UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA



ZBORNÍK ŠTUDENTSKÝCH VEDECKÝCH PRÁC 2025

LEKÁRSKA FAKULTA
Univerzita Komenského
v Bratislave

ZBORNÍK ŠTUDENTSKÝCH VEDECKÝCH PRÁC
2025

63. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

A

XX. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK

2025

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 licencii a použití diela: https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Vydavateľ

Univerzita Komenského v Bratislave, 2025

LEKÁRSKA FAKULTA
Univerzita Komenského
v Bratislave

63. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
XX. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV

VYŽIADANÁ PREDNÁŠKA

prof. MUDr. Martin Repko, PhD.
Idiopatické deformity dětské páteře – translační výzkum a doktorandská činnost

POZVANÁ PREDNÁŠKA

RNDr. Jaroslava Babková, PhD.
Medhealth - zdravie medikov

VEDECKÉ PRÁCE ŠTUDENTOV

1. Porovnanie efektu intestinálnych infúznych terapií u pacientov v pokročilom štádiu Parkinsonovej choroby
Samuel Bílek
Školiteľ: doc. MUDr. Igor Straka, PhD.
II. neurologická klinika LF UK a UNB

2. Efekt fekálnej mikrobiálnej transplantácie u detského pacienta s rekurentnými akútnymi pyelonefritídami
Vladimír Harvan
Školiteľ: MUDr. Barbora Piteková, PhD.
Klinika pediatrickej urológie LF UK a Národný ústav detských chorôb

3. Vplyv omamných a psychotropných látok na vedenie motorového vozidla
Martina Fričová
Školitelia: RNDr. Žofia Nižnanská, PhD. , doc. MUDr. Roman Kuruc, PhD., Mgr. Ing. Ľuboš Nižnanský, PhD.
Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou

4. Účinok prírodných látok na dynamiku metabolizmu etylalkoholu
Ondrej Tomášik
Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB

5. Funkčná diagnostika žilovej hemodynamiky pri hĺbkovej žilovej trombóze
Dominik Melich
Školiteľ: doc. MUDr. Denisa Čelovská, PhD.
I. Interná klinika LF UK a UNB

6. Effectiveness of multimodal analgesia in postoperative pain management (abdominal surgery)
Abdulhamid Haydarov
Tutor: doc.MUDr. Roman Zahorec, CSc.
2nd Department of Anesthesiology and Intensive Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University

7. Remisia bez liečby - nový cieľ v manažmente pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou
Mária Lojová
Školiteľ: MUDr. Katarína Slezáková, PhD.
Klinika hematológie a transfuziológie LF UK a UNB

8. Vplyv stresu na akademickú úspešnosť študentstva na skúške z fyziológie
Tomáš Bezák
Školiteľ: RNDr. Jaroslava Babková, PhD.
Fyziologický ústav LF UK

9. Prítomnosť mikroplastov v ľudskej placente: Detekcia a lokalizácia pomocou Nile Red farbenia a fluorescenčnej mikroskopie
Martin Vrždiak
Školiteľ: MUDr. Miriam Bollová
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB

10. Vplyv quercetínu na poškodenie obličiek pri diabete mellitu druhého typu.
Marek Ujpál
Školitelia: Mgr. Barbora Kaločayová, PhD., doc. RNDr. Monika Barteková, PhD., prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD.
Centrum experimentálnej medicíny SAV v. v. i.

11. Stopy mikroplastov v nádoroch endometria.
Matej Kühnel
Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB

12. Post-mortem testovanie MTHFR C677T variantu u plodov s anencefáliou
Juraj Hutník
Školiteľ: MUDr. Lajos Gergely
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

13. Explorations at the interface of transmission electron microscopy and drosophila neuroscience: a comparative study of contrast agents in brain and muscle tissue
Bc. Steven Arthur Calle
Tutor: MUDr. Paulína Gálfiová, PhD.
Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University

14. Rapid diagnosis of uropathogens and their antimicrobial resistance by nanopore sequencing – a proof-of-concept report
Dominika Stoláriková
Tutor: doc. MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH
Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University

15. Asociácia genetických variantov s výskytom ochorenia Covid-19 u jedincov s diabetom
RNDr. Nikola Janoštiaková
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

16. Molekulové markery karcinómu endometria
Mgr. Dominik Kodada
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

17. Molekulárna signalizácia v endometriálnom karcinóme v kontexte jeho biologického správania sa
Mgr. Tereza Kuracinová
Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB

18. Mutačný status génu FGFR3 u pacientov s urotelovým nádorom močového mechúra – pilotné výsledky
Mgr. Lucia Neuschlová
Školiteľ: doc. MUDr. Stanislav Žiaran, PhD., MPH
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

19. Sledovanie asociácií medzi zmenami v črevnom mikrobióme a progresiou embryonálneho karcinómu testis in vivo
Mgr. Aneta Ševčíková
Školiteľ: doc. RNDr. Soňa Čierniková, PhD.
Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.

