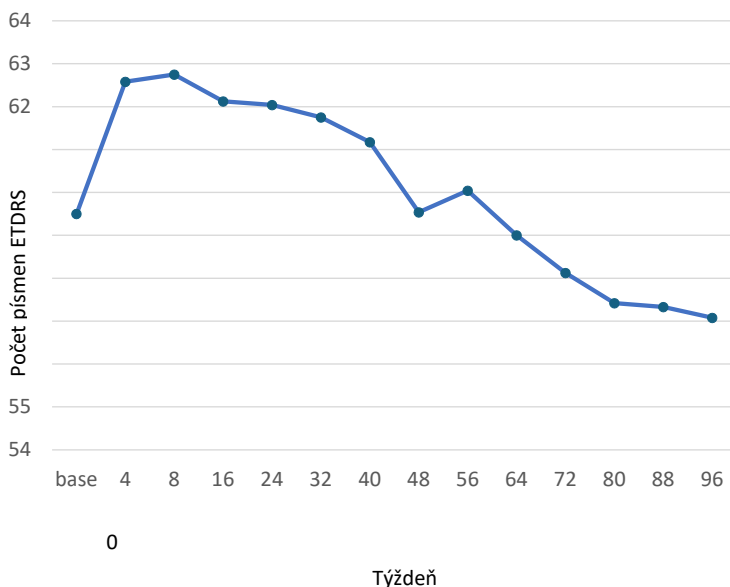
Vylučujúcim kritériom bola prítomnosť iného očného ochorenia ovplyvňujúceho najlepšiu korigovanú zrakovú ostrosť a vitreomakulárne rozhranie vyžadujúce chirurgickú intervenciu.

Výsledky

Do súboru bolo zaradených 22 pacientov (24 očí). V našom súbore bola prevaha žien, celkovo 16 voči 6 mužom. Priemerný vek pacientov v čase začatia liečby bol 74,76 rokov (SD 7,75), najmladší pacient mal 64 rokov, najstarší 90. Priemerná vstupná zraková ostrosť bola 59,50 písmen EDTRS (SD 12,56). Najmenšia hodnota bola 35 písmen, najväčšia 80 písmen.

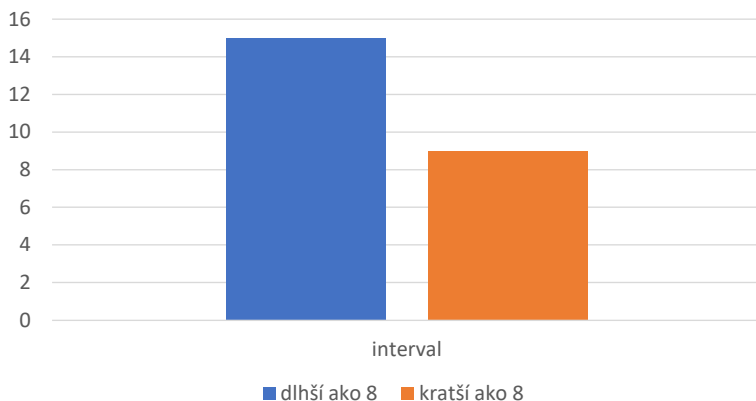
Priemerný počet injekcií počas doby sledovania bol 11,75. Najmenej bolo podaných 6 injekcií, najviac 21.

Po 48 týždňoch sledovania priemerná najlepšia korigovaná zraková ostrosť bola 59,54 písmen, čiže zlepšenie o 0,04 písmen EDTRS. V 96 týždni sledovania bola priemerná najlepšia korigovaná zraková ostrosť 57,08 písmen EDTRS, čiže pokles o 2,42 písmena.



Graf č.1: vývoj najlepšej korigovanej zrakovéj ostrosti počas sledovania

V druhom roku liečby 15 pacientov (62,5%) dosiahlo aplikačný interval medzi jednotlivými injekciami viac ako 8 týždňov. 9 pacientov (37,5%) potrebovalo v druhom roku aplikácie častejšie ako 8 týždňov.



Graf č.2: Rozdelenie pacientov podľa dĺžky aplikačného intervalu.

Diskusia

Cieľom antiVEGF liečby pri VPDM je dosiahnuť a dlhodobo udržať maximálne zlepšenie zrakovej ostrosti spolu s redukciou exsudácie v sietnici. Tiež chceme postupne znížiť množstvo injekcií. V ideálnom prípade pokračovať u pacientov len v sledovaní bez aplikácie antiVEGF terapie. Z našich údajov vyplýva, že v prvom roku terapie sme pacientom nesignifikantne zlepšili videnie o +0,04 písmena a redukovali exsudáciu. Pacienti sú naďalej liečení. V druhom roku sa nám však nedarí udržať pozitívne účinky terapie na zrakovú ostrosť a dochádza k poklesu zrakovej ostrosti o 2,42 písmena.

V registračných štúdiách VIEW I a VIEW II, dosiahli pacienti v ramene 2q8, odpovedajúcim aplikačnej schéme ako v platnom SPC, zisk 7,6 písmen ETDRS v 48 týždni sledovania, teda v prvom roku. (3) V následnom predĺžení do 96 týždňa pri zachovaní fixného režimu aplikácií, pacienti dosiahli zisk 8,35 písmen ETDRS. (4)

Novšou štúdiou zapájajúc režim aplikácií liečiť a predĺžiť je štúdia ALTAIR. Podľa tejto štúdie pri liečbe afliberceptom došlo v prvom roku zisku 9,0 písmen ETDRS. V druhom roku 7,6 písmen ETDRS. (5)

V reálnej klinickej praxi bohužiaľ dosiahnutie výsledkov z randomizovaných štúdií nie je jednoduchá. V praxi musíme rátať s mnohými faktormi či už na strane pacienta, keď sa pacient nemôže dostaviť na aplikáciu pre ďalšie jeho ochorenia, ale iné problémy spojené s dopravou. Komplikácie sa bohužiaľ vyskytujú aj na strane poskytovateľov, ako je napríklad problém nájsť

vhodný termín pre vyťaženie pracoviska, ale komplikácie súvisiace s úhradou liečby kedy sa čaká na vyjadrenie poisťovne.

Príkladom pozorovania z klinickej praxe je štúdia RAINBOW z Francúzska. Pacienti dodržiavajúci aplikačné intervaly získali 7,6 písmen v prvom roku a 4,9 v druhom roku. Pokiaľ pacienti nedodržiavali pravidelné aplikačné intervaly, ale dostali v úvode 3 nasycovacie dávky získali priemerne 5,5 písmena v prvom roku a v druhom si udržali zisk 4,0 písmen EDTRS. Ak nedodržiavali aplikačné intervaly a nedostali úvodné nasycovacie dávky, v prvom roku získali priemerne 0,01 písmena, v druhom roku stratili 2,5 písmena. (6)

Podobná štúdia z reálnej klinickej praxe bola realizovaná aj v Nemecku, štúdia PERSEUS. Pacienti s pravidelným aplikačným intervalom získali v prvom roku 8,0 písmen a v druhom 6,7 písmen EDTRS. Pokiaľ nedodržiavali aplikačné intervaly zaznamenali zisk 4,0 písmen v prvom roku a 1,8 v druhom. (7)

Výsledky v našom súbore veľmi pripomínajú poslednú skupinu zo štúdie RAINBOW. Neznamená to však, že úvodný rok liečime menej efektívne. V našom prípade slabšie zisky zrakové ostrosti sú ovplyvnené malým počtom pacientov. V súbore sa nachádzajú traja pacienti, u ktorých došlo k výraznému zhoršeniu najlepšej korigovanej zrakové ostrosti pri progresii ochorenia do fibrotickej jazvy. V súbore sa nachádza viac pacientov s ťažšou formou ochorenia, keďže pri uvedení afliberceptu na trh bol predpoklad silnejšieho efektu voči dovtedy dostupným preparátom na trhu, ktorý sa však nepotvrdil. Naši pacienti mali teda závažnejšie poškodenie pri VPDM a teda priestor na zlepšenie videnia bol menší. V našej štúdii ide o klinicky primerané zlepšenie videnia vzhľadom na degeneratívny charakter ochorenia.

Zoznam použitej literatúry

1. Guymer RH, Campbell TG. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2023 Apr 29;401(10386):1459-1472. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02609-5. Epub 2023 Mar 27. PMID: 36996856.
2. Fleckenstein M, Keenan TDL, Guymer RH, Chakravarthy U, Schmitz-Valckenberg S, Klaver CC, Wong WT, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 May 6;7(1):31. doi: 10.1038/s41572-021-00265-2. PMID: 33958600.
3. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, Stahl N, Vittori R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Groetzsch G, Sommerauer B, Sandbrink R, Simader C, Schmidt-Erfurth U; VIEW 1 and VIEW 2 Study Groups. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012 Dec;119(12):2537-48. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.09.006. Epub 2012 Oct 17. Erratum in: *Ophthalmology*. 2013 Jan;120(1):209-10. PMID: 23084240.
4. Wong TY, Cheung CMG, Lai TTY, Chen SJ, Lee WK, Yoon YH, Iida T, Tueckmantel C, Sowade O, Ogura Y. EFFICACY AND SAFETY OF INTRAVITREAL AFLIBERCEPT AND RANIBIZUMAB IN ASIAN PATIENTS WITH NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: Subgroup Analyses From the VIEW Trials. *Retina*. 2019 Mar;39(3):537-547. doi: 10.1097/IAE.0000000000001986. PMID: 29280937; PMCID: PMC6410967.
5. Ohji M, Takahashi K, Okada AA, Kobayashi M, Matsuda Y, Terano Y; ALTAIR Investigators. Efficacy and Safety of Intravitreal Aflibercept Treat-and-Extend Regimens in Exudative

Age-Related Macular Degeneration: 52- and 96-Week Findings from ALTAIR : A Randomized Controlled Trial. *Adv Ther.* 2020 Mar;37(3):1173-1187. doi: 10.1007/s12325-020-01236-x. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32016788; PMCID: PMC7089719.

6. Weber, M., Dominguez, M., Coscas, F. et al. Impact of intravitreal aflibercept dosing regimens in treatment-naïve patients with neovascular age-related macular degeneration: 2-year results of RAINBOW. *BMC Ophthalmol* 20, 206 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01468-z>
7. Framme C, Eter N, Hamacher T, Hasanbasic Z, Jochmann C, Johnson KT, Kahl M, Sachs H, Schilling H, Thelen U, Wiedemann P, Wachtlin J; Prospective Noninterventional Study to Assess the Effectiveness of Aflibercept in Routine Clinical Practice in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration Study Group. Aflibercept for Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration in Routine Clinical Practice in Germany: Twelve-Month Outcomes of PERSEUS. *Ophthalmol Retina.* 2018 Jun;2(6):539-549. doi: 10.1016/j.oret.2017.09.017. Epub 2017 Nov 20. PMID: 31047606.

14. Identification of bacteria directly from the whole blood by targeted nanopore sequencing

Mgr. Tomáš Strečanský

(normal and pathological physiology)

Co-authors: Michal Tamáš², Róbert Lipták², Diana Rusňáková^{3,5}, Tomáš Szemes^{3,4,5}, Ľubomíra Tóthová¹, Július Hodosy^{1,2}

Tutor: doc. MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, ² Institute of Physiology, Faculty of Medicine, Comenius University, ³ Comenius University Science Park,

⁴ Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University

⁵ Geneton s.r.o.

Introduction

Infectious diseases are considered as the cause of 19.7 % of all global deaths [1]. Serious infections evolving into sepsis and septic shock are among the most expensive hospital conditions [2]. Their treatment is primarily based on antibiotics [3]. However, the ability of pathogens to adapt and develop new forms of resistance is faster than the ability to discover new treatment methods. The development of antibiotic resistance is thus considered one of the greatest challenges of the coming decades, with consequences comparable to those of climate change (a 4% decline in global GDP by 2050) [4].

In addition to researching new treatment methods, improving the diagnosis of infection and antibiotic resistance is a crucial aspect of combating antibiotic resistance [5]. The current gold standard for diagnosis is a time-consuming culture of biological samples, taking 48 to 96 hours for results [6, 7]. In critical conditions such as sepsis, medical personnel is forced to administer empirical antibiotic treatment, which may be ineffective in some cases, contributing to the development of resistant pathogens and worsening the patient's condition [8]. To overcome this problem, more rapid method should be applied. Isolation of pathogens and their DNA directly from biological samples and analysis of them by emerging molecular methods have potential to eliminate the need for time-consuming hemocultivation [7].

Bacteria have different sedimentation velocity compared to other blood elements. Selective centrifugation could be used to rapidly separate bacteria directly from blood. Followed by nanopore sequencing, time needed for identification of the pathogen could be significantly reduced. Nanopore sequencing is a novel sequencing technology, that allows real-time sequencing analysis at low costs when connected to a standard computer. Although not widely used in clinical practice yet due to limited results, the increasing utilization of nanopore sequencing in research suggests its eventual incorporation into clinical practice [9].

Materials and methods

E. coli CFT073 were cultured in LB broth during the night. At the morning, bacterial suspension was diluted to OD600 equals to one. Whole blood from healthy donors was withdrawn into EDTA blood collection tubes and artificially spiked with *E. coli* CFT073 in 4 different concentrations (80,000 - 80 CFU/ml) and with LB broth as negative control. Triplicates from each concentration were centrifuged at two centrifugal speeds - 1,600g 10 min or at 350g 20 min. Supernatants from all samples were firstly dropped onto the agar plate and then pipetted into new Eppendorf tubes and centrifuged at 16,000g 10 min. The pellet was used for DNA isolation by Qiagen DNA Mini Kit. All samples were analysed by qPCR targeting V7-V9 region of 16S rRNA and sequenced by 16S barcoding kit (SQK-RAB204) on MinION Flowcell (R.9.4.1) and 16S V3-V4 Illumina Seq by a MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle). Nanopore sequencing results were analysed by Epi2me WIMP program. Illumina sequencing results were firstly demultiplexed, filtered based on quality ($Q>20$) and trimmed by Cutadapt (v3.4). Amplicon sequencing variants were created by DADA2. Taxonomic analysis was done in Silva database 138.1 with help of q2-feature-classifier. Statistical analysis and graphs were created in GraphPad Prism (8.0.2). For comparison of the results, we used multiple t-test. Statistical significance was determined by Holm-Šidák method when alpha value was ≤ 0.05 .

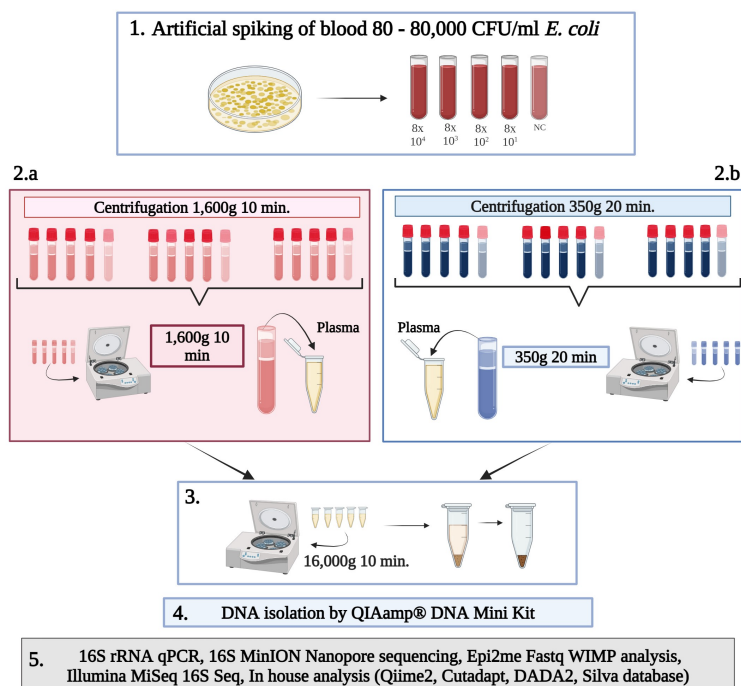
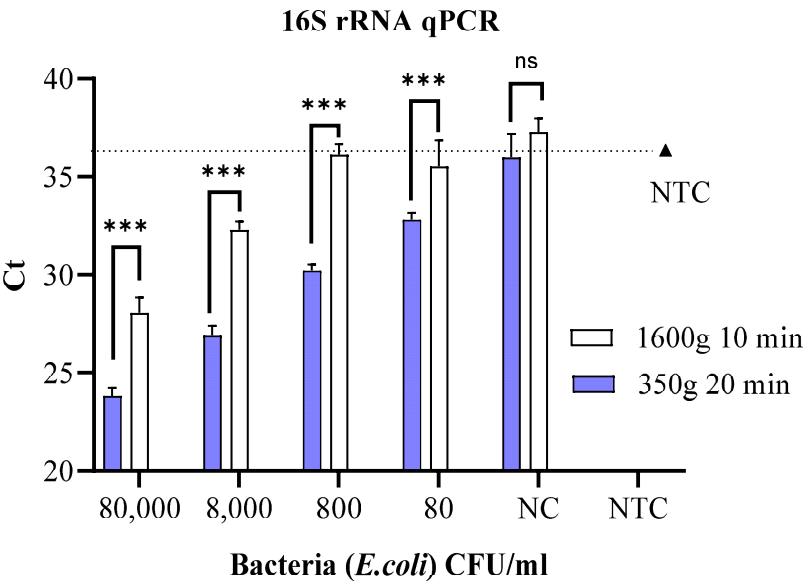


Image 1 – Schematic structure of methods of the experiment

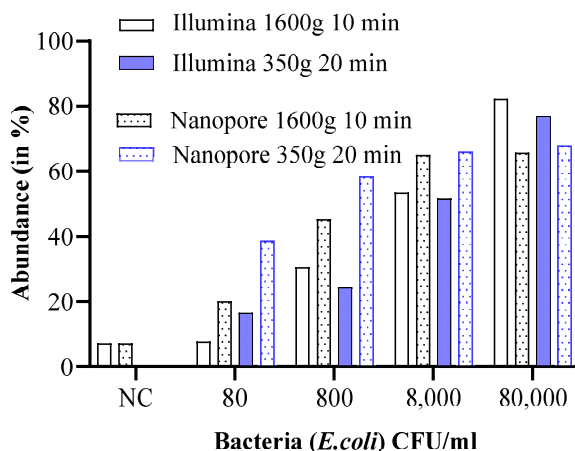
Results

16S rRNA qPCR results of samples centrifuged at 350g 20 min were 23.83 ± 0.41 , 26.91 ± 0.49 , 30.20 ± 0.33 , 32.81 ± 0.35 , 35.99 ± 1.19 and at 1,600 g 10 min were 28.05 ± 0.78 , 32.30 ± 0.44 , 36.13 ± 0.53 , 35.53 ± 1.33 , 37.27 ± 0.70 . Blood samples centrifuged at 350g for 20 minutes have significantly lower Ct value compared to samples centrifuged at 1600g 10 minutes. All samples centrifuged at 350g for 20 minutes had significantly lower Ct when compared to no template control (NTC). Only two highest concentrations of bacteria from samples centrifuged at 1600g for 10 minutes had significantly lower Ct value compared to NTC.



Graph 1 – 16S rRNA qPCR results of every concentration of artificially spiked bacteria from DNA isolated from pellet obtained after second centrifugation step 16,000g 10 minutes (Ct – cycle threshold, NTC – no template control)

Nanopore and Illumina sequencing - abundance of *E. coli* (in %)



Graph 2 – Comparison of abundance of reads aligned to genome of *E. coli* from both sequencing methods and both centrifugation speeds

Number of reads aligned to *E. coli* by Epi2me WIMP analysis of nanopore sequencing results from samples centrifuged at 350g 20 min were 55975, 2564, 396, 121, 0 and at 1,600g 10 min were 4199, 3169, 472, 55, 4 (80,000 – 80 CFU/ml, NC), respectively. Number of reads aligned to *E. coli* by analysis of 16S Illumina sequencing results from samples centrifuged at 350g 20 minutes were 46201, 32165, 12011, 8469, 0 and at 1,600g 10 min were 45548, 23524, 9187, 2204, 0 (80,000 – 80 CFU/ml, NC), respectively. Abundance of reads aligned to *E. coli* by Epi2me WIMP analysis of nanopore sequencing results from samples centrifuged at 350g 20 min were 67.9%, 66.0%, 58.5%, 38.7%, 0% and at 1,600g 10 min were 65.8%, 65.1%, 45.3%, 20.1%, 7.2% (80,000 – 80 CFU/ml, NC), respectively. Abundance of reads aligned to *E. coli* by analysis of 16S Illumina sequencing results from samples centrifuged at 350g 20 min were 76.9%, 51.7%, 24.4%, 16.6%, 0% and at 1,600g 10 min were 82.3%, 53.5%, 30.6%, 7.7%, 0% (80,000 – 80 CFU/ml, NC), respectively.

Discussion

Emerging molecular methods aim to replace gold-standard hemocultivation technique to reveal the information about the pathogens that cause infections. The major problem is isolation of bacteria directly from blood, without prior time-consuming cultivation step [7]. In our experiment, we decided to use simple, cost and time effective centrifugation method. We compared two different centrifugation speeds based on previously published theoretical calculation of sedimentation velocity of bacteria and different blood elements [10]. 1,600g 10

minutes is centrifugation standardly used for separation of plasma from the whole blood [11]. 350g 20 minutes was adopted from protocol to isolation of blood platelets, that have been calculated the most similar sedimentation speed [12]. Based on the results from 16S rRNA qPCR we consider lower centrifugation speed 350g for 20 minutes to be sensitive enough for the isolation of bacteria *E. coli* down to 80 CFU/ml of artificially spiked blood. Based on the comparison of sequencing results, we found that nanopore sequencing seems to be more sensitive for identification of bacteria at lower concentrations. Illumina sequencing results provided higher number of bacterial reads compared to result from nanopore sequencing. These results suggest the nanopore sequencing may be a relevant diagnostic tool for real-time diagnosis of pathogens directly at ICU. Up to know, we did not notice similar optimization method for evaluating nanopore and Illumina sequencing. However, there are several studies that aims to omit cultivation step and identify pathogens directly from blood [13-15].

Drawback of this targeted method is providing the information only about the type of the pathogen. For effective use in clinical practice, it is inevitable to provide information also about pathogenicity and antimicrobial resistance. In the future, we aim to replace this targeted method by whole genome amplification, that could potentially enable selective amplification of the whole genomes of pathogens and reveal besides the classification of pathogens also its pathogenicity and antimicrobial resistance.

The project was supported by grant from Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak republic VEGA No.: 1/0573/21 and Slovak Research and Development Agency No.: APVV-20-0472

References

1. Rudd, K.E., et al., Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 2020. 395(10219): p. 200-211.
2. Liu, V., et al., Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *Jama*, 2014. 312(1): p. 90-2.
3. Evans, L., et al., Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med*, 2021. 49(11): p. e1063-e1143.
4. Mestrovic, T., et al., The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: A cross-country systematic analysis. *The Lancet Public Health*, 2022. 7(11): p. e897-e913.
5. Fabre, V., K.C. Carroll, and S.E. Cosgrove, Blood culture utilization in the hospital setting: a call for diagnostic stewardship. *Journal of clinical microbiology*, 2022. 60(3): p. e01005-21.
6. Opota, O., et al., Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect*, 2015. 21(4): p. 313-22.
7. Sinha, M., et al., Emerging technologies for molecular diagnosis of sepsis. *Clinical microbiology reviews*, 2018. 31(2): p. 10.1128/cmr.00089-17.
8. Champion, M. and G. Scully, Antibiotic Use in the Intensive Care Unit: Optimization and De-Escalation. *J Intensive Care Med*, 2018. 33(12): p. 647-655.

9. Chen, P., et al., Portable nanopore-sequencing technology: Trends in development and applications. *Front Microbiol*, 2023. 14: p. 1043967.
10. Pitt, W.G., et al., Rapid separation of bacteria from blood-review and outlook. *Biotechnol Prog*, 2016. 32(4): p. 823-39.
11. Janovičová, Ľ., et al., Isolation and Quantification of Extracellular DNA from Biofluids. *Bio Protoc*, 2020. 10(16): p. e3726.
12. Burzynski, L.C., N. Pugh, and M.C.H. Clarke, Platelet Isolation and Activation Assays. *Bio Protoc*, 2019. 9(20): p. e3405.
13. Grumaz, C., et al., Rapid Next-Generation Sequencing-Based Diagnostics of Bacteremia in Septic Patients. *J Mol Diagn*, 2020. 22(3): p. 405-418.
14. Blauwkamp, T.A., et al., Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat Microbiol*, 2019. 4(4): p. 663-674.
15. Charalampous, T., et al., Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat Biotechnol*, 2019. 37(7): p. 783-792.

15. Morfológia vnútorného ucha pri Branchio-oto-renálnom syndróme

MUDr. Diana Ugorová

(otorinolaryngológia)

Spoluautori: RNDr. Silvia Borecká, PhD.², Mgr. Marek Sklenár², RNDr. Daniela Gašperíková DrSc.²

Školiteľ: Doc. MUDr. RNDr. Lukáš Varga, PhD.^{1,2}

¹ Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB, Bratislava, ² DIABGENE, Biomedicínske Centrum SAV, Bratislava

Úvod

Branchio-oto-renálny syndróm (BOR) sa vyskytuje u 1 zo 40 000 pacientov (1). Je charakterizovaný malformáciami vonkajšieho, stredného a vnútorného ucha asociovanými s prevodovou, senzorineurálnou alebo zmiešanou poruchou sluchu. Ďalej sa prejavuje branchiálnymi fistulami a cystami a renálnymi malformáciami od ľahkej renálnej hypoplázie po bilaterálnu renálnu agenézu. Ochorenie môže viesť ku konečnému štádiu renálnej insuficiencie v neskoršom veku (2). Približne 40-75 % je asociovaných s patogénnymi variantmi génu EYA1, 0-3,1 % s génom SIX5 a 2 % s génom SIX1 (3). EYA1 a SIX1 gény sa podieľajú na organogenéze u cicavcov, vrátane vývinu ucha. SIX1 gén kóduje transkripčný faktor a jeho aktivácia je závislá od spojenia s EYA proteínmi na terminály N. Porucha funkcie týchto génov vedie k rôznym vývinovým chybám, ako je to pri BOR syndróme (4).

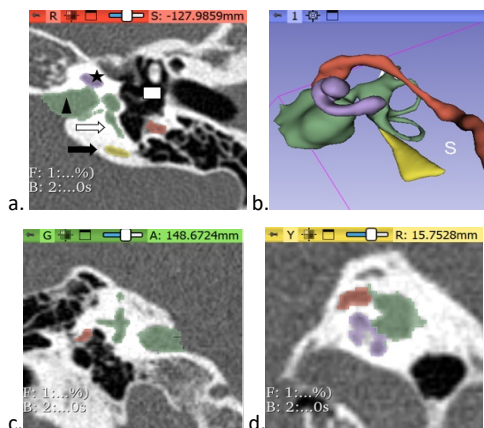
Fenotyp pacientov s BOR je komplexný a rôznorodý, či už medzi jednotlivými probandmi, ale aj medzi členmi rodiny. Dokazuje to napríklad aj incidencia malformácií vnútorného ucha, ktorá je pri BOR v 18 až 92 % (5). Skupina malformácií pri BOR zahŕňa kochleárnu hypopláziu (CH), dyspláziu semicirkulárnych kanálikov (SCC), rozšírený vestibulárny akvedukt (EVA), stenózu kochleárnej apertúry, abnormálnu pozíciu tvárového nervu či bulbózný vnútorný zvukovod (IAC) (6).

Materiál a metódy

V našej retrospektívno-prospektívnej štúdii sme zahrnuli pacientov s obojstrannou poruchou sluchu, ktorí podstúpili molekulárno-genetické vyšetrenie v období medzi rokom 2011 a 2023. U pacientov s potvrdeným patologickým variantom v génoch EYA1 a SIX1, sme vo formáte DICOM pomocou softvéru TomoCon Viewer (TatraMed Software, Bratislava, SR) analyzovali CT zobrazenia na prítomnosť a typ malformácie vnútorného ucha. V axiálnych rezoch sme manuálnym meraním získali priemer (7,4-10 mm) (7), výšku (4,4-5,9 mm) (8) a šírku (5,7-7,5 mm) (9) kochley (10). Zároveň sme podľa metódy od Juliano a spol. (11) vypočítali „turn alignment ratio“ (TAR) pre určenie kochleárneho posunu (cochlear offset) (TAR <0,476). Následne sme v axiálnych rezoch merali šírku kochleárnej apertúry (stenóza: <1,4mm, hraničný: 1,4-1,8mm, nestenotický: >1,8mm, rozšírený: >3mm) (12,13); dĺžku IAC (4-18 mm)

(14), šírku proximálneho konca IAC (stenóza: <2mm, norma: 4-8 mm), šírku v strede IAC (2,4-6,4 mm) (15,16), šírku kostného ostrovčeka laterálneho SCC (norma: 2,6-4,8 mm) (8) a polohu a šírku kanála tvárového nervu (rozšírený: >1,42 mm). Na základe Cincinnati kritérií sme hodnotili prítomnosť rozšíreného vestibulárneho akveduktu (šírka VA v oblasti operkula $\geq 2,0$ mm) (17,18).

Malformácie kochley boli následne hodnotené podľa klasifikácie malformácií od Sennaroglu a Bajin z roku 2017 (19). Pomocou softvéru 3D Slicer (verzia 5.0.3.) freeware (<https://www.slicer.org/>) sme realizovali manuálnu segmentáciu snímkov a vytvorili 3D model jednotlivých anatomických štruktúr vnútorného ucha (Obr.1). Z 3D rekonštrukcie sme následne pomocou funkcie Segment statistics automaticky vypočítali objem kochley (hypoplázia <60 mm³) (20). Merania sme následne porovnali medzi skupinami pacientov s EYA1 a SIX1 patologickým variantom (ďalej uvádzané ako skupina EYA1 a SIX1). Štatistické spracovanie meraní bolo pomocou Studentovho t-testu. Fisherov presný test bol použitý na štatistické spracovanie kategorických dát. Ako štatisticky signifikantné sme brali výsledky s $p < 0.05$.



Obr.1 CT spánkovej kosti vľavo – manuálna segmentácia (a, c, d) a 3D rekonštrukcia jednotlivých štruktúr vnútorného ucha (b) pomocou 3D Slicer softvéru (verzia 5.0.3.). Použité symboly v Obr.1a: trojuholník – vnútorný zvukovod, obdĺžnik – bubienková dutina, čierna šípka – vestibulárny akvedukt, biela šípka – laterálny semicirkulárny kanálik, hviezdička – kochlea.

Výsledky

Celkovo z 2131 pacientov, ktorí podstúpili molekulárno-genetické vyšetrenie pre obojstrannú poruchu sluchu, bol u 32 (9 probandov a 23 rodinných príslušníkov) z nich identifikovaný Branchio-oto-renálny syndróm. Patologický variant v géne EYA1 bol prítomný u 23 pacientov a v géne SIX1 u 9 pacientov. Z nich 13 pacientov (26 uší) podstúpilo CT zobrazenie spánkových

kostí v dobrej kvalite (11 pacientov v skupine EYA1 a 2 v skupine SIX1). Snímky sme vyhodnotili podľa vyššie spomínaných parametrov.

U všetkých uší sme našli kochleárny posun a kochleárnu hypopláziu. Hodnota TAR pre kochleárny posun bola v priemere $0,33 \pm 0,07$. Kochleárnu hypopláziu sme hodnotili na základe kochleárneho objemu, ktorý bol v priemere $43,88 \pm 9,22 \text{ mm}^3$ (Tab.1).

Tabuľka č.1 Rádiologické merania anatomických štruktúr spánkovej kosti.

Anatomická štruktúra	Parameter	Priemer	SD	Referenčné hodnoty
Kochlea	Výška (mm)	2,90	0,30	4,4-5,9
	Šírka (mm)	3,99	0,66	5,7-7,5
	Priemer (mm)	7,73	0,55	7,4-10
	TAR	0,33	0,07	>0,476
	Objem (mm ³)	43,88	9,22	>60
Kochleárna apertúra	Šírka (mm)	1,75	0,34	1,8-2,9
Vestibulárny akvedukt (operkulum)	Šírka (mm)	2,10	2,17	<2,0
Vnútný zvukovod	Dĺžka (mm)	7,81	1,04	4-18
	Šírka proxim. konca (mm)	6,48	1,44	4-8
	Stredová šírka (mm)	5,93	1,46	2,4-6,4
Kostný ostrovček LSCC	Šírka (mm)	2,44	0,73	2,6-4,8
Kanál tvárového nervu	Šírka (mm)	2,00	0,72	<1,42

TAR – „turn alignment ratio“, LSCC – laterálny semicirkulárny kanálik

Stenóza kochleárnej apertúry bola prítomná u jedného pacienta bilaterálne (8 %) a hranične prítomná u 15 (58 %) uší. Dyspláziu kostného ostrovčeka LSCC sme zaznamenali u 15 (58 %) uší. Rozšírený vestibulárny akvedukt bol prítomný u 7 (27 %) uší. Stenóza vnútorného zvukovodu nebola nájdená u žiadneho z pacientov. Rozšírený kanál tvárového nervu sme našli u väčšiny a to celkovo u 19 (73 %) uší a jeho mediálna poloha bola zároveň prítomná v 18 (69 %) prípadoch.

Tabuľka 2. Vyhodnotenie meraní vnútorného ucha a porovnanie skupiny EYA1 a SIX1.

Anatomická štruktúra	Parameter	EYA1			SIX1			p hodnota
		n	Priemer	SD	n	Priemer	SD	
Kochlea	Výška (mm)	22	2,90	0,23	4	3,21	0,53	0,0633
	Šírka (mm)	22	3,81	0,56	4	4,94	0,24	0,0006
	Priemer (mm)	22	7,61	0,51	4	8,38	0,15	0,0067
	TAR	22	0,33	0,07	4	0,37	0,05	0,2713
	Objem (mm ³)	22	42,31	8,89	4	52,50	6,20	0,0392
Kochleárna apertúra	Šírka (mm)	22	1,66	0,24	4	2,26	0,42	0,0004
Vestibulárny akvedukt (operkulum)	Šírka (mm)	22	2,29	2,31	4	1,04	0,26	0,296
Vnútorný zvukovod	Dĺžka (mm)	22	7,79	0,98	4	7,89	1,53	0,868
	Šírka proximálneho konca (mm)	22	6,11	1,25	4	8,46	0,42	0,0012
	Stredová šírka (mm)	22	5,61	1,32	4	7,70	0,76	0,0059
Kostný ostrovček LSCC	Šírka (mm)	22	2,34	0,76	4	2,90	0,32	0,1683
Kanál tvárového nervu	Šírka (mm)	22	2,12	0,73	4	1,37	0,07	0,053
	Mediálna poloha ?	18	Áno		4	Nie		0,0047

TAR – „turn alignment ratio“, LSCC – laterálny semicirkulárny kanálik

Štatisticky signifikantný rozdiel ($p < 0.05$) medzi skupinami pacientov s EYA1 a SIX1 bol celkovo v 8 zo 14 kategórií (57 %) (Tab.2). Pacienti v skupine SIX1 mali signifikantne väčšiu šírku (SIX1 $4,94 \pm 0,24$ mm vs. EYA1 $3,81 \pm 0,56$ mm, $p = 0.006$) a priemer kochley (SIX1 $8,38 \pm 0,15$ mm vs. EYA1 $7,61 \pm 0,51$ mm, $p = 0,0067$), čo sa odrazilo aj na celkovom objeme kochley (SIX1 $52,5 \pm 6,21$ mm vs. EYA1 $42,31 \pm 8,89$ mm, $p = 0,0392$). Signifikantný rozdiel bol takisto v stredovej šírke (SIX1 $7,7 \pm 0,76$ mm vs. EYA1 $5,61 \pm 1,32$ mm) a šírke proximálneho konca vnútorného zvukovodu (SIX1 $8,46 \pm 0,42$ mm vs. EYA1 $6,11 \pm 1,25$ mm).

Kochleárna hypoplázia sa delila na dva typy: typ 4 identifikovaný bilaterálne u 5 pacientov v skupine EYA1 a bilaterálne u dvoch pacientov v skupine SIX1; typ 3 nájdený bilaterálne u 6 pacientov v skupine EYA1.

Atypické uloženie labyrintového segmentu kanála tvárového nervu v mediálnej polohe bolo prítomné v 18 (82 %) prípadoch v skupine EYA1 a nebolo prítomné vôbec v skupine SIX1 ($p = 0,0047$). Napriek značnému rozdielu v šírke kanála tvárového nervu medzi EYA1 ($2,12 \pm 0,73$) a SIX1 ($1,37 \pm 0,07$) skupinami, tento parameter nebol signifikantne odlišný ($p = 0,053$).

Diskusia

Branchio-oto-renálny syndróm je raritné, geneticky podmienené ochorenie, ktoré postihuje viaceré orgánové systémy. Výskyt u dospelých populácie nie je známy, avšak prevalencia medzi pediatrickými pacientmi v západných krajinách je 1/40 000 (2). Je to zároveň veľmi heterogénne ochorenie, ktoré sa líši nielen medzi probandmi ale aj medzi rodinnými príslušníkmi, čo je vidieť aj u pacientov v našom súbore (5). Spoločnými morfológickými znakmi sú kochleárny posun ($TAR < 0,476$) a kochleárna hypoplázia (objem kochley $< 60 \text{ mm}^3$), ktoré sme našli u všetkých našich pacientov. Objem kochley bol už v minulosti hodnotený v súvislosti so závažnosťou poruchy sluchu (21), či pri posudzovaní zachovania zvyškov sluchu pri kochleárnej implantácii (22). Breitsprecher a spol. v roku 2022 prvýkrát kvantifikovali hranicu pre kochleárnu hypopláziu na objem menší ako 60 mm^3 (20). V priemere bol objem kochley u našich pacientov $43,88 \pm 8,89 \text{ mm}^3$, čo zodpovedá kochleárnej hypoplázii. Navyše sme zaznamenali signifikantný rozdiel v priemere kochleárných objemov medzi skupinou SIX1 ($52,50 \pm 6,2 \text{ mm}^3$) a EYA1 ($42,31 \pm 8,89 \text{ mm}^3$) ($p = 0,0392$). Nie sme si vedomí, že by bol kochleárny objem meraný v minulosti v iných štúdiách u pacientov s BOR syndrómom alebo porovnaný medzi skupinami pacientov s patologickým variantom v génoch EYA1 a SIX1.

Typologicky spadajú pacienti s patologickým variantom v géne EYA1 do skupiny s kochleárnou hypopláziou typ 4, nie je tomu tak však u všetkých našich pacientov. Šiesti pacienti spadajú do kategórie kochleárnej hypoplázie typu 3. Tento fakt je nezvyčajný a nekoreluje s poznatkami z iných štúdií (23). Naopak fenotyp SIX1 zväčša nezahŕňa kochleárnu hypopláziu typu 4 (6), tá sa však nachádza u oboch našich pacientov v skupine SIX1.

Stenóza kochleárnej apertúry bola prítomná iba u jedného pacienta a to bilaterálne. Hraničnú stenózu kochleárnej apertúry sme však zaznamenali u 15 uší, z toho 14 bolo u pacientov zo skupiny EYA1 a u jedného pacienta unilaterálne zo skupiny SIX1. V priemere bol teda rozmer kochleárnej apertúry pre skupinu EYA1 $1,66 \pm 0,24 \text{ mm}$ a pre skupinu SIX1 $2,26 \pm 0,42 \text{ mm}$ ($p = 0,0004$). Pacienti s patologickým variantom v géne SIX1 majú veľmi zriedkavo stenózu kochleárnej apertúry (6), čomu zodpovedajú aj naše výsledky.

Mediálna poloha tvárového nervu bola prítomná u 69 % pacientov, čo koreluje s výsledkami v zahraničných rádiologických štúdiách pacientov s BOR syndrómom. Mediálny posun, ale aj rozšírenie kanála tvárového nervu je asociovaný s kochleárnou hypopláziou a s BOR syndrómom ako takým (24). V našom súbore bol kanál tvárového nervu rozšírený v 73 % prípadov, v priemere $2,0 \pm 0,72 \text{ mm}$.

Stenózu vnútorného zvukovodu sme nezaznamenali u žiadneho z pacientov, avšak našli sme signifikantný rozdiel v šírke proximálneho konca (SIX1 $8,46 \pm 0,42 \text{ mm}$ vs. EYA1 $6,11 \pm 1,25$

mm) a v stredovej šírke (SIX1 $7,7 \pm 0,76$ mm vs. EYA1 $5,61 \pm 1,32$ mm) vnútorného zvukovodu medzi skupinami EYA1 a SIX1. Podľa Bächingera a spol. (25) v prípade kochleárnej hypoplázie typ 4 môže byť šírka proximálneho konca vnútorného zvukovodu zavádzajúca, keďže vykazovala vyššie hodnoty, ako u pacientov s fyziologickou kochleou. Podobné diskrepancie si všimli aj pri malformáciách ako incomplete partition typ I a III. Odporúčajú preto hodnotenie objemu vnútorného zvukovodu.

Limity našej štúdie spočívajú v nízkom počte pacientov v skupine SIX1, ktorí boli navyše v príbuzenskom vzťahu a preto tento podsúbor nemusí dostatočne presne reprezentovať charakteristiku malformácií vnútorného ucha asociovaných s týmto génom.

Naša štúdia poukazuje na rôznorodosť morfológie vnútorného ucha pacientov s BOR syndrómom. Zároveň sme zistili signifikantné rozdiely vo fenotype medzi pacientmi s patologickými variantmi v génoch EYA1 a SIX1. Meranie kochleárneho objemu je spoľahlivou metódou na diagnostiku kochleárnej hypoplázie. Zobrazenie spánkovej kosti a rádiologické vyhodnotenie jednotlivých parametrov vnútorného ucha je dôležité, keďže môže napomôcť v diagnostike a viesť k cieľenej genetickej analýze BOR syndrómu aj u pacientov s inkompletným klinickým fenotypom.

Podakovanie

Práca bola zrealizovaná vďaka finančnej podpore grantov APVV-20-0236, VEGA 1/0572/21.

Zoznam použitej literatúry

1. Fraser FC, Sproule JR, Halal F, Optiz JM. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. *Am J Med Genet* 1980; 7 (3): 341–349.
2. Morisada N, Nozu K, Iijima K. Branchio-oto-renal syndrome: Comprehensive review based on nationwide surveillance in Japan: BOR syndrome. *Pediatr Int* 2014; 56 (3) 309–314.
3. Masuda M, Kanno A, Nara K a spol. Phenotype–genotype correlation in patients with typical and atypical branchio-oto-renal syndrome. *Sci Rep* 2022; 12 (1): 969.
4. Patrick AN, Cabrera JH, Smith AL, Chen XS, Ford HL, Zhao R. Structure-function analyses of the human SIX1–EYA2 complex reveal insights into metastasis and BOR syndrome. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20 (4): 447–453.
5. Unzaki A, Morisada N, Nozu K a spol. Clinically diverse phenotypes and genotypes of patients with branchio-oto-renal syndrome. *J Hum Genet* 2018; 63 (5): 647–656.
6. Pao J, D’Arco F, Clement E, Picariello S, Moonis G, Robson CD, Juliano AF. Re-examining the cochlea in Branchio-Oto-Renal syndrome: genotype-phenotype correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2022; 43 (2): 309–314.
7. Jagt AMA, Kalkman RK, Briaire JJ, Verbist BM, Frijns JHM. Variations in cochlear duct shape revealed on clinical CT images with an automatic tracing method. *Sci Rep* 2017; 7 (1): 17566.

8. Purcell DD, Fischbein NJ, Patel A, Johnson J, Lalwani AK. Two temporal bone computed tomography measurements increase recognition of malformations and predict sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 2006; 116 (8): 1439–1446.
9. Zahara D, Dewi RD, Aboet A, Putranto FM, Lubis ND, Ashar T. Variations in cochlear size of cochlear implant candidates. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2019; 23 (2): 184–190.
10. Alshalan A, Almuawas F, Alhabib S, Hamed N, Abdelsamad Y, Dhanasingh A. Method to estimate the basal turn length in inner ear malformation types, *Sci Rep* 2023; 13 (1): 66.
11. Juliano AF. Cross sectional imaging of the ear and temporal bone. *Head Neck Pathol* 2018; 12 (3) 302–320.
12. Adunka OF, Jewells V, Buchman CA. Value of Computed tomography in the evaluation of children with cochlear nerve deficiency. *Otol Neurotol* 2007; 28 (5): 597-604.
13. Stjernholm C, Muren C. Dimensions of the cochlear nerve canal: a radioanatomic investigation. *Acta Otolaryngol* 2002; 122 (1): 43–48.
14. Kobayashi H, Zusho H. Measurements of internal auditory meatus by polytomography. 1. Normal subjects. *Br J Radiol* 1987; 60 (711): 209–214.
15. Marques SR, Ajzen S, D’Ippolito G, Alonso L, Isotani S, Lederman H. Morphometric analysis of the internal auditory canal by computed tomography imaging. *Iran J Radiol* 2012; 9 (2): 71–78.
16. Berlis A, Putz R, Schumacher M. Direct and CT measurements of canals and foramina of the skull base. *Br J Radiol* 1992; 65: 653-661.
17. Dewan K, Wippold 2nd FJ, Lieu JEC. Enlarged vestibular aqueduct in pediatric sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 140 (4): 552–558.
18. Boston M, Halsted M, Meizen-Derr J 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.
19. Sennaroğlu L, Bajin MD. Classification and current management of inner ear malformations. *Balkan Med J* 2017; 34 (5): 397.
20. Breitsprecher TM, Pscheidl A, Bächinger D a spol. Cochlear and vestibular volumes in inner ear malformations. *Otol Neurotol* 2022; 43 (8): e814.
21. Pelliccia P, Venail F, Bonafé A, Makeieff M, Iannetti G, Bartolomeo M, Mondain M. Cochlea size variability and implications in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2014; 34 (1): 42–49.
22. Dhanasingh A. The rationale for FLEX (cochlear implant) electrode with varying array lengths. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2021; 7 (1): 45.
23. D’Arco F, Youssef A, Ioannidou E a spol. Temporal bone and intracranial abnormalities in syndromic causes of hearing loss: an updated guide. *Eur J Radiol* 2020; 123:108803.
24. Propst EJ, Blaser S, Gordon KA, Harrison RV, Papsin BC. Temporal bone findings on computed tomography imaging in Branchio-Oto-Renal Syndrome. *Laryngoscope* 2005; 115 (10): 1855–1862.
25. Bächinger D, Breitsprecher TM, Pscheidl A a spol. Internal auditory canal volume in normal and malformed inner ears. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2023; 280 (5): 2149–2154.

16. Imuno-zápalový profil a variabilita srdcovej frekvencie u pacientov s karcinómom močového mechúra a zdravých kontrol

Iveta Mikolášková, MSc.

(všeobecné lekárstvo, onkológia)

Spoluautori: Kinga Szaboová², Vladimíra Ďurmanová¹, Boris Kollárik³, Patrik Hesko³, Mária Bucová¹, Luba Hunáková¹

Školiteľ: RNDr. Luba Hunáková, CSc.¹

¹ Imunologický ústav Lekárskej fakulty, Univerzity Komenského, Bratislava; ² Medirex,s.r.o., Bratislava; ³ Urologické oddelenie, Nemocnica svätého Cyrila a Metoda, Bratislava

Úvod

Výskum psychoneuroimunológie zdôrazňuje škodlivé účinky chronickej sympatickej a neuroendokrinnnej aktivácie na funkciu imunitného systému, čo obmedzuje účinnosť liečby nádorového ochorenia (1). Naopak, aktivácia vágového nervu prináša významné imunomodulačné účinky, ktoré pôsobia proti zápalu (2). Cieľom klinickej štúdie bolo preskúmať rovnováhu autonómneho nervového systému (ANS) a imuno-zápalové profile u pacientov s karcinómom močového mechúra (KMM) v porovnaní so zdravými kontrolami. Táto štúdia si kládla za cieľ stanoviť hladiny špecifických imuno-zápalových parametrov súvisiacich s KMM a korelovať ich s ukazovateľmi rovnováhy ANS. Kombinácia hodnotenia variability srdcovej frekvencie (HRV) - zmeny parametrov asociovaných s aktivitou ANS (úroveň stresu), a imuno-zápalového profilovania, nám umožnilo preskúmať vzťahy medzi stresom, charakterizovaným prevahou sympatika, a imunitnou odpoveďou u týchto pacientov.

Urotelový KMM tvorí 75% prípadov so svalovinu-neinfiltrujúcimi nádormi (NMIBCA, štádiá pTa, pT1 a CIS). Počet recidív do piatich rokov sa pohybuje od 50% do 70% (3). Zatiaľ čo transuretrálna resekcia (TURBT) efektívne odstraňuje nádory nižších štádií, existuje riziko recidívy a progresie na invazívne, svalovinu-infiltrujúce karcinómy (MIBCA, štádium >pT2) alebo metastatické ochorenia v približne 25% prípadov (3-4). Okamžitá intravezikálna chemoterapia alebo BCG imunoterapia po TURBT znižuje riziko recidívy v porovnaní so samotnou TURBT (5-6).

Na periférii, stres vyvoláva zvýšenú produkciu imuno-zápalových cytokínov, rastových faktorov a transkripčných regulátorov, ktoré sú kľúčové pri modulácii progresie nádoru (7). Predpokladá sa, že chronický stres potláča protektívnu imunitu, zhoršuje chronickú zápalovú odpoveď a zvyšuje imunoregulačné mechanizmy (7). Silná zápalová odpoveď a progresia ochorenia boli tiež spojené s expresiou TREM-1,-2 (Triggering receptors expressed on myeloid cells-1,-2) u pacientov s renálnym karcinómom (8). Expresia receptorov TREM-1 je spojená s aktivovanou Th1 bunkovou imunitou a zatiaľ čo TREM-1 prispieva v začiatkovej fázy k proti-

nádorovej imunity, jeho dlhodobá prítomnosť v mikroprostredí nádoru sa stáva prozápalovou (9-10).

Niekoľko štúdií, ktoré skúmali rôzne signálne molekuly v nádoroch, zistili, že zvýšené signalizácie BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) v nádoroch sú spojené s horšou prognózou pri rôznych nádorových chorobách (11-13). Fraktalkín/CX3CL1, s jeho duálnou úlohou v tumorigenéze, môže ovplyvňovať reguláciu imunity nádoru, ale aj adhéziu a migráciu buniek (14). U IFN- γ (Interferon gamma) spojeného s pro-Th1 imunitou, bolo zistené, že usmerňuje imunitné odpovede a inhibuje rast nádoru, a tak potenciálne prispieva k potlačeniu KMM (15). Naopak, bolo ukázané, že IL-10 (Interleukin 10) potlačil imunitný dohľad a proti-nádorové imunitné bunky v rôznych typoch nádorov (16-17). MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) bol spojený s progresiou nádoru, vrátane invázie a infiltrácie imunitných buniek (18).

Rozsiahle výskumné štúdie zdôrazňujú kľúčovú úlohu vagálne-mediovaného HRV pri prognóze nádorovej choroby (19), a modulovaní imuno-zápalových dráh (2). HRV, predstavujúca fluktuácie intervalov medzi jednotlivými údermi srdca, vypovedá o adaptabilite myokardu voči stresorom (20). Nízka HRV, indikujúca prevahu sympatika, naznačuje autonómnou dysreguláciu a oneskorený návrat k normálnym hladinám imunitných markerov po strese (21-22). Štúdie s pacientkami s nádorom prsníka naznačujú, že vyššie HRV podporuje vyvážený autonómno-kardio-respiračný stav, čím napomáha k uchovávaní energie pre regeneračné procesy počas liečby a po nej (21,23).

Metódy

Do štúdie bolo zaradených 63 pacientov, podstupujúcich TURBT na Urologickom oddelení Nemocnice svätého Cyrila a Metoda v Bratislave. Vylučovacie kritériá zahŕňali jedincov s diagnostikovaným diabetes mellitus, srdcovým ochorením, ako je ochorenie koronárnych artérií, hypertrofia ľavej komory, chlopňové ochorenie srdca, kardiostimulátor a iné onkologické ochorenie. Vylúčení boli jedinci užívajúci srdcové glykozidy, antiarytmiká, selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu alebo atropíny, ako aj jedinci so zlou kvalitou EKG alebo ektopickými údermi viac ako 10 percent. Vzorky krvi a záznamy EKG na analýzu HRV boli merané u pacientov pred TURBT jeden deň vopred alebo v deň operácie. Kontrolnú kohortu v našej štúdii tvorilo 64 dobrovoľníkov. Všetky kontrolné subjekty boli bez akejkolvek osobnej alebo rodinnej anamnézy nádorovej choroby a boli náhodne vybrané z väčšej vzorky populácie.

Imuno-zápalové parametre vrátane percenta CD14⁺ monocytov (Mo) a expresie TREM-1 a TREM-2 na CD14⁺ Mo, ktorá je prezentovaná ako percento TREM-1- a TREM-2- pozitívnych buniek zo všetkých CD14⁺ buniek, sa meralo prietokovou cytometriou (Navios-Ex, Beckman Coulter, USA). Percento aj MFI (priemerná intenzita fluorescencie) TREM expresií sa analyzovali pomocou analytického softvéru Kaluza (Beckman Coulter, USA). Sérové koncentrácie parametrov MCP-1, Fraktalkine, BDNF, IFN- γ , IL-10 a solubilné TREM-1,-2 boli určené pomocou ELISA testov (FineTest, China). Pomery lymfocytov k monocytom (LMR), trombocytov k monocytom (PMR) a neutrofilov k monocytom (NMR) boli získané pomocou automatizovaného hematologického analyzátora (Mindray BC-6200, China). 5-minutové EKG záznamy pre hodnotenie HRV boli merané pomocou EKG zariadenia Bittium Faros 180 (Bittium

Biosignals Ltd, Finland). HRV parametre, vrátane parametrov časovej domény SDNN (standard deviation of NN intervals), frekvenčnej domény HF (High frequency), LF (Low frequency), priemerná srdcová frekvencia ako aj ne-lineárne parametre OV%, PNS (parasympathetic nervous system), SNS (sympathetic nervous system) a Stress indexy, boli analyzované systémom Kubios Premium (Kubios Oy, Finland). Pri analýze dát bol použitý štatistický softvérový program Instat (Institute of Statistics, Albania). Analýza zahŕňala nezávislé skupinové porovnania pomocou Mann-Whitneyho U testu a Spearmanové biviačné korelácie.

Výsledky

Štúdie sa zúčastnilo celkovo 127 subjektov, z toho 75 mužov a 52 žien, s priemerným vekom 64.57 rokov a priemerným indexom telesnej hmotnosti (BMI) 27.13, v rozmedzí od 18.6 do 39.5. Charakteristiky primárnych premenných štúdie sú uvedené v tabuľke 1. Pacienti s KMM preukázali zmenené imunitné profily, charakterizované signifikantne vyšším percentuálnym pomerom TREM-1/TREM-2 (priemer(μ)=510.08, štandardná odchýlka(σ)=329.03) v porovnaní so zdravými kontrolami (μ =213.80, σ =222.57), ($p<0,0001$), ako aj vyšším pomerom TREM-1 MFI/TREM-2 MFI na CD14+ Mo (μ =4.96, σ =1.94 vs μ =4.13, σ =2.88; $p=0.0048$). Zistili sme však štatisticky významný pokles TREM-2 MFI u pacientov s KMM (μ =0.56, σ =1.01) v porovnaní so zdravými kontrolami (μ =0.93, σ =1.44; $p=0.0108$). Naviac mali pacienti signifikantne zvýšenú sérovú koncentráciu solubilnej TREM-1 ($p=0.0255$) a vyšší pomer sTREM-1/sTREM-2 ($p=0.0479$) oproti zdravým kontrolám. Ďalej boli u pacientov zistené zvýšené sérové hladiny BDNF ($p=0.0131$) a MCP-1 ($p=0.0129$), zatiaľ čo hladiny IFN- γ ($p=0.0018$) a IL-10 ($p=0.0077$) boli signifikantne nižšie. Výrazne nižšie pomery krvných buniek k monocytom (LMR, PMR, NMR) boli pozorované u pacientov s MIBCA ($p=0.0473$, $p=0.0058$ a $p=0.0337$) v porovnaní s NMIBCA pacientami.

Tab.1: Deskriptívna štatistika u pacientov s KMM a zdravých kontrol

Celkový počet: n= 127	Pacienti, n = 63	Zdravé kontroly, n= 64
Vek (roky – μ , σ)	67.78 (8.05)	61.42 (12.10)
Muži (n)	44	31
Ženy (n)	19	33
BMI (mean, SD)	27.76 (4.53)	26.52 (3.58)
NMIBCA (pTa, CIS, pT1) (n)	51	
Low grade (n)	28	
High grade (n)	23	
MIBCA (pT2, pT3) (n)	12	
Low grade (n)	0	
High grade (n)	12	

Poznámka: BMI = body mass index; NMIBCA = Svalovinu neinfiltrojúci karcinóm močového mechúra; MIBCA = Svalovinu infiltrojúci karcinóm močového mechúra; CIS = carcinoma in situ; Low grade = nízky stupeň, High grade = vysoký stupeň; μ = priemer, σ = štandardná odchýlka; * hodnota $p<0,05$ sa považuje za signifikantnú (Mann-Whitney Test).

Tab.2: Porovnanie premenných medzi pacientmi s KMM a zdravými kontrolami

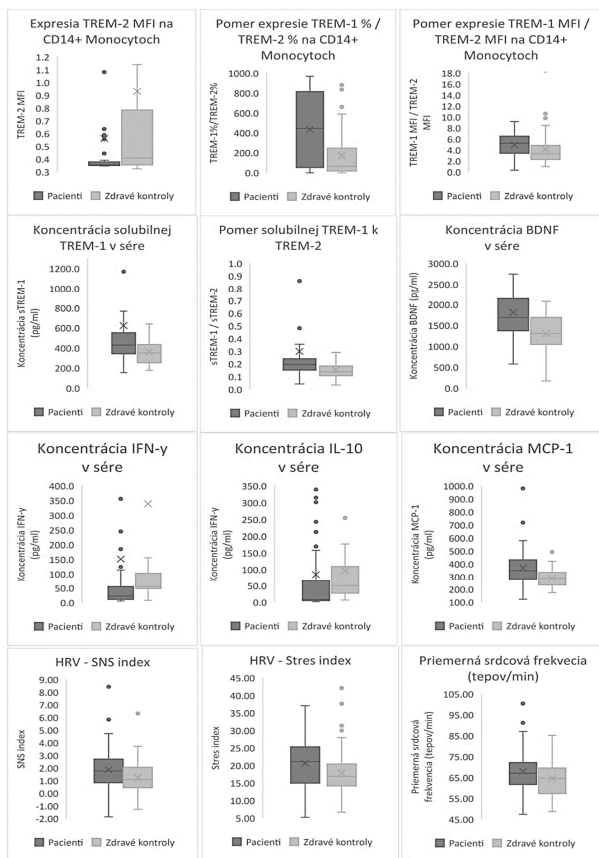
Celkový počet: n= 127	Pacienti n = 63	Zdravé kontroly n = 64	P hodnota
TREM-1 CD14+% (μ , σ)	74.31 (20.37)	60.46 (31.50)	0.0970
TREM-2 CD14+% (μ , σ)	0.43 (0.87)	1.06 (1.70)	0.0662
TREM-1 MFI (μ , σ)	1.95 (0.55)	2.83 (2.57)	0.5589
TREM-2 MFI (μ , σ)	0.56 (1.01)	0.93 (1.44)	0.0108*
TREM-1%/TREM-2% (μ , σ)	510.08 (329.03)	213.80 (222.57)	<0.0001*
TREM-1 MFI/TREM-2 MFI (μ , σ)	4.96 (1.94)	4.13 (2.88)	0.0048*
sTREM-1 (pg/ml) (μ , σ)	624.09 (1229.07)	361.12 (127.77)	0.0255*
sTREM-2 (pg/ml) (μ , σ)	2498.41 (1205.87)	2705.33 (1675.85)	0.9897
sTREM-1/sTREM-2 (μ , σ)	0.30 (0.70)	0.16 (0.07)	0.0479*
Fractalkine (pg/ml) (μ , σ)	2541.53 (4110.21)	1645.07 (620.07)	0.1098
BDNF (pg/ml) (μ , σ)	1810.81 (1038.85)	1309.75 (510.43)	0.0131*
IFN- γ (pg/ml) (μ , σ)	151.55 (654.48)	339.37 (1078.03)	0.0018*
IL-10 (pg/ml) (μ , σ)	85.00 (176.22)	98.04 (130.52)	0.0077*
MCP-1 (pg/ml) (μ , σ)	370.59 (133.29)	291.66 (83.30)	0.0129*
IFN- γ /IL-10 (μ , σ)	2.67 (3.11)	2.07 (2.12)	0.8909
OV% (μ , σ)	27.41 (14.73)	26.65 (12.22)	0.7158
SDNN (ms) (μ , σ)	20.40 (13.82)	22.30 (11.48)	0.0911
LF (Hz) (μ , σ)	0.07 (0.03)	0.07 (0.02)	0.2261
HF (Hz) (μ , σ)	0.23 (0.07)	0.23 (0.06)	0.6365
PNS index (μ , σ)	-0.64 (0.97)	-0.42 (0.82)	0.1467
SNS index (μ , σ)	1.87 (1.72)	1.23 (1.36)	0.0167*
Stres index (μ , σ)	20.66 (7.90)	17.91 (6.59)	0.0255*
Priemerná srdcová frekvencia (μ , σ)	67.97 (10.05)	64.67 (8.71)	0.0505*
LMR - NMIBC	14.94 (76.80)		0.0473*
- MIBC	3.43 (1.67)		
PMR - NMIBC	777.45 (997.81)		0.0058*
- MIBC	420.24 (164.97)		
NMR - NMIBC	14.60 (30.97)		0.0337*
- MIBC	7.77 (3.23)		

Poznámka: TREM-1,2 (MFI) = Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1 and 2 (mean fluorescence intensity); sTREM-1,2 = solubilné TREM-1,2; BDNF = Brain-derived neurotrophic factor; IFN- γ = Interferon gamma; IL-10 = Interleukin 10; MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1; SDNN = štandardná odchylka NN intervalov; HF = vysoká frekvencia; LF = nízka frekvencia; PNS = parasympatkový nervový systém; SNS = sympatkový nervový systém; LMR,

PMR, NMR = pomer lymfocytov, trombocytov a neutrofilov k monocytom; μ = priemer, σ = štandardná odchýlka * hodnota $p < 0,05$ sa považuje za signifikantnú (Mann-Whitney Test).

Pri skúmaní rozdielov medzi HRV parametrami u pacientov s KMM a zdravých kontrol sa odhalili signifikantne vyššie hodnoty u nelineárnych parametrov symbolickej dynamiky SNS index a Stres index, ako aj u parametra priemernej srdcovej frekvencie ($p=0.0167$; $p=0.0255$; $p=0.0505$).

Ďalšie podrobnosti a vizuálne znázornenia signifikantných rozdielov sú uvedené v tabuľke 2 a na obrázku 1.



Obr.1 Vybrané porovnania signifikantných rozdielov premenných medzi pacientmi s KMM a zdravými kontrolami

Diskusia

Zistenia tejto štúdie poukazujú na komplexnú súhrnu medzi neuroendokrinným systémom, imunitnou odpoveďou a progresiou u pacientov s KMM. Chronická aktivácia sympatiku a následná dysregulácia imunitno-zápalového profilu sa podieľajú na rôznych malignitách, vrátane KMM (1).

V našej štúdii sme pozorovali zmenené imuno-zápalové parametre u pacientov s KMM, charakterizované zvýšeným percentom expresie TREM-1 na CD14⁺ Mo, ako aj pomerom expresie TREM-1 k TREM-2 a jeho solubilnej formy (sTREM-1, sTREM-1/sTREM-2), v porovnaní so zdravými kontrolami. Naopak, expresia TREM-2 a koncentrácia v sére (sTREM-2) boli u pacientov znížené. Bolo ukázané, že TREM-1 je spojená s prozápalovými odpoveďami a uľahčením progresie renálneho bunkového karcinómu (8). Jeden z mechanizmov zahŕňa TREM-1 ligáciu-vyvolanú iniciáciu signálnej kaskády zahŕňajúcej Syk kinázu, fosfatidylinozitol 3-kinázu (PI3K), extracelulárne signálne regulované kinázy (ERK1/2) a mitogénom aktivované proteínové (MAP) kinázy. To vedie k aktivácii NF- κ B, kľúčového prozápalového transkripčného faktora (24) a zvýšenej produkcii prozápalových cytokínov, ako sú IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, GM-CSF, čím sa vytvára zápalové prostredie s tumor-podporujúcim účinkom, ktoré ďalej spúšťa signálne dráhy, ako sú MAPK/ERK alebo PI3K/AKT/mTOR (25).

TREM-2 bol pôvodne považovaný za proteín s funkciou inhibície nadmerného zápalu cez supresiu dráh ako NF- κ B, a pre podporu opravy a regenerácie tkaniva, avšak v jeho komplexnejšej úlohe a v prozápalových podmienkach môže aktivácia TREM-2 rekrutovať imunosupresívne SHP fosfatázy (26). To môže potlačiť imunitnú odpoveď, čo potenciálne umožňuje nádorom vyhnúť sa útoku imunitnými bunkami. Pozorované zvýšenie pomeru TREM-1/TREM-2 MFI v periférii naznačuje možný smer k prostrediu s vyššou zápalovou odpoveďou, čo môže mať potenciálne vplyv na progresívnejší charakter nádoru, ako sa ukázalo aj u pacientov s MIBCA (μ (σ) = 5.16 (2.30) v porovnaní s pacientmi s NMIBC (μ (σ) = 4.92 (1.91) a zdravými kontrolami (μ (σ) = 4.13 (2.90)).

Posun smerom k prozápalovému stavu u pacientov s KMM v našej štúdii je tiež demonštrovaný zvýšenými sérovými koncentraciami BDNF, MCP-1 a Fractalkine, a zníženými hladinami IFN- γ a IL-10 v porovnaní so zdravými kontrolami. V skupine pacientov s MIBC sme pozorovali nižšie hladiny IFN- γ , IL-10 a vyššie hladiny MCP-1, čo môže byť spojené so slabšou schopnosťou supresie nádoru uľahčujúcou jeho invazívnosť (15-16,18).

Signifikantné rozdiely v HRV parametroch (SNS a Stres index, priemerná srdcová frekvencia) medzi pacientami a zdravými kontrolami môžu naznačovať narušenú rovnováhu ANS ovplyvnenú prevahou sympatika u pacientov s KMM. Pretrvávajúca aktivácia sympatika, ktorá sa často pozoruje u jedincov s nádorovou chorobou, vedie k narušeniu imuno-zápalových reakcií, čím podporuje prostredie priaznivé pre rast nádoru (1). Fyziologicky, aktivácia SNS spúšťa uvoľňovanie katecholamínov (adrenalin a noradrenalin), ktoré sa viažu na adrenergné receptory na imunitných aj nádorových bunkách (27). Bunkami uvoľňované cytokíny prenášajú signály cez priepustnejšie oblasti hematoencefalickej bariéry, ktorých vznik môže byť umožnený stresom alebo patologickými stavmi (28). Aktivované mozgové mikroglie môžu tiež získavať monocyty z periférnej krvi, čo ovplyvňuje špecifické oblasti mozgu spojené so zmenami náklady a úzkosťou, najmä u chronicky stresovaných jedincov (29).

Existujú vedecké dôkazy naznačujúce, že stres môže ovplyvniť expresiu neurotrofických faktorov, najmä BDNF, v limbických štruktúrach mozgu (30). Chronický stres môže viesť k zníženiu alebo dysfunkcii BDNF, čo môže zhoršiť prežitie a plasticitu neurónových buniek, a tým nepriaznivo ovplyvniť funkciu hipokampu (30). Toto narušenie by mohlo ďalej modifikovať reaktivitu osi HPA a prispieť k patológii súvisiacej so stresom (31).

Pomery krvných buniek k monocytom (LMR, PMR, NMR) boli identifikované ako prognostické ukazovatele pri rôznych typoch nádorov. V našej štúdii sme pozorovali nižšie pomery u pacientov s MIBCA v porovnaní s pacientmi s NMIBCA ($p=0.0473$, $p=0.0058$ a $p=0.0337$). Predchádzajúci výskum ukázal, že zvýšené LMR je spojené s lepšími výsledkami prežitia u pacientov s nádorom prsníka, žalúdka a močového mechúra (32-34). Naopak, nižšie PMR a NMR sú spojené s nižšou mierou úplnej liečebnej odpovede a horším prežitím (35-36). Tieto krvné zápalové markery môžu pomôcť pri identifikácii pacientov s vyšším rizikom progresie ochorenia a poskytnúť pohľad na prognózu prežívania.

Záverom, táto štúdia poukazuje na zmeny v imuno-zápalových markeroch a HRV parametroch poukazujúcich na rovnováhu ANS, u pacientov s KMM. Zhoršená imunitná funkcia a narušená rovnováha ANS so sympatikovou dominanciou, môžu ovplyvniť zdravotný stav pacientov. Preto hodnotenie HRV a imuno-zápalových markerov môže poskytnúť cenné poznatky pre komplexný prístup v liečbe pacientov s KMM, čo však vyžaduje ďalšie skúmanie ich diagnostického a prognostického využitia. Tieto zistenia môžu pomôcť pri navrhovaní personalizovaných intervenčných stratégií pre zvládanie stresu a tiež oslabenej autonómnej a imunitnej regulácie.

Podakovanie: Autori ďakujú za podporu Ministerstvu školstva, vedy, výskumu a športu SR, číslo grantu VEGA 1/0090/22 a Agentúre na podporu výskumu a vývoja, číslo grantu APVV-22-0231.

Zoznam použitej literatúry

1. Eckerling A, Ricon-Becker I, Sorski L, Sandbank E, Ben-Eliyahu S. Stress and cancer: mechanisms, significance and future directions. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(12):767-785.
2. Johnston GR, Webster NR. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth*. 2009;102(4):453-62.
3. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, et al. Bladder cancer. *Lancet*. 2016;388(10061):2796-2810.
4. Brausi M, Collette L, Kurth K, et al. Genito-Urinary Tract Cancer Collaborative Group. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol*. 2002;41(5):523-31.
5. Sylvester RJ, van der MEIJDEN AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2002;168(5):1964-70.
6. Perlis N, Zlotta AR, Beyene J, Finelli A, Fleshner NE, Kulkarni GS. Immediate post-transurethral resection of bladder tumor intravesical chemotherapy prevents non-

- muscle-invasive bladder cancer recurrences: an updated meta-analysis on 2548 patients and quality-of-evidence review. *Eur Urol.* 2013;64(3):421-30.
7. Antoni MH, Dhabhar FS. The impact of psychosocial stress and stress management on immune responses in patients with cancer. *Cancer.* 2019;125(9):1417-1431.
 8. Ford JW, Gonzalez-Cotto M, MacFarlane AW 4th, et al. Tumor-Infiltrating Myeloid Cells Co-Express TREM1 and TREM2 and Elevated TREM-1 Associates With Disease Progression in Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2022;11:662723.
 9. Pelham CJ, Agrawal DK. Emerging roles for triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family signaling in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(2):243-56.
 10. Kluckova K, Kozak J, Szaboova K, et al. TREM-1 and TREM-2 Expression on Blood Monocytes Could Help Predict Survival in High-Grade Glioma Patients. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:1798147.
 11. Li C, Zeng X, Liu Z, Li F, Wang K, Wu B. BDNF VAL66MET Polymorphism Elevates the Risk of Bladder Cancer via MiRNA-146b in Micro-Vehicles. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(1):366-377.
 12. Guzel T, Mech K, Iwanowska M, Wroński M, Słodkowski M. Brain derived neurotrophic factor declines after complete curative resection in gastrointestinal cancer. *PeerJ.* 2021;9:e11718.
 13. Wang Z, Wang S, Liu Y, Gao S, Yu Y, Hu Z. Serum Levels of BDNF in Patients with Adenoma and Colorectal Cancer. *Dis Markers.* 2021;2021:8867368.
 14. Shulby SA, Dolloff NG, Stearns ME, Meucci O, Fatatis A. CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(14):4693-8.
 15. Gillezeau C, Movva N, van Gerwen M, et al. Interferon gamma expression and mortality in unselected cohorts of urothelial bladder cancer patients. *PLoS One.* 2022;17(8):e0271339.
 16. Leblond MM, Zdimerova H, Desponds E, Verdeil G. Tumor-Associated Macrophages in Bladder Cancer: Biological Role, Impact on Therapeutic Response and Perspectives for Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(18):4712.
 17. Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Med.* 2022;10:20503121211069012.
 18. Wang L, Lan J, Tang J, Luo N. MCP-1 targeting: Shutting off an engine for tumor development. *Oncol Lett.* 2022;23(1):26.
 19. De Cock M, Caers R, Spiegel D, Gidron Y. The Role of the Vagus Nerve in Cancer Prognosis: A Systematic and a Comprehensive Review. *J Oncol.* 2018;2018:1236787.
 20. Kim HG, Cheon EJ, Bai DS, Lee YH, Koo BH. Stress and Heart Rate Variability: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Psychiatry Investig.* 2018;15(3):235-245.
 21. Majerova K, Zvarik M, Ricon-Becker I, et al. Increased sympathetic modulation in breast cancer survivors determined by measurement of heart rate variability. *Sci Rep.* 2022;12(1):14666.
 22. Weber CS, Thayer JF, Rudat M, et al. Low vagal tone is associated with impaired post stress recovery of cardiovascular, endocrine, and immune markers. *Eur J Appl Physiol.* 2010;109(2):201-11.

23. Arab C, Vanderlei LCM, da Silva Paiva L, et al. Cardiac autonomic modulation impairments in advanced breast cancer patients. *Clin Res Cardiol.* 2018;107(10):924-936.
24. Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):38-46.
25. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):25-41.
26. Colonna M. The biology of TREM receptors. *Nat Rev Immunol.* 2023;23(9):580-594.
27. Cole SW, Sood AK. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1201-6.
28. Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1368-79.
29. Bower JE, Kuhlman KR. Psychoneuroimmunology: An Introduction to Immune-to-Brain Communication and Its Implications for Clinical Psychology. *Annu Rev Clin Psychol.* 2023;19:331-359.
30. Duman RS, Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1601):2475-84.
31. Notaras M, van den Buuse M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. *Mol Psychiatry.* 2020;25(10):2251-2274.
32. Ni XJ, Zhang XL, Ou-Yang QW, et al. An elevated peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio predicts favorable response and prognosis in locally advanced breast cancer following neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One.* 2014;9(11):e111886.
33. Pan YC, Jia ZF, Cao DH, et al. Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) could independently predict overall survival of resectable gastric cancer patients. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(52):e13896.
34. Yoshida T, Kinoshita H, Yoshida K, et al. Prognostic impact of perioperative lymphocyte-monocyte ratio in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy. *Tumour Biol.* 2016;37(8):10067-74.
35. Zhang Y, Shi Y, Shen H, et al. The value of a new prognostic model developed by lymphocyte-monocyte ratio and platelet-monocyte ratio in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):573.
36. Wang HK, Wei Q, Yang YL, Lu TY, Yan Y, Wang F. Clinical usefulness of the lymphocyte-to-monocyte ratio and aggregate index of systemic inflammation in patients with esophageal cancer: a retrospective cohort study. *Cancer Cell Int.* 2023;23(1):13.

17. Komplexné genomické profilovanie pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc.

Mgr. Michal Svoboda

(Lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹, RNDr. Regína Lohajová Behulová, PhD.², Mgr. Lukáš Šebest, PhD.², Mgr. Tomáš Slamka²

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, ²Onkologický ústav sv. Alžbety, Oddelenie lekárskej genetiky

Úvod

Karcinóm pľúc je celosvetovo najčastejším onkologickým ochorením a taktiež najčastejšou príčinou mortality spojenou s malignitami (1). Podľa štatistiky GLOBCAN bolo v roku 2022 odhadovaných až 2,5 milióna novo diagnostikovaných pacientov s nádorom pľúc a 1,8 milióna úmrtí (2). Nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC, z angl. non-small cell lung cancer) je histologický podtyp karcinómu pľúc a tvorí približne 85% prípadov zo všetkých nádorov pľúc. Aj napriek pokrokom v liečbe, manažmente a efektívnejšej diagnostike sú pacienti s NSCLC diagnostikovaní často až v neskorších štádiách ochorenia s celkovým 5-ročným prežívaním iba 10-15% (3). Manažment pacientov s NSCLC tradične zahŕňa chirurgickú resekciu, chemoterapiu a rádioterapiu. V posledných rokoch však identifikácia rôznych molekulárnych biomarkerov umožnila vznik viac personalizovaných cielených terapií a otvorila tak nové diagnostické a terapeutické možnosti. Tento prístup využíva informácie z molekulárno-genetických testov, ktoré umožňujú lekárom určiť konkrétnu molekulárnu patológiu nádoru a následne identifikovať najvhodnejšiu liečebnú stratégiu s minimálnymi vedľajšími účinkami a vyššou efektivitou (4,5). Vďaka pokrokom v sekvenčných a bioinformatických technológiách je v súčasnosti možné simultánne vyšetriť v nádorovom tkanive somatické varianty v desiatkach až tisícoch génov a stanoviť personalizovaný manažment každého pacienta v závislosti od jeho komplexného genomického profilu (CGP z angl. comprehensive genomic profiling). Na základe relevantných medzinárodných odporúčaní, akými sú napríklad NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (6) a ESMO (European Society for Medical Oncology) (7) usmernenia by malo byť testovanie genomických alterácií u pacientov s NSCLC zamerané minimálne na gény EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2, ALK, ROS1, MET, RET a NTRK (8). Cieľom tejto práce bolo stanovenie CGP u 78 pacientov s NSCLC a identifikácia genomických alterácií so silným klinickým významom triedy TIER I, ktoré majú priamy vplyv na ich personalizovanú liečbu.

Materiál a metódy

Analýza CGP bola vykonaná kombináciou dvoch viacgénových panelov - SOPHiA Solid Tumor Solution (STS) a SOPHiA RNATarget Oncology Solution (ROS). Podstatou molekulárno-genetickej diagnostiky STS je dôkaz somatických DNA variantov v 42 klinicky významných génoch, analýza fokálnej amplifikácie – zmena počtu chromozómových kópií (somatické CNV) v 24 génoch a analýza 6 unikátnych lokusov na detekciu stavu mikrosatelitovej instability (MSI). Podstatou molekulárno-genetickej diagnostiky ROS je dôkaz somatických RNA fúzií a veľkých genómových prestavieb v 17 génoch s možnosťou detegovať akýchkoľvek neznámych fúzných partnerov.

Izolácia nukleových kyselín

Z nádorového tkaniva vo forme FFPE rezov, získaného po chirurgickej resekcii alebo biopsii nádoru sme vyizolovali DNA a RNA. Na izoláciu DNA sme použili komerčný set zameraný na izoláciu DNA z FFPE tkaniva – Maxwell® FFPE Plus DNA Kit (Promega) a na izoláciu RNA z FFPE tkaniva - Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (Promega). Izolácia prebiehala v prístroji Maxwell® RSC Instrument (Promega) využitím paramagnetických guličiek. Koncentráciu nukleových kyselín sme stanovili pomocou fluorometrického prístroja Quantus (Promega).

Príprava knižníc

Na prípravu DNA a RNA knižníc z fixovaného FFPE tkaniva sme použili komerčný kit SOPHiA Solid Tumor Solution (STS) a SOPHiA RNATarget Oncology Solution (ROS) a postupovali podľa pokynov výrobcu. V prvom kroku sme prepísali RNA do cDNA pomocou reverznej transkripcie a náhodných hexamérov. Následne sme DNA enzymaticky fragmentovali na úseky dlhé 90 až 250 bp. Získaným fragmentom sme opravili prečnievajúce konce a pridali adenín na 3' koniec. V ďalšom kroku sme fragmenty označili pomocou adaptérových molekúl – SUA1 (short Universal Adapter1). Po prečistení knižníc od nezligovaných adaptérov sme k fragmentom pridali univerzálne indexové sekvencie pomocou amplifikácie univerzálnymi indexnými primermi (UP1-12), aby bolo možné následne vzorky odlíšiť po multiplexnej sekvenačnej reakcii pri demultiplexingu. Následne sme hybridizovali set oligonukleotidových sekvencií označených biotínom a vysoko komplementárnych ku génom nášho záujmu spolu s knižnicami pripravenými v predchádzajúcich krokoch. Hybridizácia trvala 4 až 18 hodín. Po hybridizácii sme použili streptavidínové magnetické guličky na vychytenie hybridizovaných prób, ktoré boli pevne naviazané k „targetovaným“ sekvenciám knižníc. Tromi premývaniami sme odstránili nenahybridizované nešpecifické sekvencie z magnetických guličiek. Knižnice sme následne amplifikovali a očistili čistiacimi magnetickými guličkami. Kvalitu získaných DNA knižníc sme overili kapilárnou elektroforézou (prístroj Bioanalyser, použitý kit: Agilent High Sensitivity DNA kit) a kvantifikovali na fluorometri. Knižnice sme normalizovali, aby bola zaistená uniformná reprezentácia pri analýze viacerých vzoriek súčasne. Knižnicu a kontrolnú vzorku PhiX (Illumina) sme následne denaturovali. V ďalšom kroku sme k DNA knižnici pridali 1% PhiX a takto pripravený mix sme naniesli do kazety (cartridge), ktorú sme umiestnili do samotného sekvenčného prístroja Illumina MiSeq/NextSeq 550 spolu s ostatnými súčasťami sekvenčného kitu (PR2 pufof, Flow cell – detekčná platnička). Na uvedenej detekčnej platničke priamo v

prístroji prebieha bridge PCR v jednotlivých klastroch za využitia komponentov z cartridge. Sekvenčná analýza prebiehala po dobu cca 24 hodín v závislosti od počtu PCR cyklov.

Bioinformatická analýza dát

Analýza dát prebehla pomocou špecifických softvérov (SOPHiA DDM® (Sophia Genetics)), pričom primárna analýza dát prebehla ešte priamo v prístroji.

Klasifikácia identifikovaných variantov

Identifikované varianty boli anotované podľa HGVS (Human genome variation society) (9), klasifikácia variantov sa uskutočnila na základe platných ACMG kritérií (10) a klinicko-terapeutická signifikancia bola definovaná podľa TIER kritérií (11). V práci sú uvedené iba varianty so silným klinickým významom triedy IA a IB s minimálnou alelovou frekvenciou (VAF) – 5% a zmeny počtu chromozómových kópií > 6 kópií.

Výsledky

Analyzovaný súbor 78 pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) pozostával zo 41 mužov s priemerným vekom v čase diagnózy 67,9 rokov a 37 žien s priemerným vekom v čase diagnózy 68,9 rokov. Analýza DNA panelu génov bola vykonaná pre všetkých 78 pacientov a RNA analýza veľkých génomových prestavieb pre 68/78 (87,2%) pacientov.

V súbore pacientov s NSCLC sme identifikovali molekulárne genomické alterácie so silným klinickým významom triedy TIER I u 38/78 (48,7%) pacientov. Dve genomické alterácie súčasne boli dokázané u 5/78 (6,4%) pacientov (Tab. 1).

V súbore sme celkovo identifikovali 43 genomických alterácií so silným klinickým významom triedy TIER I. Z toho bolo 29/43 (67,4%) bodových DNA variantov typu substitúcií, malých delécií alebo inzercií, 13/43 (30,2%) veľkých génomových prestavieb (fúzií) a 1/43 (2,3%) aberácia počtu chromozómových kópií (CNV).

Identifikácia genomických alterácií so silným klinickým významom na úrovni DNA

Pomocou detekcie molekulárnych biomarkerov na úrovni DNA sme identifikovali 29 bodových DNA variantov so silným klinickým významom triedy TIER I. Spektrum dokázaných bodových DNA variantov zahŕňalo 15 variantov v géne EGFR, 11 variantov v géne KRAS a po jednom variante v génoch MET, ERBB2 a BRAF. Najčastejšie identifikovanými bodovými DNA variantami boli substitúcia p.(G12C) (11x) v kodóne 12 génu KRAS a in-frame delécia p.(E746_A750del) (7x) v exóne 19 génu EGFR. Ďalšie dokázané bodové DNA varianty zahŕňali p.(L858R) (2x), p.(G719C) (1x), p.(S768I) (1x), p.(N771dup) (1x), p.(S768_D770dup) (1x), p.(E771delinsGY) (1x), p.(E746_S750delinsV) (1x) v géne EGFR, c.3082+1G>C (1x) v géne MET, p.(Y772_A775dup) (1x) v géne ERBB2 a p.(V600E) (1x) v géne BRAF (Tab. 2).

Tab. 1 Dve súčasne identifikované genomické alterácie so silným klinickým významom u pacientov s NSCLC.

Gén 1	HGVS	TIER	ACMG	Gén 2	HGVS	TIER	ACMG
EGFR	p.(S768I)	IA	5	EGFR	p.(L858R)	IA	5
EGFR	p.(G719C)	IA	5	KRAS	p.(G12C)	IA	5
BRAF	p.(V600E)	IA	5	MET exon 14 skipping (IA)			
KRAS	p.(G12C)	IA	5	MET exon 14 skipping (IA)			
MET	c.3082+1G>C	IA	5	MET exon 14 skipping (IA)			

Tab. 2 Identifikované bodové DNA varianty so silným klinickým významom u pacientov s NSCLC.

Gén	Počet	HGVS	TIER	ACMG
EGFR	7x	p.(E746_A750del)	IA	5
	2x	p.(L858R)	IA	5
	1x	p.(G719C)	IA	5
	1x	p.(S768I)	IA	5
	1x	p.(N771dup)	IA	5
	1x	p.(S768_D770dup)	IA	5
	1x	p.(E771delinsGY)	IA	5
	1x	p.(E746_S750delinsV)	IA	5
KRAS	11x	p.(G12C)	IA	5
MET	1x	c.3082+1G>C	IA	4
ERBB2	1x	p.(Y772_A775dup)	IA	4
BRAF	1x	p.(V600E)	IA	5

Na úrovni DNA sme taktiež dokázali prítomnosť somatickej amplifikácie génu MET so silným klinickým významom triedy TIER I u 1 pacienta. Identifikovanou genomickou alteráciou u tohto pacienta bola onkogénna amplifikácia génu MET v počte 12 kópií.

V analyzovanom súbore boli všetci pacienti mikrosatelitovo stabilní (MSS).

Identifikácia genomických alterácií so silným klinickým významom na úrovni RNA

Pomocou detekcie molekulárnych biomarkerov na úrovni RNA sme identifikovali 13 veľkých genomových prestavieb so silným klinickým významom triedy TIER I. Najčastejšie identifikovanými veľkými genomovými prestavbami bol MET exon 14 skipping (7x), fúzie génov KIF5B-RET (3x) a fúzie génov EML4-ALK (3x) (Tab. 3).

Gén	Počet	TIER	ACMG
<i>MET ex14 skipping (IA)</i>	7x	IA	5
<i>KIF5B-RET</i>	3x	IA	5
<i>EML4-ALK</i>	3x	IA	5

Tab. 3 Identifikované genomické alterácie so silným klinickým významom u pacientov s NSCLC na úrovni RNA.

Diskusia

Preukázané klinické prínosy spojené s niektorými špecifickými cieľenými terapiami, rýchlo rastúci počet cieľových molekulárnych biomarkerov a klesajúce náklady CGP vedú k čoraz väčšiemu dopytu po týchto typoch riešení. Tento trend potvrdila aj ESMO v roku 2020, keď vydala odporúčania ohľadom používania masívneho paralelného sekvenovania (MPS) na identifikáciu biomarkerov u pacientov s metastatickými onkologickými ochoreniami. ESMO odporúča použitie MPS pre pacientov s NSCLC, karcinómom prostaty, ovárií a cholangiokarcinómu (12). Podobný názor zastáva aj ASCO, ktorá odporúča použitie MPS na identifikáciu biomarkerov pre všetkých pacientov, ktorých nádorové ochorenie má aspoň jednu špecifickú genomickú alteráciu, ktorá má regulačné schválenie na použitie alebo vylúčenie určitého liečiva. ASCO ďalej uvádza, že pribúdajúce množstvo schválených tkanivovo-agnostických liečiv pre onkologické ochorenia s TMB-H, MSI-H alebo NTRK fúziami poskytuje dôvod na genomické testovanie všetkých nádorov (13).

NSCLC patrí medzi nádorové ochorenia s najväčším množstvom identifikovaných genomických alterácií spájaných s efektívnou biologickou liečbou, ktoré vedú ku klinicky významnému terapeutickému efektu. Mutácie v géne kódujúcom receptor epidermálneho rastového faktoru (EGFR z angl. epidermal growth factor receptor) reprezentujú prvú skupinu genomických alterácií, ktoré boli identifikované u pacientov s NSCLC (14). Incidencia EGFR mutácií je okolo 15-20% s vyššou frekvenciou v ázijskej populácii (30-40%) (15,16,17). V našom súbore sme identifikovali genomické alterácie v géne EGFR u 15/78 (19,2%) pacientov. Väčšinu EGFR mutácií tvoria aktivačné delécie v čítacom rámci exónu 19, bodové hotspot mutácie v exóne 21 a mutácie získanej rezistencie v exóne 20. Viacero randomizovaných štúdií v tretej fáze klinického testovania dokázali účinnosť EGFR tyrozínkinázových inhibítorov (TKI) v manažmente pacientov s NSCLC (18,19,20).

Aktivačné mutácie v géne KRAS (vírusový homológ onkogénu vírusu Kirsten Rat Sarcoma) sú detegované približne u 30% pacientov s NSCLC a najčastejšia z nich, p.(G12C) sa vyskytuje u 10-15% pacientov s NSCLC (21,22). V našom súbore sme identifikovali genomickú alteráciu p.(G12C) v géne KRAS u 11/78 (14,1%) pacientov. KRAS je membránový proteín patriaci do rozsiahlej rodiny enzýmov známych ako GTPázy, ktoré katalyzujú konverziu GTP na GDP. Tento cyklus medzi aktívnou a neaktívnou formou umožňuje KRAS regulovať kritické bunkové procesy, vrátane rastu a diferenciácie. Mutácia p.(G12C) v géne KRAS vedie k tvorbe konštitutívne aktívnej formy tohto proteínu, čo má za následok nekontrolovaný bunkový rast a diferenciáciu. V roku 2022 Európska komisia schválila sotorasib, liečivo cieľené špecificky na

variant p.(G12C) (24). Sotorasib sa selektívne viaže na voľný cysteín v mutovanom proteíne, tvorí nereverzibilnú kovalentnú väzbu a inaktivuje mutovaný KRAS p.(G12C), čím zabraňuje jeho patologickému pôsobeniu bez ovplyvnenia normálnej formy proteínu KRAS (wild-type KRAS).

Somatický variant p.(Y772_A775dup), ktorý sme identifikovali u 1 pacienta sa nachádza v exóne 20 génu ERBB2. Produktom génu ERBB2 je proteín HER2, ktorý funguje ako receptor s tyrozínkinázovou doménou pre ľudský epidermálny rastový faktor. Pre pacientov s aktivačnými onkogénnymi inzerciami v exóne 20, ktoré sú lokalizované v kinázovej doméne HER2, je schválená a odporúčaná liečba monoklonálnymi protilátkami inhibujúcimi HER2 (6).

Somatický variant p.(V600E), ktorý sme identifikovali u 1 pacienta sa nachádza v exóne 15 génu BRAF. Proto-onkogén BRAF kóduje proteín s funkciou serín/treonín kinázy, ktorá je súčasťou signálnej dráhy zodpovednej za bunkový rast, proliferáciu a prežívanie buniek. Prítomnosť somatických patogénnych variantov v kodóne 600 génu BRAF u pacientov s NSCLC je asociovaná s odpoveďou na kombinovanú liečbu orálnymi inhibítormi BRAF a MEK (6).

Ďalším dôležitým biomarkerom zapojeným v onkogenéze NSCLC je MET exon 14 skipping. Gén MET kóduje receptorovú tyrozínkinázu, ktorá aktivuje signálne dráhy zapojené do proliferácie, prežívania a rastu buniek a má taktiež úlohu v embryonálnom vývoji, hojení rán a regenerácii tkanív. Incidencia MET exon 14 skipping mutácií je okolo 3% (25, 26). V našom súbore sme identifikovali genomické alterácie vedúce k tejto genomickej alterácii u 7/78 (8,9%) pacientov. Exón 14 kóduje juxtamembránovú doménu MET receptora, ktorá je kľúčovou regulačnou oblasťou zabraňujúcou nadmernej signalizácii MET. Predpokladá sa, že strata tejto oblasti alebo bodové varianty, ktoré napodobňujú stratu tejto oblasti, vedú k narušeniu správnej degradácie receptora, čo spôsobuje nadmernú aktiváciu signalizácie sprostredkovej MET a tým zvýšenú proliferáciu a prežívanie buniek (25).

RET proto-onkogén kóduje transmembránový receptor tyrozínkinázy, ktorý zohráva kľúčovú úlohu vo vývoji enterického a nervového systému a taktiež renálnej morfogénéze. Za fyziologických podmienok sa proteín RET skladá z troch domén: extracelulárnej domény obsahujúcej väzobné miesto ligandu, hydrofóbnej transmembránovej domény a intracelulárnej domény s aktivitou tyrozínkinázy. Aktivácia RET vedie k auto-fosforylácii intracelulárnej domény tyrozínkinázy a následne k aktivácii viacerých signálnych dráh vrátane RAS–MAPK, PI3K–AKT, PKC a JAK–STAT. Patogénne genomické alterácie v géne RET vedú k nadmernej expresii a ligand-nezávislej aktivácii signálnych dráh zapojených do proliferácie a prežívania buniek (27). Incidencia RET fúzií je u pacientov s NSCLC 1-3%. V našom súbore sme identifikovali RET fúzie u 3/78 (3,8%) pacientov. Pacienti s fúziami v géne RET môžu profitovať z liečby RET tyrozínkinázovými inhibítormi (6).

Ďalším odporúčaným prediktívnym biomarkerom je prítomnosť ALK fúzií (anaplastické lymfómové kinázy). Incidencia ALK fúzií je u pacientov s NSCLC 4-5% (28). V našom súbore sme identifikovali ALK fúzie u 3/78 (3,8%) pacientov. ALK inhibítory zvyšujú celkové prežívanie pacientov s ALK pozitívnymi formami NSCLC v porovnaní s chemoterapiou (28, 29).

Komplexné genomické profilovanie sa pomaly ale isto etabluje v oblasti personalizovanej onkológie. Napriek tomu, že tento prístup prináša mnohé výzvy ako sú vysoké počiatkové náklady a potreba vysoko špecializovaných odborníkov, jeho prínosy v liečbe onkologických pacientov sú nespochybniteľné. Naše zistenia potvrdzujú, že identifikácia špecifických

genomických zmien pomocou CGP môže mať kľúčový význam pre efektívnejšiu a cielenejšiu liečbu, čím sa otvárajú nové možnosti pre zlepšenie kvality života pacientov s onkologickými ochoreniami.

Zoznam použitej literatúry

1. Wang F, Su Q, Li C: Identification of novel biomarkers in non-small cell lung cancer using machine learning. *Scientific reports* 2022; 12(1), 16693.
2. World Health Organization (WHO)'s cancer agency, the International Agency for Research on Cancer (IARC). <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
3. Villalobos P, Wistuba II: Lung Cancer Biomarkers. *Hematology/oncology clinics of North America* 2017;; 31(1): 13–29.
4. Gambardella V, Tarazona N, Cejalvo JM a spol.: Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers* 2020; 12(4): 1009.
5. Thomas DM, Hackett JM, Plestina S: Unlocking Access to Broad Molecular Profiling: Benefits, Barriers, and Policy Solutions. *Public Health Genomics* 2021; 25:70–79.
6. National Comprehensive Cancer Network. (2024). Non-Small Cell Lung Cancer (version 3.2024). https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
7. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J a spol.: ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023;34(4):339-357.
8. Lohajová Behulová R, Valenčíková R, Urbán V: Testovanie molekulárných biomarkerov v liečbe a manažmente pacientov s karcinómom pľúc na Slovensku: Testing molecular biomarkers in the treatment and management of patients with lung cancer in Slovakia. *Onkológia. Suplement. Komplexný sprievodca nemalobunkovým karcinómom pľúc*. Bratislava: SOLEN, 2023: 18, 4-8..
9. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR a spol.: HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human mutation* 2016; 37(6): 564–569.
10. Richards S, Aziz N, Bale S a spol.: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2015; 17(5): 405–424.
11. Li MM, Datto M, Duncavage EJ a spol.: Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2017; 19(1): 4–23.
12. Mosele F, Remon J, Mateo J a spol.: Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann. Oncol* 2020; 31(11):1491-1505.

13. Chakravarty D, Johnson A, Sklar J a spol.: Somatic Genomic Testing in Patients With Metastatic or Advanced Cancer: ASCO Provisional Clinical Opinion [published correction appears in J Clin Oncol. 2022 Jun 20;40(18):2068]. J Clin Oncol. 2022;40(11):1231-1258.
14. Midha, A., Dearden, S., McCormack, R: EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). Am. J. Cancer Res 2015; 5(9):2892-2911.
15. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF a spol.: The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget 2016; 7(48), 78985–78993.
16. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T a spol.: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. Journal of the National Cancer Institute 2005; 97(5), 339–346.
17. Melosky B, Kambartel K, Häntschel M a spol.: Worldwide Prevalence of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. Molecular diagnosis & therapy 2022: 26(1), 7–18.
18. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J a spol.: Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. N. Engl. J. Med. 2018;378(2):113-125.
19. Mok TS, Cheng Y, Zhou X a spol.: Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations [published correction appears in J. Clin. Oncol. 2020 Nov 1;38(31):3725]. J Clin Oncol. 2020; 36(22):2244-2250.
20. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D a spol.: Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. The New England journal of medicine 2020; 382(1): 41–50.
21. Lim TKH, Skoulidis F, Kerr KM, Ahn MJ, Kapp JR, Soares FA, Yatabe Y: KRAS G12C in advanced NSCLC: Prevalence, co-mutations, and testing. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 2023; 184, 107293.
22. Garcia BNC, van Kempen LC, Kuijpers CCHJ, Schuurung E, Willems SM, van der Wekken AJ: Prevalence of KRAS p.(G12C) in stage IV NSCLC patients in the Netherlands; a nation-wide retrospective cohort study. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 2022: 167, 1–7.
23. Reita D, Pabst L, Pencreach E a spol.: Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance. Cancers 2022; 14(5), 1321.
24. <https://www.amgen.com/newsroom/press-releases/2022/01/european-commission-approves-lumykras-sotorasib-for-patients-with-kras-g12cmutated-advanced-nonsmall-cell-lung-cancer>
25. Socinski MA, Pennell NA, Davies KD: MET Exon 14 Skipping Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Overview of Biology, Clinical Outcomes, and Testing Considerations. JCO precision oncology 2021; 5, PO.20.00516.
26. Fujino T, Suda K, Mitsudomi T: Lung Cancer with MET exon 14 Skipping Mutation: Genetic Feature, Current Treatments, and Future Challenges. Lung Cancer (Auckland, N.Z.) 2021: 12, 35–50.

27. Andrini E, Mosca M, Galvani L, Sperandi F, Ricciuti B, Metro G, Lamberti G: Non-small-cell lung cancer: how to manage RET-positive disease. *Drugs in context* 2022; 11, 2022-1-5.
28. Chia PL, Mitchell P, Dobrovic A, John T: Prevalence and natural history of ALK positive non-small-cell lung cancer and the clinical impact of targeted therapy with ALK inhibitors. *Clinical epidemiology* 2014; 6, 423–432.
29. Soria JC, Tan DSW, Chiari R a spol.: First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study [published correction appears in *Lancet*. 2017 Mar 4;389(10072):908]. *Lancet*. 2017;389(10072):917-929.

18. Analýza zloženia črevného mikrobiómu u myšacích xenograftov s chemorezistentnými a chemosenzitívnymi testikulárnymi nádormi z germinatívnych buniek

Mgr. Aneta Ševčíková
(onkológia)

Spoluautori: Viola Števrková¹, Nataliia Nikolaieva¹, Silvia Schmidtová^{1,2}, Natália Udvorková¹, Lucia Rojiková¹, Silvia Tyčiaková¹, Katarína Kaľavská¹, Lucia Kučerová², Michal Mego², Soňa Čierniková¹

Školiteľ: doc. RNDr. Soňa Čierniková, PhD.¹

¹ Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Bratislava, ² II. onkologická klinika a Jednotka translačného výskumu LF UK a NOÚ, Bratislava

Úvod

Testikulárne nádory sú najčastejším typom solídnych nádorov u mladých mužov vo veku 15 – 45 rokov, pričom ich incidencia neustále narastá. Takmer 98 % všetkých prípadov tvoria testikulárne nádory z germinatívnych buniek (testicular germ cell tumors, GCTs). Zavedenie chemoterapie na báze cisplatiny prinieslo významný pokrok v liečbe GCTs, no u časti pacientov zlyháva účinnosť chemoterapeutickej liečby. Rozvoj rezistencie na cisplatinu vedie u týchto pacientov ku skráteniu života o viac ako 35 rokov z dôvodu úmrtia na progresiu ochorenia (1).