20. Výsledky liečby faricimabom u pacientov s diabetickým makulárnym edémom
MUDr. Alena Trtolová
Školiteľ: doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD.
Klinika oftalmológie FNsP Nitra

21. Comparison of inalays/onlays produced by conventional method and by the system CAD/CAM of different materials and their properties
MDDr. Alexandros Tzigeris
Tutor: prof. MUDr. Peter Stanko, PhD.
Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

22. Vysoká terapeutická účinnosť TRODELVY® v liečbe agresívneho metastatického choriokarcinómu
RNDr. Natália Udvorková
Školiteľ: Mgr. Lucia Kučerová, DrSc.
Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ

23. Analýza výskytu nežiaducich účinkov antikoagulancií u hospitalizovaných pacientov - rozdiely medzi pohlaviami
PharmDr. Orsolya Hrubá
Školiteľ: doc. PharmDr. Andrea Gažová, PhD.
Ústav farmakológie a klinickej farmakológie LF UK

24. Advancing anatomical models: a study on the efficiency and quality of modern 3D reconstruction technologies
Pendar Donyawie
Tutors: MUDr. Hisham El Falougy, PhD., Mgr. Tomáš Havránek, PhD.
Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University

25. Multilayered dissection of the facial nerve and temporal region: an enhanced anatomical approach for educational and clinical insight
Simon Michael Strünck
Tutors: MUDr. Hisham El Falougy, PhD., Mgr. Tomáš Havránek, PhD.
Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University

26. Anatomical preparation of a female pelvis for demonstration and educational purposes
Benjamin Mimler
Tutors: Mgr. Tomas Havranek, PhD., MUDr. Olia El Hassoun Sečanská , PhD.
Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University

27. Development and validation of a 3D printed simulation model for minimally invasive oesophageal atresia repair
Yelyzaveta Yatsyk
Tutor: MUDr. Petra Zahradníková, PhD., MPH
Department of Pediatric Surgery, Faculty of Medicine, Comenius University; National Institute of Children's Diseases

28. Úloha črevnej mikrobioty a fekálnej mikrobiálnej transplantácie v patogenéze reumatoidnej artritídy
Mgr. Paulína Belvončíková
Školiteľ: doc. RNDr. MUDr. Roman Gardlík, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

29. Porovnanie kvantitatívnej a digitálnej polymerázovej reťazovej reakcie pri analýze génovej expresie v placente
Mgr. Natália Andová
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

30. CD44 ako potenciálny marker pľúcnej fibrózy
Mgr. Michaela Kardohelyová
Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.
Imunologický ústav LF UK

31. Masívne paralelné sekvenovanie ako nástroj diagnostiky mitochondriálnych ochorení
RNDr. Gabriela Bľandová
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

32. Spánkové správanie a neuromorfológia mozgových štruktúr v animálnom modeli porúch autistického spektra
Mgr. Petronela Sušienková
Školiteľ: Mgr. Veronika Borbélyová, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

33. Selektívna úloha Toll-like Receptora 9 v kognitívnych funkciách
Mgr. Emma Skybová
Školiteľ: Mgr. Ľubica Janovičová, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

34. Efekt sacubitril/valsartanu na hladinu úzkosti podobného správania u spontánne hypertenzných potkanov
MUDr. Mária Szighardtová
Školiteľ: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.
Ústav patologickej fyziológie LF UK

35. Imunomodulačné účinky fyzickej aktivity v myšacom modeli bakteriálnej pneumónie
Mgr. Nikola Tóthová
Školiteľ: doc. RNDr. Barbora Vlková, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

36. Signalisation differences between sterile and infection inflammation
Mgr. Emil Bečka
Tutor: doc. Mgr. Michal Pastorek, PhD.
Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University

37. Vplyv deficiencie Toll-like receptoru 9 a pohlavia na prežívanie dospelých C57BL/6 myší s abdominálne vyvolanou polymikrobiálnou sepsou
Mgr. Filip Baran
Školiteľ: Mgr. Ľubica Janovičová, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

38. Chirurgická liečba gestačnej trofoblastovej neoplázie
MUDr. Liam McCullough
Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LF UK a UN Bratislava

39. Tehotenstvo v čase COVID-19: Čo nám ukázala slovenská národná štúdia?
MUDr. Adriána Goldbergerová
Školiteľ: prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB

40. Materská mortalita na Slovensku v rokoch 2007 – 2024
MUDr. Dominika Kotríková
Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB

41. Závažná materská morbidita po technikách asistovanej reprodukcie v Slovenskej republike v rokoch 2012- 2021
MUDr. Diana Štrbová
Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB

42. 10 rokov sledovania závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike. Posunuli sme sa niekam?
Jakub Daniš
Školiteľ: prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB

43. Porovnanie pôrodných poranení u pacientok po 41. týždni tehotenstva po spontánnom nástupe pôrodu a indukcii pôrodu.
MUDr. Simona Rusnáková
Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
Gynekologicko-pôrodnícke oddelenie Nemocnica Bory, Bratislava

44. Niektoré parametre neinvazívnej diagnostiky srdcového zlyhávania pri stenóze aortálnej chlopne
MUDr. David Čmejrek
Školiteľ: doc. MUDr. Martin Dúbrava, CSc.
Kardiocentrum SUSCH, Banská Bystrica