Črevný mikrobióm predstavuje komplexný ekosystém, ktorý tvorí súbor všetkých mikroorganizmov (baktérií, vírusov, kvasiniek, archaea a húb) osídľujúcich gastrointestinálny trakt spolu s ich génmi, metabolickými aktivitami a ekologickými funkciami. Zmeny v zložení črevného mikrobiómu prispievajú k formovaniu imunitného systému a ovplyvňujú distálne orgány prostredníctvom produkcie mikrobiálnych metabolitov a signálnych molekúl (2,3). Pribúdajúce dáta z predklinických a klinických štúdií poukazujú na úlohu črevného mikrobiómu nielen v onkogenéze, ale aj v účinnosti protinádorovej liečby a toxicite asociovanej s terapiou. Prítomnosť určitých bakteriálnych druhov v črevnom mikroprostredí môže zvýšiť účinnosť protinádorovej terapie, zatiaľ čo nepriaznivé zloženie mikrobiómu je asociované s oslabenou odpoveďou (4,5). Nedávny výskum poukazuje na prepojenie medzi mikrobiómom a semenníkmi prostredníctvom existencie tzv. osi „mikrobióm-črevo-testis“, no táto oblasť zatiaľ predstavuje veľkú experimentálnu aj medicínsku výzvu (6). Pokroky v sekvenčných metódach, ako aj možnosť rozlíšenia bakteriálnych druhov osídľujúcich intestinálny trakt pomocou génu pre 16S ribozomálnu RNA, umožnili štúdium fylogénzy a taxonómie baktérií v neinvazívnych odberoch vzoriek stolice.

Cieľom našej práce bolo zaviesť metódy na analýzu črevného mikrobiómu v experimentálnom xenograftovom modeli z GCTs bunkových línií a odhaliť zmeny v mikrobiálnej kompozícii u myši nesúcich nádory v porovnaní s kontrolnými zvieratami, ako aj analyzovať rozdiely v mikrobióme zvierat s nádormi senzitivnými a rezistentnými na cisplatinu.

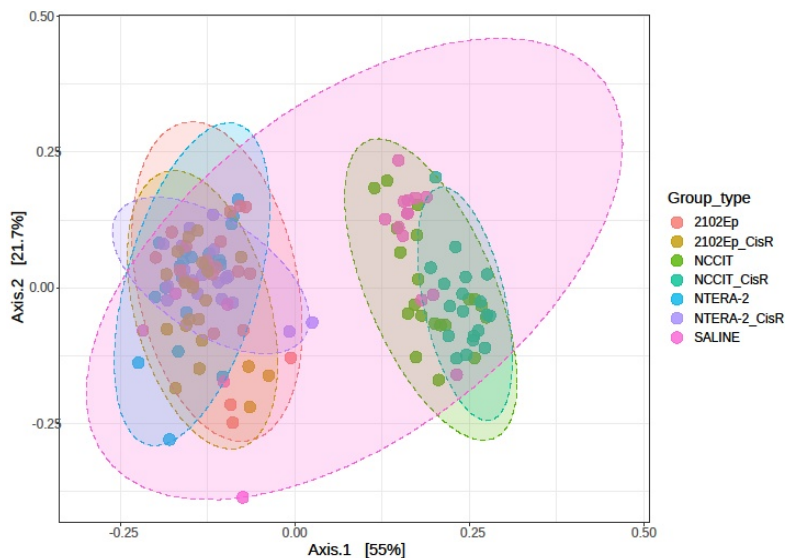
Materiál a metódy

V animálnej štúdii sme sa zamerali na stanovenie zloženia črevného mikrobiómu u myšiacich xenograftov vo veku 6-8 týždňov. Myšiam boli subkutánne aplikované senzitivné a rezistentné varianty troch typov nádorových bunkových línií odvodených od embryonálneho karcinómu (2102Ep, 2102Ep CisR, NCCIT, NCCIT CisR, NTERA-2 alebo NTERA-2 CisR). V každej experimentálnej skupine boli zaradení 4 samci NOD scid gamma myši, ktorí boli chovaní v samostatných klietkach a pri rovnakých podmienkach laboratórneho prostredia. V kontrolnej skupine boli 4 jedinci, ktorým bol namiesto nádorových buniek subkutánne aplikovaný fyziologický roztok. Všetkým jedincom (N=28) bola odoberaná stolica v týždňových intervaloch po dobu jedného mesiaca, pričom vždy pred aplikáciou nádorovej línie sme odobrali aj vzorku počiatočného tzv. bazálneho mikrobiómu. Vzorky sa pred ďalším spracovaním uskladnili do mraziaceho boxu na -80°C . Izolácia mikrobiálnej DNA zo vzoriek stolice prebiehala pomocou komerčne dostupného kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research) s následným vyhodnotením kvantity a kvality získanej DNA. Na templáte získanej DNA sme uskutočnili PCR amplifikáciu V4 hypervariabilnej oblasti 16S rRNA génu s použitím páru primerov 515 F a 806 R s linkerovými sekvenciami CS1 a CS2. Vzniknuté amplikóny boli použité ako templát pre druhú PCR, pri ktorej došlo k začleneniu unikátnych multiplexných identifikátorov tzv. „barcodes“ (Access Array™ Barcode Library for Illumina® Sequencers—384, Single Direction) o veľkosti 10 bp. Výsledné amplikóny boli paralelne sekvenované na platforme Illumina MiniSeq a získané sekvencie bioinformaticky spracované. Analýza zloženia mikrobiómu prebiehala pomocou internetovej platformy MicrobiomeAnalyst, ktorá umožnila komplexné vyhodnotenie a vizualizáciu výstupov mikrobiómovej štúdie.

Výsledky

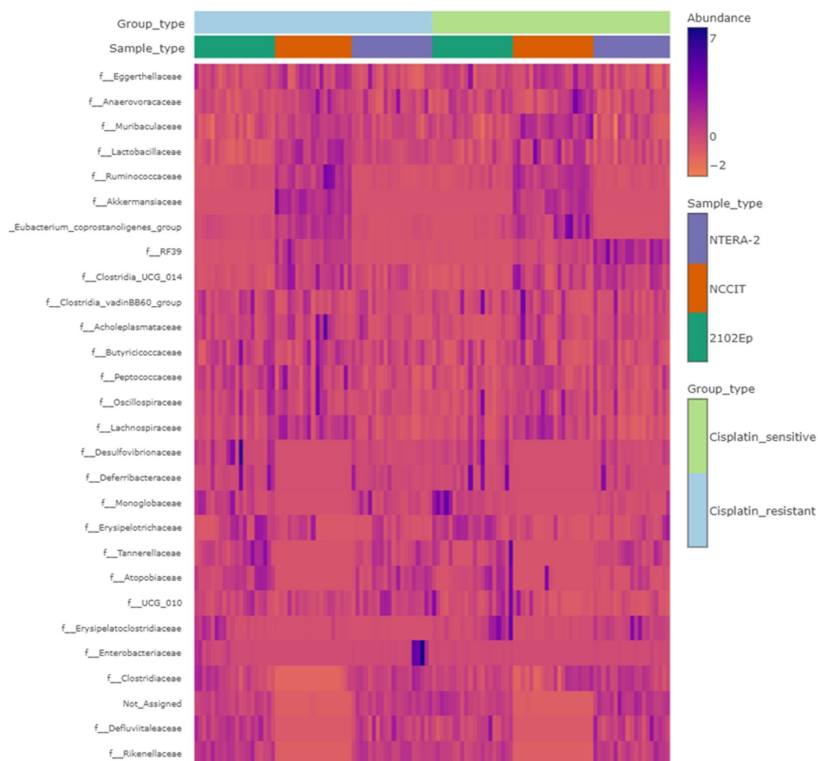
Počiatočné analýzy boli zamerané na štúdium odlišností v črevnom mikrobióme v závislosti od podanej nádorovej línie GTCs. Analýza črevného mikrobiómu poukázala na rozdiely v relatívnom zastúpení bakteriálnych čľadí u experimentálnych a kontrolných zvierat, ale tiež u xenograftov s rezistentnými a senzitivnými nádormi. Priaznivé bakteriálne čľade ako Akkermansiaceae a Erysipelotrichaceae mali vyššie zastúpenie u kontrolných zvierat, zatiaľ čo čľade Bacteroidaceae a Tannerellaceae sa ukázali ako štatisticky signifikantne vyššie zastúpené u myši nesúcich nádory. Zaujímavosťou bolo, že prítomnosť čľade Monoglobaceae úplne absentovala v mikrobióme kontrolných jedincov.

Na stanovenie porovnania rozmanitosti a početnosti bakteriálnych taxónov sme použili ukazovatele α a β diverzity. Analýza diverzity v rámci jednotlivých analyzovaných vzoriek (α -diverzita) bola stanovená pomocou Shannon indexu. Ako sa ukázalo, jeho priemerné hodnoty dosahovali > 2 , čo naznačuje vyššiu diverzitu v jednotlivých vzorkách. Analýza rozmanitosti taxónov medzi jednotlivými vzorkami (β -diverzita) pomocou Bray-Curtis indexu odhalila podobnú mikrobiálnu diverzitu u kontrolných jedincov a myši, ktorým boli aplikované senzitivné a rezistentné varianty NCCIT línie (Obrázok 1).



Obrázok 1. Stanovenie β -diverzity bakteriálnych komúní u xenograftov so subkutánne podanými nádorovými bunkovými líniami z germinatívnych buniek a kontrol. PCoA analýza pomocou Bray-Curtis indexu odráža rôznorodosť medzi pozorovanými vzorkami. Vzdialenosť medzi bodmi predstavuje úroveň ich rozdielu a čím sú body (vzorky) ku sebe bližšie, tým vyššia je ich podobnosť.

Pomocou teplotnej tzv. heat mapy (Obrázok 2) sme porovnali zloženie mikrobiómu myší na základe citlivosti nádorov na cisplatinu. Farebná škála teplotnej mapy stanovila bohatosť taxónov v jednotlivých vzorkách u senzitivných a rezistentných xenograftov. Z výsledkov vyplynulo vyššie zastúpenie čeladi Ruminococcaceae a Erysipelatoclostridiaceae u myší so senzitivnými nádormi, zatiaľ čo u myší s rezistentnými nádormi sme zaznamenali vyššiu prítomnosť zástupcov čeladi Butyrificoccaceae, Rikenellaceae a Lachnospiraceae UCG.001.



Obrázok 2. Teplotná mapa znázorňujúca zastúpenie bakteriálnych taxónov na úrovni čeľade v závislosti od podanej nádorovej línie GCTs. Farebná škála vyjadruje bohatosť taxónov vo vzorkách v rámci senzitivných a rezistentných GCTs línií. Z ľavej časti obrázka sú zaznamenané skupiny zvierat s podanými rezistentnými nádorovými líniami odvodenými od embryonálneho karcinómu, v poradí 2102Ep CisR, NCCIT CisR a NTERA-2 CisR. V pravej polovici sú znázornené ich senzitivné varianty.

Pri detailnejšom stanovení mikrobiálnych rozdielov u senzitivných a rezistentných variantov jednotlivých GCTs línií (Tabuľka 1) sme pozorovali až 9-násobne vyššie zastúpenie rodu *Candidatus Arthromitus* z čeľade Clostridiaceae u NCCIT xenograftov citlivých na cisplatinu. Výsledky analýz diferenciálnej abundancie odhalili 3-násobne vyššie hladiny *Anaeroplasma* u 2102Ep rezistentných xenograftov v porovnaní s 2102Ep senzitivným variantom, zatiaľ čo rod *Blautia*, ako člen čeľade Lachnospiraceae, vykazoval 5-násobne vyššie hladiny u rezistentných NTERA-2 xenograftov.

Tabuľka 1. Štatisticky signifikantne odlišné bakteriálne rody v závislosti od senzitivity a rezistencie podaných GCTs línií na cisplatinu.

Taxonomické zaradenie	Pomer	Vlastnosti taxónu
g_Candidatus Arthromitus	NCCIT>NCCIT CisR	imunoregulačné vlastnosti, aktivujú Th17 bunky
g_Anaeroplasma	2102Ep<2102Ep CisR	prozápalové vlastnosti
g_Blautia	NTera-2<NTera-2 CisR	znížená účinnosť protinádorovej terapie

Diskusia

Štúdium črevného mikrobiómu sa dostáva do popredia onkologického výskumu. Neustále pribúdajú údaje, ktoré potvrdzujú dôležitú úlohu mikroorganizmov v iniciácii a progresii nádorových ochorení a tiež v odpovedi na chemoterapiu a imunoterapiu. Doposiaľ však chýbajú mikrobiómové štúdie zamerané na oblasť testikulárnych nádorov, ktorých liečba je založená predovšetkým na podávaní chemoterapie na báze cisplatinu.

Naša štúdia po prvýkrát poukázala na vplyv GCTs na zloženie mikrobiómu u myšiacich xenograftov v porovnaní s kontrolami. Viaceré in vivo analýzy, no najmä klinické štúdie, zaznamenali odlišné zastúpenie bakteriálnych taxónov v črevnom mikrobióme u rôznych druhoch nádorových ochorení v porovnaní s kontrolnými vzorkami (7,8). Detailná analýza rozdielov v mikrobióme senzitívnych vs. rezistentných xenograftov na cisplatinu odhalila štatisticky signifikantné rozdiely zástupcov vybraných čeľadí ako Butyrivibrionaceae, Erysipelatoclostridiaceae, Lachnospiraceae UCG.001, Rikenellaceae a Ruminococcaceae. Je preukázané, že toto liečivo má antibiotické účinky na gramnegatívne aj grampozitívne bakteriálne kmene a môže indukovať črevnú dysbiózu. Súčasne, liečba cisplatinou vyvoláva aj stratu črevnej bariéry prostredníctvom narušenej DNA replikácie rýchlo proliferujúcich buniek črevného epitelu (9). Priaznivá kompozícia mikrobiómu a prítomnosť vybraných prospešných druhov môže zvýšiť účinnosť cisplatinu cez stimuláciu tvorby reaktívnych foriem kyslíka, čo následne vedie k zvýšeniu poškodenia DNA, blokovaniu DNA opravy a transkripcie, výsledkom čoho dochádza k zvýšenej apoptóze nádorových buniek.

V nedávnej animálnej štúdií u myši s osteosarkómom, Tian a kol. (10) detegovali zmeny v mikrobióme xenograftov v porovnaní s kontrolami, ktorým bol aplikovaný fyziologický roztok. V experimentálnej skupine liečenej cisplatinou došlo ku zníženiu celkového objemu nádoru myši a v mikrobióme týchto jedincov bola detegovaná nižšia hladina čeľade Rikenellaceae, konkrétne Rikenellaceae_RC9_gut_group. Výsledky našej štúdie tiež poukázali na takmer 4-násobne nižšie zastúpenie tejto čeľade u senzitívnych xenograftov GCTs v porovnaní so vzorkami od zvierat s rezistentnými nádormi. Aj keď výskumy zamerané na prepojenie črevného mikrobiómu s nádormi testis a účinnosťou protinádorovej liečby doposiaľ absentujú, mnohé zistenia pri iných typoch malignít poukazujú, že nami detegované bakteriálne taxóny sú asociované s odpoveďou na chemoterapeutickú liečbu (11). Väčšina štúdií je však zameraná na ich vplyv pri účinnosti imunoterapeutickej liečby pomocou inhibítorov imunitných kontrolných bodov (12-15).

Záverom môžeme konštatovať, že naše pozorovania poukázali na viaceré mikroorganizmy, ktoré by mohli nájsť uplatnenie ako mikrobiálne biomarkery asociované s odpoveďou na liečbu cisplatinou. Do budúcnosti môžu naše výstupy poslúžiť ako podklad pre plánovanie výskumov zameraných na štúdium osi „mikrobióm-črevo-testis“ a možností modulácie črevného mikrobiómu za účelom prekonania chemorezistencie u refraktérnych pacientov s nádormi testis.

PodĎakovanie

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou VEGA, čísla projektov 2/0069/22 a 1/0071/24.

Zoznam použitej literatúry

1. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA: International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology* 2015; 3(1): 4–12.
2. Sevcikova A, Mladosevicova B, Mego M, Ciernikova S: Exploring the Role of the Gut and Intratumoral Microbiomes in Tumor Progression and Metastasis. *International journal of molecular sciences* 2023; 24(24): 17199.
3. Sevcikova A, Izoldova N, Stevurkova V, Kasperova B, Chovanec M, Ciernikova S, Mego M: The Impact of the Microbiome on Resistance to Cancer Treatment with Chemotherapeutic Agents and Immunotherapy. *International journal of molecular sciences* 2022; 23(1): 488.
4. Ciernikova S, Sevcikova A, Mladosevicova B, Mego M: Microbiome in Cancer Development and Treatment. *Microorganisms* 2024; 12(1): 24.
5. Ciernikova S, Sevcikova A, Drgona L, Mego, M: Modulating the gut microbiota by probiotics, prebiotics, postbiotics, and fecal microbiota transplantation: An emerging trend in cancer patient care. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 2023; 1878(6): 188990.
6. Li X, Cheng W, Shang H, Wei H, Deng C: The Interplay between Androgen and Gut Microbiota: Is There a Microbiota-Gut-Testis Axis. *Reproductive sciences* 2022; 29(6): 1674–1684.
7. Yu H, Li XX, Han X a kol.: Fecal microbiota transplantation inhibits colorectal cancer progression: Reversing intestinal microbial dysbiosis to enhance anti-cancer immune responses. *Frontiers in microbiology* 2023; 14: 1126808.
8. Xiaofeng N, Jian C, Jingjing W, Zhanbo Q, Yifei S, Jing Z, Shuwen H: Correlation of gut microbiota with leukopenia after chemotherapy in patients with colorectal cancer. *BMC microbiology* 2023; 23(1): 349.
9. Yin B, Wang X, Yuan F, Li Y, Lu P: Research progress on the effect of gut and tumor microbiota on antitumor efficacy and adverse effects of chemotherapy drugs. *Frontiers in microbiology* 2022; 13: 899111.
10. Tian Z, Qiao X, Wang Z a kol.: Cisplatin and doxorubicin chemotherapy alters gut microbiota in a murine osteosarcoma model. *Aging* 2024; 16(2): 1336–1351.

11. Aarnoutse R, Ziemons J, Hillege LE a spol: Changes in intestinal microbiota in postmenopausal oestrogen receptor-positive breast cancer patients treated with (neo)adjuvant chemotherapy. *NPJ breast cancer* 2022; 8(1): 89.
12. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L a spol: Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)* 2018; 359(6371): 97–103.
13. Peng Z, Cheng S, Kou Y a spol: The Gut Microbiome Is Associated with Clinical Response to Anti-PD-1/PD-L1 Immunotherapy in Gastrointestinal Cancer. *Cancer immunology research* 2020; 8(10): 1251–1261.
14. Ciernikova S, Sevcikova A, Kasperova B, Drgona L, Mego M: Targeting the Gut Microbiome in Cancer Treatment. In *Handbook of Cancer and Immunology*, Cham: Springer International Publishing 2022; 1-32.
15. Sevcikova A, Mego M, Ciernikova S: Vplyv črevného mikrobiómu na účinnosť imunoterapie u onkologických pacientov. *Onkologia* 2022; 17: 177-183.

19. Modely xenograftov odvodených od pacientov s karcinómom prsníka

MUDr. Minh Tuong Tran

(chirurgia, 2. ročník)

Spoluautori: Ing. Monika Buríková, PhD.¹, Mgr. Marína Cihová, PhD.¹, RNDr. Eva Sedlačková, PhD.¹, Ing. Peter Makovický, PhD.¹

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Boháč, PhD. MPH, MHA FEBOPRAS²

¹Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v. v. i., ²II. Onkologická klinika LF UK a NOÚ, Jednotka translačného výskumu

Úvod

Karcinóm prsníka je celosvetovo najčastejším nádorovým ochorením u žien. Na základe imunohistochemickej expresie hormonálnych receptorov sa karcinóm prsníka klasifikuje do 4 kategórií alebo subtypov. Tieto receptory sú estrogénový receptor (ER), progesterónový receptor (PR), ľudský epidermálny rastový faktor (HER2+) a od nich sú odvodené 4 podtypy rakoviny prsníka a to luminálny typ A, luminálny typ B, HER2 pozitívny a trojnásobne negatívny karcinóm prsníka.

Luminálny typ A karcinómu prsníka je charakterizovaný prítomnosťou ER a/alebo PR a neprítomnosťou HER2 a má nízku expresiu markera bunkovej proliferácie Ki67 (menej ako 20 %). Klinicky sú nižšieho stupňa malignity, rastú pomaly, majú najlepšiu prognózu a dobre reagujú na hormonálnu liečbu (tamoxifén alebo inhibítory aromatázy) (1).

Luminálny typ B karcinómu prsníka majú vyšší stupeň malignity a má horšiu prognózu ako luminálny typ A. Je tiež charakterizovaný prítomnosťou ER a/alebo PR, HER2 pozitivitou a vysokou expresiou Ki67 (viac ako 20 %). Tieto nádory reagujú na hormonálnu liečbu spolu s chemoterapiou (2).

HER2 pozitívna skupina tvorí 10–15 % karcinómov prsníka a je charakterizovaná vysokou expresiou HER2 s absenciou ER a PR. Rastú rýchlejšie ako luminálne typy a ich prognóza sa zlepšila od zavedenia terapií zameraných na HER2 ako sú trastuzumab, trastuzumab kombinovaný s emtazínom (T-DM1), pertuzumab a inhibítory tyrozínkinázy, ako sú lapatinib a neratinib. Tieto tumory reagujú lepšie na chemoterapiu ako predošlé subtypy (3).

Trojnásobne negatívny karcinóm prsníka (TNBC) je ER negatívny, PR negatívny a HER2 negatívny. TNBC sa vyznačuje agresivitou, skorým relapsom a väčšou tendenciou prejavovať sa v pokročilých štádiách (4).

Modely xenograftov odvodených od pacientov

Heterogenita karcinómov prsníka sťažuje úspešnú liečbu súčasnými terapiami a taktiež sťažuje presnú predpoveď účinnosti lieku s modelmi rakoviny ako sú bunkové línie kultivované in vitro

a in vivo. Preto boli vyvinuté modely xenograftov odvodených od pacienta (z angl. patient-derived xenografts, PDX), aby lepšie odrážali heterogenitu pôvodných nádorov pacientov. PDX sa vytvárajú implantovaním ľudských nádorov do vysoko imunodeficientných myši a následne sa udržiavajú pasážovaním z myši na myš. PDX sa používajú najmä na zhodnotenie účinnosti chemoterapeutickej liečby alebo na charakteristiku nádorových buniek a ich mikroprostredia, keďže tieto modely sú podobné pôvodným nádorom pacientov (5).

Najčastejšie sa používajú NSG myši, tiež známe ako NOD SCID gama. Ide o myš, ktorá má charakteristiky neobéznej diabetickej myši (NOD/ShiLtJ), má nedostatky vo vrodenej imunite, zároveň ťažkú kombinovanú mutáciu imunitnej nedostatočnosti (SCID) a deficit gama reťazca receptora IL2, ktorý inhibuje cytokínovú signalizáciu. Preto NSG myši majú nedostatok zreých T buniek, B buniek, funkčných NK buniek a majú tiež zníženú cytokínovú signalizáciu (6).

Nádory sa pred implantáciou narežú na malé kúsky a následne sa môžu implantovať heterotopicky (vo väčšine prípadov subkutánne) alebo ortotopicky do imunodeficientných myši. Pri PDX rakoviny prsníka sa preferuje ortotopická implantácia do prsných žliaz, kde sa dá tumor presnejšie monitorovať a mikroprostredie okolo implantovaného nádoru je podobné tomu u pacienta, čo umožňuje nádorom interagovať so zložkami mikroprostredia. Tiež sa zvyšuje pravdepodobnosť výskytu metastáz, čo vedie k širokému uplatneniu modelov PDX (7).

Keďže liečebné stratégie sa medzi podtypmi karcinómu prsníka líšia, je potrebný vývoj modelov PDX pre každý podtyp. Väčšina nádorov lumenálnych typov A a B je účinne liečená terapeutickými stratégiami zameranými na ER a produkciu estrogénu, preto sa estrogénové pelety často implantujú do imunodeficientných myši pred transplantáciou nádoru (5).

HER2 pozitívne nádory vykazujú relatívne nízku mieru úspešnosti implantácie a počet štúdií s použitím tohto typu PDX je obmedzený. Kang a kol. úspešne využili tento model a ukázali, že proteín obsahujúci WW doménu 2 (WBP2) pomohol inhibičnému účinku trastuzumabu, monoklonálnej protilátky zacielenej na HER271 (8).

Keďže trojnásobne negatívny karcinóm prsníka neexprimuje ER, PR alebo HER2, nemožno ho liečiť endokrinnou terapiou alebo anti-HER2 cieľnými stratégiami. PDX modely sú dobrou voľbou pri TNBC, pretože vykazujú najvyššiu mieru úspešnosti implantácie, čiastočne aj kvôli svojej silnej agresivite. El Ayachi et al. ukázali pomocou PDX modelu, že inhibícia signalizácie Wnt/ β -katenín/HMGA2/EZH2 zbavila chemorezistencie na doxorubicín u tohto typu nádoru. Na základe týchto výsledkov navrhl terapiu zameranú na Wnt signalizáciu pri TNBC (9).

Aplikácia modelov PDX na klinické použitie

Úspešnosť transplantácie od pacienta na myši sa líši v závislosti od typu nádoru, následná úspešnosť transplantácie z myši na myš je vo všeobecnosti vysoká. Preto, ak sa PDX úspešne zavedú prvou transplantáciou, tieto myši môžu byť následne použité na iné účely pasážovaním nádorov z modelov PDX na väčší počet myší (10).

Modely PDX môžu byť použité pri vývoji nových liečiv, keďže sú schopné presnejšie predpovedať účinnosť lieku než xenograft bunkovej línie alebo geneticky upravená myš. Grunewald a kol. skúmali pomocou nádorových bunkových línií a PDX modelov rakoviny prsníka aktivitu nového inhibítora receptora fibroblastového rastového faktora (FGFR), rogaratinibu. Zistilo sa, že inhibítor FGFR účinkuje na bunky, ktoré nadmerne exprimujú FGFR

in vitro aj in vivo. Na základe týchto zistení sa začali klinické štúdie rogaratinibu u pacientov s nádormi nadmerne exprimujúcimi FGFR (11). Ďalej modely PDX môžu byť použité pri TNBC, ktoré majú nedostatok účinných terapeutických cieľov. Takto sa urýchlia štúdie na vývoj liečiv proti TNBC, respektíve na každý TNBC podtyp (12).

Obmedzenia súčasných modelov PDX

Víziou do budúcnosti je používanie modelov PDX súčasne s klinickou liečbou na terapiu pacientov s karcinómom prsníka. Existuje však niekoľko obmedzení, ktoré musia byť prekonané, aby sa mohli takýmto spôsobom modely PDX používať. Úspešnosť implantácie karcinómov prsníkov je veľmi nízka, a to 9% pri ER primárnych tumoroch a 16% pri metastatických ER pozitívnych tumoroch. Úspešnosť je vyššia pri HER2 pozitívnych tumoroch a to 25% pri primárnych a 33% pri metastatických tumoroch. Najvyššia úspešnosť je pri TNBC a to 58% pri primárnych a 85% pri metastatických tumoroch. Preto pri ER a HER2 pozitívnych tumoroch sú modely PDX nespôhlivé ako terapeutická možnosť. Vytvorenie modelu trvá 3 mesiace až 1 rok, čo môže spôsobiť oneskorené určenie terapeutической stratégie (13).

Súčasný modely PDX sú vytvorené transplantáciou nádorov do vysoko imunodeficientných myši, ktorým chýba väčšina komponentov imunitného systému potrebná na dosiahnutie vyššej miery príjmu. Aby sa zreprodukovali presnejšie charakteristiky pôvodného tumoru, do modelov PDX sa môžu transplantovať nádorovo asociované fibroblasty (CAFs) alebo mezenchymálne stromálne bunky (MSCs) získané od pacienta spolu s nádorovými bunkami.

V neposlednom rade treba brať do úvahy aj finančné hľadisko, pretože vysoko imunodeficientné myši sú veľmi drahé spolu s nákladmi na udržiavanie týchto myši v čistom prostredí, keďže trvá dlhú dobu, kým sa nádory uchytiť a začnú rásť v modeloch PDX.

Materiál a metódy

V spolupráci s Oddelením molekulárnej onkológie Ústavu experimentálnej onkológie v Biomedicínskom centre SAV v.i.i., vyvíjame PDX modely karcinómu prsníka, avšak pri in vivo metódach chýbajú chirurgické zručnosti, ktoré by pomohli v napredovaní projektu takým spôsobom, že by po následnej liečbe a chirurgickom odstránení tumoru naďalej myš prežila. S mojou súčinnosťou tak môžeme sledovať potencionálne metastázy. Doposiaľ bolo štandardom, že myš bola utratená a následne nádor odobratý. Získané výsledky by mali viesť k lepšiemu pochopeniu fyziológie nádoru a mechanizmov ovplyvňujúcich odpoveď na liečbu. Tieto nástroje by nám v budúcnosti mohli pomôcť optimalizovať a personalizovať terapiu u konkrétnych pacientov.

V Biomedicínskom centre SAV sme sa zamerali na pasážovanie PDX ortotopickým transplantovaním kúska nádorového tkaniva na ďalšiu líniu NSG myši. Po vyoperovaní tumorov sme myši nechali naďalej prežívať, aby sme mohli následne sledovať potencionálne metastázy. Pri ER pozitívnom tumore sme implantovali do myši estrogénovú peletku (17beta-estradiol 0,18 mg/peletka s 60-dňovým vylučovaním) pre stimuláciu rastu nádoru. Postup na excíziu tumoru a prípravu tkaniva na transplantáciu bol nasledovný:

Do indukčnej komory sme umiestnili myš s karcinómom prsníka s prívodom izofluránu.

Následne sme myš premiestnili na chirurgickú dosku, kde dostávala inhalačnú anestéziu cez malú tvárovú masku.

Myš sme položili na chrbát a prilepili nohy v ich prirodzenej polohe.

Tumor, ktorý sa nachádza na spodnej časti brucha v oblasti štvrtej bradavky sme za aseptických podmienok excidovali en bloc a po hemostáze sme operačnú ranu zažili v anatomických vrstvách.

Myš sme umiestnili späť do kletky. Myš sa zobudila a pohybovala sa v priebehu niekoľkých minút po operácii.

Nádor sme vložili do 15 ml kónickej skúmavky naplnenej 5 ml studeného Dulbeccovho modifikovaného Eagleovho média (DMEM).

Nádor sme preniesli na sterilnú Petriho misku obsahujúcu DMEM a tumor sme narezali na 1 mm³ fragmenty skalpelom za aseptických podmienok.

Časť nádoru sme poslali na histologické a imunohistochemické (IHC) vyšetrenie a časť fragmentov nádoru sme vložili do 15 ml kónickej skúmavky naplnenej studeným DMEM a položili na ľad. Tkanivo bolo v tejto chvíli pripravené na transplantáciu.

Pripravené fragmenty nádoru sme následne ortotopicky transplantovali do NSG myší. Transplantovali sme 2 typy tumorov. Prvý tumor pochádzal pôvodne od pacientky s lumenálnym podtypom B intraduktálneho karcinómu prsníka s IHC: ER+ 99%, PR+ 1%, HER2+, Ki67 40/90% (grade 3; pT1c pN0 pMx) s potvrdenou zárodočnou mutáciou v géne BRCA1 a CHEK2. Druhý od pacientky s trojnásobne negatívnym intraduktálnym karcinómom prsníka s IHC: ER-, PR-, HER2-, Ki67 50% (grade 3, pT2pN0pM0), ktorý už raz prepasázaný bol. Postup transplantácie karcinómu do NSG myší bol nasledovný:

Myš bola pripravená na operáciu rovnako ako pri excízii tumoru podľa bodov 1.-3. (viď hore).

Po príprave operačného poľa sme si v spodnej časti brucha centrálne v úrovni štvrtej bradavky spravili parasagitálnu incíziu a tupou preparáciou sme si sprístupnili štvrtú (inguinálnu) mliečnu žľazu bilaterálne

Pomocou separačných nožníc a pinzety sme si v mliečnych žľazách bilaterálne vytvorili malé vrecko a následne sme do neho vložili fragment tumoru. Vrecko sme zažili vstrebatelným materiálom.

Po hemostáze sme operačnú ranu zažili v anatomických vrstvách vstrebatelným materiálom.

Pri myši, ktorej sme transplantovali ER pozitívny karcinóm prsníka sme vložili estrogénovú peletku do interskapulárnej oblasti. Myš sme si napoložovali do pronačnej polohy a parasagitálnym rezom v interskapulárnej oblasti sme si sprístupnili interskapulárny tuk a pomocou pinzety sme do neho vložili estrogénovú peletku.

Po hemostáze sme zažili operačnú ranu v anatomických vrstvách vstrebatelným materiálom.

Každú myš sme umiestnili do späť do kletky. Myši sa zobudili a pohybovali sa v priebehu niekoľkých minút po operácii.

Tumor môže byť hmatateľný 2 až 8 týždňov po operácii. Medikamentóznou liečbu začneme, keď objem nádoru dosiahne 150–300 mm³. Myš po extirpácii TNBC, 4 týždne po operácii mala

extrémne ťažkosti s dýchaním a preto bola utratená. Pľúca boli odoslané na histologické vyšetrenie za účelom vylúčenia metastázy karcinómu.

Výsledky

V apríli 2023 bola do BMC SAV prijatá vzorka od pacientky A s intraduktálnym karcinómom prsníka, lúminálneho typu B, bez neoadjuvantnej terapie, grade 3, pT1c pN0 pMx. Táto vzorka bola po spracovaní implantovaná do myši PDX 0 - T82Xp0 spolu s ER peletkou. Po 11 mesiacoch bol tumor vyoperovaný a myš bola ponechaná naďalej prežívať, aby sa mohli následne sledovať potencionálne metastázy. Výsledky histologického a imunohistochemického vyšetrenia sú zhrnuté v tabuľke 1.

	Typ karcinómu	IHC
Pacientka A	intraduktálny karcinóm prsníka	ER+, PR1%, HER2+, Ki67+ (82%)
Model PDX 0 - T82Xp0	adenokarcinóm mliečnej žľazy	ER-, PR1%, HER2-, Ki67+ (80%)

Tab.1: ER – estrogénový receptor, PR – progesterónový receptor, HER2 – ľudský epidermálny rastový faktor, Ki67 – marker bunkovej proliferácie

V apríli 2023 bola do BMC SAV prijatá vzorka od pacientky B s intraduktálnym karcinómom prsníka, trojnásobne negatívnym typom, bez neoadjuvantnej terapie, grade 3, pT2 pN0 pM0. Táto vzorka bola po spracovaní implantovaná do myši PDX 0 - T83Xp0 spolu s ER peletkou, keďže výsledok IHC nebol toho času známy. V júli 2023 bola myš T83Xp0 utratená, nádor bol vyoperovaný a časť tumoru bola odoslaná na IHC vyšetrenie a druhá časť bola implantovaná do ďalšej myši PDX 1 – T83Xp1 bez všívania ER peletky, keďže histológia tumoru už bola známa. Vo februári 2024 bol tumor vyoperovaný, časť bola odoslaná na IHC vyšetrenie a druhá časť bola implantovaná do ďalšej myši PDX 2 – T83Xp2. Myš PDX 1 – T83Xp1 bola ponechaná prežívať ďalej, ale po necelom mesiaci bola utratená pre extrémne ťažkosti s dýchaním. Histológia preukázala akútny respiračný syndróm. Výsledky histologického a imunohistochemického vyšetrenia sú zhrnuté v tabuľke 2.

	Typ karcinómu	IHC
Pacientka A	Intraduktálny karcinóm prsníka	ER-, PR-, HER2-, Ki67+ (50%)
Model PDX 0 - T83Xp0	Skvamocelulárny karcinóm mliečnej žľazy	ER-, PR+, HER2-, Ki67-
Model PDX 1 - T83Xp1	Skvamocelulárny karcinóm mliečnej žľazy	ER-, PR+, HER2-, Ki67+ (1%)

Tab.2: ER – estrogénový receptor, PR – progesterónový receptor, HER2 – ľudský epidermálny rastový faktor, Ki67 – marker bunkovej proliferácie

Vzhľadom na fakt, že išlo o pacientku TNBC sme očakávali aj PDX IHC - ER, PR a HER2 negatív. Avšak zaznamenali sme slabú pozitivitu PR (1%). Ďalším prekvapujúcim faktom bolo, že proliferáčny marker Ki67 bol v PDX 0 negatívny a v PDX 1 veľmi slabo pozitívny (1%), pričom histologická správa pacientky uvádza 50% pozitivitu. Okrem iného, rast tohto nádoru z pacientky na myš (PDX 0) bol prekvapujúco rýchly a to 78 dní, preto by sme očakávali, že marker proliferácie bude vo vyššom percente exprimovaný, avšak ďalšou pasážou na myš (PDX1), pričom rast nádoru bol 218 dní prišlo k zvýšenej expresii Ki67, ale len na 1%.

Diskusia

V štúdií od Ji a spol. boli histologické a IHC charakteristiky približne na 90 % v súlade medzi primárnymi a PDX nádormi (14).

Nezrovnalosti v IHC profile pacientky A a PDX 0 - T82Xp0 bola pravdepodobne spôsobená chybnou aplikáciou ER peletky. Nádor rástol pomaly (11 mesiacov), zistili sme až pri operácii (február 2024), že ER peletka aplikovaná v apríli 2023 nebola rozpustená. ER peletku sme nedostatočne aplikovali do interskapulárneho tuku.

V prípade pacientky B, existuje niekoľko faktorov, ktoré mohli zapríčiniť rozdiel v Ki67 a PR hodnotách v PDX modeloch a v pôvodnom nádore pacienta. Mikroprostredie v modeli PDX, v ktorom nádor rastie je iné ako rástol v tele pacienta. Toto zmenené mikroprostredie by mohlo ovplyvniť rýchlosť bunkovej proliferácie a následne expresiu Ki67. Pri každom pasážovaní môže dôjsť k potencionálnym zmenám v biológii nádoru, ktoré môžu ovplyvniť zmeny v bunkových receptoroch, rýchlosť bunkovej proliferácie a tak aj hladiny expresie Ki67. Časom môžu nádorové bunky akumulovať genetické zmeny, ktoré môžu ovplyvniť ich charakteristiky, vrátane rýchlosti proliferácie.

Aj keď existujú dôkazy, ktoré naznačujú, že expresia Ki67 sa môže v modeloch PDX meniť, presný mechanizmus týchto zmien si vyžaduje ďalšie skúmanie s väčším počtom subjektov.

Podporené grantom VEGA 2/0067/22

Zoznam použitej literatúry

1. Higgins MJ, Stearns V: Understanding resistance to tamoxifen in hormone receptor-positive breast cancer. *Clinical Chemistry* 2009; 55(8):1453-1455.
2. Inic Z, Zegarac M, Inic M a spol.: Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clinical Medicine Insights. Oncology* 2014; 11(8):107-111.
3. Figueroa-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly R, Wolff AC: Treatment of HER2-positive breast cancer. *The Breast* 2014; 23(2):128-136.
4. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G: Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer* (Dove Medical Press). 2016; 20(8):93-107.

5. Zhang X, Claerhout S, Prat A a spol.: A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Research* 2013; 73(15):4885-4897.
6. Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL: Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harbor protocols* 2014; 1(7):694-708.
7. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature Reviews Cancer* 2015; 15(8):451-452.
8. Kang SA, Guan JS, Tan HJ a spol.: Elevated WBP2 Expression in HER2-positive Breast Cancers Correlates with Sensitivity to Trastuzumab-based Neoadjuvant Therapy: A Retrospective and Multicentric Study. *Clinical Cancer Research* 2019; 25(8):2588-2600
9. El Ayachi I, Fatima I, Wend P a spol.: The WNT10B Network Is Associated with Survival and Metastases in Chemoresistant Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research* 2019; 79(5):982-993.
10. Yu J, Qin B, Moyer AM a spol. Establishing and characterizing patient-derived xenografts using pre-chemotherapy percutaneous biopsy and post-chemotherapy surgical samples from a prospective neoadjuvant breast cancer study. *Breast Cancer Research* 2017; 19(1):130.
11. Grünewald S, Politz O, Bender S a spol.: Rogaratinib: A potent and selective pan-FGFR inhibitor with broad antitumor activity in FGFR-overexpressing preclinical cancer models. *International journal of cancer* 2019; 145(5):1346-1357.
12. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X a spol.: Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 2016; 11(6):e0157368:1-22.
13. Guillen KP, Fujita M, Butterfield AJ a spol.: A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nature Cancer* 2022; 3:232–250.
14. Ji X, Chen S, Guo Y a spol.: Establishment and evaluation of four different types of patient-derived xenograft models. *Cancer Cell International* 2017; 17, 122

20. Sacituzumab govitekan a jeho terapeutický účinok na chemorezistentné nádory semenníkov vznikajúce zo zárodočných buniek.

Mgr. Natália Udovorková

(onkológia)

Spoluautori: Mgr. Lucia Kučerová DrSc. ^{1,3}, prof. MUDR. Michal Mego DrSc. ^{1,4}

Školiteľ: Mgr. Lucia Kučerová DrSc. ^{1,3}

¹ Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ, Klenova 1, 833 10 Bratislava, ² Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitálska 24, 813 72 Bratislava, ³ Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, ⁴ II. onkologická klinika LF UK a NOÚ, Klenova 1, 833 10 Bratislava

Úvod

Nádory semenníkov vznikajúce zo zárodočných buniek (TGCT – z angl. Testicular germ cell tumors) sa v populácii nevyskytujú často, no u mužov vo veku 15 – 44 rokov je toto ochorenie najčastejším zhubným ochorením (1). Ide teda o diagnózu, ktorá postihuje najmä mladých ľudí, ktorí aj po úplnom uzdravení často trpia neplodnosťou, psychickými problémami, zdravotnými komplikáciami spojenými s chemoterapiou, rádioterapiou, či radikálnou orchiektómiou. Väčšina pacientov však veľmi dobre reaguje na chemoterapiu na báze platiny, ktorá je súčasťou štandardnej liečby (2). Existuje však malá skupina pacientov, u ktorých sa rozvinie chemorezistentné ochorenie, majú zlú prognózu a často recidivujú s fatálnymi následkami. Na základe histologickej klasifikácie sa TGCT delia na seminómy a neseminómy. Seminómy sa šíria pomalšie, sú citlivejšie na radiačnú terapiu a objavujú sa častejšie u starších pacientov. Neseminómy vykazujú rezistenciu voči chemoterapeutickej liečbe, sú agresívnejšie, často sa diagnostikujú neskôr a objavujú sa u mužov tesne po puberte, v neskoršom tínedžerskom veku (3, 4).

Chemoterapia na báze cisplatiny je dlhodobo zavedeným štandardom starostlivosti o pacientov s TGCT. Existuje asi 20 % pacientov, ktorí na tento typ liečby nereagujú. Na posilnenie účinnosti cisplatiny alebo zvýšenie citlivosti refraktérnych pacientov na toto chemoterapeutické činidlo by sa mohli použiť kombinované terapie s cisplatinou. Je však dôležité pochopiť mechanizmus, ktorým nádorové bunky získavajú rezistentný stav (5-9).

V niekoľkých typoch nádorových ochorení, vrátane TGCT, bola dokázaná mutácia, či deregulácia markerov kmeňových buniek. Deregulácia týchto markerov a signálnych dráh, v ktorých zohrávajú dôležitú úlohu, môže viesť k získaniu chemorezistencie, zvýšenej invázivnosti a celkovému zlepšeniu prežívania nádorových buniek. Stále pribúdajú predklinické a klinické dôkazy o tom, že by tieto markery mohli predstavovať vhodné terapeutické ciele pri malignitách. Po ovplyvnení týchto markerov inhibítorom alebo vhodnou protilátkou v monoterapii, či v kombinovanej terapii s cisplatinou, môže dôjsť k zníženiu

tumorigenicity rôznych typov nádorových buniek, alebo dokonca k zvráteniu chemorezistentného stavu (10, 11).

Konjugáty protilátka – liečivo (ADCs – z angl. Antibody – drug conjugates) sú nové spôsoby kombinovania protilátok s chemoterapiou. Princípom tohoto mechanizmu je väzba monoklonálnej protilátky s liečivom na špecifické proteíny alebo receptory lokalizované extracelulárne na určitých typoch buniek, vrátane nádorových. Takto naviazaný liek sa dostane do buniek a poškodí DNA cieľovej bunky. Súčasne sa liečivo uvoľňuje v extracelulárnom priestore, čo spôsobuje poškodenie a následnú smrť aj okolitých nádorových buniek (12). Liečivá typu ADC zacielené na povrchové markery nádorových kmeňových buniek predstavujú sľubnú novú stratégiu na špecifickú eradikáciu tejto podskupiny malígnych buniek.

Terapeutické účinky ADC boli dokázané pri niekoľkých typoch nádorových ochorení, vrátane ťažko liečiteľných a chemorezistentných (nádory vaječníkov, uroteliálne nádory, nádory hlavy a krku, nádory pľúc). Preukázali sa aj zmeny citlivosti na liečbu chemoterapiou. Súčasne mechanizmus ADC poškodzuje najmä konkrétne, cieľové (nádorové) bunky. Podľa našich zistení, doposiaľ neexistujú žiadne komplexné štúdie uvádzajúce účinok ADC u pacientov s TGCT, aj keď predstavuje veľmi účinnú liečebnú modalitu (13-15).

Sacituzumab govitekan (SG, IMMU –132) je typ ADC modality, ktorá obsahuje humanizovanú RS7 anti – Trop – 2 monoklonálnu protilátku, ktorá využíva svoj vlastný hydrolyzovateľný linker. Ten je dôležitý pre selektívne uvoľňovanie SN – 38, aktívneho metabolitu Irinotekanu. Dochádza k väzbe na proteín Trop – 2 kódovaný génom TACSTD2 (z angl. Tumor Associated Calcium Signal Transducer 2), ktorý je prednostne exprimovaný na povrchu nádorových buniek. Výsledný komplex je transportovaný do lyzozómov. Protilátka je katabolizovaná a linker je hydrolyzovaný. Uvoľňuje sa SN – 38, ktorý pôsobí na Topo 1 (topoizomerázu typu 1), spôsobuje poškodenie DNA a apoptózu buniek. SN – 38 sa zároveň uvoľňuje z bunky, a môže vyvolať cytotoxické účinky aj v susedných nádorových bunkách s nízkou povrchovou expresiou Trop – 2 (16).

V našej práci pilotné experimenty naznačujú, že ADC SG by mohol byť sľubnou terapeutickou modalitou pre pacientov s refraktérnym TGCT.

Materiál a metódy

Bunkové línie

V našej práci sme použili rôzne histologické subtypy nádorových zárodočných bunkových línií (GCTs – z angl. Germ Cell Tumors) vrátane embryonálneho karcinómu (2102Ep, NCCIT, TERA-1, TERA-2, NTERA-2 NEC8), choriokarcinómu (JEG-3, JAR), seminómu (TCam-2), teratómu (Susa), nádoru žltkového vaku (NOY-1), testikulárneho nádoru žltkového vaku (NCRG-1) a z nich odvodené izogénne varianty rezistentné na cisplatinu rezistentné varianty. Tieto bunkové línie boli komerčne zakúpené (ATCC® z angl. American Type Culture Collection), DSMZ z angl. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) alebo získané darom z iných laboratórií. Rezistentné varianty týchto bunkových línií boli derivované priamo v našom laboratóriu (postupným zvyšovaním selekčného tlaku cisplatinou) alebo získané darom. Kultivačné média (DMEM z angl. Dulbecco's Modified Eagles Medium, s obsahom

glukózy 4,5g/l , Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Germany; RPMI 1640, Sigma – Aldrich; Advanced-DMEM/F12 (1X) Gibco, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA; McCoy's 5A, Sigma – Aldrich). Všetky použité media obsahovali 10% fetálne hovädzie sérum (Gibco, ThermoFischer Scientific), a Antibiotický a antimykotický roztok A5955 (100x), Sigma - Aldrich. Bunky boli kultivované v podmienkach 2D alebo 3D (vo forme multicelulárnych sféroidov), v termostate pri 37°C s 5% obsahom CO₂.

qRT-PCR

RNA bola zo vzoriek vyzisovaná pomocou komerčne dostupného kitu (NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification; Macherey – Nagel; Germany) a prepísaná do cDNA s využitím kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer Scientific; Waltham MA, USA). V oboch prípadoch sme postupovali podľa priloženého manuálu výrobcu. Kvalita a čistota vyzisovanej RNA bola stanovená pomocou NanoDrop spektrofotometra ND – 100 (ThermoFischer Scientific). Génová expresia vo vzorkách bola sledovaná pomocou kvantitatívnej real – time PCR s využitím TaqMan sond (TaqMan™ Gene expression Assay, FAM; ThermoFischer Scientific). Porovnanie hladiny exprese sledovaných génov bolo vyhodnotené s použitím 2 – $\Delta\Delta C_t$ metódy, pričom expresia génu GAPDH (Glyceraldehyd – 3 – fosfát dehydrogenáza) bola referenčnou hodnotou. Pre priebeh reakcie bol použitý termocyklér AriaMX Real – time PCR systém (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

Prietoková cytometria

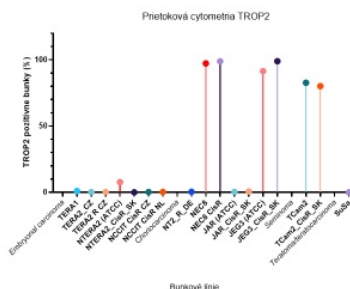
Na detekciu povrchového markera Trop – 2 bola použitá protilátka Trop – 2 anti – human, APC REAfinity™ clone REA916 (Miltenyi Biotec, Germany) v riedení 1:50 a bolo použitých 500 000 nádorových buniek. Mŕtve bunky boli vylúčené z analýzy na základe farbenia Sytox Green a analýza prebehla pomocou BD FACSCanto™ II flow cytometer (Beckton Dickinson, USA), ktorý obsahuje program FacsDiva. Dáta boli vyhodnotené pomocou programu FCS Express.

Stanovenie relatívnej bunkovej viability

Na stanovenie ciltivosti buniek po ovplyvnení Sacituzumab govitekanom (SG, IMMU-132, Selleckchem, Huston, USA) bol použitý luminiscenčný kit: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA), podľa postupu uvedeného u výrobcu. Bunky boli nasadené v množstve 1x10⁵/jamka v 100μl kultivačného média na 96 jamkové platničky (Cell culture microplate, F-bottom, μCLEAR®, white, cellstar®, Greiner Bio-one, Germany), po 6 hodinách boli liečené SG (Selleckchemm) v rôznych koncentráciách (v technických tripikátoch). Na konci experimentu boli hodnoty vyjadrené ako priemery replikátov ± SD, a relatívna viabilita bola uvedená v percentách. Za 100 % bunkovú viabilitu sa považovala luminiscencia kontrolných buniek bez liečiva. Hodnoty IC₅₀ sme vyhodnotili pomocou Graphad Prism® (Boston, MA,USA). 3D mnohobunkové sféroidy boli kultivované v 96 – jamkových platničkách s ultra – nízkou priľnavosťou (ULA platničky, Corning™; Thermo Fisher Scientific, NY USA). v kultivačnom médiu 3 dni. Následne boli ovplyvnené rôznymi koncentraciami liečiva - SG, (Selleckchemm). Po 4 dňoch bola relatívna viabilita 3D mnohobunkových sféroidov odtestovaná pomocou testu CellTiter-Glo™ 3D Cell Viability Assay (Promega Corporation) a výsledky boli vyhodnotené pomocou Graphad Prism® (Boston, MA,USA).

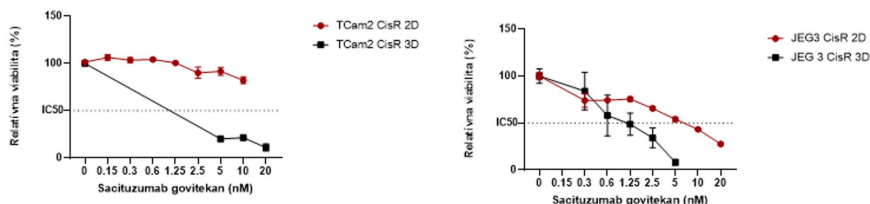
In vivo experimenty

Výsledky

[illegible]

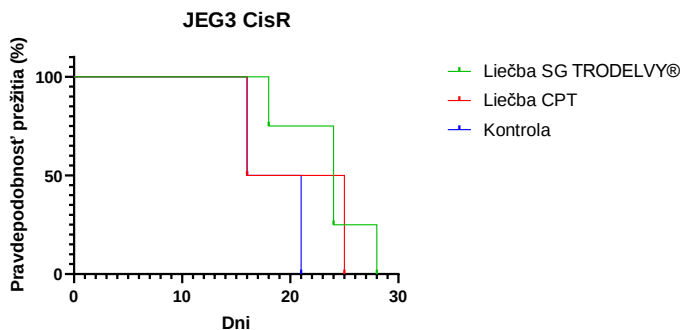
Cytotoxicita SG in vitro poukázala, že u bunkovej línie JEG3 CisR a TCam2 CisR bola senzitivita v 3D multicelulárnych sféroidoch vyššia v porovnaní s bunkovou líniou kultivovanou v 2D

prostredí (v monovrstve). Hodnoty IC50 boli: IC50 (TCam2 CisR 2D) = > 10 nM SG; IC50 (TCam2 CisR 3D) = 1,25 nM SG; IC50 (JEG3 CisR 2D) = 8 nM SG; (JEG3 CisR 3D) = 1,25 nM SG.



Obrázok 2: Stanovenie citlivosti SG na 2D a 3D bunkovom modeli línii TCam2 CisR a JEG3 CisR.

V ďalšom kroku sme skúmali tumorigenicita buniek JEG3 CisR. Aby sme mohli otestovať účinok SG na rast nádoru, vytvorili sa subkutánnym podaním nádorových buniek JEG3 CisR xenoimplantáty. Zvieratá boli rozdelené do skupín (kontrolné zvieratá bez liečby n=2; zvieratá liečené cisplatinou n=2; zvieratá liečené SG TRODELVY® n=4). Všetkým zvieratám sa vytvoril hmatateľný nádor medzi 4. až 7. dňom po podaní buniek. Prvá dávka liečby bola podaná zvieratám 7. deň. Zvieratá, ktorým bol podaný liek SG TRODELVY®, preživali dlhšie ako neliečená skupina a dokonca doba prežívania bola dlhšia v porovnaní s kohortou liečenou cisplatinou (graf 1).



Graf 1: Pravdepodobnosť prežitia (%) zvierat po podaní SG TRODELVY® v porovnaní s neliečenými zvieratami a zvieratami liečenými cisplatinou.

Diskusia

Cisplatina ako protinádorové činidlo bola schválená FDA (z angl. Food and Drug Administration) na liečbu rakoviny semenníkov už v roku 1978 a dodnes je terapeutikom používaným pri liečbe týchto pacientov v prvej linii. TGCT predstavujú asi 1% všetkých malignít, no u mladých mužov ide o najčastejšie sa vyskytujúce nádorové ochorenie. Tieto nádory sú veľmi senzitívne na chemoterapiu na báze cisplatiny, avšak asi 20% pacientov vykazuje na túto liečbu rezistenciu, majú zlú prognózu a zomierajú. Práve pre týchto pacientov je dôležité hľadať nové terapeutické ciele (17-19).

Trop – 2 je glykoproteín na povrchu buniek, ktorý je exprimovaný v rôznych tkanivách, vrátane epitelových buniek a určitých typoch nádorových buniek. Exprimuje sa hlavne počas ranného embryonálneho vývoja, podieľa sa na bunkovej adhézii, proliferácii a prenose signálu. Je nadmerne exprimovaný v mnohých typoch nádorov, vrátane nádorov pľúc, prsníka, pankreasu, vaječníkov a hrubého čreva, čo z neho robí zaujímavý cieľ vo vývoji terapie a liečby onkologických pacientov (13, 14, 20-22). Vyhľadávanie v databáze ukázalo expresiu Trop – 2 aj v nádorových zárodočných bunkách NTERA – 2 a Susa (1 – internetový zdroj uvedený v referenciách).

SG je liek na princípe ADC doposiaľ schválený FDA pre metastatický trojito – negatívny karcinóm prsníka (TNBC – z angl. Triple – negative breast cancer) a metastatický uroteliálny karcinóm (15, 23). Skúma sa tiež možná inhibícia Trop – 2 pomocou inhibítora PARP – 1 a imunoterapia (14). Na základe významného zlepšenia v prežívaní bez progresie u pacientov s metastatickým TNBC, sa SG stal prvým typom ADC vo svojej triede zameraným na Trop – 2 s anti – Trop – 2 protilátkou konjugovanou s inhibítorom topoizomerázy SN – 38 (24). Ďalším typom ADC terapie, ktorá funguje ako inhibítor topoizomerázy, je Trastuzumab Deruxtecán (T – DXd). T – DXd inhiboval rast ortotopických xenograftov (PDX – z angl. Patient derived xenograft), odvodených z mozgovej metastázy HER2+/HER2 – (HER2 – z angl. Receptor tyrosine – protein kinase erbB – 2) karcinómu prsníka (25).

V súčasnosti prebieha nábor do niekoľkých klinických štúdií, ktoré skúmajú SG a T – DXd ako možnú účinnú terapiu na princípe ADC. Ide napríklad o klinickú štúdiu SG s recidivujúcim alebo perzistujúcim karcinómom krčka maternice (NCT05838521), či karcinómom endometria (NCT04251416) a mnohé ďalšie. SG vstúpil do fázy II klinických skúšok v súvislosti s liečbou metastatického karcinómu slinných žliaz (NCT05884320). T – DXd je v prebiehajúcej klinickej štúdii zameranej najmä na metastatický HER2+ karcinóm prsníka (NCT04739761), či štúdiu s účastníkmi s HER2 mutovaným metastatickým nemalobunkovým karcinómom pľúc (NCT0464423). SG a T – DXd sa v súčasnosti stávajú veľmi zaujímavými Trop – 2 inhibítormi so sľubnými výsledkami pre rôzne typy nádorov, ktoré nadexprimujú tento povrchový glykoproteín (2 – internetový zdroj uvedený v referenciách). Pozitívne výsledky boli zaznamenané aj u pomerne novo vyvinutého konjugátu ADC – Datopotamab Deruxtecán (Dato – DXd, DS – 1062a) – so silným inhibítorom DNA topoizomerázy I (DXd) (26).

V našej práci sme dokázali prítomnosť a nadexpresiu glykoproteínu Trop – 2 na niekoľkých bunkových líniiach GCTs ako na úrovni proteínu, tak na úrovni génu. SG v 3D, cisplatina – rezistentnom bunkovom modeli TCam2 CisR a JEG3 CisR, mal silný cytotoxický účinok v nižších koncentraciách oproti 2D modelu. Toto zistenie naznačuje jeho možný protinádorový účinok in vivo. Na overenie protinádorového účinku SG TRODELVY® bola v pilotnom experimente na

skupine 8 zvierat subkutánne bilaterálne injikovaná bunková línia JEG3 CisR. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Neliečená skupina predstavovala kontrolu (n=4 xenografty), liečená kontrola ošetrovaná cisplatinou (n=4 xenografty) a liečená kontrola SG TRODELVY® (n=8 xenograftov). Napriek tomu, že skupina zvierat liečená SG TRODELVY® dosahovala najdlhšiu dĺžku prežívania v porovnaní s kontrolami ale aj skupinou liečenou cisplatinou, tieto výsledky nedosiahli štatistickú významnosť. JEG3 CisR je agresívny typ choriokarcinómu so zlou progresiou (27). V našom in vivo experimente nádory rástli agresívne a väčšina liečených zvierat musela byť z dôvodu zlého zdravotného stavu a presiahnutí veľkosti nádora 1x1cm3 utratená skôr, ako im boli podané všetky dávky liečiva, čo ovplyvnilo sledovať možný efekt liečiva v dlhšom čase.

Vzhľadom na naše výsledky plánujeme pokračovať v overení cytotoxického a protinádorového účinku liečiva SG na odlišných histologických bunkových líniah, v ktorých sme potvrdili nadexpresiu markera Trop – 2 a veríme, že potenciálne nové liečebné modalita na princípe ADC by mohli vytvoriť úplne nový smer v liečbe pacientov s recidivujúcim refraktérnym TGCT.

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja – grant APVV-20-0158, APVV-21-0197, grant VEGA 2/0124/21 a s podporou Nadácie Výskum rakoviny a Liga proti rakovine.

Zoznam použitej literatúry

1. Hires M, Jane E, Kalavska K, Chovanec M, Mego M, Kasak P, Bertok T, and Tkac J. Glycan signatures for the identification of cisplatin-resistant testicular cancer cell lines: Specific glycoproteomic profiling of human chorionic gonadotropin (hCG). *Cancer Med* 11: 968-982, 2022.
2. Ghazarian AA, Kelly SP, Altekruze SF, Rosenberg PS, and McGlynn KA. Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: Forecast through 2026. *Cancer* 123: 2320-2328, 2017.
3. Oldenburg J, Berney DM, Bokemeyer C, Climent MA, Daugaard G, Gietema JA, De Giorgi U, Haugnes HS, Huddart RA, Leão R, Sohaib A, Gillesen S, and Powles T. Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 33: 362-375, 2022.
4. Cabral ERM, Pacanhella MF, Lengert AVH, Dos Reis MB, Leal LF, de Lima MA, da Silva ALV, Pinto IA, Reis RM, Pinto MT, and Cárcano FM. Somatic mutation detection and KRAS amplification in testicular germ cell tumors. *Front Oncol* 13: 1133363, 2023.
5. Országhová Z, Kalavska K, Mego M, and Chovanec M. Overcoming Chemotherapy Resistance in Germ Cell Tumors. *Biomedicines* 10: 2022.
6. Schmidtova S, Kalavska K, Gercakova K, Cierna Z, Miklikova S, Smolkova B, Buocikova V, Miskovska V, Durinikova E, Burikova M, Chovanec M, Matuskova M, Mego M, and Kucerova L. Disulfiram Overcomes Cisplatin Resistance in Human Embryonal Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)* 11: 2019.
7. Schmidtova S, Dorssers LCJ, Kalavska K, Gillis AJM, Oosterhuis JW, Stoop H, Miklikova S, Kozovska Z, Burikova M, Gercakova K, Durinikova E, Chovanec M, Mego M, Kucerova L,

- and Looijenga LHJ. Napabucasin overcomes cisplatin resistance in ovarian germ cell tumor-derived cell line by inhibiting cancer stemness. *Cancer Cell Int* 20: 364, 2020.
8. Schmidtova S, Udovorkova N, Cierna Z, Horak S, Kalavska K, Chovanec M, Rojikova L, Vulevova M, Kucerova L, and Mego M. Effect of the PARP inhibitor veliparib on germ cell tumor cell lines. *Oncol Lett* 24: 392, 2022.
 9. Timmerman DM, Eleveld TF, Sriram S, Dorssers LCJ, Gillis AJM, Schmidtova S, Kalavska K, van de Werken HJG, Oing C, Honecker F, Mego M, and Looijenga LHJ. Chromosome 3p25.3 Gain Is Associated With Cisplatin Resistance and Is an Independent Predictor of Poor Outcome in Male Malignant Germ Cell Tumors. *J Clin Oncol* 40: 3077-3087, 2022.
 10. Karsten U, and Goletz S. What makes cancer stem cell markers different? *Springerplus* 2: 301, 2013.
 11. Oren O, and Smith BD. Eliminating Cancer Stem Cells by Targeting Embryonic Signaling Pathways. *Stem Cell Rev Rep* 13: 17-23, 2017.
 12. Hafeez U, Parakh S, Gan HK, and Scott AM. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* 25: 2020.
 13. Guerra E, Trerotola M, Relli V, Lattanzio R, Tripaldi R, Vacca G, Ceci M, Boujnah K, Garbo V, Moschella A, Zappacosta R, Simeone P, de Lange R, Weidle UH, Rotelli MT, Picciariello A, Depalo R, Querzoli P, Pedriali M, Bianchini E, Angelucci D, Pizzicannella G, Di Loreto C, Piantelli M, Antolini L, Sun XF, Altomare DF, and Alberti S. Trop-2 induces ADAM10-mediated cleavage of E-cadherin and drives EMT-less metastasis in colon cancer. *Neoplasia* 23: 898-911, 2021.
 14. Sakach E, Sacks R, and Kalinsky K. Trop-2 as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 14: 2022.
 15. Faltas B, Goldenberg DM, Ocean AJ, Govindan SV, Wilhelm F, Sharkey RM, Hajdenberg J, Hodes G, Nanus DM, and Tagawa ST. Sacituzumab Govitecan, a Novel Antibody--Drug Conjugate, in Patients With Metastatic Platinum-Resistant Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 14: e75-79, 2016.
 16. Rugo HS, Bardia A, Tolane SM, Arteaga C, Cortes J, Sohn J, Marm   F, Hong Q, Delaney RJ, Hafeez A, André F, and Schmid P. TROPICS-02: A Phase III study investigating sacituzumab govitecan in the treatment of HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Future Oncol* 16: 705-715, 2020.
 17. Huang D, Savage SR, Calinawan AP, Lin C, Zhang B, Wang P, Starr TK, Birrer MJ, and Paulovich AG. A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene* 40: 6395-6405, 2021.
 18. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, and Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209-249, 2021.
 19. McHugh DJ, Gleeson JP, and Feldman DR. Testicular cancer in 2023: Current status and recent progress. *CA Cancer J Clin* 2023.
 20. Qiu JR, Tang Q, Lin H, Wang ZC, Li YH, and Zhu J. [Expression and clinical significance of Trop-2 in human pancreatic cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 91: 103-106, 2011.
 21. Raji R, Guzzo F, Carrara L, Varughese J, Cocco E, Bellone S, Betti M, Todeschini P, Gasparini S, Ratner E, Silasi DA, Azodi M, Schwartz P, Rutherford TJ, Buza N, Pecorelli S, and Santin AD. Uterine and ovarian carcinosarcomas overexpressing Trop-2 are

- sensitive to hRS7, a humanized anti-Trop-2 antibody. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 106, 2011.
22. Heist RS, Guarino MJ, Masters G, Purcell WT, Starodub AN, Horn L, Scheff RJ, Bardia A, Messersmith WA, Berlin J, Ocean AJ, Govindan SV, Maliakal P, Mudenda B, Wegener WA, Sharkey RM, Goldenberg DM, and Camidge DR. Therapy of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With an SN-38-Anti-Trop-2 Drug Conjugate, Sacituzumab Govitecan. *J Clin Oncol* 35: 2790-2797, 2017.
 23. Bardia A, Mayer IA, Vahdat LT, Tolane SM, Isakoff SJ, Diamond JR, O'Shaughnessy J, Moroosse RL, Santin AD, Abramson VG, Shah NC, Rugo HS, Goldenberg DM, Sweidan AM, Iannone R, Washkowitz S, Sharkey RM, Wegener WA, and Kalinsky K. Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 380: 741-751, 2019.
 24. Shastry M, Jacob S, Rugo HS, and Hamilton E. Antibody-drug conjugates targeting TROP-2: Clinical development in metastatic breast cancer. *Breast* 66: 169-177, 2022.
 25. Adams E, Wildiers H, Neven P, and Punie K. Sacituzumab govitecan and trastuzumab deruxtecan: two new antibody-drug conjugates in the breast cancer treatment landscape. *ESMO Open* 6: 100204, 2021.
 26. Okajima D, Yasuda S, Maejima T, Karibe T, Sakurai K, Aida T, Toki T, Yamaguchi J, Kitamura M, Kamei R, Fujitani T, Honda T, Shibutani T, Muramatsu S, Nakada T, Goto R, Takahashi S, Yamaguchi M, Hamada H, Noguchi Y, Murakami M, Abe Y, and Agatsuma T. Datopotamab Deruxtecan, a Novel TROP2-directed Antibody-drug Conjugate, Demonstrates Potent Antitumor Activity by Efficient Drug Delivery to Tumor Cells. *Mol Cancer Ther* 20: 2329-2340, 2021.
 27. Watanabe E, Yokoi A, Yoshida K, Sugiyama M, Kitagawa M, Nishino K, Yamamoto E, Niimi K, Yamamoto Y, and Kajiyama H. Drug library screening identifies histone deacetylase inhibition as a novel therapeutic strategy for choriocarcinoma. *Cancer Medicine* 12: 4543-4556, 2023.
 28. www.proteinatlas.com
 29. www.clinicaltrials.com

21. Úloha Klotho proteínu v imunopatogenéze gliómov

Mgr. Eszter Zsemlye

(lekárske neurovedy)

Spoluautori: V. Ďurmanová¹, K. Klučková¹, J. Kozák², B. Rýchly³, M. Suchánková¹, M. Švajdler^{4,5}, J. Šteno², V. Matejčík², M. Bucová¹

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

¹ Imunologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, ² Neurochirurgická klinika LF UK a UN Bratislava, ³ Alpha Medical, s.r.o Bratislava, ⁴ Cytopathos, s r.o. Bratislava,

⁵ Šiklův ústav patológie, LF a FN Plzeň, Karlova Univerzita, Česká republika

Úvod

Gliómy sú najčastejšou formou primárnych malígnych nádorov mozgu u dospelých ľudí. Môžu sa vyskytovať v každej časti centrálnej nervovej sústavy (CNS), ale najčastejšie sa vyskytujú v mozgu. Podľa klasifikácie Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) sa delia na stupne I až IV (1). U viac ako polovice pacientov sa diagnostikuje najagresívnejšia a najmalígnejšia forma – multiformný glioblastóm (GBM; glióm IV. stupňa) (2). Napriek pokrokom v priemernom a krátkodobom prežívaní, percento pacientov, ktorí dosiahli 5-ročné celkové prežitie je stále veľmi nízke – 4,6 % (3).

Ľudský Klotho gén (KL gén) kóduje tri proteíny: α , β a KLR (klotho related) proteín. Multifunkčný α -Klotho proteín reguluje metabolizmus fosfátu, vápnika a vitamínu D. Okrem toho sa považuje za proteín dlhovekosti a zdravia v starobe, má antioxidantné, protizápalové, tumor supresívne aktivity a reguluje inzulínovú senzitivitu. Zistilo sa, že sérové hladiny α -Klotho proteínu sú nižšie u osôb nad 40 rokov a osôb s mnohými vekom podmienenými chorobami ako nádory, hypertenzia, choroby obličiek a ďalšie (4). α Klotho proteín sa vyskytuje v troch formách – membránovej a cirkulujúcej, ktorá môže byť solubilná (vzniká odštiepením membránovej formy) a sekrečná. Pre ťažkosti v ich rozlíšení sa pri stanovovaní ich koncentrácie sa obe cirkulujúce formy zvyknú označovať ako solubilné. Solubilný α -Klotho proteín môže plniť funkciu tumor supresorovej molekuly a inhibítora proliferácie tumorov cez reguláciu IGF-1 (insulin like growth factor) signálnej dráhy (5). Naopak, zvýšená hladina α -Klotho proteínu sa spája s viacerými pozitívnymi dôsledkami ako zvýšené prežívanie pacientov s rôznymi nádormi (6) a tiež zníženým rizikom kardiovaskulárnych chorôb (7).

Materiál a metódy

V štúdií bolo 55 pacientov (23 žien a 32 mužov) starších ako 18 rokov s histologicky overenými gliómami II. (N=15), III. (N=11) a IV. (N=29) stupňa (grade) s následnou čiastočnou alebo úplnou resekciou nádoru. Priemerný vek pacientov v čase diagnostiky bol 54,38±15,22 rokov.

Histologická diagnostika bola stanovená dvomi neuropatológmi podľa najnovších klasifikačných kritérií WHO. Kontrolnú skupinu tvorilo 140 zdravých dobrovoľníkov bez akýchkoľvek nádorov, autoimunitných chorôb a akútnych zápalových stavov (63 žien a 77 mužov s priemerným vekom $41,93 \pm 10,47$ rokov). Krv sa pacientom odoberala ráno pred chirurgickým zákrokom. Štúdia bola schválená Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice Bratislava. Všetky vyšetrenia prebiehali v súlade s Medzinárodnou etickou smernicou a Helsinskou deklaráciou. Od každého účastníka výskumu sme obdržali písomný informovaný súhlas pre zaradenie do štúdie a vedenie osobných údajov.

DNA sme izolovali z periférnej krvi a následne uskladnili v mrazničke pri -20°C , séra a plazmy v hlbokomraziacom boxe pri -80°C . Vyšetrovali sme dva polymorfizmy génu Klotho. Klotho polymorfizmus rs1207568 (alela G alebo A na pozícií -395) sme vyšetrovali metódou PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) podľa Liu et al. (2015) (8). PCR produkt mal veľkosť 257 bp. Po štiepení enzýmom Hpy 188III sme získali buď intaktný 257 bp amplikon (pre alelu G) alebo dva fragmenty veľkosti 147 bp a 100 bp (pre alelu A). Druhým vyšetrovaným polymorfizmom génu Klotho bol polymorfizmus rs564481 (alela C alebo T na pozícií 1818). PCR produkty veľkosti 164 bp sme štiepili reštrikčným enzýmom Nsi (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) (8), kde sme dostali intaktný 164 bp fragment (pre alelu C) alebo dva fragmenty veľkosti 136 bp a 28 bp (pre alelu T).

Sérové hladiny cirkulujúceho solubilného alfa Klotho proteínu (αKlotho) sme analyzovali u 55 pacientov s gliómami a 47 zdravých kontrol sandwichovou ELISA metódou podľa návodu výrobcu (human SAKL ELISA kit; Exbio, BioVendor, Brno, CzechRepublic). Dĺžka prežívania sa počítala odo dňa diagnostiky do marca 2022 alebo do smrti pacienta.

Štatistickú analýzu sme robili pomocou programov InStat a SAS. Signifikantné rozdiely v alelách a vo frekvencii genotypov medzi dvomi skúmanými skupinami (gliómoví pacienti a zdravá kontrola) sme vyhodnotili štandardným chi-kvadrátovým testom. Aplikovali sme Studentov t-test, Mann-Whitneyho test, Coxov model proporcionálnych rizík. Výsledky sme vyjadrili ako medián a medzikvartilný rozdiel (IQR; interquartile range), priemer $\pm$ štandardná odchýlka (SD) v závislosti od Gaussovského rozloženia. Hodnota $P < 0,05$ bola stanovená pre štatistickú významnosť.

Výsledky

1. Analýza Klotho rs1207568 a rs564481 polymorfizmov u pacientov s gliómami a kontrolnou skupinou

V skupine 55 pacientov s gliómami a 140 zdravých kontrol sme analyzovali frekvenciu alieli a genotypov Klotho rs1207568 (-395G/A) a rs564481 (1818C/T) génového polymorfizmu. Logisticko regresná analýza Klotho polymorfizmov rs1207568 v -395 G/A a rs564481 v 1818C/T neodhalila štatisticky signifikantný rozdiel vo frekvencii alieli a genotypov medzi pacientmi s gliómami a zdravými kontrolami. Zistili sme však signifikantné rozdiely v distribúcií alieli a genotypu pri polymorfizme génu Klotho rs1207568. Frekvencia alely rs1207568A ($p = 0,006$; OR = 6,22), genotypu rs1207568 GA v kodominantnom modeli ($p = 0,0064$; OR = 6,13), dominantnom modeli ($p = 0,0023$; OR = 7,16) a over-dominantnom modeli ($p = 0,011$; OR =

5,41) bola signifikantne vyššia u pacientov s gliómami IV. stupňa v porovnaní s pacientmi s gliómami II.+III. stupňa (Tabuľka 1).

Tabuľka 1. Frekvencie aliel a genotypov Klotho rs1207568 polymorfizmu u pacientov s gliómami II.+III. a IV. stupňa

SNP/ Model	Alela/ genotyp	Grade IV (n=29)	Grade II+ III (n=26)	Univariantná analýza		Multivariantná analýza	
				P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)
rs1207568	G	42 (72,41%)	49 (94,23%)				
-395G/A	A	16 (27,59%)	3 (5,77%)	0,006	6,22 (1,69- 22,84)	-	-
Kodominantný	GG	15 (51,72%)	23 (88,46%)		1,00		1,00
	GA	12 (41,38%)	3 (11,54%)	0,0064	6,13 (1,48- 25,44)	0,029	10,90 (1,39- 85,53)
	AA	2 (6,90%)	0 (0,00%)		NA (0,00-NA)		NA (0,00-NA)
Dominantný	GG	15 (51,72%)	23 (88,46%)		1,00		1,00
	GA+AA	14 (48,28%)	3 (11,54%)	0,0023	7,16 (1,75- 29,20)	0,0085	11,59 (1,51- 89,19)
	GG+GA	27 (93,10%)	26 (100,00%)		1,00		1,00
Recesívny	AA	2 (6,90%)	0 (0,00%)	0,10	NA (0,00-NA)	0,43	NA (0,00-NA)
	GG+AA	17 (58,62%)	23 (88,46%)		1,00		1,00
Over- dominantný	GA	12 (41,38%)	3 (11,54%)	0,011	5,41 (1,32- 22,21)	0,015	9,99 (1,25- 79,81)

Frekvencia aliel a genotypov sa uvádza v absolútnych počtoch s percentami v zátvorkách. Univariantná analýza je založená na χ^2 teste. Multivariantná analýza pridáva pohlavie a vek. OR - oddsratio; CI - konfidenčný interval, n-počet. Hodnota $p < 0,05$ bola stanovená pre štatistickú významnosť.

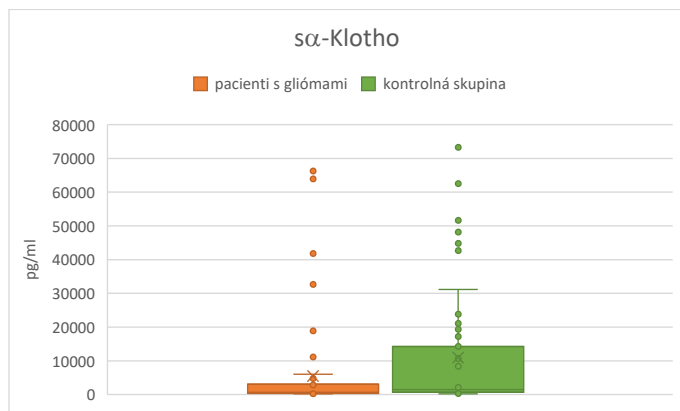
2. Prežívanie pacientov s gliómami a asociácia prežívania pacientov s vyšetrovanými polymorfizmami

Priemerné celkové prežívanie našich pacientov s gliómami bolo $25,3 \pm 24,36$ mesiacov od diagnostiky, u štádia II: $50,47 \pm 24,40$ mesiacov, štádia III: $32,45 \pm 20,14$ mesiacov a štádia IV: $9,57 \pm 9,28$ mesiacov.

Pri vyšetrení asociácie Klotho polymorfizmov rs1207568 a rs564481 s celkovým prežívaním u pacientov s gliómami sme nezistili štatisticky signifikantnú koreláciu medzi Klotho polymorfizmami a celkovým prežívaním pacientov v žiadnom nami vyšetrenom genetickom modeli.

3. Porovnanie sérových hladín α -Klotho proteínu u pacientov s gliómami a kontrolnou skupinou zdravých osôb

Sérové hladiny α -Klotho boli signifikantne nižšie u pacientov s gliómami (priemer $\pm$ SD 5471,9 $\pm$ 13971 pg/ml) v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých osôb (priemer $\pm$ SD: 10971 $\pm$ 18426 pg/ml; $p=0,0036$; Obrázok 1).



Obrázok 1. Sérové hladiny α -Klotho u pacientov s gliómami a kontrolnou skupinou.

Porovnávali sme hladiny α -Klotho u pacientov s gliómami v rôznych stupňoch choroby. Nezistili sme štatisticky signifikantný rozdiel medzi pacientmi s jednotlivými stupňami gliómov. Ale signifikantné rozdiely sme získali, keď sme porovnávali sérové hladiny α -Klotho medzi pacientmi s jednotlivými stupňami gliómov a kontrolnou skupinou. Našli sme štatisticky signifikantný rozdiel medzi pacientmi s gliómami III. a IV. stupňa v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p=0,034$ a $p=0,0083$) (Tabuľka 2).

Tabuľka 2. Porovnanie sérových hladín α -Klotho u pacientov s jednotlivými stupňami gliómov a kontrolnou skupinou

	Grade 2 (N=15)	Grade 3 (N=11)	Grade 4 (N=29)	KS (N=47)	p (2 vs. KS)	p (3 vs. KS)	p (4 vs. KS)
α KL (pg/ml) (priemer $\pm$ SD)	10923 25515	$\pm$ 6954 19704	$\pm$ 5180 $\pm$ 13242	10971 $\pm$ 18426	0,21	0,034	0,0083

α KL – solubilný alfa Klotho, SD – štandardná odchýlka

4. Korelácia medzi sérovou hladinou α -Klotho a celkovým prežívaním

Sérové hladiny α -Klotho u celého súboru pacientov s gliómami nekorelovali štatisticky signifikantne s celkovým prežívaním pacientov ($p=0,15$). Keď sme však pacientov s gliómami rozdelili na dve skupiny (pacienti s hodnotami solubilného α -Klotho pod 2500 pg/ml a nad 2500 pg/ml), zistili sme, že pacienti s hodnotami α -Klotho nad 2500 pg/ml prežívajú signifikantne dlhšie v porovnaní s pacientmi s hodnotami α -Klotho pod 2500 pg/ml ($p=0,038$).

5. Korelácia sérových hladín α -Klotho s vybranými biomarkermi

Keďže zápal a adaptívna bunkami mediovaná imunita sú dva kľúčové faktory, ktoré ovplyvňujú rast nádorov, zaujímalo nás, či sérové hladiny α -Klotho korelujú s nami vybranými a vyšetrovanými biomarkermi. Výsledky ukázali, že hladiny α -Klotho proteínu vysoko signifikantne pozitívne korelujú s koncentráciami vaskulárneho endotelového rastového faktoru VEGF ($p=0,0008$), chemokínu fraktalkin/CX3CL1 ($p=0,0009$) a cytokínu IL-13 ($p=0,0004$). Tiež pozitívne korelujú s hladinami Th1 cytokínu IFN- γ ($p=0,003$), neurotrofného faktora GDNF (glial derived neurotrophic factor; $p=0,027$) a cytokínmi IL-6 ($p=0,035$) a IL-4 ($p=0,0037$).

Diskusia

Väčšina nádorov centrálnej nervovej sústavy sa diagnostikuje až po objavení sa klinických príznakov. Markery, ktoré by vedeli predpovedať prežívanie pacientov s gliómami sú veľmi vzácné. Aj práve preto sa v súčasnosti veľa štúdií zameriava na výskum nových biomarkerov, ktoré by sa mohli používať na skorú diagnostiku a liečbu nádorov. Jeden z týchto biomarkerov je práve Klotho gén a Klotho proteín. Lee et al. uvádzajú epigenetické utlmenie Klotho génu v neskorej fáze tumorigenézy pri nádore krčka maternice a poukazujú na to, že strata funkcie Klotho génu môže viesť k aktivácii Wnt cesty (9). Klotho gén má významnú úlohu ako anti-onkogén v prípade ľudskej bunkovej línie nádoru pľúc A549, kde inhibuje rast a podporuje apoptózu (10). Liu et al. korelovali Klotho polymorfizmy rs1207568 (-395G/A) a rs564481 (1818C/T) s možnosťou vzniku karcinómu kolorekta a zistili, že AA a GA genotypy rs1207568 (-395G/A) polymorfizmu sú rizikovým faktorom pre vznik karcinómu kolorekta (8). V našej štúdií sme vyšetrovali Klotho polymorfizmus rs1207568 (-395G/A), kde sme zistili, že frekvencia alely A a genotypu GA bola signifikantne vyššia u pacientov s gliómami IV. stupňa v porovnaní s gliómami II. stupňa a frekvencia genotypu GA bola signifikantne vyššia u pacientov s gliómami IV. stupňa v porovnaní s gliómami III. stupňa.

Solubilný Klotho proteín má tiež komplexnú úlohu v rôznych typoch nádorov. Dokázala sa funkcia α -Klotho ako tumor supressora pri karcinóme vaječníkov v experimente aj v klinike (11). U nádorov pankreasu sa popisuje aj znížená expresia α -Klotho v nádorovom tkanive, čo môže byť prognostickým markerom nízkeho prežívania pacientov (12).

Záver

Zistili sme, že pri Klotho polymorfizme rs1207568 (-395G/A) je vyššia frekvencia alely A a genotypu GA u pacientov s gliómami IV. stupňa v porovnaní s nižšími stupňami (stupeň II. a

III). Namerali sme štatisticky signifikantne nižšie hladiny α -Klotho proteínu u pacientov s gliómami v porovnaní s kontrolnou skupinou. Keď sme skupinu gliómových pacientov rozdelili podľa stupňov nádorov a porovnali jednotlivé stupne s kontrolnou skupinou, zistili sme, že u pacientov s gliómami IV. stupňa bol štatisticky signifikantný rozdiel v porovnaní so zdravou kontrolou najvýraznejší. Na základe dostupnej literatúry a našich zistení môžeme predpokladať, že Klotho gén a solubilný α -Klotho proteín môžu byť potencionálnym biomarkerom pre diagnostiku gliómov. Napriek tomu, že funkcia Klotho sa dnes intenzívne skúma, presný mechanizmus ešte stále nie je jasný, preto sú potrebné ďalšie štúdie na objasnenie danej problematiky.

Štúdia bola podporená Slovenskou neziskovou organizáciou Liga proti rakovine (2018).

Zoznam použitej literatúry

1. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, a spol. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006 –2010. *Neuro-oncol.* 2013; 15(sup 6): ii1 –56.
2. Altieri R, Agnoletti A, Quattrucci F, a spol. Molecular biology of gliomas: present and future challenges. *Transl Med Uni Sa.* 2014; 10:29-37. PMID: 25147764; PMCID: PMC4140427.
3. Cantrell JN, Waddle MR, Rotman M, a spol. ProgressToward Long-Term Survivors of Glioblastoma. *Mayo Clin Proc* 2019; 94 (7):1278-1286. doi:10.1016/j.mayocp.2018.11.03
4. Pedersen L, Pedersen SM, Brasen CL, Rasmussen LM. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clin Biochem.* 2013;46:1079–1083.
5. Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, et al. KL1 internal repeat mediate klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4254–4266.
6. Mota J, Lima AMM, Gomes JIS et al. Klotho in Cancer: Potential Diagnostic and Prognostic Applications. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(21):3357.
7. Luo W, Wei N, Sun Z, Gong Y. Association between serum α -klotho level and the prevalence of heart failure in the general population. *Cardiovasc J Afr.* 2023;34:1-6.
8. Liu C, Cui W, Wang L, Yan L, Ruan X, Liu Y, Jia X, Zhang X. Klotho gene polymorphisms are related to colorectal cancer susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(6):7446-7449.
9. Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ and Lee MS. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 109.
10. Chen B, Wang X, Zhao W and Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 99.
11. Lojkin, I.; Rubinek, T.; Orsulic, S.; Schwarzmanna, O.; Karlan, B.Y.; Bose, S.; Wolf, I. Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer. *CancerLett.* 2015, 362, 149–157.

12. Haq, F.; Sung, Y.-N.; Park, I.; Kayani, M.A.; Yousuf, F.; Hong, S.-M.; Ahn, S.-M. FGFR1 expression defines clinically distinct subtypes in pancreatic cancer. *J. Transl. Med.* 2018, 16, 374.

22. Vplyv LL37 na dynamiku tvorby a degradácie neutrofilových extracelulárnych pascí

Mgr. Letícia Hudecová

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Emil Bečka, Jakub Janko

Školiteľ: Mgr. Michal Pastorek, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

Úvod

Imunitný systém má mnoho mechanizmov, ktorými sa bráni proti vzniknutej infekcii. Ako prvé prichádzajú do miesta infekcie neutrofilové, ktoré sú vyzbrojené arzenálom obranných mechanizmov voči infekcii. U ľudí predstavujú 50-70% všetkých cirkulujúcich leukocytov (1). Neutrofilové sú vyzbrojené peptidmi so silnou mikrobiocídou funkciou, ako sú napríklad myeloperoxidáza (MPO), neutrofilová elastáza, proteináza 3 alebo antimikrobiálne peptidy (2). Pri styku s patogénmi ich uvoľňujú počas fagocytózy, degranulácie a tvorbe neutrofilových extracelulárnych pascí (NETy). NETy sú zložené z chromatinových vlákien s naviazanými histónmi, granulárnymi a cytosolickými peptidmi. Spoločne vytvárajú sieť, do ktorej zachytávajú baktérie, čím zabraňujú šíreniu infekcie, avšak ich prítomnosť môže byť aj patologická (3). Zvýšené koncentrácie NETov v cirkulácii boli detekované u pacientov s autoimunitnými ochoreniami (systémový lupus erythematosus, reumatoidná artritída, psoriáza), trombózami, aterosklerózou alebo metabolickými ochoreniami, ktoré sú často asociované so sterilným zápalom. (4). Jednou z najčastejších negatívnych vlastností NETov je ich toxický vplyv na tkanivá. Komponenty NETov ako sú históny, MPO, elastázy alebo antimikrobiálne peptidy totiž vo vysokých koncentráciách poškodzujú integritu bunkovej membrány (5).

Jedným z antimikrobiálnych peptidov naviazaných na NEToch je aj katelicidín, respektíve jeho skrátená aktívna forma, LL37. Okrem antimikrobiálnej funkcie má aj mnohé imunomodulačné funkcie ako sú regulácia chemotaxie imunitných buniek, ovplyvňovanie fagocytózy alebo indukcia expzie cytokínov (6). LL37 má silný pozitívny náboj, vďaka čomu vytvára väzby s negatívne nabitou DNA. Preto sa prirodzene vyskytuje aj na NEToch a stabilizuje tiež DNA uvoľnenú z poškodených buniek alebo z baktérii. Následne LL37 uľahčuje internalizáciu DNA do buniek a potencuje tak aktiváciu receptora vrodenej imunity Toll-like receptor 9 (TLR9), čím sa spúšťa zápalová odpoveď.

V tejto práci sme skúmali hypotézu, podľa ktorej interakcia NET-DNA s LL37 povedie ku zvýšeniu rezistencie NETov voči degradácii plazmatickou deoxyribonukleázou I (DNáza I). Predpokladali sme, že takto ochránené NETy ďalej potencujú zápal cez aktiváciu TLR9 receptora a ich toxicita je priamo závislá od koncentrácie LL37. Niekoľko štúdií už ukázalo, že proteínový obsah NETov je závislý aj od stimulu, ktorých ich indukoval (9). Preto sme

postulovali ďalšiu hypotézu, že NETy indukované počas infekcie budú v porovnaní s NETmi indukované počas sterilného zápalu mať iné proteínové zloženie s vyšším obsahom LL37 a teda budú viac imunogénne. Pochopenie vplyvu LL37 na imunomodulačné vlastnosti NETov by nám mohlo otvoriť dvere k novým terapeutickým cieľom.

Materiál a metódy

Na izoláciu ľudských neutrofilov od zdravých dobrovoľníkov a myšacích neutrofilov z laboratórnych wild-type a katelidín-deficientných C57/BL6 myši bol použitý MojoSort Isolation Kit (BioLegend, San Diego, USA), ktorý na princípe negatívnej selekcie využíva protilátky viažuce sa na všetky ostatné leukocyty. Následne sú tieto protilátky pomocou avidín-biotín interakcie vychytané magnetickými guľičkami. V poslednom kroku sa odoberá frakcia so supernatantom, ktorý obsahuje už len neutrofile. Vyzolované neutrofile boli inkubované s nasledujúcimi stimulmi: forbol-12-myristát-13-acetát (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), *S. aureus* a mitochondrie na 3 hodiny za podmienok 37°C, 5% CO₂ v 5ml Petriho miske. Po inkubácii boli NETy zmyté z povrchu misy do 2 ml Eppendorf skúmavky a najskôr boli centrifugované na 400 g, 10min. Po centrifugácii bol odobratý supernatant, ktorý bol znovu centrifugovaný na 16 000 g, 10 min a ďalej sa pracovalo s peletmi.

Na analýzu rezistencie NETov voči degradácii DNázou I (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) boli NETy inkubované s DNA-viažúcou fabrikou, 200 nM SytoxTM green (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) celú noc pri teplote 37°C. Následne bola pridaná DNáza I 2,5 kU/reakcia na 1 hod, 37°C. Aktivita nukleázy bola zastavená s 2,5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), 75°C, 10 min. NETy sa nechali inkubovať na noc, 37°C a následne bola meraná fluorescencia SytoxTM green.

Schopnosť LL37 potencovať NETmi indukovanú aktiváciu TLR9 receptora bola analyzovaná prostredníctvom TLR9 bunkového reportérového systému (InvivoGen, San Diego, USA). Experiment bol zložený zo štyroch skupín: kontrolné NETy, NETy + DNáza I, NETy + LL37, NETy + LL37 + DNáza I. Všetky skupiny boli pridané k bunkovej kultúre HEK-293 Blue hTLR9. Po 16h inkubácii za podmienok 5% CO₂, 37°C, bola meraná koncentrácia produktu signálizačnej dráhy TLR9 systému.

Pre analýzu imunogenicity NETov na produkciu nových NETov bol použitý prietokový cytometer (Beckman Coulter, CA, USA). Do odobratej krvi zdravých dobrovoľníkov boli pridané NETy indukované s *S. aureus* a mitochondriami. Po 3 hod inkubácie pri teplote 37°C boli erytrocyty lyzované s chloridom amónnym. Pomocou fluorescenčne značenými protilátkami, ktoré sa špecificky viažu na neutrofile (CD66b-PE, CD10-APC, CD49d-PC7, FPR1-PC5) a na NETy (Zombie-NIR-APC 750, MPO-FITC, LL37-BV510) (BioLegend, San Diego, USA).

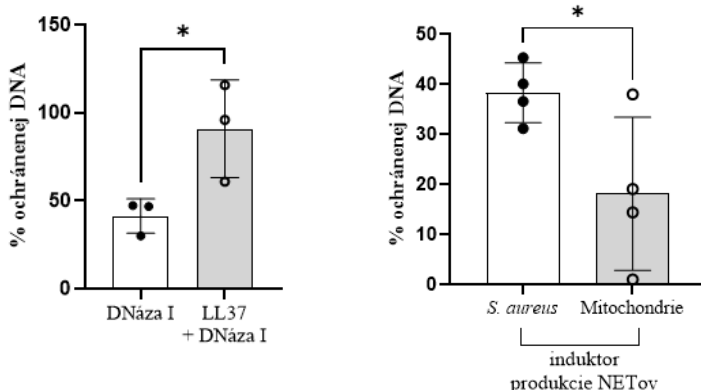
Výsledky

Prostredníctvom našich výsledkov sme preukázali že NETy majú vyššiu rezistenciu voči degradácii DNázou I v porovnaní s genomickou DNA. Po pridaní LL37 bolo takmer 100% NETov ochránených v porovnaní NETmi inkubovanými s DNázou I (Graf 1A). *S.aureus*-indukované NETy obsahovali vyššiu koncentráciu LL37 v porovnaní s NETmi indukovanými

mitochondriami. Preto sme pozorovali zvýšenú rezistenciu *S.aureus*-indukovaných NETov, až takmer 40% z pôvodnej koncentrácie NETov bolo ochránených (Graf 1B).

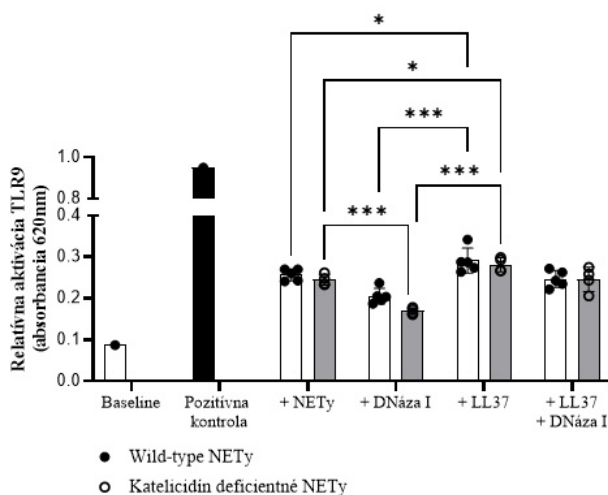
Inkubácia NETov s TLR9 reportérovým systémom preukázala, že NETy sú rozpoznávané TLR9 receptorom. Po pridaní LL37 bola aktivácia TLR9 receptoru zvýšená. Wild-type a katelicidín-deficientné NETy sa nelíšili v aktivácii TLR9 receptora, avšak sme pozorovali, že aj po opracovaní DNázou I boli katelicidín-deficientné NETy aktivovať TLR9 receptor (Graf 2).

Pomocou prietokového cytometra sme preukázali, že *S.aureus*-indukované NETy viac stimulovali tvorbu nových NETov, v porovnaní s NETmi indukovanými mitochondriami, (Graf 3). NETy indukované SA-NETmi obsahovali vyššiu koncentráciu LL37 v pomere s počtom produkovaných NETov indukovaných SA-NETmi v porovnaní s NETmi indukovanými MITO-NETmi (Graf 4).

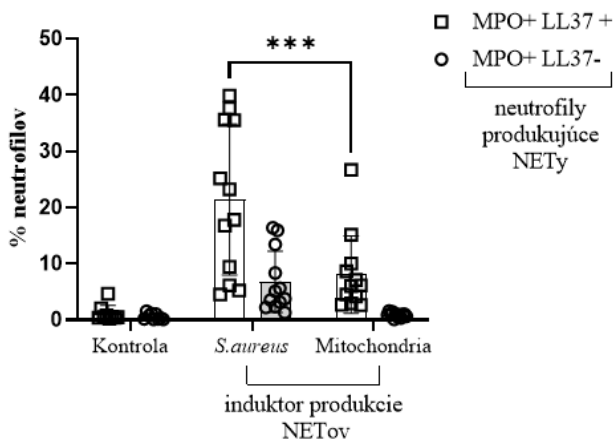


Graf 1A: Rezistencia NETov a ochranná funkcia LL37 pred degradáciou NETov exogénnou DNázou I v koncentrácii 2,5 KU/reakciu.

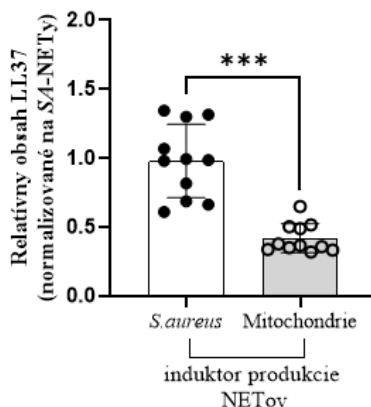
Graf 1B: Rezistencia NETov indukovaných s *S.aureus* a mitochondriami voči degradácii exogénnou DNázou I v koncentrácii 2,5 KU/reakciu. Údaje sú uvedené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné ($n=4$, $*p<0,05$).



Graf 2: Aktivácia TLR9 receptoru myšimi wild-type a katelicidín deficientnými NETmi, ktoré sú opracované s exogénnou DNázou I s koncentráciou 2,5 KU/reakciu a inkubované s LL37 v koncentrácii 90 ng/μl. Údaje sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné (n=5, *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001).



Graf 3: Indukcia ex vivo NETózy prostredníctvom NETov indukovaných s *S. aureus* a mitochondriami. Údaje sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné (n=5, *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001)



Graf 4: Obsah LL37 v NEToch indukovanými *S.aureus*-NETmi a NETmi indukovanými mitochondriami v pomere s počtom produkovaných NETov indukovaných SA-NETmi. Údaje sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné (n=12, *p<0,05, **p<0,01, * p<0,001).**

Diskusia

V našom výskume sme sa zamerali na vplyv LL37 na imunogenicitu NETov a vplyv rôznych induktorov na vlastnosti NETov. Výsledky štúdie z roku 2014 pod vedením doktorky Neumannovej ukázali, že LL37 zvyšuje stabilitu DNA v NEToch počas infekcie tým, že ich chráni pred bakteriálnymi nukleázami, čím podporuje antimikrobiálne aktivity neutrofilov (8). Preto sme sa zamerali na analýzu ochrannej funkcie LL37 pred degradáciou DNA v NEToch DNázou I, ktorá dosahuje vysoké koncentrácie v extracelulárnom prostredí. Preukázali sme, že LL37 zvyšuje rezistenciu NETov voči degradácii DNázou I. To by mohlo znamenať, že ochránené NETy zostávajú v cirkulácii a pôsobia toxicky na tkanivá, prípadne sú ich komponenty terčom auto-protilátok, čo ešte viac podporuje prebiehajúci zápal (4). a naše výsledky sú tak konzistentné s už publikovanou literatúrou(8). V ďalšej časti experimentu sme indukovali produkciu NETov pomocou *S.aureus* a mitochondrií. Po rozpoznaní patogénov sa aktivujú mechanizmy na obranu hostiteľa voči infekcií, čo spôsobí, že NETy indukované patogénmi obsahujú vyššiu koncentráciu LL37, čo ich robí viac rezistentné voči degradácii či už bakteriálnymi nukleázami alebo DNázou I. Našou hypotézou je, že počas sterilného zápalu neutrofily nemusia brániť hostiteľa pred infekciou, preto ani NETy nepotrebujú mať zvýšenú rezistenciu voči degradácii, čím sa telo chráni pred pretrvávajúcim sterilným zápalom.

V ďalšom experimente sme analyzovali imunostimulačnú funkciu myšacích NETov. Po pridaní LL37 sme pozorovali zvýšenú aktiváciu TLR9 receptora pri degradovaných aj nedegradovaných NEToch. Naše výsledky potvrdzujú štúdie Landeho a kol. z rokov 2007 a 2011 (7, 10). DNA z NETov sa vďaka LL37 ľahšie internalizujú do imunitných buniek, pričom LL37 sa vyhýba tolerancii vlastnej DNA a potencuje jej rozpoznanie receptorom TLR9. A keďže TLR9 receptor

rozpoznáva primárne bakteriálnu DNA, ktorá neobsahuje metylované CpG mostíky, tieto výsledky teda naznačujú, že NETy obsahujú nemetylovanú CpG DNA, ktorá je dostatočná na rozpoznanie receptorom TLR9. Pozorovali sme, že aj degradované NETy s nedostatkom katelicidínu generujú dostatočný signál na rozpoznanie receptorom a jeho aktiváciu. To naznačuje, že LL37/CRAMP nie je jediný peptid, ktorý chráni DNA pred degradáciou a potencuje rozpoznávanie DNA receptorom TLR9.

V poslednej časti experimentu sme indukovali ex vivo NETózu s NETmi indukovanými s *S.aureus* a mitochondriami. Pomocou prietokového cytometra sme preukázali, že *S.aureus*-indukované NETy viacej indukovali produkciu nových NETov v porovnaní s mitochondriami-indukovanými NETmi, čím vznikol začarovaný kruh. Fakt, že NETy indukujú tvorbu nových NETov už bol potvrdený niekoľkými štúdiami (11). Naším vysvetlením je, že vyššia koncentrácia LL37 naviazaná na SA-NEToch zvýšila rezistenciu NETov voči degradácii plazmatickou DNázou I a takto ochránená DNA bola pod vplyvom LL37 internalizovaná do neutrofilov, kde pomohol TLR9 receptoru rozpoznať vlastnú DNA, čím sa stimulovala produkcia nových NETov. NETy indukované *S.aureus*-NETmi obsahovali viacej LL37 v porovnaní s NETmi indukovanými MITO-NETmi. Predpokladáme, že čím vyššia koncentrácia LL37 je naviazaná na DNA, tým viac pomáha TLR9 receptoru ju rozpoznať, čím sa znovu aktivujú obranné mechanizmy neutrofilu. Avšak pochopenie vplyvu takýchto NETov na priebeh *S.aureus* infekcie si vyžaduje ďalší výskum.

Práca bola podporená grantom APVV č. APVV-21-0378.

Zoznam použitej literatúry

1. Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 172(5), 2731–2738.
2. Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 82(1), e00057-17.
3. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (New York, N.Y.), 303(5663), 1532–1535.
4. Carmona-Rivera, C., Zhao, W., Yalavarthi, S., & Kaplan, M. J. (2015). Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(7), 1417–1424.
5. Papayannopoulos V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature reviews. Immunology*, 18(2), 134–147.
6. Scheenstra, M. R., van Harten, R. M., Veldhuizen, E. J. A., Haagsman, H. P., & Coorens, M. (2020). Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation. *Frontiers in immunology*, 11, 1137.
7. Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y. H., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J. M., Liu, Y. J., & Gilliet, M.

- M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449(7162), 564–569.
8. Neumann, A., Völlger, L., Berends, E. T., Molhoek, E. M., Stapels, D. A., Midon, M., Friães, A., Pingoud, A., Rooijakkers, S. H., Gallo, R. L., Mörgelin, M., Nizet, V., Naim, H. Y., & von Köckritz-Blickwede, M. (2014). Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular
 9. Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, et al. (2019) Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS ONE* 14(7): e0218946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218946>
 11. Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y. J., & Gilliet, M. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*, 3(73), 73ra19.
 12. 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., Pennathur, S., & Kaplan, M. J. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine*, 5(178), 178ra40.

23. Vplyv pitia úžitkovej vody na organizmus hlodavcov

Mgr. Kristína Lichá

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Rebecca Horváthová¹, Andrej Feješ¹, Nikola Kováčová¹, Peter Celec^{1,2}, Tomáš Mackulák³, Barbora Tamášová¹

Školiteľ: Mgr. Barbora Tamášová, PhD.¹

¹ Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave,
² Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzity Komenského v Bratislave, ³ Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava

Úvod

Úžitková voda, ktorá sa vypúšťa z čistiarní odpadových vôd (ČOV) obsahuje, aj napriek prečisteniu, metabolity odpadových látok, ako napríklad endokrinných disruptorov, liečiv alebo drog. Pri akumulácii v organizme môžu byť tieto látky škodlivé a ovplyvňovať fyziologické funkcie organizmu, vrátane metabolizmu, správania alebo endokrinných funkcií. Zvýšená koncentrácia endokrinných disruptorov až na hodnotu 15 µg/l môže spôsobiť akútnu alebo chronickú toxicitu u ľudí (1). Úžitková voda z ČOV má vyššiu antimikrobiálnu rezistenciu v porovnaní s vodou z povrchových zdrojov (2). Z dôvodu biologicky neodbúrateľnej povahy antibiotík dochádza k šíreniu génov rezistencie pomocou vypúšťania úžitkovej vody do životného prostredia (3). Úžitková voda je v tejto štúdii prečistená voda podľa pravidiel Európskej únie, ktorá sa dostáva do životného prostredia, kde ju pijú živočíchy alebo sa používa na zavlažovanie. V upravenom stave, napriek tomu, že v nej aj po prečistení ostáva pomerne veľa rôznych nečistôt, ju prijíma aj človek. Doposiaľ boli publikované krátkodobé štúdie vplyvu pitia úžitkových vôd so zameraním sa na ťažké kovy alebo špecifické endokrinné disruptory. Cieľom tejto štúdie bolo však sledovať vplyv dlhodobého pitia úžitkovej vody z ČOV na organizmus a zdravie hlodavcov. Zamerali sme sa na sledovanie vplyvu celkovej úžitkovej vody, pričom sa v nej vo vyšších množstvách nachádzal kofeín, zvyšky antidepresív a antihypertenzív. Predpokladali sme, že kofeín, zvyšky drog a antidepresív môžu na testované zvieratá pôsobiť stimulačne, zlepšovať pamäť a znižovať úzkosť.

Materiál a metódy

V tejto štúdii bola použitá prečistená úžitková voda, ktorá bola zbieraná v ČOV Trnava. Čistenie odpadových vôd v sebe zahŕňa rôzne stupne, a to mechanické čistenie na odstránenie väčších častíc, sedimentáciu a odstraňovanie nerozpustných pevných látok, biologické čistenie na odstraňovanie rozpustných organických látok a dezinfekciu vypúšťaných odpadových vôd na odstránenie patogénnych mikroorganizmov. Úžitková voda v tejto štúdii bola zbieraná po poslednej fáze prečistenia a bola analyzovaná vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

Experimentálne zvieratá

Na túto štúdiu boli použité potkany kmeňa Wistar (Velaz, s.r.o., Praha, Česká republika). Samce ($n = 20$) a samice ($n = 10$) boli oddelene umiestnené v klietkach za kontrolovaných podmienok (teplota 22 ± 2 °C, vlhkosť 55 ± 10 %, cyklus svetlo-tma 12 h: 12 h), s ad libitum prístupom k potrave a vode. Všetky experimentálne postupy boli schválené Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR a boli vykonané v súlade so smernicou EÚ 2010/63/EÚ a slovenskou legislatívou.

Príjem vody a stravy

Zozbieraná úžitková voda z ČOV Trnava bola podávaná experimentálnej skupine – „wastewater“ skupina (WW). Kohútiková voda bola podávaná kontrolnej skupine (CTRL). Obom skupinám (CTRL a WW) sa podávalo štandardné krmivo pre hlodavce.

Experimentálny dizajn

Vo veku desať týždňov boli samce a samice rozdelené do dvoch skupín s približne rovnakou telesnou hmotnosťou. Desať samcov a päť samíc pilo úžitkovú vodu a desať samcov a päť samíc pilo kohútikovú vodu. Potkany pili úžitkovú vodu po dobu 8 mesiacov. Potkany boli raz týždenne vážené. Spotreba vody a krmiva bola meraná každé dva dni. Vzhľadom k obsahu látok vo vode, sme sa zamerali sme sa na sledovanie vplyvu zvyškov kofeínu, antidepresív a antihypertenzív, čomu sme prispôbili aj nasledujúce testy. Na zvieratách bola vykonaná séria behaviorálnych testov a bol im zmeraný krvný tlak.

Behaviorálne testy

Potkany boli po ôsmych mesiacoch behaviorálne testované so zameraním sa na lokomočnú a exploratívnu aktivitu, úzkostné správanie a pamäť. Správanie zvierat počas testovania bolo zaznamenané prostredníctvom videokamery a súbory boli analyzované prostredníctvom systému na spracovanie obrazu a videa EthoVision XT 10.1 (Noldus Information Technology, Wageningen, Holandsko).

Test otvoreného poľa (TOP) slúži na skúmanie lokomočnej aktivity. Štvorcová podlaha arény (100×100 cm) bola rozdelená na centrálnu (20×20 cm) a hraničnú zónu. Zvieratá boli jednotlivito umiestnené do stredovej zóny arény a voľne skúmali arénu počas 5 minút. Čas strávený v stredovej zóne a prejdená vzdialenosť boli merané. TOP zároveň slúžil aj ako habituácia na ďalší behaviorálny test – test rozpoznávania nového objektu (TRNO). TRNO slúži na testovanie pamäte a učenia a pozostáva z dvoch fáz. Počas tréningovej fázy boli potkany umiestnené do arény s dvomi identickými objektmi, ktoré skúmali po dobu 5 minút. Analyzoval sa celkový čas interakcií s ktorýmkoľvek z objektov, aby sa posúdilo exploratívne správanie. Následne boli zvieratá vložené do domácej klietky a po hodine boli naspäť vrátené do arény na 5 minút, pričom jeden objekt bol vymenený za nový s iným tvarom, materiálom a farbou ako známy objekt. Test vyvýšeného krížového poľa slúžil na testovanie anxiety. Aparatúra v tvare plus bola zložená z dvoch protiľahlých otvorených a z dvoch zatvorených ramien vybiehajúcich z centrálnej plošiny a nachádzala sa vo výške 60 cm nad podlahou.

Zvieratá boli umiestnené na centrálnu plošinu smerom k otvorenému ramenu a 5 minút skúmali arénu. Preferencia otvoreného ramena bola hodnotená ako počet vstupov do a času stráveného v otvorených ramenách vo vzťahu k vstupom a času v niektorých z ramien.

Meranie tlaku krvi

Krvný tlak bol neinvazívne meraný prostredníctvom tlakomeru CODA Monitor (Kent Scientific Corporation, USA). Zvieratá boli počas merania umiestnené do restrainerov, v ktorých boli predtým habituované. Restrainery boli položené na výhrevnej podložke, ktorá zabezpečovala počas celého merania prísun tepla. Meranie krvného tlaku prebiehalo v izolačnej miestnosti a počas merania boli pracovníci v tichu, aby sa predišlo zvýšenému stresu potkanov. Bol meraný systolický a diastolický krvný tlak.

Štatistická analýza

Získané výsledky boli spracované v programe Excel a štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad Prism (verzia 10.0.2). Grafy boli vytvorené v programe GraphPad Prism (verzia 10.0.2). Výsledné dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ smerodajná odchýlka.

Výsledky

Zloženie úžitkovej vody

Úžitková voda obsahovala vo zvýšenej koncentrácii kofeín a vo väčšom zastúpení sa tam nachádzali metabolity antidepresív, antihypertenzív a zvyšky drog.

Tabuľka č.1: Priemerné koncentrácie vybraných zložiek úžitkovej vody

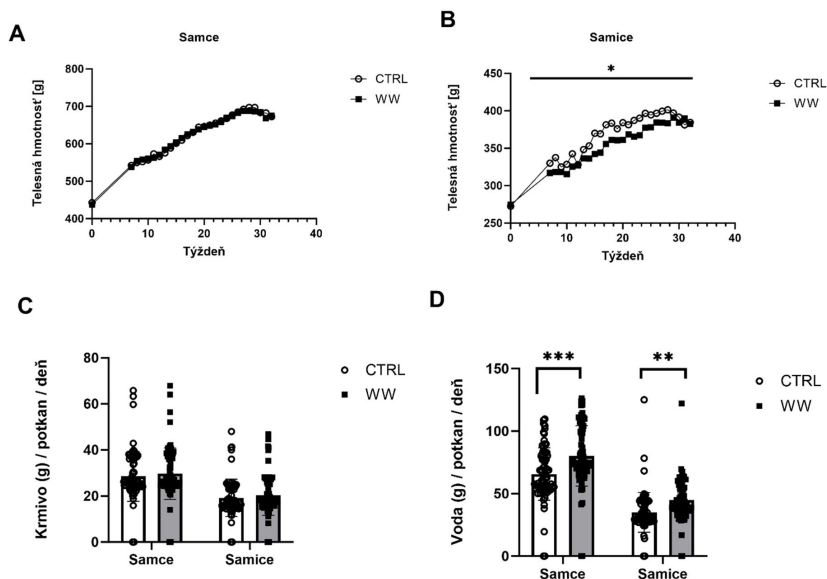
Zložka	Priemerná koncentrácia (ng/L)
Kofeín	19 850
Antidepresíva	40,9
Drogy	219
Antihypertenzíva	201

Vplyv pitia úžitkovej vody na telesnú hmotnosť testovaných zvierat

Telesná hmotnosť samcov CTRL skupiny bola $623,1 \pm 61,4$ a telesná hmotnosť samcov WW skupiny bola $622,1 \pm 59,8$ (Obr. 1A), ale nebol pozorovaný signifikantný rozdiel medzi skupinami samcov. Telesná hmotnosť samíc CTRL skupiny bola priemerne $367,7 \pm 30,9$ g, telesná hmotnosť samíc WW skupiny bola $353,7 \pm 29,1$ g a bola signifikantne nižšia v porovnaní s CTRL skupinou ($p < 0,01$) (Obr. 1B).

Vplyv pitia úžitkovej vody na príjem vody a krmiva testovanými zvieratami

Spotreba krmiva bola v oboch skupinách podobná (Obr. 1C). Príjem vody bol signifikantne zvýšený u samíc WW skupiny ($p < 0,01$) a u samcov WW skupiny ($p < 0,001$) (Obr. 1D).



Obrázok č.1: A,B: Hmotnosť samcov a samíc. C: Spotreba krmiva zvieratami. D: Spotreba vody zvieratami. Zobrazené hodnoty sú priemer $\pm$ SD. CTRL – kontrolná skupiny, WW – „wastewater“ skupina. ** $p < 0,01$. * $p < 0,001$.**

Vplyv pitia úžitkovej vody na správanie testovaných zvierat

Aby sme zistili, či úžitková voda vplýva na správanie zvierat bola vykonaná séria behaviorálnych testov zameraných na lokomočnú aktivitu, exploratívne správanie, pamäť a úzkosť. Pri behaviorálnych testoch nebol pozorovaný efekt pitia úžitkovej vody. Prejdená vzdialenosť v TOP samcov CTRL skupiny bola $2795,19 \pm 685,5$ cm a WW skupiny bola $2950,50 \pm 814,6$ cm. Prejdená vzdialenosť v TOP samíc CTRL skupiny $4621,68 \pm 1033,1$ cm a WW skupiny bola $4723,878 \pm 612,3$ cm. Čas strávený v centrálnej zóne v TOP samcov CTRL skupiny bol $13,4 \pm 10,7$ s a samcov WW skupiny bol $9,75 \pm 5,5$ s. Čas strávený v centrálnej zóne v TOP samíc CTRL skupiny bol $52,2 \pm 27,1$ s a samíc WW skupiny bol $35,9 \pm 13,8$ s. Exploratívny čas v TRNO samcov CTRL skupiny bol $54,8 \pm 25,0$ s a samcov WW skupiny bol $52,2 \pm 27,9$ s. Exploratívny čas v TRNO samíc CTRL skupiny bol $87,3 \pm 23,4$ s a samíc WW skupiny bol $74,1 \pm$

8,5 s. Hodnoty sú uvedené ako priemer $\pm$ smerodajná odchýlka. Čas v otvorených ramenách počas testu vyvýšeného krížového poľa samcov CTRL skupiny bol $44,9 \pm 22,1$ s a samcov WW skupiny bol $52,2 \pm 27,9$ s. Čas v otvorených ramenách počas testu vyvýšeného krížového poľa samíc CTRL skupiny bol $90,8 \pm 32,2$ s a samíc WW skupiny bol $104,4 \pm 26,8$ s.

Vplyv pitia úžitkovej vody na krvný tlak testovaných zvierat

Nebol pozorovaný efekt pitia úžitkovej vody na hodnoty krvného tlaku medzi CTRL a WW skupinou u samíc a samcov. Systolický krvný tlak samcov CTRL skupiny bol 128 mmHg a samcov WW skupiny bol 139 mmHg. Diastolický krvný tlak samcov CTRL skupiny bol 96 mmHg a samcov WW skupiny bol 101 mmHg. Systolický krvný tlak samíc CTRL skupiny bol 128 mmHg a samíc WW skupiny bol 129 mmHg. Diastolický krvný tlak samíc CTRL skupiny bol 94 mmHg a samíc WW skupiny bol 93 mmHg.

Diskusia

Úžitková voda, ktorá sa vypúšťa do prostredia a používa sa napríklad aj na zavlažovanie, následne prichádza do kontaktu s rôznymi organizmami, medzi ktoré patrí aj človek. Napriek prečisteniu v ČOV sa v nej stále nachádzajú odpadové látky, medzi ktoré patria zvyšky liečiv, kofeínu alebo drog. Človek síce prichádza do kontaktu s takouto vodou prevažne prostredníctvom konzumácie plodín alebo živočíchov, čo do značnej miery ovplyvňuje efekt na organizmus, avšak akumulácia odpadových látok môže mať škodlivý efekt na ľudský organizmus. Testovanie vplyvu úžitkovej vody je prevažne zamerané na vodné živočíchov (4–6). Vplyv dlhodobého pitia úžitkovej vody nebol doposiaľ detailne preskúmaný na organizmus hlodavcov. Preto sme sa v tejto štúdii rozhodli otestovať, ako bude vplývať pitie úžitkovej vody na organizmus hlodavcov, konkrétne potkanov. Zvieratá pili úžitkovú vodu po dobu 8 mesiacov, počas ktorých boli sledované jednotlivé parametre, ako hmotnosť potkanov, spotreba vody a krmiva. Na konci experimentu bol zvieratám zmeraný krvný tlak a boli behaviorálne testované. Tieto testy boli vybrané na základe zložiek, ktoré sa našli v úžitkovej vode. Medzi zložky, ktoré sa v úžitkovej vode nachádzali vo vyššom zastúpení patrili zvyšky kofeínu, drog, liekov na zníženie krvného tlaku či antidepresíva.

Samice potkanov WW skupiny mali nižšiu hmotnosť v porovnaní s CTRL samicami. Tento pokles hmotnosti by mohol byť sčasti spôsobený napríklad vyšším obsahom kofeínu v úžitkovej vode. Pri samcoch sme efekt v zmene hmotnosti nepozorovali. Spotreba vody bola vo WW skupine zvýšená v prípade oboch pohlaví, čo by mohlo naznačovať opäť efekt kofeínu alebo zvyškov drog. Pri spotrebe jedla sme tento efekt nepozorovali. Bolo publikované, že potkany, ktoré prijímali kofeín počas 6 týždňov v dávkach 213 mg alebo 284 mg kofeínu/kg telesnej hmotnosti potkana/deň mali zníženú hmotnosť v porovnaní s kontrolnou skupinou (7). Taktiež tieto potkany skonzumovali menej krmiva a vody než kontrolná skupina. Uvedomujeme si, že dávka kofeínu, ktorú prijímali potkany v našom experimente je násobne nižšia, keďže testujeme vplyv celkovej úžitkovej vody, a teda efekt kofeínu na organizmus potkanov sa nemusí prejavíť, ale pri dlhodobom prijímaní takejto vody sa môže efekt kofeínu naakumulovať.

Podobne aj behaviorálne testovanie nepreukázalo efekt dlhodobého pitia úžitkovej vody na správanie, pamäť alebo anxiétu potkanov. Predpokladali sme, že potkany WW skupiny by mohli mať zvýšené exploratívne a lokomočné správanie, vzhľadom na prítomnosť metabolitov antidepresív a kofeínu v úžitkovej vode, keďže kofeín pri nižších dávkach pôsobí ako stimulant (8). Bol publikovaný článok, ktorý tvrdil, že keď boli potkany vystavené vyšším dávkam kofeínu, preukazovali anxiogénne správanie (9). V našej štúdii sa nepotvrdil podobný efekt a zvieratá nevykazovali anxiogénne správanie. Pri hodnotení treba brať stále do úvahy aj nižšie dávky kofeínu a vplyv iných látok nachádzajúcich sa v úžitkovej vode, ako napríklad zvyškov antidepresív, ktoré môžu mať opačný, a teda anti-anxiogénny efekt. Kofeín môže mať slabý efekt na zlepšenie pamäte (10). V našej štúdii zvieratá WW skupiny nevykazovali lepšiu pamäť.

Vzhľadom k tomu, že v úžitkovej vode sa nachádzali aj zvyšky antihypertenzív, zamerali sme sa aj na hodnoty krvného tlaku zvierat. Nepreukázali sme zníženie krvného tlaku zvierat WW skupiny, ale naopak hodnoty krvného tlaku boli mierne zvýšené v porovnaní s CTRL skupinou.

Pri hodnotení všetkých testov treba brať do úvahy, že sme testovali vplyv celkovej úžitkovej a aj z toho dôvodu boli koncentrácie odpadových látok nachádzajúcich sa v úžitkovej vode znížené. Je možné, že pri dlhobnejšom pití úžitkovej vody by sa naakumulovali odpadové látky vo väčšom množstve v organizme, čím by došlo k silnejšiemu efektu na organizmus. Avšak, napriek tomu, že nebol pozorovaný žiaden efekt, je takáto voda vypúšťaná do prostredia a môže mať potenciálne škodlivý vplyv na organizmy.

Zoznam použitej literatúry

1. Li Y, Zhu G, Ng WJ, Tan SK. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of The Total Environment*. 2014 Jan 15;468–469:908–32.
2. Verburg I, García-Cobos S, Leal LH, Waar K, Friedrich AW, Schmitt H. Abundance and antimicrobial resistance of three bacterial species along a complete wastewater pathway. *Microorganisms*. 2019 Sep 1;7(9).
3. Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res*. 2013 Apr 1;47(5):1875–87.
4. McCallum ES, Krutzelmann E, Brodin T, Fick J, Sundelin A, Balshine S. Exposure to wastewater effluent affects fish behaviour and tissue-specific uptake of pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*. 2017 Dec 15;605–606:578–88.
5. Meador JP, Ball SC, James CA, McIntyre JK. Using the fish plasma model to evaluate potential effects of pharmaceuticals in effluent from a large urban wastewater treatment plant. *Environmental Pollution* [Internet]. 2024 May 1 [cited 2024 Apr 4];348:123842. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749124005566>
6. Zabel I, Appelbaum Y, Arnon S, Britzi M, Schwartsburd F, Snyder S, et al. The effect of tertiary treated wastewater on fish growth and health: Laboratory-scale experiment with *Poecilia reticulata* (guppy). *PLoS One*. 2019 Jun 1;14(6).

7. Feyisa TO, Melka DS, Menon M, Labisso WL, Habte ML. Investigation of the effect of coffee on body weight, serum glucose, uric acid and lipid profile levels in male albino Wistar rats feeding on high-fructose diet. *Lab Anim Res.* 2019 Dec 1;35(1).
8. Marin MT, Zancheta R, Paro AH, Possi APM, Cruz FC, Planeta CS. Comparison of caffeine-induced locomotor activity between adolescent and adult rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jun 25;660(2–3):363–7.
9. Almosawi S, Baksh H, Qareeballa A, Falamarzi F, Alsaleh B, Alrabaani M, et al. Acute administration of caffeine: The effect on motor coordination, higher brain cognitive functions, and the social behavior of BLC57 mice. *Behavioral Sciences.* 2018 Jul 25;8(8).
10. Angelucci MEM, Cesário C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C. Caffeine effect on Morris water maze. Vol. 35, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2002.

24. Extracelulárna DNA ako súčasť extracelulárnych pascí neutrofilov v patogenéze reumatoidnej a kolagénom-indukovanej artritídy

Mgr. Kristína Macáková

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Veronika Borbélyová¹, Bernhard Maximilian Schuh¹, Emöke Šteňová², Michal Pastorek¹, Peter Celec^{1,3}, Barbora Vlková¹

Školiteľ: doc. RNDr. Barbora Vlková, PhD.¹

¹ Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia, ² 1st Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University Hospital, Comenius University, Bratislava, Slovakia, ³ Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia

Úvod

Reumatoidná artritída (RA) je chronická zápalová autoimunitná choroba, ktorej etiopatogenéza napriek intenzívnemu výskumu nie je známa [1]. Neutrofilové bunky vrodenej imunity sú kľúčové pre našu obranyschopnosť, ale ich aktivita môže stimulovať mechanizmy, ktoré vedú aj k RA. Jednou zo schopností neutrofilov je tvorba extracelulárnych pascí, ktoré, ak nie sú rýchlo degradované, svojou prítomnosťou môžu indukovať tvorbu protilátok kľúčových v patogenéze RA [2, 3]. Protilátky proti citrulinovaným peptidom, ktoré vznikajú v rámci tvorby extracelulárnych pascí, patria k základným serologickým markerom skorej RA. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli skúmať neutrofilové bunky a ich extracelulárne pasce (NETs) pri RA. Skúmali sme schopnosť neutrofilov tvoriť NETs v skupine pacientov s RA (liečených a neliečených) a taktiež sme sa zamerali na dynamiku extracelulárnej DNA (ecDNA) ako súčasť NETs a jej vzťah k hlavným klinickým monitorovacím markerom - DAS28 (Disease activity score) a CRP (C-reactive protein). EcDNA nie je len dôležitou zložkou NETs ale vedie aj k aktivácii pro-zápalových signálnych dráh [4]. Počas fyziologických podmienok je nízka koncentrácia ecDNA zabezpečená štiepením rôznymi deoxyribonukleázami - DNázami. DNázy štiepia DNA pomocou hydrolýzy fosfodiesterových väzieb. Tieto enzýmy sú kódované viacerými gény a ich expresia je tkanivovo špecifická [5].

V animálnom modeli RA - kolagénom typu II indukovaná artritída sme testovali podávanie DNázy I. Predpokladali sme, že podávanie nukleázy povedie k zmiereniu zápalu a teda k nižšiemu artritickému skóre v porovnaní s neliečenou skupinou [6]. Aplikácia DNázy bola preventívna, kedy enzým bol podávaný pred nástupom prvých znakov artritídy, alebo terapeutická, kedy sme podávanie DNázy načasovali na objavenie sa prvých príznakov artritídy.

Materiál a metódy

V rámci tejto štúdie bola využitá kombinácia observačnej štúdie na pacientoch s intervenčným modelom na laboratórnych zvieratách.

Klinická štúdia

Do klinickej časti boli zaradené dve kohorty pacientov.

Kohorta 1: táto skupina zahŕňala tri skupiny pacientov. Pacienti s diagnózou RA - neliečení (naivní), pacienti s diagnózou RA – liečení (bDMARDs), pacienti s diagnózou artrózy - kontrolná skupina.

Kohorta 2: táto skupina zahŕňala 39 pacientov s diagnózou RA. Vzorky od týchto pacientov boli odobraté v troch rôznych časových bodoch - pred začatím liečby bDMARDs a tri, resp. dvanásť mesiacov po začatí liečby. Na sledovanie klinického stavu sa použili DAS28, CRP, reumatoidný faktor a protilátky proti citrulinovaným peptidom.

Animálny model

V modeli CIA sa použil hovädzí kolagén typu II (100 ug/myš). Kolagénová emulzia sa pripravila s kompletným Freundovým adjuvansom s konečnou koncentráciou 2 mg/ml Mycobacterium tuberculosis. Pripravená emulzia sa aplikovala subkutánne do chvosta. Rozvoj artritídy sa očakával na 28. až 35. deň. Závažnosť artritídy so skóre RA vyšším ako 10 (maximálne skóre RA - 16) sa očakávala v dňoch 42 – 56 [6]. Aby sme opísali účinnosť DNázy I, testovali sme jej aplikáciu dvomi rôznymi spôsobmi, preventívnym spôsobom aplikácie, ktorý spočíval v aplikácii DNázy pred 21. dňom a spôsobom terapeutickým, keď sa DNáza aplikovala po objavení sa prvých príznakov. V tomto experimente boli použité myši kmeňa DBA/1J, staré 6 mesiacov. Experiment zahŕňal štyri skupiny myší. Kontrolná skupina - CTRL (n = 5), ktorá dostávala raz denne, každých 24 hodín injekciu 0,9 % NaCl i.p. Skupina s artritídou - CIA (n = 10), ktorá rovnako ako CTRL skupina dostávala raz denne 0,9 % NaCl i.p. (2 mg/ml, Chondrex, Woodinville, WA, USA) so zmesou rovnakého objemu CFA (2 mg/ml, Chondrex, Woodinville, WA, USA). Skupina CIA + preventívna aplikácia DNázy I (n=10) spočívala v aplikácii enzýmu DNáza I (10 mg/kg, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemecko) každých 24 hodín, i.p. od dňa 21. Skupina CIA + terapeutická aplikácia DNázy (n=10), sa DNáza I (10 mg/kg) aplikovala každých 24 hodín, i.p. po 42. dni, keď sa objavili prvé príznaky artritídy. Myši v tomto chronickom experimente boli hodnotené každých 7 dní. V rámci hodnotenia sa analyzovali artritické skóre, opuch kvantifikovaný pomocou pletyzmometra a rozsah zápalu pomocou bioluminiscencie.

Extracelulárne pasce neutrofilov

Na kvantifikáciu NETs v dôsledku stimulácie neutrofilov sa použilo interkalačné farbivo Sytox Green. Vlnová dĺžka je 488 nm (excitácia) a 525 nm (emisía). Na stimuláciu izolovaných neutrofilov od pacientov z kohorty 1, sa použili izolované ľudské mitochondrie a bakteriálne kultúry E. coli a S. aureus. Neutrofilové činitele sa stanovili na základe fluorescence Sytox Green farbenia. Ako negatívna kontrola sa použil fyziologický roztok, ako pozitívna kontrola PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 100 nM).

Extracelulárna DNA a DNázová aktivita

Na kvantifikáciu koncentrácie ecDNA boli využité vzorky krvi odobraté do litiovo-heparínových skúmaviek. (Microvette 500 LH, Sarstedt, Nemecko). Na oddelenie plazmy sa krvné vzorky centrifugovali pri $1600 \times g$ počas 10 minút pri $4^\circ C$. Plazma sa opäť centrifugovala pri $16\,000 \times g$ počas 10 min pri $4^\circ C$. Supernatant sa použil na izoláciu ecDNA pomocou súpravy QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko). Kvantifikácia izolovanej ecDNA sa vykonala pomocou fluorometra Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Subcelulárny pôvod ecDNA sa určil pomocou špecifickej kvantitatívnej PCR na Mastercycler Realplex 4 (Eppendorf, Hamburg, Nemecko). Na stanovenie aktivity DNázy v sére, sa použila metóda jednoduchšej radiálnej enzýmovej difúzie (SRED). Aktivita DNázy sa potom vypočítala pomocou softvéru ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) a kalibračnej krivky. Aktivita DNázy sa vyjadrila v Kunitzových jednotkách (K.u.) na ml séra [7].

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 One- a Two-way ANOVA test s Bonferroni korekciou. Výsledky sú prezentované ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka. Za signifikantné rozdiely boli považované tie, u ktorých bolo dosiahnuté $p < 0,05$.

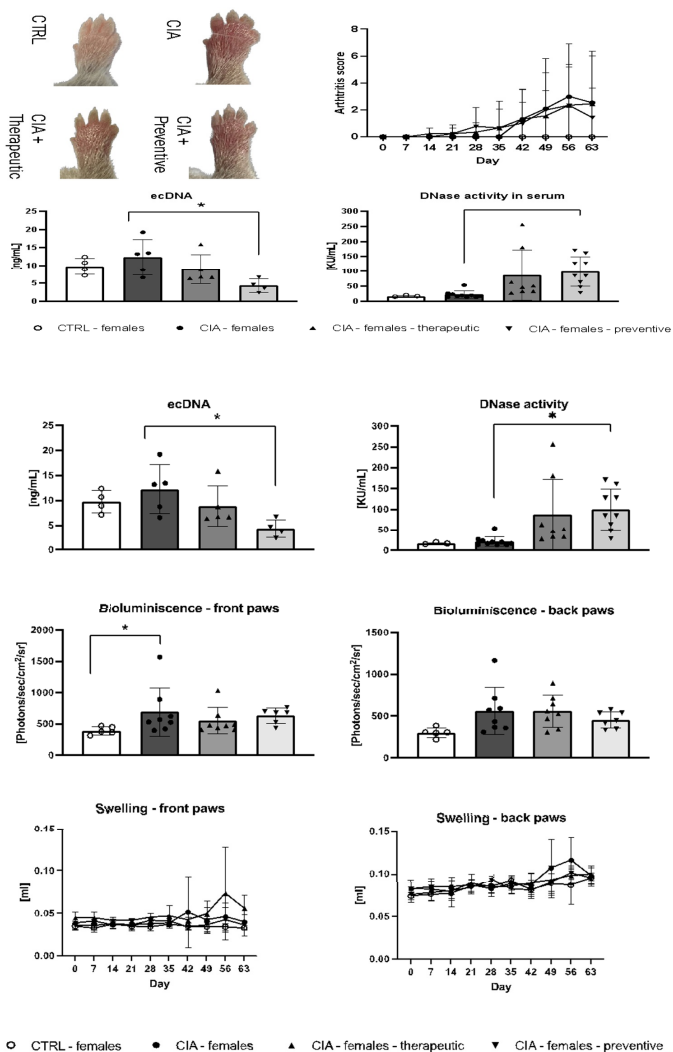
Výsledky

Klinické dáta

Naivní pacienti s RA vykazovali vyššie percento buniek tvoriacich NETs o 91 % v porovnaní s kontrolnou skupinou a o jedenapolkrát viac v porovnaní s RA liečenými pacientmi. Tieto výsledky boli preukázané pri bakteriálnych stimuloch imitujúce infekčný zápal a aj pri mitochondriách, ktoré boli využité s cieľom mimikovať sterilný zápal.

V prípade analýzy koncentrácie ecDNA, keď sa analyzovali všetci RA pacienti spolu (kategorizovaný len podľa časového bodu odberu), dynamika celkovej koncentrácie ecDNA v plazme nevykazovala štatisticky významný pokles v žiadnom z vybraných časových období. Štatisticky významný pokles ecDNA v plazme sa zistil, keď sa pacienti s RA rozdelili do skupín odrážajúcich odpoveď na liečbu. U pacientov, ktorí odpovedali dobre na liečbu ecDNA významne klesla o 60 %, a to po prvých troch mesiacoch biologickej liečby, ($p < 0.05$, $F = 5.69$).

Animálny model



Obrázok 1 A - znázornenie príznakov artritídy v príslušných skupinách, **B** - dynamika skóre artritídy, **C** - koncentrácia ecDNA (extracelulárnej DNA) v príslušných skupinách, **D** - aktivita DNázy v príslušných skupinách, **E + F** - kvantifikácia bioluminiscencie v príslušných skupinách v rámci predných a zadných labiek, **G + H** - opuch predných a zadných labiek v príslušných skupinách

Pri analýze artritického skóre sa medzi skupinami nezistili žiadne rozdiely ($p=ns$). Koncentrácia ecDNA v tomto zvieracom modeli vykazovala jeden významný rozdiel, a to medzi samicami CIA a preventívne liečenými samicami CIA ($F=3.62$, $p<0,05$). Samice CIA, ktoré dostávali DNázu I s preventívnym prístupom, vykazovali takmer 3-násobne nižšiu koncentráciu ecDNA v porovnaní s myšami v skupine bez liečby CIA (obrázok 1 C). Pri analýze DNázovej aktivity sa tiež získal významný rozdiel medzi skupinou CIA a CIA s preventívnou aplikáciou DNázy I. U CIA skupiny - bola preventívna DNázová aktivita v sére takmer päťkrát vyššia ako v skupine CIA bez liečby ($F=4.89$, $p<0,05$) (obrázok 1 D). Kvantifikácia bioluminiscencie ukázala významný rozdiel v predných labkách medzi kontrolnou skupinou myši, myšami bez zápalu a CIA myšami. CIA myši vykazovali zvýšenie bioluminiscenčného signálu o 79 % ($F=9.14$, $p<0,05$) (obrázok 1 E). Analýza opuchu predných labiek, ktorá sa vykonala pomocou pletyzmometra, nepreukázala žiadne významné výsledky medzi kontrolnou skupinou, samicami CIA a skupinami CIA liečenými pomocou DNázy.

Diskusia

Na základe výsledkov z analýzy kvantifikácii NETs sme potvrdili, že v prípade pacientov RA neutrofilov majú vyššiu tendenciu tvorby NETs v porovnaní s kontrolnou skupinou pacientov. Pri analýze neutrofilov od zdravých donorov v kombinácii s plazmou od pacientov z kohorty 1 sa ukázalo, že práve plazma od naivných RA pacientov viedla k najvyššie miere tvorby NETs. Zvýšená tvorba NETs u naivných pacientov s RA v porovnaní s liečenými RA pacientami, mohla byť spôsobná faktom, že protizápalová liečba vedie k zníženej tvorbe cytokínov – čiže vedie k zníženej koncentrácii jedného zo spúšťačov tvorby NETs.

Keďže došlo k zvýšenej tvorbe NETs zamerali sme sa na kvantifikáciu najabundantnejšej zložky NETs – ecDNA. Jej dynamiku sme sledovali pred a po podaní efektívnej biologickej liečby v rámci pacientov z kohorty 2. Efektívnosť liečby bola zaznamenaná na základe klinických parametrov DAS28 a CRP, ktoré vykázali silný pokles po začatí liečby. Sledovanie dynamiky ecDNA nepreukázalo žiadny výrazný zmeny pokiaľ boli pacienti analyzovaní len podľa časového bodu odberu. Po kategorizácii pacientov aj na základe ich typu odpovede, výrazný rozdiel bol detegovaný len v prípade pacientov, ktorí boli v kategórii dobre na liečbu odpovedajúcich pacientov.

Aplikácia DNázy v CIA modeli RA nevedla ku žiadnym majoritným zmenám. Zmeny teda nenastali v ani jednom z prístupov podávania DNázy I – preventívnom ani terapeutickom. Vysvetlením môže byť systémové podávanie DNázy, nakoľko pri RA ide primárne o lokálne postihnutia zápalu kĺbov v končatinách. V literatúre nie sú opísané žiadne štúdie, ktoré by do veľkej miery kopírovali dizajn tohto experimentu, ale našli sme niektoré, ktoré sa tiež zaoberajú ecDNA ako jedným z kľúčových faktorov a snažia sa určiť účinky jej odstránenia. Podporný fakt, že ecDNA by mohla byť kľúčová v patogenéze RA, spočíva v publikácii spájajúcej akumuláciu vlastnej DNA súvisiacu s vekom, ktorá vedie k závažnejším príznakom artritídy u potkanov [8]. To má teda za následok, že čoraz viac publikácií sa snaží nájsť iné a odlišné prístupy na stlmenie zvýšenej koncentrácie ecDNA [9-11]. Jedným z hlavných mechanizmov, ako sa iné vedecké skupiny snažia dosiahnuť zníženie koncentrácie ecDNA, je použitie nanoplatforiem alebo nanogélov. Príkladom je vývoj špecifickej nanoformy, ktorá by sa mohla

priamo naviazať ecDNA, a tak zabrániť aktivácii zápalových dráh a v dôsledku toho zabrániť prípadnému vzniku zápalu [12]

Dôvodom, prečo sme sa venovali tejto téme, je nielen celosvetový výskyt tejto choroby, ale aj skutočnosť, že u väčšiny ľudí trpiacich touto chorobou, predovšetkým u žien, je obdobie pozorovania prvých príznakov starším veku alebo po menopauze. Predpokladá sa však, že zlom, ktorý vied švočil k prepuknutiu tejto choroby sa začal o niekoľko rokov skôr, ale nie je známe aký a prečo. Objasnenie príčiny alebo presného patomechanizmu, ktorý stojí za RA rozvojom, pomôže nielen získať presnejšie poznatky o vzniku, ale predovšetkým povedie k lepšie cielenej liečbe, keďže súčasná nie je špecifická a je zameraná len na kontrolu zápalu a časť pacientov na ňu nereaguje. Presnejšie a hlbšie poznatky však môžu výrazne pomôcť aj pri odhaľovaní včasných diagnostických markerov, keďže tie v rámci RA stále absentujú.

Podporené čiastočne grantom APVV-18-0366 , UK/438/2021, UK/333/2023.

Zoznam použitej literatúry

1. Smolen, J.S., et al., Rheumatoid arthritis. Nat Rev Dis Primers, 2018. 4: p. 18001.
2. Brinkmann, V., et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 2004. 303(5663): p. 1532-5.
3. Corsiero, E., et al., NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. Front Immunol, 2016. 7: p. 485.
4. Duvvuri, B. and C. Lood, Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. Front Immunol, 2019. 10: p. 502.
5. Han, D.S.C. and Y.M.D. Lo, The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. Trends Genet, 2021. 37(8): p. 758-770.
6. Redmond, P., Protocol for the successful induction of collagen-induced arthritis (CIA) and collagen antibody-induced arthritis (CAIA) in mice. Chondrex INC, 2017. 98052(888): p. 1-6.
7. Lauková, L., et al., Exogenous deoxyribonuclease has a protective effect in a mouse model of sepsis. Biomed Pharmacother, 2017. 93: p. 8-16.
8. Luo, W.-D., et al., Age-related self-DNA accumulation may accelerate arthritis in rats and in human rheumatoid arthritis. Nature Communications, 2023. 14(1): p. 4394.
9. Zhu, H., et al., Bioinspired nanogels as cell-free DNA trapping and scavenging organelles for rheumatoid arthritis treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2023. 120(33): p. e2303385120.
10. Cheng, F., et al., Targeting Lymph Nodes for Systemic Immunosuppression Using Cell-Free-DNA-Scavenging And cGAS-Inhibiting Nanomedicine-In-Hydrogel for Rheumatoid Arthritis Immunotherapy. Advanced Science, 2023. 10(26): p. 2302575.
11. Liu, X., et al., Cationic brush hybrid nanoparticles scavenge cell-free DNA to enhance rheumatoid arthritis treatment. Acta Biomaterialia, 2023. 170: p. 215-227.
12. Geng, W., et al., Cell-free DNA depletion via cell-penetrating poly (disulfide) s for rheumatoid arthritis therapy. Applied Materials Today, 2022. 26: p. 101351.

25. Vplyv kyseliny karnózovej a jej kombinácie s metotrexátom na oxidačný stres u potkanov s adjuvantnou artritídou

Mgr. Lucia Pastvová

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: PharmDr. Katarína Bauerová, PhD., DrSc. ²

Školiteľ: prof. RNDr. Jana Muchová, PhD. ¹

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, ² Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV

Úvod

Reumatoidná artritída (RA) je chronické autoimunitné zápalové ochorenie, v dôsledku ktorého dochádza k progresívnemu poškodeniu kĺbov (1). Postihuje približne 1% dospelých osôb z celosvetovej populácie, pričom najvyššia incidencia ochorenia je medzi 40-60 rokom života. U žien je riziko vzniku RA trojnásobne vyššie ako u mužov (2, 3). Zápalový proces v oblasti kĺbov sa vyznačuje proliferáciou synoviálneho tkaniva, infiltráciou zápalových buniek a zvýšenou produkciou prozápalových cytokínov (4, 5). Chronický zápal v synoviálnej membráne spôsobuje eróziu chrupavky a marginálnej kosti a následne deštrukciu kĺbu (6). Okrem toho v dôsledku zápalových procesov u pacientov s RA dochádza k nadprodukcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čo naruša rovnováhu medzi antioxidantmi a voľnými radikálmi a vedie k oxidačnému stresu. Voľné radikály zapríčiňujú oxidačné poškodenie rôznych bunkových a extracelulárnych molekúl, vrátane lipidov, proteínov, nukleotidov a DNA (7). ROS sú dôležitými intracelulárnymi signálnymi molekulami, ktoré podporujú zápalovú odpoveď v synoviálnom tkanive a tiež môžu priamo poškodzovať kĺbnu chrupavku inhibíciou syntézy a degradáciou proteoglykánov, apoptózou chondrocytov a aktiváciou matrixmetaloproteinázy a cyklooxygenázy (8, 9). Prvou voľbou v liečbe RA je podávanie nízkych dávok metotrexátu (MTX), ktorý účinne potláča zápalovú aktivitu a klinické prejavy ochorenia. Zároveň však môže pôsobiť toxicky pre pečeň, vyvolať zlyhanie obličiek a závažnú cytopéniu (10). Keďže farmakologická liečba RA nesie so sebou riziko závažných vedľajších účinkov, skúmajú sa alternatívne spôsoby bezpečnej a účinnej liečby, akou môžu byť práve prírodné látky (11). Kyselina karnózová (CA) je fenolový diterpén a radí sa do skupiny sekundárnych metabolitov rastlín, tzv. terpénov alebo izoprenoidov. Vyznačuje sa vysokou reaktivitou voči ROS a jej antioxidantná aktivita je podmienená schopnosťou vychytávať voľné radikály pomocou dvoch fenolových hydroxylových skupín (12, 13).

Cieľom tejto štúdie bolo sledovať účinok kyseliny karnózovej v monoterapii, a tiež v kombinácii s metotrexátom na aktivitu antioxidantných enzýmov v erytrocytoch, celkovú antioxidantnú kapacitu plazmy a hladinu lipoperoxidov, markerov oxidačného poškodenia lipidov v plazme u potkanov s experimentálne vyvolanou adjuvantnou artritídou a posúdiť jej možný priaznivý vplyv na zníženie oxidačného stresu v súvislosti s reumatoidnou artritídou.

Materiál a metódy

V experimente boli použité samce potkanov kmeňa Lewis ($n=37$) z chovnej stanice Oddelenia toxikológie a chovu laboratórnych zvierat Centra experimentálnej medicíny SAV, Dobrá voda, Slovensko (SK CH 24016). Projekt bol schválený Etickou komisiou Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centra experimentálnej medicíny SAV a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky. Zvieratá boli po príchode umiestnené v karanténe po dobu 7 dní. Dĺžka trvania experimentu bola 28 dní, počas ktorých mali potkany zabezpečený prístup k pitnej vode a potrave ad libitum a svetelný režim 12h svetla/12h tmy. Hmotnosť zvierat bola 160 až 180 g. U potkanov bola vyvolaná adjuvantná artritída (AA) intradermálnou injekciou ku koreňu chvosta s obsahom 0,1 ml roztoku nekompletného Freundovho adjuvans (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), v ktorom bolo rozsuspendované teplom inaktivované *Mycobacterium butyricum* (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Potkany boli randomizáciou rozdelené do 5 skupín: HC – zdravá kontrolná skupina, AA – kontrolná skupina potkanov s AA bez liečby, MTX – potkany s AA, ktorým bol podávaný MTX dvakrát týždenne v dávke 0,3 mg/kg hmotnosti, CA – potkany s AA, ktorým bola podávaná CA denne v dávke 100 mg/kg hmotnosti, CA+MTX – potkany s AA, ktorým bola podávaná CA v kombinácii s MTX v dávkach uvedených vyššie. Skúmané látky boli zvieratám podávané orálne gastrickou sondou. Meranie hmotnosti a objemu zadnej labky zvierat sa uskutočnilo na 14., 21. a 28. deň experimentu a hodnoty boli porovnávané s hodnotami nameranými v 1. deň experimentu. Na meranie objemu zadnej labky bol použitý elektronický vodný pletyzmometer (UGO BASILE, Comerio-Varese, Italy). Vzorky krvi boli odoberané na 14. a 21. deň z retroorbitálneho plexu a na 28. deň punkciou srdca. Zvieratá boli usmrtené v hlbkej anestézii (Zoletil, Virbac SA, Carros, France/Xylariem, Eucupar N.V., Oostcamp, Belgium) na 28. deň experimentu. Zo vzoriek krvi sme po centrifugácii (20 min. pri 3000 ot./min, 4°C) získali plazmu, ktorá bola uskladnená pri teplote -80°C až do analýzy. Suspenzia krvných buniek bola zamrzená a uskladnená pri teplote -20°C až do analýzy. Pred analýzou bol pripravený 40 x riedený hemolyzátny, ktorý bol použitý na stanovenie antioxidantných enzýmov. Pre stanovenie aktivity superoxidodismutázy (SOD) v erytrocytoch bol použitý komerčný set (Sigma – Aldrich, Nemecko). Aktivita katalázy (CAT) v erytrocytoch bola stanovená metódou podľa Bergmayer (14). V plazme bola stanovená celková antioxidantná kapacita (TEAC) metódou podľa Re a kol. (15) a koncentrácia lipoperoxidov (LPx) bola stanovená metódou podľa El-Saadani a kol. (16). Štatistickú významnosť medzi kontrolnou, neliečenou a liečenými skupinami sme posudzovali T-testom, pričom za štatisticky významné rozdiely považujeme hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

Výsledky stanovenia zmeny hmotnosti tela a objemu zadnej labky sú uvedené v tab. 1. Meraním telesnej hmotnosti u potkanov s AA sme pozorovali štatisticky významný nárast hmotnosti na 14., 21. a 28. deň v skupinách liečených MTX a kombináciou CA a MTX v porovnaní s neliečenou skupinou AA ($p < 0,05$, AA vs. MTX/CA-MTX). Objem zadnej labky v neliečenej skupine AA signifikantne vzrástol na 14., 21. a 28. deň v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou HC ($p < 0,05$, HC vs. AA) v dôsledku neliečenej artritídy. V skupinách liečených MTX a CA-MTX na 14. a 21. deň signifikantne poklesol objem zadnej labky v porovnaní s AA ($p < 0,05$, AA vs. MTX/CA-MTX), avšak na 28. deň bola táto zmena významná len v skupine CA-MTX v porovnaní so skupinou AA ($p < 0,05$, AA vs. CA-MTX) (17).

Výsledky merania aktivity antioxidačných enzýmov (SOD, CAT) v erytrocytoch, TEAC a hladiny LPX v plazme na 28. deň experimentu sú uvedené v tab. 2. Stanovením aktivity SOD na 28. deň sme pozorovali jej signifikantné zvýšenie v skupine liečenej MTX ($p < 0,05$, HC vs. MTX) a hranične významne zvýšenú aktivitu v skupine CA a CA-MTX v porovnaní s HC ($p > 0,05$, HC vs. CA/CA-MT). Aktivita CAT sa štatisticky významne zvýšila v skupine s kombinovanou liečbou CA-MTX v porovnaní s neliečenou skupinou AA ($p < 0,001$, AA vs. CA-MTX) a skupinami liečenými MTX alebo CA ($p < 0,01$, MTX vs. CA-MTX; $p < 0,05$, CA vs. CA-MTX). Ďalej sme sledovali zmenu TEAC a hladiny LPx v plazme na 14., 21. a 28. deň experimentu. Na 14. deň sa TEAC signifikantne znížil u potkanov s AA bez liečby v porovnaní so zdravou kontrolou ($p < 0,05$, HC vs. AA), v skupine s kombinovanou liečbou CA-MTX sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie TEAC v porovnaní so skupinami HC a AA ($p < 0,001$, HC vs. CA-MTX; $p < 0,001$, AA vs. CA-MTX). Na 21. deň pokusu bola TEAC významne vyššia u skupiny liečenej MTX v porovnaní so skupinami HC a AA ($p < 0,001$, HC vs. MTX; $p < 0,001$, AA vs. MTX) a u skupiny CA-MTX v porovnaní s HC, AA a CA ($p < 0,001$, HC vs. CA-MTX; $p < 0,001$, AA vs. CA-MTX; $p < 0,05$, CA vs. CA-MTX).

Na 28. deň pokusu sme pozorovali signifikantné zvýšenie TEAC v skupinách liečených MTX, CA a ich kombináciou v porovnaní s HC a AA ($p < 0,05$, HC vs. CA; $p < 0,001$, HC vs. MTX/CA-MTX; $p < 0,05$, AA vs. CA; $p < 0,001$, AA vs. MTX/CA-MTX). Hladina LPx v plazme na 14. deň bola štatisticky významne nižšia u skupiny, ktorej bola podávaná CA v porovnaní s HC a skupinou liečenou MTX ($p < 0,05$, HC vs. CA; $p < 0,05$, MTX vs. CA). Signifikantné zvýšenie hladiny LPx na 14. deň sme zistili v skupine, ktorej bola podávaná kombinácia CA a MTX v porovnaní so skupinou, ktorá dostávala len CA ($p < 0,05$, CA vs. CA-MTX). Na 21. a 28. deň experimentu sme nezistili signifikantný rozdiel v hladine LPx medzi jednotlivými skupinami.

Tab. 1: Vplyv kyseliny karnózovej, metotrexátu a ich kombinácie na zmenu hmotnosti tela a objemu zadnej labky na 14., 21. a 28. deň experimentu (17)

	HC	AA	MTX	CA	CA-MTX
Zmena hmotnosti (g)					
14. deň	78,8±14,19	44,59±16,11a	76,14±5,26b	45,08±20,59	65,15±11,69b
21. deň	101,63±17,22	23,30±13,82a	73,07±24,99b	24,81±11,85	78,55±10,53b
28. deň	115,03±19,86	43,10±11,98a	78,36±31,45b	36,46±14,77	89,06±15,40b
Zmena objemu zadnej labky (%)					
14. deň	9,49±8,51	35,90±14,30a	11,63±6,83b	43,59±27,42	7,41±4,34b
21. deň	9,79±6,01	71,79±14,41a	30,47±20,76b	72,63±13,58	8,43±2,28b
28. deň	12,35±5,16	54,81±14,71a	34,40±25,76	55,79±14,44	12,33±5,38b

Hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka); označenie štatisticky významných rozdielov: a HC vs. AA; b AA vs. MTX/CA/CA-MTX, $p \leq 0.05$.

Tab. 2: Vplyv kyseliny karnózovej, metotrexátu a ich kombinácie na aktivitu antioxidantných enzýmov a hladinu lipoperoxidov na 28. deň experimentu

Parameter	HC	AA	MTX	CA	CA+MTX
SOD (U/mg Hb)	770,73±34,20	801,84±37,79	828,65±34,60a	838,99±81,70	825,47±65,34
CAT (μkat/g Hb)	5,64±1,00	5,05±0,61	5,08±0,79	5,16±1,05	6,40±0,60b, c, d
TEAC (mmol/l)	3,18±0,19	3,18±1,82	4,02±0,12a, b	3,66±0,55a, b	4,09±0,27a, b
LPx (nmol/ml)	27,70±9,65	22,40±12,32	21,93±9,36	24,21±20,18	30,10±15,35

Hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka); označenie štatisticky významných rozdielov: a HC vs. AA/MTX/CA/CA-MTX; b AA vs. MTX/CA/CA-MTX; c MTX vs. CA/CA-MTX; d CA vs. CA-MTX, $p \leq 0.05$.

Diskusia

V našej štúdii sme sledovali účinok CA a jej kombinácie s MTX na klinické prejavy AA, konkrétne na zmenu hmotnosti tela a opuchu zadných labiek u potkanov kmeňa Lewis. Taktiež sme pozorovali schopnosť skúmaných látok ovplyvniť aktivitu antioxidantných enzýmov, celkovú antioxidantnú kapacitu a mieru oxidačného poškodenia lipidov v plazme u potkanov s experimentálne vyvolanou AA.

Z výsledkov meraní telesnej hmotnosti môžeme konštatovať, že podávanie MTX výrazne znížilo úbytok hmotnosti u zvierat s AA. Liečba CA v monoterapii a v kombinácii s MTX však neprekázala významný ochranný efekt pred úbytkom hmotnosti v dôsledku ochorenia.

Extrakt listov z rozmarínu s obsahom 20% CA v štúdii Ibarra a kol. (18) významne znížil prírastok celkovej hmotnosti a epididymálneho tuku u myši kŕmených stravou s vysokým podielom tuku, z čoho vyplýva, že rozmarínový extrakt má vplyv na metabolické poruchy, ako obezita, dyslipidémia, či diabetes.

Suplementáciou CA v monoterapii sme nezaznamenali významné zmeny opuchu zadnej labky. Avšak kombinovanou liečbou CA a MTX po 28. dňoch sme dosiahli účinnejšie zníženie opuchu ako podávaním len samotného MTX. Na rozdiel od našich výsledkov, v štúdii Xia a kol. (19) pozorovali zníženie opuchu zadnej labky u myši s kolagénom indukovanou artritídou, ktorým bola podávaná CA v monoterapii denne v dávke 30 a 60 mg/kg hmotnosti.

Meraním aktivity SOD na 28. deň sme v našom experimente zaznamenali jej významné zvýšenie len v skupine MTX a hranične významné zvýšenie aktivity SOD účinkom CA v monoterapii a v kombinácii s MTX. Aktivita CAT sa na 28. deň významne zvýšila podávaním kombinovanej liečby CA s MTX u potkanov s AA. Analýzou našich výsledkov sme tiež preukázali, že podávanie CA, MTX a ich kombinácie po 28 dňoch signifikantne zvýšilo celkovú antioxidantnú kapacitu v plazme u potkanov s AA. Podobné výsledky zistili v štúdii Gardi a kol.

(20), kde sledovali účinok iného prírodného polyfenolu, kvercetínu, na celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy, ktorá bola znížená v dôsledku vyvolania AA. Suplementáciou kvercetínom v dennej dávke 150 mg/kg hmotnosti sa zvýšila celková antioxidačná kapacita plazmy u artritických potkanov. V štúdií Bauerová a kol. (21) pozorovali u potkanov s experimentálne vyvolanou AA po podávaní kyseliny hyalurónovej významné zvýšenie TEAC, aktivity SOD a na rozdiel od našich výsledkov zníženie aktivity CAT a pokles hladiny LPx.

V prípade oxidačného poškodenia lipidov sme po 28 dňovej liečbe uvedenými látkami nepozorovali významnú zmenu plazmatickej hladiny LPx. Naproti tomu, štúdia Loussouarna a kol. (13) potvrdila silné antioxidačné účinky kyseliny karnózovej proti oxidačnému poškodeniu lipidov in vitro (roztoky lipidov) a in vivo (biomembrány). CA je veľmi reaktívna voči ROS, ľahko sa oxiduje a premieňa na rôzne metabolity, napr. karnozol, ktorý takisto poskytuje rovnako účinnú ochranu voči peroxidácii lipidov (13).

V závere práce môžeme konštatovať, že kombinovaná liečba CA s MTX môže pozitívne ovplyvňovať klinické prejavy RA, ako úbytok telesnej hmotnosti a opuch v oblasti kĺbov, postihnutých zápalom, a tiež oxidačný stav v organizme.

Zoznam použitej literatúry

1. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2017;389:2328-2337.
2. Bennett JL, Pratt AG, Dodds R, et al. Rheumatoid sarcopenia: loss of skeletal muscle strength and mass in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2023;19(4):239-251.
3. Gulati M, Farah Z, Mouyis M. Clinical features of rheumatoid arthritis. *Medicine* 2018;46(4):211-215.
4. Fouda AI, Rageh I, Hashaad NI, Hamza S. Synovial fluid anti-citrulline-containing peptide antibody and its role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Egyptian Rheumatology & Rehabilitation* 2017;44:97-102.
5. Taylor PC, Narayan N. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Medicine* 2018.
6. Rovenský J. Reumatoidná artritída – klinický obraz, diagnostika a liečba. *Via pract* 2008;5(1):6-13.
7. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M et al. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem* 2014;391:225–232.
8. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 2011;14:325-331.
9. Hadjigogos K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med* 2003;45:7-13.
10. Svanstrom H, Lund M, Melbye M, Pasternak B. Concomitant use of low-dose methotrexate and NSAIDs and the risk of serious adverse events among patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2018;1-9.
11. Lindler BN, Long KE, Taylor NA, Lei W. Use of Herbal Medications for Treatment of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Medicines (Basel)* 2020;7(11):67.
12. Birtić S, Dussort P, Pierre FX, Bily AC, Roller M. Carnosic acid. *Phytochemistry* 2015;115:9-19.

13. Loussouarn M, Krieger-Liszkay A, Svilar L, Bily A, Birtić S, Havaux M. Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. *Plant Physiology* 2017;175:1381-1394.
14. Bergmeyer H. *Methods of Enzymatic Analysis, Volume III: Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*. VCH, Weinheim 1987.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–7.
16. El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jürgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J. Lipid Res* 1989;30:627–30.
17. Chrastina M, Poništ S, Tóth J, Cziple S, Pašková Ľ, Vyletelová V, Švik K, Bauerová K. Combination Therapy of Carnosic Acid and Methotrexate Effectively Suppressed the Inflammatory Markers and Oxidative Stress in Experimental Arthritis. *Molecules*. 2022; 27(20):7115.
18. Ibarra A, Cases J, Roller M, Chiralt-Boix A, Coussaert A, Ripoll C. Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. *Br J Nutr* 2011;106:1182–1189.
19. Xia G, Wang X, Sun H, Qin Y, Fu M. Carnosic acid (CA) attenuates collagen-induced arthritis in db/db mice via inflammation suppression by regulating ROS-dependent p38 pathway. *Free radical biology & medicine* 2017;108:418–432.
20. Gardi C, Bauerova K, Stringa B, Kuncirova V, Slovak L, Ponis S, Drafi F, Bezakova L, Tedesco I, Acquaviva A, Bilotto S, Russo GL. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015; 583, 150-157.
21. Bauerova K, Kucharska J, Ponist S, Slovak L, Svik K, Jakus V, Muchova J. The Role of Endogenous Antioxidants in the Treatment of Experimental Arthritis. [Online First], IntechOpen. 2019. Dostupné na: <https://www.intechopen.com/online-first/the-role-of-endogenous-antioxidants-in-the-treatment-of-experimental-arthritis>, (27.3.2024).

26. Vplyv inhibície aromatázy na správanie myší v genetickom animálnom modeli porúch autistického spektra

Mgr. Petronela Sušienková

(lekárske neurovedy)

Spoluautori: Emma Skybová, Andrej Feješ, Nikola Dudová, Peter Celec

Školiteľ: Mgr. Veronika Borbélyová, PhD.

1Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

Úvod

Poruchy autistického spektra (PAS) sú skupinou neurovývinových pervazívnych porúch vyznačujúcich sa ťažkosťami v sociálnych interakciách, komunikácii a prítomnosťou repetitívneho a stereotypného správania (1). Často sú sprevádzané komorbiditami, napríklad úzkostnými poruchami (2). Etiopatogenéza PAS nie je celkom objasnená, avšak predpokladá sa, že ide o polygénne podmienenú poruchu, na ktorej vzniku sa podieľajú okrem genetických aj environmentálne a endokrinné faktory, vrátane pohlavných hormónov (1,3). Často skúmaným génom v súvislosti s PAS je tzv. SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3 (Shank3) zodpovedajúci za správny vývin a funkciu neurónov a synapsí, ktorého mutácie boli identifikované aj u 1-2% pacientov diagnostikovaných s PAS (3). Z environmentálnych faktorov bolo identifikovaných viacero pre- a perinatálnych rizík spojených s PAS dieťaťa, akými sú napríklad vek matky vyšší ako 35 rokov, nadváha, hypertenzia, preeklampsia, či užívanie psychofarmakologickej liečby úzkostných a depresívnych porúch v tehotenstve (4). Na rolu endokrinných faktorov, konkrétne steroidných hormónov, v etiopatogenéze PAS poukazuje vyššia prevalencia PAS u chlapcov v pomere 3:1 (1). Baron Cohen postuloval teóriu extrémne mužského mozgu, kde predpokladal, že vystavenie plodu vysokým koncentráciám testosterónu súvisí s vývinom PAS, resp. výskytom autistických črt u dieťaťa (5), čo podporili niektoré klinické štúdie (6-7). Avšak, v posledných rokoch pribúda viacero štúdií, ktoré nezistili súvislosť medzi prenatálnym hyperandrogenizmom a PAS, či autistických črt potomkov (8). Okrem samotných hormónov môže významnú rolu zohrávať aj expresia receptorov pre steroidné hormóny a enzýmov u ľudí s PAS (9). Post mortem analýzy mozgu pacientov s PAS poukázali na zníženú expresiu estrogénového receptora beta a aromatázy (enzýmu, ktorý sa podieľa na syntéze estradiolu z testosterónu) v porovnaní s mozgami zdravých pacientov (10). Tieto výsledky naznačujú, že znížená aromatizácia môže viesť k zvýšeniu koncentrií testosterónu inhibíciou syntézy estradiolu a tým potenciálne prehĺbiť autistický fenotyp. Z toho dôvodu bolo našim cieľom skúmať vplyv inhibície aromatázy na sociálne správanie a úzkosti-podobné správanie samíc myší s mutáciou v Shank3 géne. Predpokladali sme, že inhibícia aromatázy zvýši koncentráciu testosterónu, prehĺbi ťažkosti v sociálnej interakcii a správanie podobné úzkosti.

Materiál a metódy

Samice myší s deléciou exónov 13-16 Shank3b génu (Shank3b^{-/-}, KO) a wild-type myši bez mutácie (Shank3b^{+/+}, WT) boli rozdelené na kontrolnú a experimentálnu skupinu (Tab.1). Experimentálnej skupine bol subkutánne podávaný letrozol (LET, 1mg/kg) rozpustený v 100% dimetylsulfoxide a zriedený s olivovým olejom na koncentráciu 2,5 %. Kontrolnej skupine (CTRL) bol subkutánne podávaný roztok dimetylsulfoxidu a olivového oleja v objeme 1ml/kg (koncentrácia DMSO 2,5%).

Tab.1: Počet samíc myší pre jednotlivé skupiny v experimente

Genotyp/Intervencia	CTRL	LET
WT	5	8
KO	7	8

Subkutánne podávanie roztokov bolo vykonané po dobu 21 dní v čase medzi 11:00 – 12:00. Medzi 18. – 21. dňom podávania roztokov prebehlo v dopoludňajších hodinách behaviorálne testovanie samíc myší zamerané na:

sociálne správanie: sociálny záujem (iniciovanie sociálnej interakcie) a nezáujem (vyhýbanie sa sociálnej interakcii, samočistenie, panáčkovanie) v teste recipročnej sociálnej interakcie,

úzkosti-podobné správanie: menej času stráveného na otvorenom ramene vyvýšeného bludiska v tvare plus,

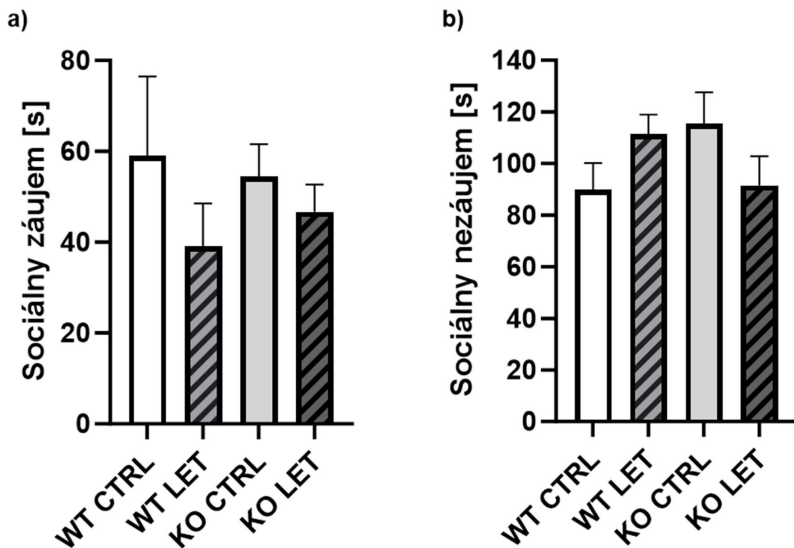
úzkostné vyhýbanie sa novým objektom: nižšia miera zahrabávania guľčiek do pilín v test zahrabávania guľčiek.

Po ukončení 21-dňovej podávania roztokov bola myšiam odobratá krv z retro-orbitálneho plexu pod krátkodobou inhalačnou anestéziou (3% izoflurán, 97% kyslík). Krvná plazma bola použitá na stanovenie koncentrácie testosterónu pomocou komerčne dostupného kitu enzýmovej imunisorbentovej analýzy (DRG Instruments GmbH, Marburg, Nemecko) podľa inštrukcií výrobcu. Hodnotená bola aj hmotnosť maternice normalizovaná na % telesnej hmotnosti.

Sociálne správanie myší a vyhýbanie sa objektom boli manuálne hodnotené dvomi nezávislými zaškolenými hodnotiteľmi, pričom pre účely štatistickej analýzy boli použité priemery hodnôt od oboch hodnotiteľov. Úzkosti-podobné správanie bolo analyzované automaticky za použitia softwaru EthoVision XT 16 (Noldus, Wageningen, Holandsko). Dáta boli analyzované prostredníctvom štatistického softwaru JASP 0.18.2.0 (University of Amsterdam, Amsterdam, Holandsko) a vizualizované prostredníctvom softwaru GraphPad 10 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Vplyv podania letrozolu na koncentráciu cirkulujúceho testosterónu bol analyzovaný t-testom pre nezávislé výbery. Dvojfaktorová ANOVA bola použitá na zistenie vplyvu genotypu, podania letrozolu a ich interakcie pre dáta z behaviorálnych testov. Na porovnanie skupín myší v prípade signifikantného výsledku ANOVA testu bol použitý post hoc test s Tukeyho korekciou. Hodnoty P nižšie ako 0,05 sme považovali za štatisticky významné. Dáta sú vizualizované ako priemer plus štandardná chyba.

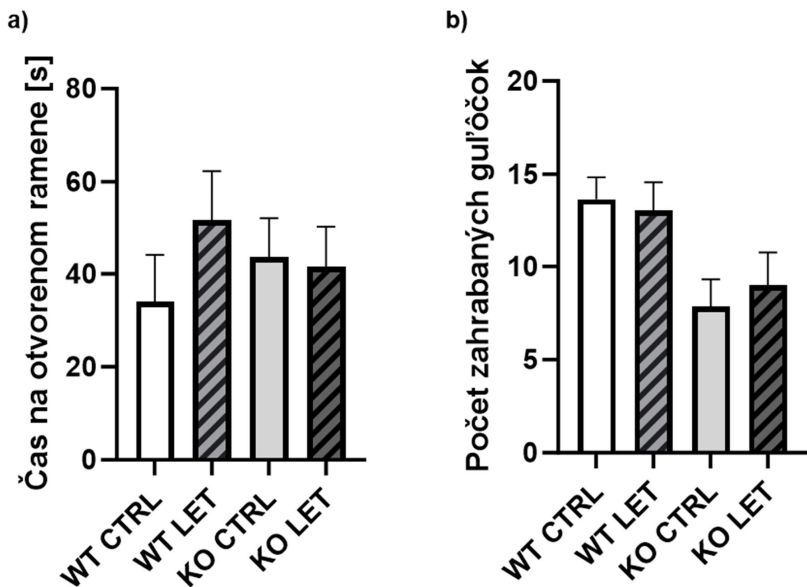
Výsledky

Kým sociálny záujem (Obr. 1a) samíc myší nebol ovplyvnený genotypom, inhibíciou aromatázy ani ich interakciou, tak interakcia genotypu a podávania letrozolu mala signifikantný vplyv na sociálny nezáujem samíc (Obr. 1b) o interakciu s druhou myšou ($F(1, 24)=4,48$; $p<0,05$; $\eta^2=0,16$). Post hoc analýza nepreukázala významné rozdiely medzi skupinami samíc myší.



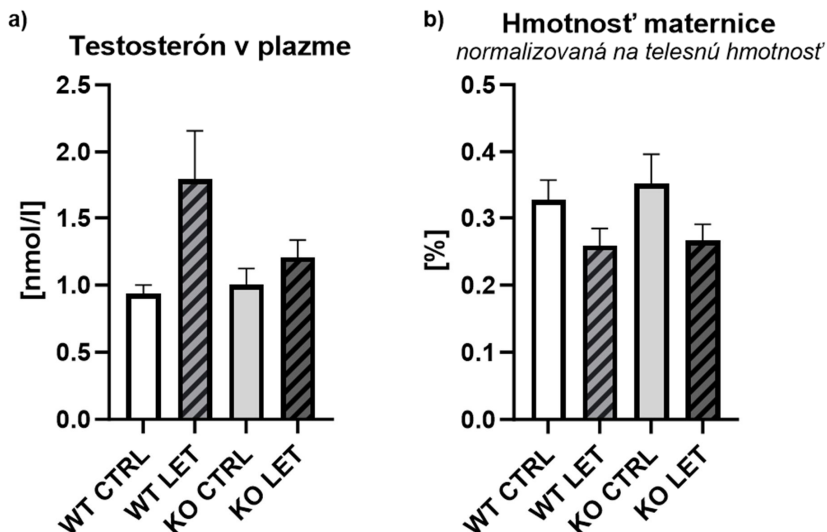
Obr. 1 a) Sociálny záujem myší o interakciu, b) sociálny nezáujem myší o interakciu s druhou myšou pri priamom kontakte.

Správanie podobné úzkosti pozorované prostredníctvom vyvýšeného bludiska v tvare plus nebolo ovplyvnené genotypom, podávaním letrozolu ani ich interakciou (Obr. 2a). Pri úzkosti-podobnom vyhýbavom správaní (Obr. 2b) sme zistili signifikantný efekt genotypu ($F(1, 24)=8,89$; $p<0,01$; $\eta^2=0,27$), pričom KO samice zahrabali o takmer 36% menej guľičiek ako WT samice ($t=2,98$; $p<0,01$; $d=1,15$). Významný vplyv inhibície aromatázy sme nepozorovali samostatne ani v interakcii s genotypom.



Obr. 2 a) Úzkosti-podobné správanie vo vyvýšenom bludisku v tvare plus, b) úzkosti-podobné správanie v teste zahrabávania guľôčiek.

Podávanie letrozolu malo významný vplyv na koncentráciu cirkulujúceho testosterónu samíc (Obr. 3a; $F(1, 24)=5,41$; $p<0,05$; $\eta^2=0,17$). Samice, ktorým bola inhibovaná aromatáza bez ohľadu na genotyp mali o polovicu vyššiu koncentráciu testosterónu v plazme ako CTRL samice ($t=2,33$; $p<0,05$; $d=0,9$). Genotyp ani jeho interakcia s podávaním letrozolu nemala signifikantný vplyv na koncentráciu cirkulujúceho testosterónu. Hmotnosť maternice bola ovplyvnená podávaním letrozolu, avšak nie genotypom ani ich interakciou (Obr. 3b; $F(1, 22)=6,31$; $p<0,05$; $\eta^2=0,22$). Podávanie letrozolu znížilo o približne 20% hmotnosť materníc oproti materniciam kontrol ($t=-2,51$; $p<0,05$, $d=-1,01$).



Obr. 3 a) Koncentrácie cirkulujúceho testosterónu, b) hmotnosť maternice normalizovaná na % telesnej hmotnosti.

Diskusia

Náš experiment bol zameraný na sledovanie vplyvu inhibície aromatázy na sociálne správanie a úzkosti-podobné správanie myší s deléciou Shank3 génu. Pokiaľ je nám známe, ide o prvú experimentálnu prácu kombinujúci vplyv inhibície aromatázy a genetickej predispozície k PAS prostredníctvom animálneho modelu Shank3^{-/-} myší. Výsledky koncentrácie cirkulujúceho testosterónu boli zvýšené po podávaní letrozolu a sprevádzané znížením hmotnosti maternice samíc, čo naznačuje zníženie koncentrácie estradiolu (11). To naznačuje úspešnú inhibíciu aromatázy v našom experimente, keďže aj predchádzajúci výskum preukázal morfológické zmeny maternice, konkrétne jej zmenšenie, a tiež zvýšenie koncentrácie testosterónu u samíc potkanov, ktorým bol podávaný letrozol (12).

Teóriu Barona Cohena (5) o súvislosti hyperandrogenizmu a prehĺbenia autistických črt nebola podporená výsledkami nášho experimentu. Sociálne správanie, ako kľúčová oblasť ťažkostí u ľudí s PAS, nebola zhoršená podávaním letrozolu u myší s mutáciou Shank3 génu. Naše výsledky skôr naznačili trend, kedy by podávanie inhibítora aromatázy mohlo pri tejto predispozícii znížiť mieru sociálneho nezáujmu, a to takmer na rovnakú úroveň ako u WT CTRL zvierat. Trend prehĺbenia sociálneho nezáujmu pozorovaný u WT LET samíc je v zhode s výsledkami práce zameranej na prenatálne vystavenie hyperandrogénnemu prostrediu podávaním letrozolu matkám potkanov, ktorých samičky potomstvo malo zhoršené sociálne správanie (13). Zároveň sa zdá, že delécia Shank3 génu má rozličné behaviorálne dôsledky pri inhibícii účinku aromatázy.

Častými komorbiditami u ľudí s PAS sú úzkostné poruchy (2). Naše výsledky nie sú v zhode s predchádzajúcimi prácami, v ktorých podávanie letrozolu (14) ako aj delécia Shank3 génu (15) u hlodavcov mala za následok vyššiu mieru úzkosti podobného správania. Úzkostné vyhýbanie sa objektom u samíc myší s mutáciou Shank3 génu pozorované v našom experimente je v zhode s predchádzajúcim výskumom (16). Naše výsledky skôr podporujú prepojenosť úzkostného vyhýbania sa s genetickou predispozíciou než s endokrinnými faktormi.

Výhodou tejto práce je využitie samíc myší, pretože výskum PAS býva orientovaný viac na samcov, resp. mužov, čo prehľbuje rodovú a pohlavnú zaujatosť vo výskume PAS. Naša práca tiež naznačila možné špecifické behaviorálne účinky inhibície aromatázy pri genetickej predispozícii k PAS. Avšak naše výsledky sú limitované malým počtom zvierat vzhľadom na variabilitu správania, keďže aj samotné PAS sú heterogénnou skupinou porúch. Do budúceho výskumu by bolo potrebné objasniť naznačené trendy najmä pre opačný efekt inhibície aromatázy na sociálne správanie u KO a WT zvierat. Taktiež by bolo vhodné sa zamerať na skúmanie steroidných hormónov, expresie ich receptorov a aromatázy v špecifických mozgových štruktúrach súvisiacich so sociálnym správaním.

Podporené grantmi APVV-20-0185 a VEGA 1/0341/23.

Zoznam použitej literatúry

1. Solmi M, Song M, Yon DK, a spol.: Incidence, prevalence, and global burden of autism spectrum disorder from 1990 to 2019 across 204 countries. *Molecular Psychiatry* 2022; 27(10): 4172–4180.
2. Khachadourian V, Mahjani B, Sandin S, a spol.: Comorbidities in autism spectrum disorder and their etiologies. *Translational Psychiatry* 2023; 13(71).
3. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, a spol.: Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* 2020; 180(3), 568-584.e23.
4. Kim JY, Son MJ, Son CY, a spol.: Environmental risk factors and biomarkers for autism spectrum disorder: an umbrella review of the evidence. *Lancet Psychiatry* 2019; 6(7):590-600.
5. Baron-Cohen S: The extreme male brain theory of autism. *Trends in Cognitive Sciences* 2002, 6(6): 248–254.
6. Auyeung B, Taylor K, Hackett G, Baron-Cohen S: Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old children. *Molecular autism* 2010; 1: 1-8.
7. Knickmeyer R, Baron-Cohen S, Raggatt P, Taylor K: Foetal testosterone, social relationships, and restricted interests in children. *Journal of child psychology and psychiatry* 2005; 46(2): 198-210.
8. May T, Yi KLJ, Loveland KL, Vollenhoven, B, Williams K: Overlap of autism and conditions associated with atypical sex hormone levels or response: a systematic review and meta-analysis. *Research in Autism Spectrum Disorders* 2021; 80, 101693.
9. Wilson HA, Creighton C, Scharfman H, Choleris, E, MacLusky NJ. Endocrine Insights into the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *The Neuroscientist* 2020; 107385842095204.

10. Crider A, Thakkar R, Ahmed AO, Pillai A. Dysregulation of estrogen receptor beta (ER β), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects. *Molecular Autism* 2014; 5, 46.
11. Heo JH, Lee SR, Jo SL, Yang H, Lee HW, Hong EJ. Letrozole Accelerates Metabolic Remodeling through Activation of Glycolysis in Cardiomyocytes: A Role beyond Hormone Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(1): 547.
12. Pich K, Rajewska J, Kamińska K, a spol.: Effect of Vitamin D3 on Chemerin and Adiponectin Levels in Uterus of Polycystic Ovary Syndrome Rats. *Cells* 2023; 12(16): 2026.
13. Xu XJ, Zhang HF, Shou XJ. a spol.: Prenatal hyperandrogenic environment induced autistic-like behavior in rat offspring. *Physiology & Behavior* 2015; 138: 13–20.
14. Borbélyová V, Domonkos E, Csongová M. a spol.: Sex-dependent effects of letrozole on anxiety in middle-aged rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2017; 44: 93-98.
15. Drapeau E, Riad M, Kajiwara Y, Buxbaum JD: Behavioral phenotyping of an improved mouse model of Phelan–McDermid syndrome with a complete deletion of the Shank3 gene. *Eneuro* 2018; 5(3).
16. Jaramillo TC, Speed HE., Xuan Z, a spol.: Novel Shank3 Mutant Exhibits Behaviors With Face Validity for Autism and Altered Striatal and Hippocampal Function. *Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research* 2017; 10(1): 42–65.

27. Plazmou aktivovaná tekutina ako liečba infekcií močových ciest?

Mgr. Nadja Šupčíková

(normálna a patologická fyziológia)

Školiteľ: doc. RNDr. Martin Kopáni, PhD.

Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LF UK, Bratislava

Úvod

Uropatogénna *Escherichia coli* (*E. coli*) je rozšírený patogén zodpovedným patogénom väčšiny infekcií močových ciest (IMC). Hoci IMC majú relatívne nízku mortalitu, postihujú celé populačné spektrum a u detí a starších pacientov IMC často sprevádzajú komplikácie vyžadujúce hospitalizáciu. Vzhľadom na častú rekurentnosť sú IMC spájané s rastúcou rezistenciou na antibiotiká (Wagenlehner et al. 2020). Preto je potrebné skúmať inovatívne liečebné stratégie na účinný boj proti týmto infekciám.

Medzi skúmanými metódami liečby si zdroje studenej plazmy získali pozornosť vďaka schopnosti generovať rôzne činidlá s biologickými účinkami, vrátane reaktívnych druhov kyslíka (ROS), reaktívnych druhov dusíka (RNS) a nabitých častíc. Studená atmosférická plazma je elektricky neutrálna zmes elektrónov, iónov, neutrálnych atómov a molekúl (Dubuc et al., 2018). Plazma dokáže účinne inaktivovať rôzne typy mikroorganizmov v kvapalinách, na povrchoch a vyvolať tiež biologické reakcie v tkanivách a bunkách. Predpokladá sa, že účinky plazmy sú sprostredkované hlavne pôsobením ROS a RNS. V klinickej aplikácii plazmy sa preukázalo významné zlepšenie hojenia rán a dokonca zvýšenie migrácie neutrofilov do miesta rany (Arndt et al., 2015) a aktivácie granulocytov bez toho, aby dochádzalo k netóze (Kupke et al., 2021). Pri niektorých chorobách nie je možné použiť priame pôsobenie plazmy a preto vhodnou alternatívou by mohli byť tekutiny opracované plazmou (angl. plasma activated liquid, PAL). Produkty generované plazmou a rozpustené vo vodnom roztoku boli aplikované na bunkové kultúry (Bekeschus et al., 2018) ako aj na in vivo modeli (Freund et al., 2019). Taktiež bol dokázaný antimikrobiálny účinok PAL (Arndt et al., 2015, Kaushik et al., 2018, Hen et al., 2016). Vzhľadom na rýchlo rastúci počet baktérií rezistentných voči viacerým liekom by plazma alebo plazmou aktivované tekutiny mohli byť zaujímavé ako potenciálna neantibiotická alternatíva na liečbu bakteriálnych infekcií.

Primárnym cieľom tejto štúdie preto bolo preskúmať antimikrobiálnu účinnosť PAL na uropatogénnu *E. coli* s potenciálnou aplikáciou v zvieracom modeli IMC.

Materiál a metódy

V prvej časti bol analyzovaný antimikrobiálny efekt viacerých typov PAL. Roztok 1xPBS bol opracovaný plazmou pomocou štyroch rôznych výbojov: Streamer Corona (SC), Transient Spark with Electrospray (TS-ES), Transient Spark Batch (TS-B) a Glow Discharge (GD).

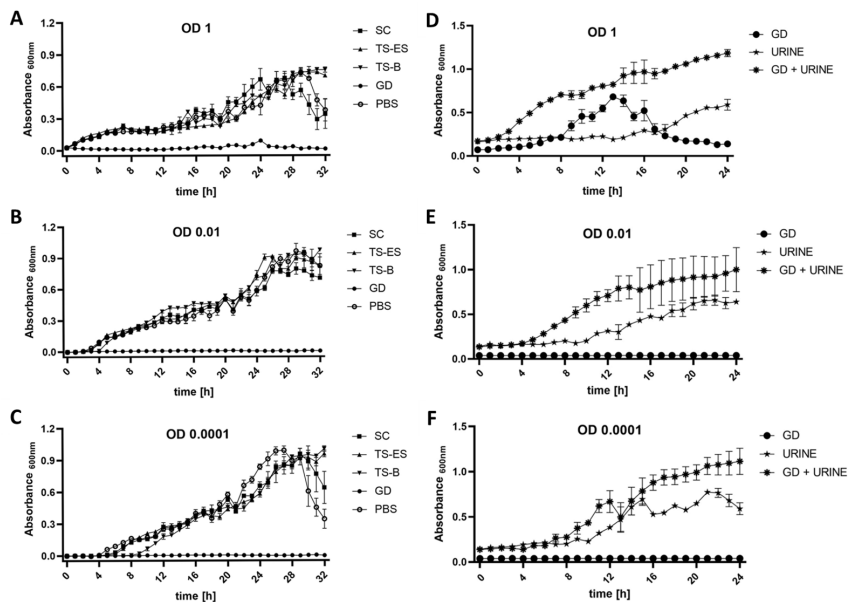
PAL alebo 1xPBS (CTRL) spolu s LB médiom boli aplikované na 3 rôzne koncentrácie nočnej *E. coli* kultúry 8x10⁸ KTJ/ml (=OD 1), 8x10⁶ KTJ/ml (=OD 0,01), 8x10⁴ KTJ/ml (=OD 0,0001) v pomere 1:1:18 v celkovom objeme 200 µl. Optická hustota zmesi bola sledovaná spektrofotometricky v hodinových intervaloch po dobu 32 h. V časových bodoch 0, 4, 8, 12, 24 hodín sa určila bakteriálna záťaž zmesi na mikrobiologických médiách, čím sa určil počet kolónií tvoriacich jednotky (KTJ).

V druhej časti bola PAL s naučinnnejším antimikrobiálnym účinkom aplikovaná na vzorky myšacieho moču, pričom moč buď úplne nahradil testovanú PAL alebo bol zmiešaný s testovanou PAL v pomere 1:1. Tu sa 10 µl bakteriálnej kultúry zmiešalo s 10 µl tekutého LB média a 180 µl buď myšieho moču, GD PAL, alebo kombináciou myšieho moču a GD PAL v pomere 1:1. Podobne ako v predchádzajúcom experimente, hodnoty optickej hustoty boli zaznamenané každú hodinu počas 24 hodín, pričom testy antimikrobiálnej aktivity boli vykonané v rovnakých piatich časových bodoch.

Výsledky

Porovnanie antibakteriálnych účinkov rôznych typov PAL ukázalo (Obr. 1 A-C), že GD PAL vykazuje najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu v porovnaní s ostatnými typmi PAL. Najvýraznejší efekt GD PAL bol pozorovaný u baktérií o koncentrácii 8x10⁸ KTJ/ml (Obr. 1 A), kde už po 1 hodine inkubácie vzrástol počet baktérií ošetrených ostatnými PAL ako aj CTRL. Navyše, ostatné PAL nepreukázali žiadny inhibičný účinok na rast baktérií v porovnaní s CTRL.

GD PAL zmiešaný s močom vykazoval nielen oslabený antimikrobiálny účinok v porovnaní so silným antimikrobiálnym účinkom GD PAL (Obr. 1 D-F). Kombinácia GD PAL a moču vedie k výrazne nižšej antimikrobiálnej aktivite GD PAL a umožňuje rýchlejší rast baktérií ako samotný moč pre všetky testované koncentrácie. Pri aplikácii GD PAL na OD 1 sa zvyšuje množstvo baktérií počas 6-20 h (Obr. 1 D). V oboch častiach experimentu sa ukázalo, že antimikrobiálny účinok je slabší pri vyššej koncentrácii baktérií.



Obr.1 Antimikrobiálny efekt na bakteriálnu kultúru *E. coli* za použitia štyroch rôznych PAL (A, B, C) a GD PAL zmiešanej s myšacím močom (D, E, F)

Diskusia

V experimente boli porovnané štyri druhy PAL, ktoré vznikli opracovaním PBS pomocou rôznych výbojov, aby sa posúdila ich antimikrobiálna účinnosť proti uropatogénnym baktériám *E. coli*. Následne sa najúčinnější variant PAL testoval v aplikácii na myšaciu moč, pričom sa predpokladalo, že táto potenciálna terapia IMC bude následne testovaná na myšacom modeli. Predchádzajúci výskum ukázal, že aplikácia studenej plazmy pri úprave vody vedie k tvorbe PAL vykazujúcich výrazné antimikrobiálne vlastnosti (Bekeschus et al., 2018, Freund et al., 2019, Arndt et al., 2015, Kaushik et al., 2018, Hen et al., 2016).

Základným faktorom spojeným s antimikrobiálnou účinnosťou PAL je existencia ROS a RNS (Dubuc et al., 2018). Rôzne techniky používané na generovanie PAL poskytujú rôzne kombinácie ROS a RNS v rôznych typoch PAL (Machala et al., 2011). Preto sa skúmala antimikrobiálna účinnosť štyroch odlišných typov PAL produkovaných rôznymi plazmatickými výbojmi.

Výsledky experimentu poukazujú na GD PAL ako najsilnejší z hľadiska inaktívácie uropatogénnych baktérií *E. coli* in vitro. Tento záver bol podporený meraním optickej hustoty ako aj stanovením počtu baktérií mikrobiologicky. V súlade s našimi výsledkami nedávna štúdia tiež naznačila vysokú účinnosť plazmy GD proti *E. coli* rezistentným na antibiotiká, pričom účinok sa pripisuje hydroxylovým radikálom ($\cdot\text{OH}$) (Yang et al., 2020).

Na základe porovnania štyroch rôznych PAL sa predpokladalo, že najúčinnější GD PAL bude vykazovať antimikrobiálnu aktivitu aj pri zmiešaní s močom a preto sa GD PAL otestovala aj v kombinácii s myšiacim močom. Tento predpoklad sa nepotvrdil. Zmes GD PAL a moču nedokázala inhibovať rast baktérií v porovnaní so samotným močom. Jedným z pravdepodobných vysvetlení by mohla byť schopnosť moču neutralizovať ·OH radikály prítomné v PAL, ako už bolo zdokumentované (Lin et al., 2000). Ďalšou možnosťou je, že GD PAL interferuje s vrodenými, nespecifickými imunitnými reakciami u myši určenými na boj proti bakteriálnym infekciám. Literatúra predtým naznačila, že liečba studenou atmosférickou plazmou môže vyvolať posun polarizácie makrofágov smerom k protizápalovému stavu, čo potenciálne bráni rozlíšeniu IMC (Crestale et al., 2018). Naopak, špecifické náboje studenej atmosférickej plazmy preukázali schopnosť zvýšiť oxidačný stres a iné antimikrobiálne mechanizmy v polymorfonukleárných bunkách, vďaka čomu sú účinnejšie pri eradikácii baktérií (Sabbatini et al., 2021). Tieto účinky však boli vyvolané priamo atmosférickou plazmou a v súčasnosti neexistujú dôkazy o podobných zmenách vyskytujúcich sa in vitro alebo in vivo v dôsledku plazmou ošetrovaných kvapalín. Zaujímavé je, že v druhej časti experimentu pri použití GD PAL na bakteriálnu kultúru OD 1 je prítomný nárast množstva baktérií počas 6-20 h, pričom v prvej časti experimentu je stav stabilný. Možným vysvetlením je, že pri príprave experimentu môže dochádzať k malým rozdielom v bakteriálnej kultúre, najmä vo viabilite baktérií. Do budúca bude nevyhnutné doplniť do protokolu ďalší krok na overenie viability baktérií a dosiahnuť tak kvalitnejšiu štandardizáciu.

PAL predstavuje sľubnú alternatívu pre inaktiváciu baktérií. Zistilo sa, že antimikrobiálny účinok GD PAL je najvýznamnejší na rast baktérií v porovnaní s SC, TS-ES, TS-B PAL a PBS. Napriek potvrdeniu antimikrobiálneho účinku naše zistenia naznačujú zníženie antimikrobiálnej účinnosti, keď sa PAL kombinuje s močom myši. Je potrebný ďalší výskum na preskúmanie zložitého mechanizmu, ktorý je základom vplyvu moču na PAL.

Zoznam použitej literatúry

1. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff AK, Karrer S: Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013;8(11):e79325.
2. Bekeschus S, Käding A, Schröder T, Wende K, Hackbarth C, Liedtke KR, van der Linde J, von Woedtke T, Heidecke CD, Partecke LI. Cold Physical Plasma-Treated Buffered Saline Solution as Effective Agent Against Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(6):824-831.
3. Crestale L, Laurita R, Liguori A, Stancampiano A, Talmon M, Bisag A, Gherardi M, Amoroso A, Colombo V, Fresu LG. Cold Atmospheric Pressure Plasma Treatment Modulates Human Monocytes/Macrophages Responsiveness. *Plasma*. 2018;1(2):261-276.
4. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette JP, Laurencin-Dalieux S, Cousty S. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758835918786475.

5. Freund E, Liedtke KR, van der Linde J, Metelmann HR, Heidecke CD, Partecke LI, Bekeschus S. Physical plasma-treated saline promotes an immunogenic phenotype in CT26 colon cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2019;9(1):634.
6. Gilmore BF, Flynn PB, O'Brien S, Hickok N, Freeman T, Bourke P. Cold Plasmas for Biofilm Control: Opportunities and Challenges. *Trends Biotechnol.* 2018;36(6):627-638.
7. Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, Jha N, Adhikari B, Lee SJ, Masur K, von Woedtke T, Weltmann KD, Choi EH. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol Chem.* 2018;400(1):39-62.
8. Kupke LS, Arndt S, Lenzer S, Metz S, Unger P, Zimmermann JL, Bosserhoff AK, Gruber M, Karrer S. Cold Atmospheric Plasma Promotes the Immunoreactivity of Granulocytes In Vitro. *Biomolecules.* 2021;11(6):902.
9. Lin WC, Lai TY, Wu YE. Scavenging of reactive oxygen species by a urinary preparation. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):251-8.
10. Machala Z, Tarabova B, Sersenova D, Janda M, Hensel K. Chemical and antibacterial effects of plasma activated water: correlation with gaseous and aqueous reactive oxygen and nitrogen species, plasma sources and air flow conditions. *J Phys D.* 2019;52:34002
11. Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells.* 2021;10(3):494.
12. Shen J, Tian Y, Li Y, Ma R, Zhang Q, Zhang J, Fang J. Bactericidal Effects against *S. aureus* and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures. *Sci Rep.* 2016;6:28505.
13. Scholtz V, Pazlarova J, Souskova H, Khun J, Julak J. Nonthermal plasma--A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6 Pt 2):1108-19.
14. Wagenlehner FME, Bjerklund Johansen TE, Cai T, Koves B, Kranz J, Pilatz A, Tandogdu Z. Epidemiology, definition and treatment of complicated urinary tract infections. *Nat Rev Urol.* 2020;17(10):586-600.
15. Yang Y, Wan K, Yang Z, Li D, Li G, Zhang S, Wang L, Yu X. Inactivation of antibiotic resistant *Escherichia upec* and degradation of its resistance genes by glow discharge plasma in an aqueous solution. *Chemosphere.* 2020;252:126476.

28. Štúdium mitochondriálnych ochorení s využitím technológií masívne paralelného sekvenovania

Mgr. Gabriela Bľandová

(Lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: Mgr. Marian Baldovič, PhD^{2,3}, prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD¹

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, ² Katedra molekulárnej biológie PriF UK, ³ Laboratórium genomickej medicíny, GHC GENETICS, SK

Úvod

Mitochondriálne ochorenia označujú veľký počet mitochondriálnych porúch s rozličnými genetickými príčinami a taktiež so širokým spektrom klinických príznakov (1). Určenie genetickej príčiny u pacienta môže byť náročné vzhľadom na rozsiahlu heterogenitu klinických symptómov, nedostatočne objasnené korelácie genotypu a fenotypu a nešpecifickú povahu mnohých symptómov s významným klinickým presahom pre iné stavy (2).

Mutácie prítomné v mitochondriálnej DNA (mtDNA) ale aj v jadrovom genóme môžu viesť k týmto poruchám a narušiť tak normálnu funkciu mitochondrií. Mutácie v mtDNA sú zodpovedné za 80 % mitochondriálnych ochorení u dospelých. Naopak, mutácie mtDNA boli detegované iba v 20 % až v 25 % prípadov mitochondriálnych chorôb s nástupom v detstve (3), pričom väčšina mitochondriálnych ochorení s nástupom v detstve je spôsobená autozomálnymi recesívnymi mutáciami jadrovej DNA (4).

Mutácie mtDNA sú často v heteroplazmatickom stave, teda vo forme zmesi normálnych a mutantných kópií mtDNA v bunke. Prahová úroveň, teda minimálny kritický podiel mutovaných mtDNA potrebných na fenotypový prejav ochorenia, je rozdielna pre jednotlivé mutácie. Hoci prahová hladina čiastočne vysvetľuje fenotypy pacientov, väčšinou presná korelácia medzi klinickou závažnosťou a podielom mutovanej mtDNA nie je objasnená (5). Navyše hladina heteroplazmie sa medzi rôznymi tkanivami toho istého jedinca môže značne líšiť (6).

Masívne paralelné sekvenovanie, tiež známe ako NGS, výrazne zlepšilo schopnosť vedeckým tímom vykonávať biomedicínsky výskum aj v tejto oblasti. NGS umožňuje paralelné sekvenovanie jadrového a mitochondriálneho genómu, čo so sebou na druhej strane prináša najmä výzvy spojené s bioinformatickým spracovaním dát. Bioinformatické nástroje musia byť prispôbené na detegovanie aj nízkej úrovne heteroplazmie a taktiež na odhad počtu kópií mtDNA. Bioinformatickú analýzu sťažujú aj NUMTy (z ang. Nuclear Mitochondrial Segments), teda homologické sekvencie mtDNA, ktoré boli začlenené do jadrového genómu (7).

V budúcnosti bude potrebné vypracovať metodické usmernenia, ktoré spresnia a zefektívnia diagnostický algoritmus a uľahčia stanovenie diagnózy u jedincov so známami primárneho

mitochondriálneho ochorenia s rôznymi úrovňami heteroplazmie v kontexte ich špecifického variantu mtDNA (2).

Materiál a metódy

Biologický materiál

Do štúdie bolo zahrnutých 134 pacientov so suspektným mitochondriálnym ochorením za účelom odhalenia genetickej príčiny ochorenia resp. potvrdenia diagnózy. Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas, pričom súhlasili s využitím dát na vedecké účely.

DNA extrakcia

DNA pacientov bola izolovaná zo vzoriek periférnej krvi s použitím komerčne dostupného kitu innuPREP Blood DNA Mini (IST Innuscreen GmbH), pričom sme postupovali podľa odporúčaní výrobcu. Kvantita DNA vo vzorke sa stanovila fluorometricky využitím kitu Invitrogen™ Qubit™ 1X DsDNA HS Assay Kit a prístroja Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Masívne paralelné sekvenovanie

Vzorky boli analyzované prístupom sekvenovania klinického exómu (CES) pomocou kitu SOPHiA Clinical Exome Solution v3 (SOPHiA GENETICS) alebo prístupom sekvenovania celého exómu (WES) za použitia kitu SOPHiA Whole Exome Solution v2 (SOPHiA GENETICS). CES v3 zahŕňa 4 727 jadrových génov, celý mitochondriálny genóm a 200 variantov so známou patogenitou v nekódujúcich oblastiach. WES v2 zahŕňa 19 425 jadrových génov, celý mitochondriálny genóm, pričom výrobca udáva aj schopnosť detegovať heteroplazmiu a zvýšenú citlivosť a presnosť pre komplexné, heterogénne varianty. Obidva tieto prístupy zahŕňajú prípravu DNA knižnice, kontrolu kvality DNA knižnice, kvantifikáciu DNA knižnice, samotné sekvenovanie pomocou sekvenačného systému NextSeq 550 (Illumina).

Bioinformatická analýza

Získané dáta sú analyzované softvérom SOPHiA DDM™, kde bol zostavený virtuálny panel génov asociovaný s mitochondriálnymi ochoreniami. CES prístup v tomto paneli zahŕňa 192 jadrových génov a WES prístup 240. Dáta sú klasifikované, filtrované, prioritizované a interpretované.

MLPA analýza

Keďže softvérová platforma SOPHiA DDM™ neobsahuje nástroj na detekciu variantov počtu kópií (CNV, z angl. Copy number variants) pre mtDNA u všetkých vzoriek sa realizuje aj MLPA analýza (z angl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) pomocou komerčne dostupného kitu SALSA MLPA Probemix P125 Mitochondrial DNA (MRC Holland). Vzorky sú analyzované na prístroji SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), kde prebieha fragmentačná analýza a následne vyhodnotené pomocou softvéru Coffalyser.

Výsledky

Vytvorili sme databázu 134 pacientov, ktorí boli indikovaní na CES alebo WES analýzu pre podozrenie na bližšie nešpecifikované mitochondriálne ochorenie. Vzorky týchto pacientov boli zanalyzované NGS metódami a taktiež bioinformaticky vyhodnotené. Detegovali sme patogénne prípadne potenciálne patogénne varianty v jadrových a taktiež mitochondriálnych génoch. V jadrových génoch asociovaných s mitochondriálnymi ochoreniami sme identifikovali 27 variantov. V mtDNA bolo nájdených 7 jednonukleotidových variantov (SNV, z angl. Single nucleotide variant) a 1 deléciu väčšieho rozsahu. 2 varianty v mtDNA boli detegované v homoplazmickom stave a 6 v heteroplazmickom. Jednotlivé nálezy sú zaznamenané v tabuľke 1 a 2.

Tabuľka 1: Nálezy detegované v jadrovom genóme zo vzoriek periférnej krvi

Pohlavie	Vek	Metóda	Gén	Referenčná sekvenca	Variant	Dedičnosť	Genotypový status	rs	Typ variantu
žena	29	CES	NEB	NM_001164508	c.23989C>T	AR	HET	rs549794342	nonsense
žena	4	WES	MTFMT	NM_139242	c.994C>T	AR	HET	rs200286768	
žena	17	CES	PDHX	NM_003477	c.1336C>T	AR	HOM	rs1135402725	
			SPG7	NM_003119	c.233T>A	AD/ AR	HET	rs121918358	
			COL7A1	NM_000094	c.8017C>T	AD/ AR	HET	rs781478312	missense
žena	3	WES	SPG7	NM_003119	c.1045G>A	AD/ AR	HET	rs141659620	
žena	3	WES	SCO2	NM_005138	c.418G>A	AD/ AR	HOM	rs74315511	
žena	3	WES	HIBCH	NM_014362	c.650T>C	AR	HET	-	
muž	3	CES	SLC25A12	NM_003705	c.1335C>A	AR	HOM	rs917943692	
muž	3	CES	CAV3	NM_033337	c.165C>A	AD	HET	rs759446749	
muž	18	CES	DNAJC30	NM_032317	c.152A>G	AR	HOM	rs61732167	
žena	25	CES	SCO2	NM_005138	c.418G>A	AD/ AR	HET	rs74315511	
žena	26	CES WES	COL7A1	NM_000094	c.5096C>T	AD/ AR	HET	rs121912845	
muž	31	CES	CACNA1S	NM_000069	c.3725G>A	AD/ AR	HET	rs750637537	
žena	35	CES	SLC3A1	NM_000341	c.1400T>C	AD/ AR	HET	rs121912691	
			RYR1	NM_000540	c.6385G>A	AD/ AR	HET	rs772695891	
muž	36	CES	ACAD8	NM_014384	c.958G>A	AR	HET	rs200620279	
žena	40	CES	SCO2	NM_005138	c.418G>A	AD/ AR	HET	rs74315511	

žena	43	CES	POLG	NM_001126131	c.3527_3529delinsAAA	AD/ AR	HET	rs776031396	
muž	49	CES	RYR1	NM_000540	c.2122G>A	AD/AR	HET	rs138874610	
muž	49	CES	SQSTM1	NM_003900	c.1175C>T	AD/AR	HET	rs104893941	
žena	54	CES	CYP7B1	NM_004820	c.1456C>T	AR	HET	rs116171274	
žena	55	CES	CPT2	NM_000098	c.149C>A	AD/ AR	HET	rs28936375	
žena	48	CES	DNAJC30	NM_032317	c.152A>G	AR	HOM	rs61732167	splice site
			TTN	NM_001256850	c.29732-2_29732-1delAGinsTT	AD/AR	HET	-	
žena	75	CES	NEB	NM_001164507	c.4719+2T>A	AR	HET	-	
muž	77	CES	NDUFAF6	NM_152416	c.715-3C>A	AR	HET	rs200620409	

Tabuľka 2: Nález detegované v mitochondriálnom genóme

Pohlavie	Vek	Metóda	Materiál	Typ variantu	Gén	Pozícia NC_012920	Miera heteroplazmie	rs
žena	48	CES	perif. krv	SNV	MT-ND1	m.3394T>C	T 65 %, C 35 %	rs41460449
žena	42	CES	perif. krv	SNV	MT-ND1	m.3394T>C	T 0 %, C 100 %	rs41460449
muž	37	CES	perif. krv	SNV	MT-TN	m.15910C>T	C 0 %, T 100 %	rs2068749850
žena	14	MLPA	perif. krv bukálny ster moč	SNV	MT-TK	m.8344A>G	A 11 %, G 89 % A 13 %, G 87 % A 13 %, G 87 %	rs118192098
muž	4	MLPA	perif. krv	SNV	MT-TK	m.8344A>G	A 91 %, G 9 %	rs118192098
muž	10	CES MLPA	perif. krv	SNV	MT-TL1	m.3243A>G	A 32 %, G 68 % A 37 %, G 63 %	rs199474657
muž	36	MLPA	perif. krv	SNV	MT-ND1	m.3460G>A	G 9 %, A 91 %	rs199476118
muž	2	MLPA WES	perif. krv buk. ster	DEL	MT-CYB	m.(10857_11528) _(15343_15794)del	WT 44,2 %, Del 55,8 % WT 55 – 70 %, WT 30 – 45 %	-

Diskusia

V poslednom desaťročí rýchly rozvoj pokročilých technológií v genetike a genomike umožnil dramaticky zvýšiť identifikáciu genetických príčin mitochondriálnych porúch. Naša pilotná štúdia identifikovala patogénne prípadne potenciálne patogénne varianty v génoch jadrovej DNA a v mtDNA. U 31 pacientov sme detegovali kauzálne resp. potenciálne kauzálne varianty, čo predstavuje 23 % z celkového počtu pacientov. 74,2 % z týchto pacientov malo nález v jadrovom genóme a 25,8 % pacientov v mitochondriálnom genóme. Celková diagnostická úspešnosť je mierne nižšia v porovnaní so štúdiou Grigalioniené et al. (8), kde zo súboru 83

nepríbuzných pacientov so suspektným mitochondriálnym ochorením určili diagnózu 38,1 % z nich. Väčšiu úspešnosť určenia diagnózy pripisujeme tomu, že v danej štúdií boli vzorky analyzované WES prístupom. U zvyšného počtu pacientov ostala genetická príčina ochorenia neidentifikovaná respektíve u niektorých pacientov sme detegovali patogénne varianty v inom panely génov. Z týchto dôvodov a aj na základe záverov iných štúdií je pravdepodobné, že v nezanedbateľnej časti pacientov ide v skutočnosti o diagnózu mimo skupiny mitochondriálnych ochorení. Tento problém súvisí s obrovskou fenotypovou variabilitou týchto ochorení s klinickým presahom pre iné stavy (9), čo komplikuje správnu indikáciu vyššetrenia vhodného panelu génov pri genetickej konzultácii v ambulancii klinického genetika.

Pri nálezoch v mtDNA je výraznou komplikáciou heteroplazmia (10). V našom súbore pacientov s nálezom v mtDNA sme detegovali 6 z 8 variantov v heteroplazmickom stave, čo je v súlade s poznatkami, že väčšina variantov podieľajúcich sa na ochoreniach sa nachádza práve v tomto stave (11). Úroveň heteroplazmie sa môže výrazne líšiť medzi rôznymi tkanivami, ale aj rovnakým tkanivom testovaným v rôznom čase (10), preto je pri nálezoch v mtDNA vhodné ich overovanie aj v inom relevantnom tkanive. V našom súbore pacientov sme v rámci rôznych tkanív nedetegovali výrazný rozdiel tejto úrovne. Napríklad u 14 ročnej pacientky so suspektnou Leberovou hereditárnou optickou neuropatiou (LHON, z angl. Leber hereditary optic neuropathy) sme identifikovali variant m.8344A>G zo vzorky periférnej krvi s úrovňou heteroplazmie 89 %, kým vo vzorke bukalného steru a moču úroveň heteroplazmie dosahovala úroveň 87 %. Zostáva však otázne, či v tomto prípade ide o skutočne kauzálny variant, vzhľadom na to, že tento variant je asociovaný s MERRF (12), kde sú zrakové ťažkosti skôr ojedinele, čo poukazuje na to, že môže ísť len o sekundárny nález. V tomto prípade by bolo vhodné doplniť MLPA analýzu aj analýzou jadrových génov.

Väčšina z nálezov v mtDNA boli klinicky suspektné a v súlade s fenotypom pacientov. Tieto diagnózy sa potvrdili MLPA analýzou, ktorá deteguje aj 6 najčastejších patogénnych variantov v mitochondriálnom genóme, pričom išlo najmä o LHON. Napríklad sme detegovali variant m.3460G>A v heteroplazmickom stave (91 % pre mutovanú alelu) zo vzorky periférnej krvi u 36 ročného pacienta s atrofiou zrakového nervu s pozitívnou rodinnou anamnézou. Tento variant nesie 90 % pacientov s LHON, pričom zasahuje jednu z podjednotiek komplexu I v dýchacom reťazci a je s výnimkou zriedkavých prípadov de novo variantov prítomný u všetkých matrilineárnych členov rodiny pacienta s LHON(13).

Jediná delícia veľkého rozsahu identifikovaná v mtDNA bola m.(10857_11528)_(15343_15794)del v géne MT-CYB u 2 ročného pacienta s aplastickou anémiou, pancytopeniou, hepatomegáliou a hypofunkciou pankreasu. Klinické príznaky poukazovali na Pearsonov syndróm, pre ktorý sú charakteristické delície veľkého rozsahu v mtDNA (14). Tento variant bol identifikovaný metódou WES zo vzorky periférnej krvi v heteroplazmickom stave (55,8 %) a následne overený MLPA analýzou zo vzorky bukalného steru v heteroplazmickom stave (30 – 45 %). Tento rozdiel v detegovanej miere heteroplazmie môže byť prítomný vzhľadom na iné analyzované tkanivo, ale taktiež na charakter variantu a taktiež použitých metód.

V klinickej praxi a najmä laboratórnej genetickej diagnostike sa ukazuje za dôležité vzorky prioritizovať vzhľadom na zdĺhavý a finančne náročný proces CES/WES analýzy. U dospelého pacienta s podozrením na mitochondriálne ochorenie s maternálnou dedičnosťou (obraz v RA je však málokedy jasný) má zmysel v prvom kroku analyzovať mitochondriálny genóm. Pri

podozrení na časté patologické mtDNA varianty je vhodné ako prvé analyzovať vzorku pacienta časovo menej náročnou MLPA metódou. Tento prístup tak v relatívne krátkom čase potvrdí alebo vylúči prítomnosť najčastejších variantov asociovaných v mitochondriálnymi ochoreniami v mtDNA a pri pozitívnych nálezoch tak zníži náklady na komplexnejšie vyšetrenie vo forme WES alebo CES. Pri negatívnom výsledku je nevyhnutná CES/WES analýza, pre detekciu iných zriedkavejších patologických mtDNA variantov alebo kauzatívnych variantov v jadrovej DNA asociovaných s mitochondriálnymi ochoreniami.

Potvrdenie správnej molekulárnej etiológie je u jedincov s mitochondriálnym ochorením dôležité na uľahčenie správneho klinického manažmentu pacienta a jeho príbuzných, prípadné umožnenie účasti na nových klinických štúdiách liečby, stanovenie rizika opakovania v ďalších graviditách matky a možnosti prenatálnej diagnostiky, ktoré môžu byť dostupné pre postihnutých jednotlivcov a ich rodinných príslušníkov (2).

Zoznam použitej literatúry

1. Carroll, C. J., Brilhante, V., & Suomalainen, A. (2014). Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *British journal of pharmacology*, 171(8), 1837-1853.
2. McCormick, E. M., Lott, M. T., Dulik, M. C., Shen, L., Attimonelli, M., Vitale, O., ... & Falk, M. J. (2020). Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Human mutation*, 41(12), 2028-20
3. Thorburn, D. R. (2004). Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *Journal of inherited metabolic disease*, 27(3), 349-362.
4. Skladal, D., Halliday, J., & Thorburn, D. R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*, 126(8), 1905-1912.
5. Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2020). Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO reports*, 21(3), e49612.
6. He, Y., Wu, J., Dressman, D. C., Iacobuzio-Donahue, C., Markowitz, S. D., Velculescu, V. E., ... & Papadopoulos, N. (2010). Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature*, 464(7288), 610-614.
7. Ye, F., Samuels, D. C., Clark, T., & Guo, Y. (2014). High-throughput sequencing in mitochondrial DNA research. *Mitochondrion*, 17, 157-163.
8. Grigalionienė, K., Burnytė, B., Ambrozaitytė, L., & Utkus, A. (2023). Wide diagnostic and genotypic spectrum in patients with suspected mitochondrial disease. *Orphanet journal of rare diseases*, 18(1), 307.
9. Chinnery, P. F., Elliott, H. R., Hudson, G., Samuels, D. C., & Relton, C. L. (2012). Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *International journal of epidemiology*, 41(1), 177-187
10. Naue, J., Hörer, S., Sängler, T., Strobl, C., Hatzer-Grubwieser, P., Parson, W., & Lutz-Bonengel, S. (2015). Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 20, 82-94.
11. Ye, K., Lu, J., Ma, F., Keinan, A., & Gu, Z. (2014). Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), 10654-10659.
12. Ripolone, M., Zanolini, S., Napoli, L., Ronchi, D., Ciscato, P., Comi, G. P., ... & Sciacco, M. (2023). MERRF Mutation A8344G in a Four-Generation Family without Central Nervous

System Involvement: Clinical and Molecular Characterization. *Journal of Personalized Medicine*, 13(1), 147.

13. Shemesh, A., Sood, G., & Margolin, E. (2021). Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
14. Faruggia, P., Di Marco, F., & Dufour, C. (2018). Pearson syndrome. *Expert review of hematology*, 11(3), 239-246.

29. Pilotný projekt: Identifikácia patogénnych zárodočných variantov u slovenských rómskych pacientov s malígnym ochorením

Mgr. Nikola Janoštiaková

(lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: Dominik Kodada¹, Oliver Petrovič², Michaela Hýblová², Mária Rečková^{3,4}, Michal Mego⁵, Vanda Repiská¹, Gabriel Minárik²

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, ²Medirex Group Academy, Nitra, ³Národný onkologický ústav, Bratislava, ⁴POKO Poprad s.r.o., Poprad, ⁵II.

Onkologická klinika LF UK a NOÚ, Bratislava

Úvod

Rómovia tvoria jednu z najpočetnejších národnostných menšín na Slovensku – ich odhadovaný počet je podľa projektu Atlas rómskych komunit (2019) okolo 440 000 ľudí (viac ako 8 % obyvateľstva) [1], no pri poslednom oficiálnom sčítaní obyvateľstva Slovenskej republiky (2021) sa k rómskej národnosti prihlásilo iba 156 164 ľudí (menej ako 3 % populácie, pričom iba 1,23 % populácie uviedlo rómsku ako svoju prvú národnosť) [2]. Ich história na Slovensku siaha do 14. storočia a ich pôvod sa spája s Indiou [3].

Celkovo sa odhaduje, že v rámci celého sveta žije asi 15 miliónov Rómov [4].

Rómovia čelia mnohým socioekonomickým problémom, ako je chudoba, nezamestnanosť, diskriminácia a zlý prístup k vzdelaniu a zdravotnej starostlivosti, čo sa pravdepodobne odráža aj na ich zdravotnej kondícii [5]. V porovnaní s majoritnou populáciou Slovenska sa u Rómov odhaduje vyššia miera chorobnosti a úmrtnosti na rôzne ochorenia, vrátane rakoviny, avšak tieto rozdiely nie sú dostatočne preskúmané. Existuje viacero faktorov, ktoré k týmto rozdielom môžu prispievať:

Socioekonomické faktory: chudoba, zanedbávanie zdravej výživy a preventívnej starostlivosti, ako aj stres a znečistenie prostredia zvyšujú riziko vzniku malígnych ochorení [6].

Genetické faktory: rôzne národnosti/ etnicity zdieľajú špecifické genetické pozadie, ktoré ich môže predisponovať k určitým typom onkologických ochorení [7, 8].

Diskriminácia: predsudky v prístupe k zdravotnej starostlivosti môžu viesť k neskoršej diagnostike a horšej liečbe rakoviny. Jedným z problémov pri vykonávaní štúdií na rómskej populácii je, že údaje by mohli viesť k stigmatizácii rómskej minority. Rómska etnická príslušnosť teda nebola vo všeobecnosti zaznamenaná a študovaná v klinických štúdiách [3].

Na základe vyššie uvedených poznatkov predpokladáme, že identifikácia zárodočných mutácií súvisiacich s rakovinou u slovenskej rómskej populácii má význam, nakoľko môže dopomôcť k zlepšeniu odhadu rizika vzniku rakoviny u Rómov a následne k zabezpečeniu cielených skríningových programov a včasnej diagnostiky pre odhalenie skorej štádií rakoviny. Tento

prístup by mohol následne viesť k vývoju personalizovaných liečebných stratégií pre rómskych pacientov s rakovinou.

Materiál a metódy

Pre našu pilotnú štúdiu sme analyzovali vzorky 43 onkologických rómskych pacientov bez vzájomných príbuzenských vzťahov vo veku 37-77 rokov s rôznymi diagnostikovanými typmi nádorov: karcinóm pľúc a priedušiek (22 vzoriek), kolorektálny karcinóm (10 vzoriek), karcinóm vaječníkov (5 vzoriek), maternice (2 vzorky), krčka maternice (1 vzorka), prostaty (1 vzorka), mandlí (1 vzorka), spojivového a mäkkého tkaniva – mezotelióm (1 vzorka). Genómová DNA bola izolovaná zo vzoriek periférnej krvi pomocou súpravy QIAwave DNA blood and tissue kit (Qiagen) a následné NGS knižnice boli pripravené pomocou navrhnutého panelu s dizajnom pokrývajúcim kompletne kódujúce oblasti vybraných génov (Tab 1). Na prípravu DNA knižníc sme použili protokol SureSelect XT HS2 DNA System (Agilent Technologies). Po masívnom paralelnom sekvenovaní boli dáta zanalyzované pomocou bioinformatických postupov. Na anotáciu/ filtrovanie variantov s cieľom detegovania patogénnych variantov s dôrazom na zárodočné mutácie súvisiace s onkologickými ochoreniami bola využitá klinická databáza QCI (Qiagen Clinical Insight).

Tab. 1: Zoznam génov, ktorých kódujúce oblasti sú obsiahnuté v nadizajnovanom paneli pre prípravu NGS knižníc.

AIM2	BRAF	DICER1	FAN1	GSTP1	MSH2	PIK3CA	RAD51C	SDHC	TP53
ALK	BRCA1	DIS3L2	FANCA	KEAP1	MSH3	PMS1	RAD51D	SDHD	TSC1
ALK	BRCA2	EGFR	FANCC	KRAS	MSH6	PMS2	RAD52	SEC63	TSC2
ATM	BRF1	EPCAM	FANCM	MCPH1	MUTYH	POLD1	RECQL	SEMA4A	VHL
AXIN2	BUB1	ERBB2	FBXW7	MET	NAT1	POLE	REST	SETD2	WRN
BAI3	CDC73	ERBB4	FH	MFI2	NBN	POLE2	REV3L	SMAD4	WT1
BAP1	CDH1	ERCC6	FLCN	MITF	NF1	POT1	RPS20	SMARCA4	XRCC2
BARD1	CDKN1C	EXO1	GALNT12	MLH1	NTHL1	PTEN	RUNX1T1	SMARCB1	XRCC4
BLM	CDKN2A	FAF1	GPC3	MLH3	NUDT1	PTPRJ	SDHA	STK11	YAP1
BMPR1A	CHD4	FAM111B	GREM1	MRE11	PALB2	RAD50	SDHAF2	TGFBR2	
BPIFB1	CHEK2	FAM175A	GRM8	MRE11A	PARP1	RAD51	SDHB	TMEM127	

Výsledky

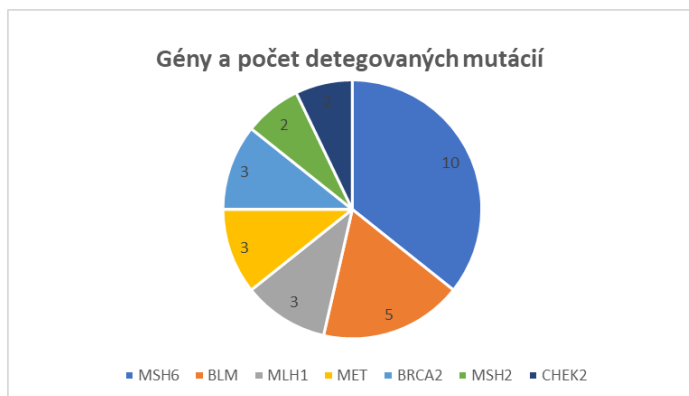
Graf 1 zobrazuje počet mutácií (patogénnych, pravdepodobne patogénnych a takisto aj varianty neznámej signifikancie) v génoch s najčastejším výskytom mutácií – MSH6, BLM, MLH1, MET, BRCA2, MSH2, CHEK2.

Po detekcii všetkých variantov sme sa zameriavali len na patogénne/ pravdepodobne patogénne mutácie – boli identifikované v 16 z 22 prípadov karcinómov pľúc/ priedušiek, v 4 z 10 prípadov karcinómov hrubého čreva/ konečníka, v 3 z 5 prípadov karcinómov vaječníkov, v 2 z 2 prípadov karcinómov maternice a v prípade karcinómu krčka maternice.

Najpočetnejšie patogénne/ pravdepodobne patogénne varianty boli detegované v géne MSH6 (v 3 prípadoch karcinómov vaječníkov, v 1 prípade karcinómu krčka maternice a v 6 prípadoch karcinómov pľúc/ priedušiek). V dvoch prípadoch variantov MSH6 išlo o bialelické mutácie.

Ďalej sme identifikovali patogénne/ pravdepodobne patogénne mutácie v géne MLH1 v 3 vzorkách (2 prípady karcinómov pľúc/ priedušiek a 1 prípad karcinómu maternice), v dvoch vzorkách v génoch ATM (2 prípady karcinómov hrubého čreva/ konečníka), CHEK2 (1 prípad karcinómu pľúc/ priedušiek, 1 prípad karcinómu maternice), NF1 (1 prípad karcinómu pľúc/ priedušiek, 1 prípad karcinómu hrubého čreva/ konečníka) a MSH2 (2 prípady karcinómu pľúc/ priedušiek). V génoch BRCA2, CDH7, FANCM, SOS1, NTHL1 boli identifikované patogénne/ pravdepodobne patogénne mutácie s jednou zhodou, teda po jednej vzorke (išlo o prípady karcinómov pľúc/ priedušiek, jedine pri géne NTHL1 o prípad karcinómu hrubého čreva/ konečníka).

V 9 vzorkách z 43 (21 %) sme neboli schopní identifikovať žiadnu patogénnu alebo suspektnú mutáciu.



Graf 1: Identifikované gény s príslušným počtom detegovaných mutácií/ variantov. Varianty majú charakter patogénny, pravdepodobne patogénny a neznámej signifikancie.

Diskusia

Rómovia sú druhou najväčšou národnostnou menšinou žijúcou na Slovensku, no ich zdravotné potreby nie sú dostatočne preskúmané, čoho príčinou sú viaceré faktory. Väčšina publikovaných štúdií o zdraví Rómov sa týka prenosných chorôb, ide však väčšinou o komunitné štúdie s obmedzenou veľkosťou vzorky a s neúplnými či zmätočnými údajmi o respondentoch [3, 9, 10]. Boli však pozorované viaceré rizikové zdravotné parametre týkajúce sa najmä civilizačných ochorení, a to najmä u Rómov s nutrične nevyváženou stravou, vysokou prevalenciou fajčenia v anamnéze s nízkou fyzickou aktivitou [6].

O rakovine u Rómov bolo publikovaných minimum prác, i keď je známe, že u rôznych rasových a etnických skupín boli hlásené rozdiely vo výsledkoch liečby a biológie onkologických ochorení. Napríklad afroamerické ženy majú nižší celoživotný výskyt rakoviny prsníka ako biele ženy, avšak riziko úmrtnosti v dôsledku tohto ochorenia a incidencia vo veku do 45 rokov je u nich vyššia [7, 8]. U afroameričaniek je tiež pravdepodobnejšia diagnostika rakoviny prsníka v pokročilom štádiu, nádory sú častejšie zle diferencované v porovnaní s nádormi u bielych žien. Tieto biologické znaky boli tiež častejšie pozorované u žien zo západnej subsaharskej Afriky, ktoré majú spoločný pôvod s afroamerickými ženami [11]. Napokon sa tiež uvádza, že Afroameričanky s karcinómom prsníka mali menšiu pravdepodobnosť, že dostanú optimálnu starostlivosť v porovnaní s kaukazskými Američanmi, čo mohlo prispieť k horším výsledkom.

Problematickou vykonávanie genetických výskumov zameraných na rómsku populáciu sa vo svojej nedávno publikovanej práci zaoberali aj autori Ena a kol. (2022), ktorí poukázali na potrebu dôkladnejšej genotypizácie rómskych subpopulácií v rámci Európy a na nutnosť ich samostatnej kategorizácie v rámci populačných štúdií v dôsledku pomerne výraznej genetickej odlišnosti voči majoritnej populácii. Samostatná kategorizácia rómskeho etnika v rámci genetických výskumov je označovaná niektorými autormi ako neetická s kontextom rasovej diskriminácie, avšak cieľom výskumov zameraných na konkrétne etnikum je poskytnúť rozšírené možnosti personalizovanej medicíny založenej na dôkazoch a upriamiť pozornosť na geneticky podmienené ochorenia, ktorých výskyt je typický pre danú rasu, či etnikum [12]. S rovnakým cieľom sme sa v rámci nášho výskumu zamerali na pacientov slovenského rómskeho etnika – naša pilotná štúdia prináša prvotné informácie o spektre zárodočných mutácií súvisiacich s onkologickými ochoreniami u slovenských rómskych pacientov, pričom sa nám podarilo identifikovať 17 patogénnych a 9 pravdepodobne patogénnych variantov (vylúčili sme varianty neznámej signifikancie, ktorých vplyv nie je známy) v 11 génoch.

V nami nadizajnovanom knižničnom paneli sme obsiahli kódujúce oblasti až 108 génov súvisiacich s onkologickými ochoreniami prítomnými u pacientov zahrnutých do štúdie. Gény záujmu zároveň súvisia aj s ochorením Lynchov syndróm – jeho charakteristikou je dysfunkcia minimálne jedného z mismatch opravných génov zahŕňajúce MLH1, MSH2, PMS2 a MSH6 gény, ktoré sa označujú aj ako Lynch-asociované gény [13]. V našom prípade sme identifikovali najviac prípadov patogénnych/ pravdepodobne patogénnych variantov v 3 zo 4 Lynch-asociovaných génov – MSH6 (10 prípadov), MLH1 (3 prípady), takisto aj MSH2 (2 prípady). Navyše, v dvoch analýzach sme identifikovali bialelické mutácie v géne MSH6, čo môže indikovať Lynchov syndróm (pozícia cis alebo trans nebola overená).

I keď Rómovia predstavujú najpočetnejšiu geneticky odlišnú subpopuláciu Slovenska, mnohí stále žijú v izolácii od majoritného obyvateľstva, čo vedie aj k reprodukčnej izolácii. Táto

izolácia môže prispievať k vyššej prevalencii určitých genetických mutácií a biologických rozdielov v rómskej populácii. V literatúre bol zaznamenaný vysoký koeficient príbuzenskej plemenitby u Rómov [3], čo môže predstavovať limitujúci faktor štúdií. Do našej kohorty pacientov boli zahrnutí len Rómovia bez vzájomných príbuzenských väzieb, avšak doteraz sme sa nezameriavali na asociáciu výsledkov s klinickými charakteristikami pacientov. Limitami práce je aj chýbajúca kontrolná skupina nerómskych pacientov – získané údaje v súčasnosti nie je možné porovnať s dátami majoritnej populácie. Zároveň bola pilotná štúdia realizovaná na pomerne malej vzorke pacientov. Do budúcnosti preto plánujeme uskutočniť ďalšie analýzy a to: rozšíriť kohortu rómskych pacientov; získať a porovnať dáta s kontrolnou skupinou nerómskych pacientov; korelovať zistené genetické varianty s klinickými a patologickými charakteristikami pacientov.

Projekt vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. Úrad splnomocnenca vlády SR pre rómske komunity. Dostupné online: <https://www.romovia.vlada.gov.sk/atlas-romskych-komunit/atlas-romskych-komunit-2019/> (citované 3.4.2024).
2. Sčítanie obyvateľov, domov a bytov 2021. Dostupné online: <https://www.scitanie.sk/obyvatelia/zakladne-vysledky/pocet-obyvatelov/SR/SK0/SR3>. (citované 3.4.2024).
3. Koupilová I, Epstein H, Holcík J: Health needs of the Roma population in the Czech and Slovak Republics. *Social Science Medicine* 2001; 53(9): 1191–1204.
4. Melegh BI, Banfai Z, Hadzsiev K, Miseta A, Melegh B: Refining the South Asian Origin of the Romani people. *BMC Genetics* 2017; 18(1):82.
5. Parekth N, Rose T: Health inequalities of the Roma in Eu-rope: a literature review. *Central European Journal of Public Health* 2011; 19(3): 139–142.
6. Ginter E, Krajcovicova-Kudlackova M, Kacala O, Kovacic V, Valachovicova M: Health status of Romanies (Gypsies) in the Slovak Republic and in the neighboring countries. *Bratislavské Lekárske Listy* 2001; 102(10): 479–484.
7. Brawley OW: Health disparities in breast cancer. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 2013; 40(3): 513– 523.
8. Grenae C, Phelps MA, Villalona-Calero MA: Raceand ethnicity in cancer therapy: what have we learned? *Clinical pharmacology and therapeutics* 2014; 95(4): 403– 412.
9. Cook B, Wayne FG, Valentine A, Lessios A, Yeh B: Revisiting the evi-dence on health and health disparities among the Roma:a systematic review 2003–2012. *International Journal of Public Health* 2013; 58(6): 885–911.
10. Rosicova K, Reijneveld SA, Madarasova-Geckova A, Stewart RE, Rosic M, Groothoff JW, van Dijk JP: Inequalities in mortality by socioeconomic factors and Roma ethnicity in the two biggest cities in Slovakia:a multilevel analysis. *International Journal for Equity in Health* 2015; 14(1): 123.

11. Newman LA: Breast cancer disparities: high-risk breastcancer and African ancestry. *Surgical Oncology Clinics of North America* 2014; 23(3): 579–592.
12. Ena GF, Aizpurua-Iraola J, Font-Porterias N, Calafell F, Comas D: Population Genetics of the European Roma-A Review. *Genes* 2022; 13(11), 2068.
13. Duraturo F, Liccardo R, De Rosa M, Izzo P: Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncology letters* 2019; 17(3) 3048–3054.

30. Úloha molekuly CD222 v imunopatogenéze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb

Mgr. Michaela Kardohelyová

(lekárska mikrobiológia a imunológia)

Spoluautori: M. Suchánková¹, V. Leksá², J. Urban³, M. Gánovská³, E. Tibenská⁴, K. Szaboová⁴, E. Tedlová⁵, M. Bucová¹

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

¹Imunologický ústav LF UK, Bratislava; ²Ústav molekulárnej biológie SAV, ³Národný ústav tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie Vyšné Hágy; ⁴Medirex a. s., Bratislava;

⁵Klinika pneumológie a ftizeológie LF UK a UN, Bratislava

Úvod

Patogenéza idiopatickej pľúcnej fibrózy nie je doteraz dostatočne prebádaná. Aj napriek výraznému pokroku v posledných rokoch, zostávajú presné molekulárne mechanizmy neobjasnené. Rozvoju fibrotického procesu predchádza poškodenie alveolárnych epitelových buniek, aktivácia fibroblastov a ich diferenciácia na myofibroblasty. Niektoré aktuálne práce poukazujú na úlohu receptora pre inzulínu podobný rastový faktor 2 (IGF2R, M6PR, CD222) v procesoch súvisiacich s rozvojom ireverzibilnej fibrózy (1,2,3). CD222/IGF2R sa nachádza v Golgiho aparáte a viaže proteíny obsahujúce manózo 6-fosfát (M6P), ktoré transportuje do lyzozómov (5). Cieľom práce bolo stanovenie koncentrácie solubilnej molekuly CD222 (sCD222) v tekutine bronchoalveolárnej laváže (BALT) a identifikácia možného zdroja sCD222 pomocou stimulácie bunkových línií pľúcnych epitelových buniek a pľúcnych fibroblastov.

Materiál a metódy

Výšetrovaný súbor tvorilo 361 pacientov s difúznymi parenchýmovými pľúcnymi chorobami (DPPCH), ktorí pochádzali z Národného ústavu tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie vo Vyšných Hágoch a z Kliniky pneumológie a ftizeológie LF UK a FN v Bratislave. Zaradili sme ich do štyroch skupín: 1. Pacienti s idiopatickou pľúcnou fibrózou (IPF; n=60); 2. Pacienti s pľúcnou sarkoidózou (S; n=227); 3. Pacienti s hypersenzitívnou pneumonitídou (HP; n=47) – zápalová forma a 4. HP-fibrotická forma (n=27).

Koncentráciu sCD222 v BALT u pacientov s DPPCH sme zisťovali pomocou metódy ELISA (IGF2R /CD222/ ELISA Kit: Abcam, Catalogue No. Ab213788). V ďalšom kroku sme pomocou BALT stimulovali bunkové kultúry A549, čo sú pľúcne epitelové bunky a bunkové kultúry MRC-5, čo sú fibroblasty, s cieľom zistiť ich schopnosť produkcie CD222.

Koncentráciu CD222 sme merali v médiu týchto buniek (t.j. v supernatante po centrifugácii) a to v prvom kroku po 24 - hodinovej stimulácii pomocou BALT a v druhom kroku po premytí

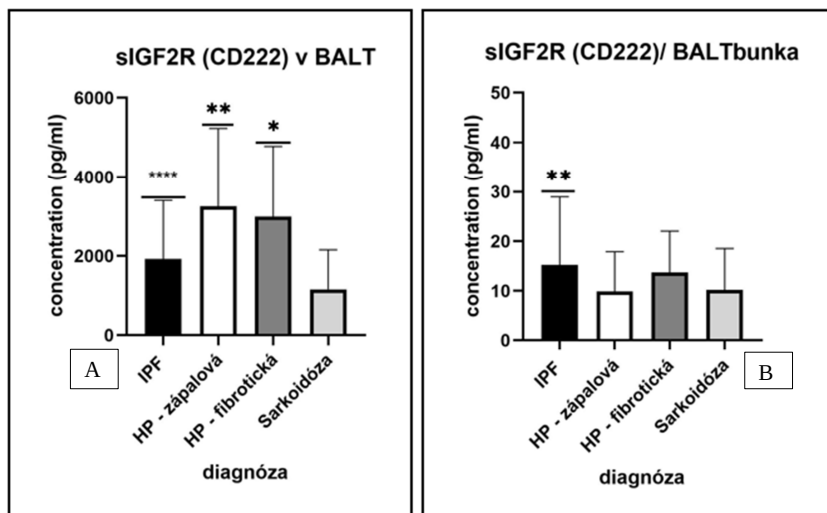
a 24 hodinovej inkubácii v čistom médiu s PBS (phosphate buffer solution). Výsledky získané metódou ELISA sme overili metódou Western blot.

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov sme použili program GraphPad Prims 8.0. a hodnoty $p < 0,05$ boli štatisticky významné. Pri neparametrickom rozložení dát sme použili Mann-Whitney test a aj neparametrickú analýzu variance (Kruskal–Wallis) s Dunn post-testom.

Výsledky

1. Porovnanie koncentrácií sCD222 v BALT pacientov s IPF, hypersenzitívnou pneumonitídou a sarkoidózou

Porovnaním koncentrácie solubilnej formy CD222 v BALT sme zistili štatisticky významne vyššie koncentrácie u pacientov s IPF a oboch foriem HP v porovnaní so sarkoidózou. Po prepočte koncentrácií na jednu BALT bunku sme zistili štatisticky významne vyššie hodnoty u pacientov s IPF v porovnaní so sarkoidózou (obrázok 1).



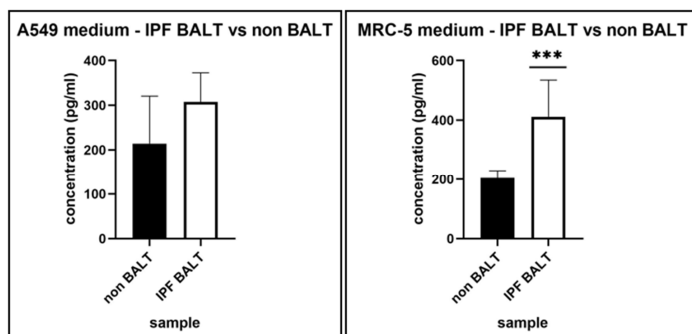
Obrázok 1: Porovnanie koncentrácie sIGF2R (sCD222) v BALT pri jednotlivých diagnózach (A). Údaje sú prezentované ako medzikvartilový rozdiel, a hodnoty $p < 0,05$ sa považovali za štatisticky významné (* $p = 0,0324$, ** $p = 0,0013$, * $p < 0,0001$).**

Porovnanie koncentrácie sIGF2R /sCD222 v prepočte na jednu BALT bunku pri jednotlivých diagnózach (B). Údaje sú prezentované ako medzikvartilový rozdiel, a hodnoty $p < 0,05$ sa považovali za štatisticky významné (** $p = 0,0025$).

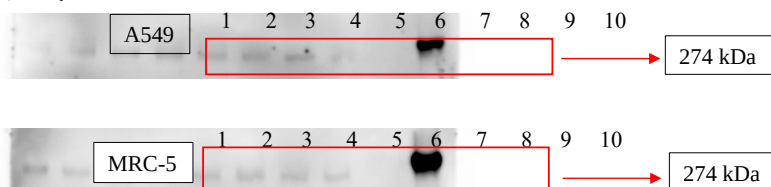
Keďže v prepočte na jednu bunku v BALT sme zistili najvyššie koncentrácie sCD222 u pacientov s IPF, predpokladáme pri tejto diagnóze ako ďalší možný zdroj tvorby CD222 pľúcne epitelové bunky (A549) a fibroblasty (MRC5) – iné bunky, než sú prítomné v BALT. Preto v ďalšom kroku sme do našich experimentov zahrnuli prácu s bunkovými líniami.

2. Stimulácia buniek A549 a MRC5 pomocou BALT od pacientov s IPF. Porovnanie koncentrácie sCD222 v v supernatantoch médií buniek s BALT a bez BALT len v prítomnosti PBS.

Po stimulácii fibroblastov (lína buniek MRC-5) pomocou BALT pacientov s IPF sme v supernatante médií buniek MRC-5 namerali signifikantne vyššie koncentrácie sCD222 v porovnaní s kontrolným médiom MRC-5 buniek bez BALT stimulovaných len pomocou PBS.



Obrázok 2: Porovnanie koncentrácie sCD222 vo vzorkách supernatantov médií bunkových kultúr pneumocytov A549 a fibroblastov MRC-5 stimulovaných BALT od pacientov s idiopatickou pľúcnou fibrózou so supernatantmi kultúr bez BALT s PBS. Údaje sú prezentované ako medián a hodnoty $p < 0,05$ sa považovali za štatisticky významné ($p = 0,0010$).**



Obrázok 3: Sledovanie prítomnosti sCD222 prostredníctvom metódy Western blot (WB) vo vzorkách supernatantov bunkových kultúr A549 a MRC-5 stimulovaných BALT pacientov s IPF a sarkoidózou.

Tab.1 Popis jednotlivých vzoriek, ktoré sa analyzovali pomocou metódy Western blot

Vzorka	Obsah vzoriek
1	kontrola – bunky (A549; MRC-5) + PBS
2-6	bunky + BALT IPF
7,8	bunky + BALT sarkoidóza
9	marker
10	lyzát buniek

Diskusia

Výšetrenie markerov v tekutine z bronchoalveolárnej laváže umožňuje analyzovať produkty zápalového procesu priamo v mieste jeho priebehu. Kombinácia možností získania reálnych mediátorov fibrotického procesu (BALT) a využitím modelov bunkových kultúr umožňuje sledovať reakcie sledovaných typov buniek v prostredí prebiehajúceho fibrotického procesu. Je dôležité povedať, že imunopatogenézu IPF a iných fibrotických procesov v pľúcach nepoznáme. CD222 ako jeden z možných markerov má viac možných funkcií. Úloha CD222 bola dokázaná v niekoľkých nedávnych štúdiách. Zistilo sa, že sa podieľa na klírense apoptických buniek a v procese fibrotizácie. Uvedené štúdie naznačujú úlohu CD222/IGF2R v procese fibrotizácie prostredníctvom vplyvu na diferenciáciu fibroblastov na myofibroblasty, ukladanie extracelulárnej matrix a aktiváciu TGF- β (4,6). Zistili sme signifikantne vyššie hodnoty koncentrácie sCD222 v BALT pacientov s IPF v porovnaní s pacientami so sarkoidózou. Taktiež sme zistili, že pľúcne epitelové bunky po stimulácii pomocou BALT pacientov s IPF neprodukovali signifikantne vyššie množstvo sCD222 v porovnaní s kontrolnými nestimulovanými bunkami. Naopak, fibroblasty po stimulácii BALT pacientov s IPF tvorili signifikantne vyššie množstvo sCD222 v porovnaní s kontrolnými nestimulovanými bunkami. Získané výsledky sme potvrdili aj analýzou pomocou Western blotu.

Záver

V štúdií sme dokázali zvýšenú koncentráciu CD222 v BALT u pacientov s IPF. Pľúcne fibroblasty, ktoré sú kľúčovými hráčmi fibrotizácie pľúcneho parenchýmu produkujú CD222 pod vplyvom BALT od pacientov s IPF, čo simuluje zápalové mikroprostredie charakteristické pre progresívny fibrotický proces u pacientov s IPF.

Štúdia bola financovaná z grantu VEGA 1/0426/24, APVV-20-0513, VEGA 2/0152/21.

Zoznam použitej literatúry

1. Adams T.S., Schupp J.C., Poli S., Ayaub E.A, Neumark N, et al. 2020. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. Sci. Adv. 6(28):eaba1983

2. American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 15;165(2):277-304. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.ats01. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Aug 1;166(3):426. PMID: 11790668.
3. Beisang D.J., Smith K., Yang L., Benyumov A., Gilbertsen A., et al. 2020. Single-cell RNA sequencing reveals that lung mesenchymal progenitor cells in IPF exhibit pathological features early in their differentiation trajectory. *Sci. Rep.* 10:11162
4. Garrett S.M., Hsu E., Thomas J.M., Pilewski J.M., Feghali-Bostwick C. Insulin-like growth factor (IGF)-II- mediated fibrosis in pathogenic lung conditions. *PLoS One.* 2019;14(11):e0225422. Published 2019 Nov 25. doi:10.1371/journal.pone.0225422
5. Leksa V., Ilková A., Vičíková K., Stockinger H. Unravelling novel functions of the endosomal transporter mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor receptor (CD222) in health and disease: An emerging regulator of the immune system. *Immunol Lett.* 2017 Oct;190:194-200. doi: 10.1016/j.imlet.2017.08.011. Epub 2017 Aug 16. PMID: 28823520.
6. Ohradanova-Repic A., Machacek C., Donner C., et al. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor mediates plasminogen-induced efferocytosis. *J Leukoc Biol.* 2019;105(3):519-530. doi:10.1002/JLB.1AB0417-160RR

31. Multigénová analýza u pacientiek s prekancerózou a s karcinómom endometria.

Mgr. Dominik Kodada

(lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: Patrik Krumpolec², Nikola Janoštiaková¹, Gabriel Minárik², Vanda Repiská¹

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, ²Medirex Group Academy, Nitra

Úvod

Endometriálna hyperplázia je relatívne bežná gynekologická diagnóza, ktorá je definovaná ako zvýšenie pomeru endometriálnych žliazok ku stróme v porovnaní s normálnym proliferatívnym endometriom (1). Endometriálne polypy sú tiež častou diagnózou vyskytujúcou sa najmä u post-menopauzálnych žien (2). Hyperplázia aj polyp endometria sú častými príčinami abnormálneho maternicového krvácania a sú asociované s progresiou na endometriálny karcinóm (EC) (2 – 4). Medzi prekursorovými stavmi (hyperpláziou a polypmi) a EC ju popísaných množstvo rovnakých molekulárnych zmien (5 – 7). Časť prípadov EC má priamy súvis s dedičnými formami reprezentovanými najmä Lynchovým syndrómom a mutáciami v známych génoch kódujúcich mismatch opravné proteíny (8, 9). Ďalšou skupinou dedičných foriem asociovaných s rozvojom EC sú tie, ktoré majú primárne súvis s nádormi prsníka alebo vaječníkov (HBOC, hereditary breast and ovarian cancer). Konkrétne medzi najčastejšie mutované gény patria gény PTEN, čo je najfrekvencovanejší mutovaný gén v samotných nádoroch endometria a TP53, ktorého mutácie sú asociované so závažnými prípadmi s najhoršou prognózou pre pacientku (9, 10). Menej časté sú v prípade hereditárnych foriem mutácie v génoch POLE a POLD1, spôsobujúce Polymerase proofreading–associated syndrome (syndróm asociovaný s proofreading-ovou aktivitou polymeráz) (9, 11). Cieľom našej práce je identifikovať patogénne varianty vybraných génov a popísať frekvencie ich výskytu u slovenských pacientiek s klinicky diagnostikovanou endometriálnou prekancerózou (EP) a EC a to aj v kontexte stanovenia podielu ich hereditárnych foriem.

Materiál a metódy

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Bratislavského samosprávneho kraja (06196/2020/HF). Pacientky poskytli informovaný súhlas so zaradením do štúdie. V štúdiu boli zahrnuté vzorky od 205 žien s rôznymi typmi endometriálnej prekancerózy (EP vetva) a od 41 žien s klinicky diagnostikovaným karcinómom endometria (EC vetva). Ženám v EP vetve bola pre účely štúdie odobraná periférna krv, od žien v EC vetve boli po chirurgickom zákroku získané vzorky tkaniva maternice reprezentujúce zdravé a nádorové tkanivo. Vzorky tkanív boli stabilizované použitím roztoku DNA/RNA Shield (Zymo Research). Zo vzoriek periférnej krvi ako aj zo vzoriek tkaniva bola izolovaná DNA použitím kitu Qiagen Blood & Tissue Kit

(Qiagen) podľa príslušných originálnych protokolov od výrobcu. Izolovaná DNA bola enzymaticky štiepená s použitím dsDNA Shearase Plus (Zymo Research) tak, aby bola priemerná veľkosť fragmentov cca 350 bp, v zmysle protokolu od výrobcu a následne bola prečistená s použitím magnetických partikul AMPure XP Beads (Beckman Coulter). Naštiepená a prečistená DNA bola použitá na prípravu celogenómových knižníc použitím kitu TruSeq Nano Library Preparation Kit (Illumina) podľa protokolu od výrobcu. Pripravené celogenómové knižnice boli sekvenované na platforme NovaSeq X Plus (Illumina) s cieľom dosiahnuť pokrytie 30x. Sekundárna analýza prebehla na DRAGEN Bio-IT platforme (Illumina). Výstupné dáta v podobe získaných VCF súborov s detegovanými SNV/InDel variantmi boli anotované s využitím QIAGEN Clinical Insight (QCI) platformy od spoločnosti Qiagen (12). Ďalej boli filtrované s ohľadom na detekciu prítomných patogénnych a pravdepodobne patogénnych variantov v rozsahu panelu 415 génov s najvyššou frekvenciou výskytu ich mutácií pri karcinóme endometria. Tento panel bol zostavený na základe cbiportal z 8 štúdií realizovanými medzi rokmi 2013 – 2023 (13).

Výsledky

U pacientiek z EP vetvy sme germinálne mutácie identifikovali u 30,14 % prípadov. Viac ako polovica z nich (17,07 % EP vetvy) niesla mutácie vyhodnotené ako patogénne a 13,17 % EP vetvy ako pravdepodobne patogénne. Mutácie sme zaznamenali v 36 génoch, pričom najčastejšie mutovanými génmi v rámci EP vetvy boli CHEK2 (4,39 %), SOS1 (3,41 %), NBN (2,44 %) a SLX4 (1,95 %). Okrem nich sme u 2 pacientiek s endometriálnym polypom identifikovali germinálne mutácie v géne POLE a u 1 pacientky s hyperpláziou endometria mutáciu v géne MSH6, ktorý je asociovaný s Lynchovým syndrómom. Z 18 HBOC patogénnych variantov génov u EP pacientiek identifikovali mutácie v už spomenutom géne CHEK2 u 9 pacientiek, u 3 pacientiek v géne ATM a pre každý z génov (BRCA1, BRCA2, NF1, PALB2, RAD51C a RAD51D) sme zaznamenali mutáciu u 1 pacientky z EP vetvy (Tab1).

mutovaný gén	frekvencia (%)	kategória	hyperplázia endometria	polyp endometria	hyperplázia + polyp	metrorágia	nešpecifikované
CHEK2	4,39	HBOC	6	2			1
ATM	1,46		2			1	
BRCA1	0,49				1		
BRCA2	0,49			1			
NF1	0,49			1			
PALB2	0,49			1			
RAD51C	0,49		1				
RAD51D	0,49		1				
POLE	0,98	PPAS		2			
MSH6	0,49	LS	1				
MUTYH	0,49	MAP		1			

Tab.1: Patogénne varianty vo vybraných génoch u pacientiek z EP vetvy. Prává zvýraznená časť tabuľky uvádza počty pacientiek s daným prekanceróznym stavom. (HBOC= hereditary breast and ovarian cancer asociované, PPAS= Polymerase proofreading-associated syndrome asociované, LS= Lynch syndrome asociované, MAP= MUTYH-associated polyposis asociované)

Zo zdravých tkanív pacientiek z EC vetvy sme vyhodnocovali detekciu germinálnych patogénnych alebo pravdepodobne patogénnych variantov, pričom sme mutácie identifikovali spolu v 8 génoch – PMS2, CHEK2, PALB2, PTEN, ERCC2, NUP93, SLX4, WRAP53. Zo 41 pacientiek, 19,24 % nieslo aspoň 1 mutáciu vyhodnotenú ako patogénnu alebo pravdepodobne patogénnu. Najčastejšie mutovaným génom bol gén PMS2, ktorého patogénny variant sa vyskytoval u 2 pacientiek, ostatné varianty boli prítomné vždy len u 1 pacientky. Dedičné patogénne varianty HBOC génov boli identifikované u 7,32 % pacientiek z EC vetvy (Tab.2).

mutovaný gén	frekvencia (%)	kategória	IA	IB	II
CHEK2	2,44	HBOC		1	
PALB2	2,44				1
PTEN	2,44	HBOC, CS	1		
PMS2	4,88	LS		2	

Tab.2: Germinálne patogénne varianty vo vybraných génoch u pacientiek z EC vetvy. Pravá zvýraznená časť tabuľky uvádza počty pacientiek s daným štádiom EC. (HBOC= hereditary breast and ovarian cancer asociované, LS= Lynch syndrome asociované, CS= Cowden syndrome asociované)

V nádorových tkanivách pacientiek z EC vetvy sme identifikovali 63 rôznych mutovaných génov, pričom až 85,37 % nádorov nieslo aspoň 1 patogénnu alebo pravdepodobne patogénnu onkomutáciu. Z nich boli najfrekventovanejšie mutované gény PTEN (56,10 %), PIK3CA (31,70 %), ARID1A (19,51 %) a TP53 (12,20 %). Z ďalších klinicky významných mutácií boli v tkanivách identifikované onkomutácie v génoch CTNNB1 (4,88 %), POLE (4,88 %), PMS2 (4,88 %), MSH2 (2,44 %) a MSH6 (2,44 %).

Diskusia

Vývin prekanceróz endometria nie je spájaný so významnými molekulárnymi zmenami (14) a štúdie germinálnych mutácií pre EC jej venujú len malú pozornosť. Král a kol. (2023) identifikovali u 2 z 8 pacientiek s intraepiteliálnou neopláziou (typ hyperplázie u ktorej je najčastejšia progresia na EC, má zvýšené riziko výskytu pri Lynchovom syndróme) mutácie v géne BRCA1 a 1 pacientka bola zaradená do skupiny s Lynchovým syndrómom (9). V našej mnohonásobne väčšej kohorte (bez diskriminácie typu hyperplázie) sme však identifikovali patogénny variant génu asociovaného s týmto syndrómom len u 1 pacientky. V rámci EP vetvy sme identifikovali aj 2 patogénne varianty pre gén POLE. Pre tieto varianty sa uvádza predispozícia pre EC, no relatívne riziko je z dôvodu ich nízkej frekvencie náročné kvantifikovať (15). Z patogénnych variantov v HBOC génoch sa riziko vzniku EC zvyšuje 2-3-násobne pri germinálnych mutáciách v géne BRCA1, no tento údaj je náročné interpretovať kvôli možnému užívaniu tamoxifenu, rizikového faktoru pre vznik EC (15, 16). Z génov, ktoré sú asociované s Lynchovým syndrómom sme v EP vetve identifikovali iba 1 patogénny variant v géne MSH6 u pacientky s hyperpláziou endometria. Pri jeho germinálnych mutáciách dochádza u ~40 – 45 % pacientiek k vývinu EC počas života (15). Germinálne mutácie v géne POLE boli tiež preukázané za významné pri riziku vzniku EC (9), no z dôvodu nízkeho počtu prípadov nie je relatívne riziko vzniku EC pre germinálne mutácie spoľahlivo kvantifikovateľné (15). V našej

štúdií boli POLE mutácie prítomné u 2 pacientiek z EP vetvy. V rámci EP vetvy sme identifikovali aj germinálnu mutáciu v géne MUTYH. Ten síce nepatrí medzi HBOC gény, no u heterozygotných nositeľiek jeho mutácií je ~2 násobne vyššie riziko vývinu EC (17).

Kvôli pomerne nízkej početnosti pacientiek v EC vetve bol počet identifikovaných germinálnych patogénnych variantov veľmi nízky, no frekvencia mutácií v génoch asociovaných s Lynchovým syndrómom (v našom prípade génu PMS2) bola 4,88 %, čo je porovnateľné aj s niekoľkonásobne väčšími štúdiami (9, 18). Dedičné patogénne varianty HBOC génov sa v rovnakej vetve vyskytovali u 7,32 % pacientiek. Existujú štúdie, v ktorých boli takéto varianty frekventovanejšie ako patogénne varianty génov asociovaných s Lynchovým syndrómom (9, 19), no častejšie je pozorovaný opak (20 – 23). Väčšina pacientiek s dedičnými variantmi génov asociovaných s Lynchovým syndrómom má, rovnako ako je tomu v našej štúdií, nádory I. štádia (9).

Germinálne mutácie v géne PTEN môžu spôsobovať Cowdenov syndróm, no aj mimo neho sú medzi pacientkami EC považované za veľmi zriedkavé (na rozdiel od somatických mutácií v tomto géne) (15, 24, 25), ale riziko vývinu EC je u nositeľiek patogénnych variantov tohto génu vysoké (~ 25%) (15).

Poradie onkomutácií identifikovaných v nádorových tkanivách pacientiek z EC vetvy približne zodpovedá ich frekvenciám pri EC u europoidnej rasy, pričom medzi najčastejšie mutovanými sú tumor-supresorové gény (PTEN, ARID1A, PIK3R1, TP53, CTCF, KMT2C) a onkogény (PIK3CA, CTNNB1) (24). Na základe prítomnosti konkrétnych mutovaných génov je možné klasifikovať nádory podľa ich závažnosti s presahom na prognózu ochorenia. Vo všeobecnosti majú najlepšiu prognózu pacientky s nádormi s POLE mutáciami, stredne závažné sú nádory s mutáciami v PMS2, MSH2, MSH6 a CTNNB1 (10). V „multiple-classifier“ prípadoch sa ukázalo, že celková prognóza sa odvíja skôr podľa mutácie s nižšou závažnosťou (26). Z našej EC vetvy by teda málo závažnými boli nádory u 2 pacientiek s POLE mutáciami (hoci 1 z nich má mutovaný aj gén TP53), stredne závažnými by bolo 5 nádorov (hoci 2 z nich majú tiež mutovaný aj gén TP53) a 2 nádory s TP53 mutáciami by boli klasifikované ako závažné. Takéto hodnotenie je však zjednodušené, nakoľko nedisponujeme informáciami o globálnej úrovni mutovanosti nádoru, mikrosatelitovej instabilite ani úrovňou metylácie v oblastiach záujmu, ktoré je možné zahrnúť do presnejšej prognózy.

Podporené v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. Armstrong AJ, Hurd WW, Elguero S, Barker NM, Zanotti KM: Diagnosis and Management of Endometrial Hyperplasia. J Minim Invasive Gynecol 2012; 19(5): 562-571.
2. Balik G, Kagitci M, Ustuner I, Akpınar F, Guvendag Guven ES: Which endometrial pathologies need intraoperative frozen sections? Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(10):6121-6125.

3. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, Silverberg S, Lim PC, Burke JJ 2nd, Alberts D, Curtin J: Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 2006; 106(4): 812-819.
4. Semere LG, Ko E, Johnson NR, Vitonis AF, Phang LJ, Cramer DW, Mutter GL: Endometrial intraepithelial neoplasia: clinical correlates and outcomes. *Obstet Gynecol* 2011; 118(1): 21-28.
5. Owings RA, Quick CM: Endometrial intraepithelial neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(4): 484-491.
6. Lax SF, Mutter GL: Endometrial atypical hyperplasia/endometrioid intraepithelial neoplasia, V: WHO Classification of Tumours 5th Edition Female Genital Tumours. Kim K-R, Lax SF, Lazar AJ, Longacre TA, Malpica A, Matias-Guiu X, Nucci MR, Oliva E (editori), Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2020; 623, ISBN 978-92-832-4504-9 <https://publications.iarc.fr/592>.
7. Sahoo SS, Aguilar M, Xu Y, Lucas E, Miller V, Chen H, Zheng W, Cuevas IC, Li HD, Hitrys D, Wachsmann MB, Bishop JA, Cantarell B, Gagan J, Koduru P, SoRelle JA, Castrillon DH: Endometrial polyps are non-neoplastic but harbor epithelial mutations in endometrial cancer drivers at low allelic frequencies. *Mod Pathol*. 2022; 35(11):1702-1712
8. Daniels MS, Lu KH: Genetic predisposition in gynecologic cancers. *Semin Oncol* 2016; 43(5): 543-547.
9. Kral J, Jelinkova S, Zemankova P, Vocka M, Borecka M, Cerna L, Cerna M, Dostalek L, Duskova P, Foretova L, Havranek O, Horackova K, Hovhannisyan M, Chvojka S, Kalousova M, Kosarova M, Koudova M, Krutikova V, Machackova E, Nehasil P, Novotny J, Otahalova B, Puchmajerova A, Safarikova M, Slama J, Stranecky V, Subrt I, Tavandzis S, Zikan M, Zima T, Soukupova J, Kleiblova P, Kleibl Z, Janatova M: Germline multigene panel testing of patients with endometrial cancer. *Oncol Lett* 2023; 25(6): 216.
10. van den Heerik ASVM, Horeweg N, Nout RA, Lutgens LCHW, van der Steen-Banasik EM, Westerveld GH, van den Berg HA, Slot A, Koppe FLA, Kommoss S, Mens JWM, Nowee ME, Bijmolt S, Cibula D, Stam TC, Jurgenliemk-Schulz IM, Snyers A, Hamann M, Zwanenburg AG, Coen VLMA, Vandecasteele K, Gillham C, Chargari C, Verhoeven-Adema KW, Putter H, van den Hout WB, Wortman BG, Nijman HW, Bosse T, Creutzberg CL: PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2020; 30(12): 2002-2007.
11. Mur P, García-Mulero S, Del Valle J, Magraner-Pardo L, Vidal A, Pineda M, Cinnirella G, Martín-Ramos E, Pons T, López-Doriga A, Belhadj S, Feliubadaló L, Muñoz-Torres PM, Navarro M, Grau E, Darder E, Lloret G, Sanz J, Ramón Y Cajal T, Balmana J, Brunet J, Moreno V, Piulats JM, Matías-Guiu X, Sanz-Pamplona R, Aligué R, Capellá G, Lázaro C, Valle L: Role of POLE and POLD1 in familial cancer. *Genet Med* 2020; 22(12): 2089-2100.
12. <https://variants.ingenuity.com/qci/>
13. cBioPortal for Cancer Genomics (Endometrial Cancer (MSK, 2018), Endometrial Cancer (MSK, Cancer Discovery 2023), Endometrial Carcinoma (CPTAC, Cell 2020), Endometrial Carcinoma MSI (MSK, Clin Cancer Res 2022), Endometrial Carcinoma cfDNA (MSK, Clin Cancer Res 2022), Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, Firehose Legacy),

- Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, Nature 2013), Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas).
14. Singh G, Puckett Y: Endometrial Hyperplasia. Jul 17. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls 2023; Publishing; 2024 Jan.
 15. Dörk T, Hillemanns P, Tempfer C, Breu J, Fleisch MC: Genetic Susceptibility to Endometrial Cancer: Risk Factors and Clinical Management. *Cancers (Basel)* 2020; 12(9): 2407.
 16. Thompson D, Easton DF, Breast Cancer Linkage Consortium: Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(18): 1358-1365.
 17. Win AK, Reece JC, Dowty JG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, Southey MC, Young JP, Cleary SP, Kim H, Cotterchio M, Macrae FA, Tucker KM, Baron JA, Burnett T, Le Marchand L, Casey G, Haile RW, Newcomb PA, Thibodeau SN, Hopper JL, Gallinger S, Winship IM, Lindor NM, Jenkins MA: Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. *Int J Cancer* 2016; 139(7): 1557-1563.
 18. Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, Kunze KL, Golafshar M, Uson PLS Jr, Mountjoy L, Ertz-Archambault N, Patel N, Rodriguez EA, Lizaola-Mayo B, Lehrer M, Thorpe CS, Yu NY, Esplin ED, Nussbaum RL, Sharp RR, Azevedo C, Klint M, Hager M, Macklin-Mantia S, Bryce AH, Bekaii-Saab TS, Sekulic A, Stewart AK: Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. *JAMA Oncol* 2021; 7(2): 230-237.
 19. Long B, Lilyquist J, Weaver A, Hu C, Gnanaolivu R, Lee KY, Hart SN, Polley EC, Bakum-Gomez JN, Couch FJ, Dowdy SC: Cancer susceptibility gene mutations in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2019; 152(1): 20-25.
 20. Tian W, Bi R, Ren Y, He H, Shi S, Shan B, Yang W, Wang Q, Wang H: Screening for hereditary cancers in patients with endometrial cancer reveals a high frequency of germline mutations in cancer predisposition genes. *Int J Cancer* 2019; 145(5): 1290-1298.
 21. Heald B, Mokhtary S, Nielsen SM, Rojahn S, Yang S, Michalski ST, Esplin ED: Unexpected actionable genetic variants revealed by multigene panel testing of patients with uterine cancer. *Gynecol Oncol* 2022; 166(2): 344-350.
 22. Karpel HC, Chern JY, Smith J M, Smith A J, Pothuri B: Utility of germline multi-gene panel testing in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2022; 165(3): 546-551.
 23. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, Vaccari EM, Bissonnette J, Booker JK, Cremona ML, Gibellini F, Murphy PD, Pineda-Alvarez DE, Pollewick GD, Xu Z, Richard G, Bale S, Klein RT, Hruska KS, Chung WK: Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med* 2016; 18(8): 823-832.
 24. Weigelt B, Marra A, Selenica P, Rios-Doria E, Momeni-Boroujeni A, Berger MF, Arora K, Nemirovsky D, Iasonos A, Chakravarty D, Abu-Rustum NR, Da Cruz Paula A, Dessources K, Ellenson LH, Liu YL, Aghajanian C, Brown CL: Molecular Characterization of Endometrial Carcinomas in Black and White Patients Reveals Disparate Drivers with Therapeutic Implications. *Cancer Discov* 2023; 13(11): 2356-2369.
 25. Black D, Bogomolnii F, Robson ME, Offit K, Barakat RR, Boyd J: Evaluation of germline PTEN mutations in endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 2005; 96(1): 21-24.

26. León-Castillo A, Gilvazquez E, Nout R, Smit VT, McAlpine JN, McConechy M, Kommoss S, Brucker SY, Carlson JW, Epstein E, Rau TT, Soslow RA, Ganesan R, Matias-Guiu X, Oliva E, Harrison BT, Church DN, Gilks CB, Bosse T: Clinicopathological and molecular characterisation of 'multiple-classifier' endometrial carcinomas. *J Pathol* 2020; 250{3}: 312-322.

32. Identifikácia rizikových polymorfizmov v 5'URR oblasti génu HLAG u pacientov s Alzheimerovou chorobou

Mgr. Agáta Očenášová

(lekárska mikrobiológia a imunológia)

Spoluautori: Ivana Shawkatová¹, Juraj Javor¹, Zuzana Párnická¹, Gabriel Minárik², Klaudia Babišová², Patrik Krumpolec², Barbora Vašečková³, Iliana Királyová⁴, Iveta Mikolášková¹, Vladimíra Ďurmanová¹

Školiteľ: doc. RNDr. Vladimíra Ďurmanová, PhD.¹

¹ Imunologický ústav LF UK, Bratislava, ² Medirex Group Academy, Bratislava, ³ Psychiatrická klinika LF UK a UNB, Bratislava, ⁴ Centrum MEMORY, Bratislava

Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegeneratívna choroba mozgu, ktorú charakterizuje progresívny zánik kognitívnych a intelektových funkcií jedinca. Imunopatogenéza Alzheimerovej choroby nie je dostatočne objasnená, na jej rozvoji sa okrem nadmerného ukladania modifikovaných proteínov (tau proteín, beta amyloid) v mozgu zúčastňuje aj zápal (1). Molekula HLA-G patrí medzi neklasické HLA molekuly I. triedy a vyznačuje sa imunomodulačnými vlastnosťami. Molekula HLA-G je zodpovedná za inhibíciu imunitnej odpovede tým, že sa nadväzuje na receptory ILT2 (exprimovaný na monocytoch, B-Ly, T-Ly), ILT4 (exprimovaný na monocytoch a dendritických bunkách) a KIR2DL4 (exprimovaný na CD56+ NK). Expresia HLA-G je za fyziologických podmienok obmedzená najmä na fetálny cytotrofoblast, ďalej bola expresia HLA-G pozorovaná na epiteliálnych bunkách týmusu, na aktivovaných monocytoch, bunkách endotelu, ovárii, testes, matrice nechťov a rohovke (2). Nadmerná expresia HLA-G sa vyskytuje aj pri tumoroch, kedy imunosupresívna úloha tejto molekuly napomáha tumoru vyhnúť sa imunitnej odpovedi (3). Gén HLAG sa nachádza na chromozóme 6p22.1, pričom do marca 2024 bolo identifikovaných 158 alií, ktoré kódujú 48 rôznych HLA-G proteínov. Mnohé bodové mutácie spôsobujú substitúciu aminokyselín a možné následné zmeny v biologickej funkcii HLA-G, vrátane schopnosti modulovať funkcie imunitného systému, čím môže dochádzať ku asociácii s chorobami (4).

V promótorovej oblasti na 5' konci HLAG (5'URR- 5' upstream regulatory region) sa nachádza viac ako 29 polymorfizmov, z ktorých viaceré majú vplyv na expresiu génu (5). Medzi špecifické regulačné elementy v oblasti 5'URR patria elementy PRE (response element to progesterone, -52bp až -38bp), sekvencia HSE (heat-shock element, -464bp až -453bp), sekvencia ISRE (interferon-sensitive response element, -745bp až -754bp) a rôzne ďalšie regulačné elementy (6). Niektoré polymorfizmy zvyšujú expresiu HLA-G, napríklad polymorfizmus -725G/T/C (rs1233334) zvyšuje hladiny HLA-G v prípade, že sú prítomné alely -725G (7).

Cieľom štúdie bolo analyzovať vplyv polymorfizmov v promótorovej oblasti HLAG na riziko rozvoja Alzheimerovej choroby a jej vybrané klinické prejavy. Spomínaná asociácia nebola

doteraz skúmaná, aj keď množstvo štúdií potvrdzuje, že patologická hladina HLA-G ovplyvňuje fyziologické funkcie. Zvýšená/znížená hladina HLA-G môže byť výhodná v jednej fyziologickej funkcii, no v druhej je naopak nevýhodná. Naším predpokladom je, že znížená expresia HLA-G asociovaná s polymorfizmami v regulačných oblastiach HLAG má negatívny vplyv na rozvoj Alzheimerovej choroby.

Materiál a metódy

Vyšetrovaný súbor

Štúdia zahŕňala 181 pacientov s neskorým nástupom Alzheimerovej choroby (58 mužov a 123 žien, priemerný vek $79,67 \pm 5,76$ rokov) diagnostikovanej podľa kritérií NINCDS-ADRDA, v rôznych psychiatrických a neurologických ambulanciách po celom Slovensku. Priemerný vek pri nástupe choroby bol $77,39 \pm 6,21$ rokov. Kontrolná skupina pozostávala zo 108 jednotlivcov (45 mužov a 63 žien s priemerným vekom $71,59 \pm 6,19$ rokov) bez akejkoľvek osobnej alebo rodinnej anamnézy AD alebo iných psychiatrických porúch. Na zistenie kognitívnych schopností bol použitý MoCA test, pre zaradenie do kontrolnej skupiny sme vybrali tých jedincov, čo mali minimálne skóre 26 z 30, čo značí normálny kognitívny výkon. Alela ApoE $\epsilon 4$ ako známy genetický rizikový faktor pre AD bola skúmaná v oboch kohortách štúdie a zahrnutá ako stratifikačný faktor v ďalších analýzach. Všetci účastníci podpísali informovaný súhlas so zaradením do štúdie.

Genotypizácia

DNA obidvoch skupín bola izolovaná zo vzoriek venóznej krvi modifikovanou fenol-chloroformovou metódou (8). Genotypizáciu alely ApoE $\epsilon 4$ sme uskutočnili pomocou Sangerovho sekvenovania na základe určenia rs429358 (C/T) a rs7412 (T/C) vo štvrtom exóne (9). Oblasť génu HLAG 5'URR bola amplifikovaná F primerom 5'-CACGGAACTTAGGGC TACGG-3' a R primerom 5'-GCGTCTGGGAGAATGAGTCC-3', pričom sa vytvoril 828 bp amplikón (10). Následne bol amplikón purifikovaný pomocou ExoSap kitu, a analyzovaný použitým BigDye súpravou, taktiež Sangerovou metódou sekvenovania. Polymorfizmy sme vyhodnocovali v obidvoch prípadoch pomocou softvérovej aplikácie FinchTV.

Štatistická analýza

Na analýzu sme použili štatistický softvér InStat (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Hodnoty p , pomer šancí (OR) a 95% interval spoľahlivosti (CI) boli vypočítané v kodominantných, dominantných, recesívnych a nadmerne dominantných modeloch dedičnosti využitím štandardného chi-kvadrátového testu (univariantná analýza). Multivariantná logistická regresná analýza asociovaná s vekom, pohlavím a nosičstvom APOE $\epsilon 4$, ako možnými modifikujúcimi kovariantmi, bola hodnotená pomocou softvéru SNPstats, dostupného na <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>. Korelácie medzi HLAG 5'URR polymorfizmami a klinickými parametrami ako vek nástupu choroby a skóre kognitívneho testu MoCA boli rovnako hodnotené logistickou regresnou analýzou. Za štatisticky významnú hodnotu sme považovali $p < 0,05$.

Výsledky

Do štúdie bolo zahrnutých 181 pacientov s AD a 108 kontrolných jedincov. Medzi skupinou s AD a kontrolami nebol štatisticky významný rozdiel vo vzťahu k pohlaviu ($p=0,05$), pričom ženy mali vyššiu prevalenciu u pacientov s AD (67,95%) aj u kontrol (58,33%). Priemerný vek pri vyšetrení bol signifikantne vyšší v skupine s AD ako v kontrolnej skupine ($79,67 \pm 5,76$ vs $71,59 \pm 6,19$ rokov; $p<0,0001$), zatiaľ čo opačný trend bol pozorovaný pri skóre MoCA s nižšou hodnotou u pacientov s AD ($15,73 \pm 5,89$ vs $27,60 \pm 1,39$; $p<0,0001$). Priemerný vek pri nástupe choroby bol $77,39 \pm 6,21$ rokov. U pacientov s AD bol zistený signifikantne vyšší výskyt rizikovej alely APOE $\epsilon 4$ v porovnaní s kontrolami (39,44% vs 14,81%, $p<0,0001$), čím sme potvrdili rizikový účinok APOE $\epsilon 4$ v rozvoji AD v slovenskej populácii.

Pomocou univariantnej analýzy sme zistili signifikantne vyššie zastúpenie recesívnych HLAG genotypov haplobloku zloženého z piatich polymorfizmov (-762 C/T, -716 T/G, -689 A/G, -666 G/T, -633G/A) v skupine AD pacientov v porovnaní s kontrolami (30,94% vs 19,44%, OR=1,86, 95% CI=1,05-3,29, $p=0,03$) (tab. 1). Naopak, analýza HLAG polymorfizmu na pozícii -646 A/G nepreukázala žiadne signifikantné rozdiely medzi študovanými skupinami ($p>0,05$).

Tab. č. 1 Alelová a genotypová frekvencia regulačných polymorfizmov v HLAG 5'URR oblasti u AD pacientov a kontrol

SNP/ Model	Alela/ genotyp	AD (n=181)	Kontroly (n=108)	Univariantná analýza		Multivariatná analýza	
				P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)
Haploblok							
-762C/T, -716T/G, -689A/G, -666G/T, 633G/A							
-762C/T	C	170 (46,96%)	117 (54,17%)				
	T	192 (53,04%)	99 (45,83%)	0,11	1,34 (0,95-1,87)	-	-
kodominantný	CC	45 (24,86%)	30 (27,78%)		1,00		1,00
	CT	80 (44,20%)	57 (52,78%)	0,09	0,94 (0,53-1,66)	0,23	1,36 (0,65-2,85)
	TT	56 (30,94%)	21 (19,44%)		1,78 (0,90-3,52)		2,09 (0,89-4,90)
dominantný	CC	45 (24,86%)	30 (27,78%)		1,00		1,00
	CT+TT	136 (75,14%)	78 (72,22%)	0,59	1,16 (0,68-1,99)	0,19	1,58 (0,79-3,17)
recesívny	CC+CT	125 (69,06%)	87 (80,56%)		1,00		1,00
	TT	56 (30,94%)	21 (19,44%)	0,03	1,86 (1,05-3,29)	0,13	1,72 (0,84-3,51)
over-dominantný	CC+TT	101 (55,80%)	51 (47,22%)		1,00		1,00
	CT	80 (44,20%)	57 (52,78%)	0,16	0,71 (0,44-1,14)	0,86	0,95 (0,51-1,76)
-646A/G	A	358 (98,90%)	212 (98,15%)				
	G	4 (1,10%)	4 (1,85%)	0,71	0,59 (1,15-2,39)	-	-
kodominantný	AA	177 (97,79%)	104 (96,30%)		1,00		1,00
	AG	4 (2,21%)	4 (3,70%)	0,46	0,59 (0,14-2,40)	0,40	0,50 (0,10-2,46)
	GG	0 (0,00%)	0 (0,00%)				

n - počet; OR - pomer šancí; CI - interval spoľahlivosti; P - hodnota významnosti. Multivariantná analýza bola upravená pre pohlavie, vek, nosičstvo APOE $\epsilon 4$.

Analýza asociácie polymorfizmov HLAG 5'URR haplobloku s klinickými parametrami choroby ako vek nástupu AD a skóre kognitívneho testu MoCA nezistila žiadne signifikantné rozdiely (tab. 2).

Tab. č. 2 Asociácia HLAG 5'URR haplobloku s klinickými parametrami u AD pacientov

Parameter	-762C/C (n=45)	-762C/T (n=80)	-762T/T (n=56)	P/P * KM	P/P* DM	P/P* RM
Vek nástupu choroby, priemer ± SD (roky)	77,11±6,45	77,22±6,10	77,85±6,24	0,80/0,79	0,73/0,74	0,50/0,49
MoCA skóre, priemer ± SD	15,96±6,15	16,00±6,15	15,16±5,35	0,69/0,70	0,77/0,73	0,39/0,39

KM – kodominantný model, DM – dominantný model, RM – recesívny model, SD – smerodajná odchýlka, MoCA - Montreal Cognitive Assessment, $P < 0,05$ je štatisticky významná, *P – P hodnota v závislosti od pohlavia a nosičstva APOE ε4. Haploblok je tvorený z piatich polymorfizmov, t.j. -762 C/T, -716 T/G, -689 A/G, -666 G/T, -633G/A.

Diskusia

Molekula HLA-G je neklasická HLA molekula I. triedy, ktorá sa podieľa na regulácii imunitných procesov (2). Úloha HLA-G v imunopatogenéze Alzheimerovej choroby nebola doteraz v žiadnej štúdii skúmaná, no množstvo štúdií potvrdzuje, že nízka resp. vysoká hladina HLA-G ma vplyv na fyziologické funkcie. Znížená/zvýšená hladina HLA-G môže byť v jednej fyziologickej situácii výhodná, v druhej však nevýhodná. Zvýšená hladina HLA-G ovplyvnená polymorfizmami má protektívny účinok pri rozvoji autoimunitných a zápalových chorôb, naopak má negatívny účinok na rozvoj nádorov (11). Predpokladá sa, že zvýšená expresia HLA-G inhibuje zápalové procesy, ktoré sa podieľajú na progresii AD.

Úroveň exprese ovplyvňujú aj génové varianty (polymorfizmy) nachádzajúce sa v promótorovej 5'URR oblasti génu HLAG. Viaceré polymorfizmy sa nachádzajú v blízkosti regulačných elementov a majú negatívny, resp. pozitívny vplyv na expresiu génu (6). V našej štúdii sme porovnaním zastúpenia aliel a genotypov variantov 5'URR oblasti HLAG medzi súborom pacientov s AD a kontrolným súborom zistili, že haploblok v recesívnom genotype (-762TT, -716GG, -689GG, -666TT a -633 AA) je signifikantne častejší u pacientov s AD ako v kontrolnej skupine ($p=0,03$). Analýza asociácie genotypov z haplobloku HLAG s klinickými prejavmi choroby ako vek nástupu choroby a MoCA skóre nepreukázala žiadne signifikantné rozdiely. Niektoré štúdie zistili spojitosť -725G, -716T a -201G alely so zvýšenou expresiou promótoru HLAG, čo by mohlo viesť k modulácii zápalových procesov a inhibícii progresie AD (6, 7).

Predbežné výsledky analýzy haplobloku HLAG poukazujú na možnú asociáciu recesívnych genotypov (-762TT, -716GG, -689GG, -666TT a -633AA) s rizikom rozvoja Alzheimerovej choroby, a dominantných aliel (-762C, -716T, -689A, -666G a -633G) s neuroprotektívnym účinkom.

Zoznam použitej literatúry

1. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015;14(4):388-405.
2. Favier B, LeMaoult J, Carosella ED. Functions of HLA-G in the immune system. *Tissue Antigens.* 2007;69 Suppl 1:150-152.
3. Martín-Villa JM, Vaquero-Yuste C, Molina-Alejandre M, Juarez I, Suárez-Trujillo F, López-Nares A, et al. HLA-G: Too Much or Too Little? Role in Cancer and Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2022; 13:796054.
4. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):369-395.
5. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res.* 2014;2014:734068.
6. Dias FC, Bertol BC, Poras I, et al. The genetic diversity within the 1.4 kb HLA-G 5' upstream regulatory region moderately impacts on cellular microenvironment responses. *Sci Rep.* 2018;8(1):5652.
7. Ober C, Billstrand C, Kuldanek S, Tan Z. The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Human Reproduction* 2006;21(7):1743-1748
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 1215.
9. Durmanova V, Parnicka Z, Javor J, et al. A Novel Association of Polymorphism in the ITGA4 Gene Encoding the VLA-4 $\alpha 4$ Subunit with Increased Risk of Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:7623823
10. Catamo E, Addobbati C, Segat L, et al. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2015;85(6):458-465.
11. de Almeida BS, Muniz YCN, Prompt AH, Castelli EC, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Genetic association between HLA-G 14-bp polymorphism and diseases: A systematic review and meta-analysis. *Hum Immunol.* 2018;79(10):724-735.

33. Dynamika extracelulárnej DNA a deoxyribonukleázy po fyzickej aktivite

Mgr. Nikola Tóthová

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Kristína Macáková, Martina Tribulíková, Ema Illa, Barbora Vlková, Peter Celec

Školiteľ: doc. RNDr. Barbora Vlková, PhD.

Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Úvod

Pravidelná fyzická aktivita je vo všeobecnosti asociovaná s prevenciou kardiovaskulárnych chorôb, obezity, diabetu, či depresie (1). Benefičné účinky fyzickej aktivity na organizmus však závisia predovšetkým od jej intenzity a dĺžky trvania (2). Zatiaľ čo primeraná fyzická aktivita má pozitívny vplyv, intenzívna alebo dlhotrvajúca svalová práca pôsobí na organizmus ako záťaž. Výskum extracelulárnej DNA (ecDNA) má význam v mnohých biomedicínskych disciplínach, vrátane fyziológie cvičenia. Počas intenzívnej fyzickej aktivity sa totiž z buniek dostáva DNA do cirkulácie, a to procesom apoptózy, nekrózy alebo produkciou neutrofilových extracelulárnych pascí (3). V krvi zdravých jedincov cirkulujú fyziologicky nízke koncentrácie DNA. ecDNA je následne odstraňovaná hydrolytickým štiepením deoxyribonukleázou (DNázou), keďže ináč aktivuje imunitný systém ako tzv. signál nebezpečenstva podnecujúci sterilný zápal (4). Imunitné reakcie organizmu preto nemusia súvisieť iba s ochorením, ale aj s fyzickým preťažením. Za prevenciu patologického potenciálu ecDNA zodpovedá práve intaktná DNázová aktivita. Doposiaľ boli v súvislosti s fyzickou aktivitou popísané ako primárny zdroj uvoľnenia DNA do cirkulácie polymorfonukleárne neutrofilové (5). Neutrofilové sú totiž fyzickou námahou predominantne mobilizované do krvného riečiska ako kľúčové bunky vrodenej imunity (6). Iným známym zdrojom ecDNA sú mitochondrie svalových buniek, z ktorých sa môže uvoľniť DNA v dôsledku poškodenia svalov alebo nedostatočného zásobenia tkaniva kyslíkom počas intenzívnej fyzickej záťaže (7). Zmeny v koncentrácii ecDNA po fyzickom tréningu by preto mohli slúžiť ako marker svalového preťaženia. Regulácia koncentrácie ecDNA prostredníctvom aktivity DNázy po fyzickej aktivite zatiaľ nie je dostatočne známa. Cieľom tohto experimentu bolo popísať dynamiku ecDNA a DNázovej aktivity 30 minút po vykonaní fyzickej aktivity, a zároveň stanoviť koreláciu aktivity DNázy s intraindividuálnymi zmenami ecDNA, ako možného mechanizmu regulácie ecDNA po fyzickej aktivite.

Materiál a metódy

Tento štúdie sa zúčastnilo 18 zdravých dobrovoľníkov oboch pohlaví (10 žien a 8 mužov), ktorí podpísali informovaný súhlas s účasťou na výskume. Probandi najskôr vyplnili dotazník týkajúci sa ich telesného stavu, t.j. parametre ako sú výška, hmotnosť, chronické choroby, užívanie liekov a frekvencia vykonávania fyzickej aktivity. Fyzická aktivita bola v tejto štúdii reprezentovaná maximálnym šprintom 160 schodmi za čo najkratší čas, s 3 opakovaniami

a intervalom odpočinku 60 sekúnd. Pred samotným fyzickým testom a hneď po ňom boli účastníkom zaznamenané parametre vitálnych funkcií, akými sú telesná teplota, saturácia krvi kyslíkom, krvný tlak a srdcová frekvencia. Srdcová frekvencia bola meraná aj počas fyzickej aktivity pomocou smart hodínok. Vzorky venóznej krvi, odobraté probandom pred a 30 minút po fyzickej aktivite, boli spracované centrifugáciou pri 1600 x g, 4°C, 10 minút pre získanie séra a plazmy. Plazma bola následne centrifugovaná pri 16 000 x g, 4°C, 10 minút na analýzu extracelulárnej DNA.

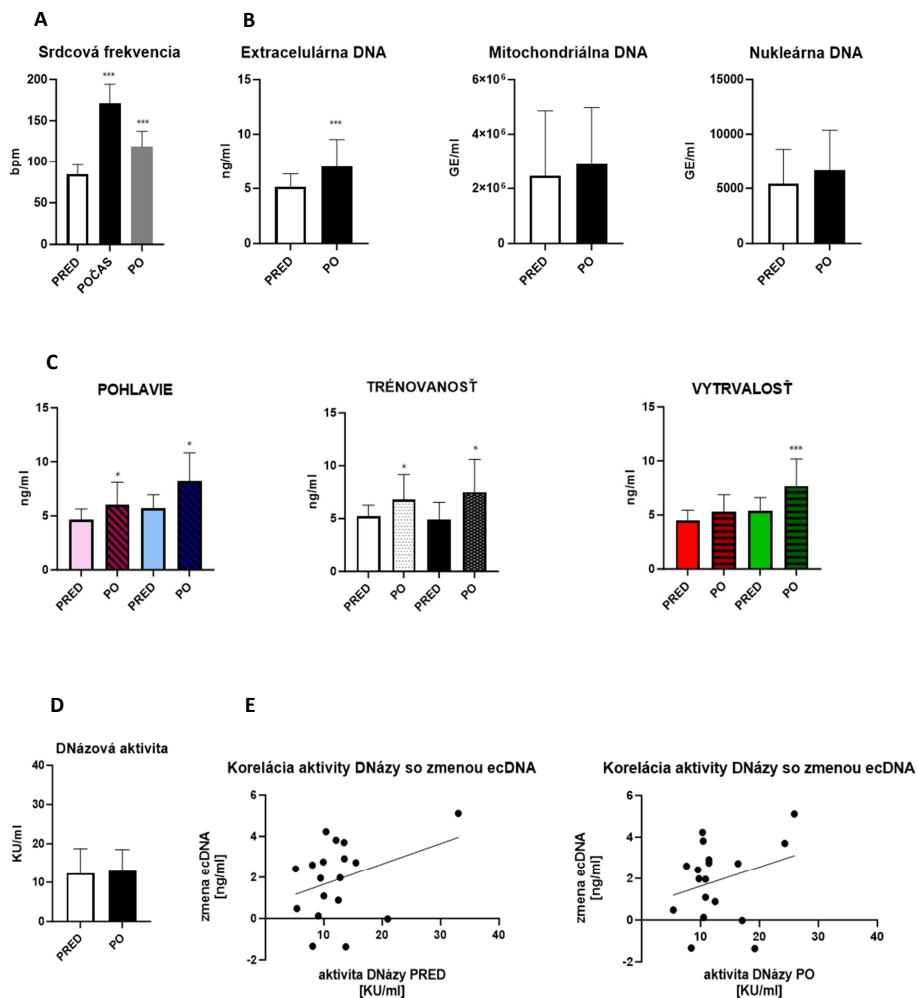
ecDNA bola izolovaná automaticky pomocou prístroja QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) na základe kolónkovej elúcie. Koncentrácia ecDNA v plazme probandov bola kvantifikovaná fluorometricky prostredníctvom Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Subcelulárny pôvod ecDNA (mitochondriálny a nukleárny) bol detegovaný metódou real-time PCR v termocykleri qTOWER3 G (Analytik Jena, Thuringia, Germany). Aktivita DNázy vo vzorkách séra bola stanovená v agarózovom géli so substrátom kuracej DNA radiálnou difúziou enzýmu. Štatistická analýza bola spracovaná a graficky znázornená použitím softvéru GraphPad Prism 10 (La Jolla, San Diego, CA, USA). Rozdiely pred a 30 minút po vykonaní fyzickej aktivity boli vyhodnotené párovým t-testom. Korelácie parametrov boli stanovené hodnotou Pearsonovho korelačného koeficientu (r). Za štatisticky významné sú považované hodnoty p menšie ako 0,05. Získané údaje sú uvedené ako priemer ± štandardná odchýlka.

Výsledky

Priemerná dĺžka trvania fyzického testu predstavovala 9 minút a 8 sekúnd u žien, u mužov zasa 7 minút a 38 sekúnd. 50% probandov ženského pohlavia nespĺnilo sériu 3 opakovaní maximálneho šprintu 160 schodmi, v dôsledku predčasného vyčerpania. Intenzita fyzickej záťaže bola potvrdená zvýšenou srdcovou frekvenciou, a to nad 180 bpm. Ostatné parametre vitálnych funkcií neboli výrazne ovplyvnené fyzickou aktivitou. Koncentrácia ecDNA v plazme probandov sa zvýšila 30 minút po vykonaní fyzickej aktivity o ~37% (p=0,0004). Navyše sme pozorovali, že kľúčovým faktorom vplyvajúcim na uvoľnenie DNA do cirkulácie je vytrvalosť pri intenzívnom cvičení. V subcelulárnom pôvode ecDNA, mitochondriálneho (mtDNA) a nukleárneho (ncDNA) charakteru, sme neidentifikovali žiadne významné rozdiely (mtDNA: p=0,19; ncDNA: p=0,07). Aktivita DNázy vo vzorkách séra nebola signifikantne zmenená 30 minút po fyzickej aktivite (p=0,58), a preto sme nepotvrdili koreláciu medzi DNázovou aktivitou a intraindividuálnymi zmenami v ecDNA v tomto časovom bode (r=0,28).

Parameter (jednotka)	Ženy (n = 10)	Muži (n = 8)
Vek (roky)	22 ± 5,1	20 ± 2,4
Výška (cm)	165 ± 2,4	177 ± 6,1
Hmotnosť (kg)	61,7 ± 8,9	72,9 ± 9,7
BMI (kg/m ²)	22,6 ± 2,6	23,2 ± 2,6
Trvanie fyzickej aktivity (min)	9:08	7:38

Tab.1: Parametre zúčastnených probandov. BMI – index telesnej hmotnosti



Obz.1: A – srdcová frekvencia zaznamenaná pred, počas a hneď po fyzickej aktivite; B – koncentrácia ecDNA a jej subcelulárneho pôvodu (mtDNA, ncDNA) pred a 30 min po fyzickej aktivite; C – faktory ovplyvňujúce uvoľnenie DNA do cirkulácie; D – DNázová aktivita stanovená pred a 30 min po fyzickej aktivite; E – korelácia DNázovej aktivity a intraindividuálnej zmeny ecDNA pred a 30 min po fyzickej aktivite

Diskusia

V tejto práci sme sledovali dynamiku koncentrácie ecDNA a DNázovej aktivity 30 minút po fyzickej aktivite. Fyzická záťaž pri vykonávaní nami zvoleného modelu fyzickej aktivity sa preukázala zvýšenou srdcovou frekvenciou, ako aj významným vzostupom koncentrácie ecDNA v plazme probandov, pravdepodobne v dôsledku rozpadu svalových buniek. Pri analýze subcelulárneho pôvodu ecDNA sme síce identifikovali narastajúci trend, avšak nedošlo k výraznému ovplyvneniu koncentrácie mtDNA ani ncDNA po fyzickej aktivite, ako bolo popísané v predchádzajúcich štúdiách (7,8). Možným vysvetlením tohto rozdielu je fragmentácia detegovanej ecDNA, kedy veľkosti fragmentov ecDNA zachytených fluorometricky nezodpovedali veľkosti úsekov mtDNA ani ncDNA amplifikovaných metódou real-time PCR. Fragmentácia cirkulujúcej DNA však závisí jednak od samotného procesu, akým je DNA uvoľnená do krvného obehu, ako aj od charakteru fyzickej aktivity. Zatiaľ čo kratšie fragmenty ecDNA sú asociované s intenzívnym silovým cvičením, prítomnosť dlhších fragmentov ecDNA reflektuje iba mierne poškodenie buniek vplyvom svalovej práce (9). Na základe charakteristík zúčastnených probandov, akými sú pohlavie, tréňovanosť a vytrvalosť sme potvrdili, že práve vytrvalosť, resp. intenzita fyzickej aktivity je kľúčová pre uvoľnenie DNA do cirkulácie (10). Čo sa týka dynamiky DNázovej aktivity, nezaznamenali sme štatisticky významný rozdiel medzi hodnotami bazálnej aktivity DNázy a hodnotami DNázovej aktivity 30 minút po fyzickej aktivite. Neidentifikovali sme tak ani významnú koreláciu medzi DNázovou aktivitou a intraindividuálnymi zmenami v extracelulárnej DNA, napriek našej hypotéze, že zvýšená DNázová aktivita bude regulovať množstvo ecDNA. Vzhľadom na získané výsledky je možným záverom nesprávne zvolený časový bod, a to 30 minút po vykonaní fyzickej aktivity, kedy za tento čas mohlo dôjsť k návratu DNázovej aktivity späť k pokojovým hodnotám, alebo tento časový bod nebol dostatočný na to, aby došlo k očakávaným zmenám. K objasneniu významu DNázy v regulácii extracelulárnej DNA po fyzickej aktivite sú preto potrebné ďalšie štúdie.

Zoznam použitej literatúry

1. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS: Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 174 (6), 2006, 801–809.
2. MacIntosh BR, Murias JM, Keir DA, Weir JM: What Is Moderate to Vigorous Exercise Intensity? *Frontiers in physiology*, 12, 2021, 682233.
3. Vittori LN, Tarozzi A, Latessa PM: Circulating Cell-Free DNA in Physical Activities. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 183–197.
4. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, et al.: Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Sep; 1075: 191-6.
5. Fridlich O, Peretz A, Fox-Fisher I, et al.: Elevated cfDNA after exercise is derived primarily from mature polymorphonuclear neutrophils, with a minor contribution of cardiomyocytes. *Cell Rep Med*. 2023;4(6):101074.
6. Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R: Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise*, 2015, 355–380.
7. Ohlsson L, Hall A, Lindahl H, et al.: Increased level of circulating cell-free mitochondrial DNA due to a single bout of strenuous physical exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2020;120(4):897-905.

8. Stawski R, Walczak K, Perdas E et al.: Decreased integrity of exercise-induced plasma cell free nuclear DNA – negative association with the increased oxidants production by circulating phagocytes. *Sci Rep* 9, 2019, 15970.
9. Tug S, Tross AK, Hegen P, et al. :Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184668.
10. Haller N, Tug S, Breitbach S, Jörgensen A, Simon P: Increases in Circulating Cell-Free DNA During Aerobic Running Depend on Intensity and Duration. *Int J Sports Physiol Perform*. 2017;12(4):455-462.

34. Flammer syndrome and glaucoma.

Iryna Korol

(medicine, 5. year)

Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University, Vinnitsya, Ukraine

Supervisor: prof. MD, PhD. Nataliia Malachkova

Guest lecture prof. Universita di Palermo, Palermo, Italy

Introduction

The term Flammer syndrome relates a phenotype, that combines the presence of primary vascular dysregulation together with a group of symptoms and signs, that can occur both in healthy and in people with different diseases. However, the blood vessels of patients with Flammer syndrome react differently to stimuli, such as cold, physical or emotional stress, which contribute the appearance or progression of a number of unfavorable states such as normal-tension glaucoma, retinal vein occlusion, migraine. Low arterial pressure, increased sensitivity to cold and increased level of vasoconstrictor endothelin-1 in blood circulation confirm the role of vascular dysregulation and endothelial dysfunction. And as a result it occurs an insufficient or unbalanced blood flow to optic nerve, that leads to hypoperfusion due to ischemia [1]. Unlike other types of endothelial dysfunction, Flammer syndrome can even protect person from some diseases such as arteriosclerosis, but it is one of the causes and symptom of illnesses, such as normal-tension glaucoma, retinal vein occlusion or even sudden hearing loss in patients without traditional risk factors [2]. The main symptoms are: cold extremities, low arterial pressure, headaches, lack of thirst, insomnia, tinnitus, skinny build of body, reversible blotches and hypersensitivity to cold, pain, drugs, smell. [3]

Methods

During the research 824 questionnaire from 14 regions of Ukraine was collected. They include 2 blocks of questions: the first block was filled by ophthalmologists, where they specified the age, sex, diagnosis of the patient, preliminary indications of glaucoma and current values, as well as the therapy currently taken by the patient and their personal opinion regarding further patient's therapy tactics.

In the second block, the questions were asked regarding the leading symptoms in Flammer syndrome. This questionnaire was filled out by the patients, where they indicated or noticed similar symptoms in themselves and the frequency of their detection.

Results

Among the patients, women dominated and accounted for 63% of all respondents. Taking into considerations diagnoses, we admit, that primary open angle glaucoma prevailed and was diagnosed in 544 patients (78,16%), slightly less, namely 88 (12,64%) of patients suffered from ocular hypertension, 35 (5,03%) respondents had optic neuropathy and in 29 (4,16%) was detected normal-tension glaucoma. Talking about the forecast, we detected, that the dynamics is not positive and the disease has a tendency to progress. Comparing previous and current indicators, it should be noted, that moderate, advanced and severe stages of glaucoma increased and the early stage remained in 42.74% of patients compared to 47.88% of previous data (Tab.1). Regarding the medical tactics, most physicians preferred carbonic anhydrase inhibitors (21,31%) and β blockers (19,97%). Due to glaucoma progression 58,83% of physicians consider it necessary to review and change treatment tactics. Statistics of the second block of questions that patients filled out regarding the leading symptoms of the Flammer syndrome showed that cold extremities often disturb 40,6% of patients and low arterial pressure often observe in themselves 32,68% of all respondents. Also during our survey it was found out that insomnia and difficulty falling asleep disturb 34,76% and headaches bother more than half of patients – 52%. Most respondents in 20-30 years considered themselves slim 54.47% and 7.73% were overweight. And regarding the reduction of drinking problems, only 28.16% noted them. Among all respondents, 21,3% probably have Flammer syndrome.

		Early	Moderate	Advanced	Severe
Previous		47,88%	45,00%	5,70%	1,36%
Current		42,74%	49,47%	6,13%	1,66%

Tab.1: Progression of glaucoma among respondents.

Discussion

Current treatments are of limited value and still not fully based on well-controlled studies. Studying the risks that are associated with the development of the disease can improve preventive measures, optimize the principles of diagnosis and treatment that are maximally adapted to patient and determine a long-term prognosis about future quality of life [1]. In case of glaucoma progression despite the level of intraocular pressure, it is proved that vascular factors have a leading pathogenetic role. One of these is a primary vascular dysregulation, a major component of Flammer syndrome. Medical sources describe several reasons why this syndrome can be a risk factor for glaucoma. Patients with Flammer syndrome are more likely to have impaired autoregulation mechanisms, arterial hypotension, high retinal venous pressure and astrocytes activation. Activated astrocytes partially lose contact with blood vessels and nerve axons, interfering normal oxygen transport. The consequences of this are, on the one hand, hypoxia in nerve cells, on the other hand - increased saturation of venous oxygen. Therefore, it can be expected that certain treatment tactics for Flamer syndrome will improve long-term prognosis of glaucoma. However, this still needs to be studied and confirmed in controlled studies [4]. Thoroughly analysis of the relevant symptoms

and signs stimulated the initiation of a number of scientific studies. In addition, studies may explain the possible association between normal-tension glaucoma and Flammer syndrome to prevent glaucomatous optic neuropathy [5].

References

1. Konieczka K, Ritch R, Traverso CE, Kim DM, Kook MS, Gallino A, Golubnitschaja O, Erb C, Reitsamer HA, Kida T, Kurysheva N, Yao K. Flammer syndrome. *EPMA J.* 2014 Jul 8;5(1):11.
2. Barthelmes J, Nägele MP, Ludovici V, Ruschitzka F, Sudano I, Flammer AJ. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease and Flammer syndrome-similarities and differences. *EPMA J.* 2017 Jun 6;8(2):99-109.
3. Golubnitschaja O, Flammer J. Individualised patient profile: clinical utility of Flammer syndrome phenotype and general lessons for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J.* 2018 Feb 22;9(1):15-20.
4. Konieczka K, Flammer J. Treatment of Glaucoma Patients with Flammer Syndrome. *J Clin Med.* 2021 Sep 17;10(18):4227.
5. Flammer J, Konieczka K, Bruno RM, Virdis A, Flammer AJ, Taddei S. The eye and the heart. *Eur Heart J.* 2013;34(17):1270-8. doi: 10.1093/eurheartj/ehd023, PMID 23401492.

Obsah

Lukáš Balogh	10
Anna Farkašová	18
Tetiana Pidlypska.....	23
Matúš Pukanec	30
Dorota Bartková	36
Linda Ilavská, MBA	41
Sylvia Kasanická, Sebastián Kern.....	50
Sebastián Stanko	56
MUDr. David Čmejrek.....	62
MUDr. Falat Jakub	69
Mgr. Claudia Feitscherová.....	76
MUDr. Ján Juhas	86
Mgr. Tomáš Strečanský	91
MUDr. Diana Ugorová	97
Iveta Mikolášková, MSc.....	104
Mgr. Michal Svoboda	113
Mgr. Aneta Ševčíková.....	122
MUDr. Minh Tuong Tran	129
Mgr. Natália Udovorková	136
Mgr. Eszter Zsemlye	145
Mgr. Letícia Hudecová.....	152
Mgr. Kristína Lichá.....	159
Mgr. Kristína Macáková.....	166
Mgr. Lucia Pastvová.....	172
Mgr. Petronela Sušienková	178
Mgr. Nadja Šupčíková.....	185
Mgr. Gabriela Bľandová.....	190
Mgr. Nikola Janoštiaková	197
Mgr. Michaela Kardohelyová	203
Mgr. Dominik Kodada.....	208
Mgr. Agáta Očenášová	215
Mgr. Nikola Tóthová.....	220
Iryna Korol	225

Zborník študentských vedeckých prác 2024
62. fakultná konferencia študentskej vedeckej odbornej činnosti
XIX. vedecká konferencia doktorandov LF UK

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2024
Za jazykovú korektúru (jazykovú a gramatickú stránku príspevku) zodpovedajú autori
Technická redakcia, návrh obálky: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.

Rozsah 230 strán, 13,9 AH, prvé vydanie
Vyšlo ako elektronická publikácia