45. Eight-year survival analysis of patients with dilated cardiomyopathy: Does treatment era affect prognosis?
MUDr. Lukáš Kučera
Tutor: doc. MUDr. Eva Goncalvesová, CSc., FEFH, FHFA
Kardiologická klinika LFUK a NÚSCH

46. Hodnotenie vybraných parametrov kardiovaskulárneho rizika a ambulantného monitoringu tlaku krvi po transplantácii obličky
MUDr. Michaela Javorková
Školiteľ: doc. MUDr. Zuzana Žilinská, PhD., MPH, MHA
Klinika nefrológie a transplantácii obličiek LFUK a UNB

47. Vybrané neuropsychiatrické aspekty idiopatického normotenzného hydrocefalu: pilotná štúdia.
MUDr. Simona Holkovičová
Školiteľ: doc. MUDr. Igor Straka, PhD.
II. neurologická klinika LF UK a UNB

VEDECKÉ PRÁCE ŠTUDENTOV

1. Porovnanie efektu intestinálnych infúznych terapií u pacientov v pokročilom štádiu Parkinsonovej choroby

Samuel Bílek
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Spoluautor: MUDr. Zuzana André
Školiteľ: doc. MUDr. Igor Straka, PhD.
II. neurologická klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

Parkinsonova choroba (PCH) je progresívne multisystémové a multineurotransmiterové neurodegeneratívne ochorenie. Klinicky sa prejavuje kombináciou motorických a nemotorických symptómov. Základom liečby je dopamínergická terapia, ktorá síce účinne zmierňuje motorické prejavy, no nemotorické symptómy často pretrvávajú a negatívne ovplyvňujú kvalitu života pacientov (1).

V pokročilom štádiu vplyvom pulzatilnej dopamínergickej stimulácie a pokračujúcej neurodegenerácie dochádza k vzniku motorických a nemotorických fluktuácií - striedanie stavov ON a OFF (striedanie stavov dobrej a zlej hybnosti), ktoré sú spočiatku predvídateľné. Časom sa stávajú nepredvídateľnými, čo je spôsobné vplyvom nepravidelného vyprázdňovanie žalúdka, infekcie Helicobacter pylori a syndrómu bakteriálneho prerastania; a tiež sa do klinického obrazu pridávajú dyskinézy (mimovôľové pohyby). Vstrebávanie levodopy z tenkého čreva (jejunum) je navyše v kompetícii s bielkovinami o rovnaký transportér, čo komplikuje perorálnu liečbu, najmä u pacientov s polypragmáziou (1–3).

U pacientov s nedostatočnou kontrolou symptómov pri perorálnej terapii sú preto indikované tzv. pokročilé metódy – hlboká mozgová stimulácia alebo infúzne terapie.

Princípom intestinálne infúznych terapii je administrácia levodopy vo forme gélu priamo do jejuna pomocou PEG-J (perkutánna endoskopická gastrostómia s jejunálnou extenziou), čím sa obchádza žalúdok a znižuje variabilita absorpcie. Výsledkom je stabilnejšia plazmatická hladina liečiva a kontinuálna dopamínergická stimulácia. Na Slovensku je dostupná terapia levodopa/karbidopa intestinálnym gélom (LCIG) od roku 2009. Od roku 2022 je k dispozícii aj levodopa/entakapón/karbidopa intestinálny gél (LECIG)– novšia formulácia s pridaným entakapónom (inhibítor COMT), ktorá zvyšuje biologickú dostupnosť levodopy. To umožňuje nižšie dávky, menšiu pumpu a potenciálne nižšie riziko nežiaducich účinkov, najmä periférnej neurotoxicity (4,5).

Cieľom našej štúdie bolo porovnanie efektu liečby LCIG a LECIG na motorické, nemotorické funkcie a vybrané laboratórne parametre a porovnávať ich zmeny po 6 mesiacoch na liečbe.

Materiál a metódy

Do našej intervenčnej štúdie boli zaradení pacienti s PCH z Centra pre extrapyramídové ochorenia II. neurologickej kliniky LF UK a UNB indikovaných na intestinálne infúzne terapie. Pacienti v pokročilom štádiu PCH boli rozdelení do troch skupín:

1. na liečbe LCIG (skupina LCIG),
2. na liečbe LECIG (skupina LECIG),
3. na optimalizovanej perorálnej farmakoterapii (skupina OMT, z anglického *optimized medical treatment*).

Pacienti v skupinách LCIG a LECIG boli vyšetrení jeden deň pred zavedením PEG-J a zahájením infúznej liečby a po šiestich mesiacoch na liečbe. Pacienti v skupine OMT boli vyšetrení tiež po šiestich mesiacoch.

Pacienti podstúpili vyšetrovaciu batériu dotazníkov a škál:

1. na posúdenie kognitívnych funkcií *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA),
2. na posúdenie príznakov PCH – *MDS Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (MDS-UPDRS), časti I – nemotorické aspekty denného života, II – motorické stránky denného života, III – vyšetrenie motoriky, IV – motorické komplikácie,
3. na vyšetrenie nemotorických príznakov a nemotorických fluktuácií *MDS Non-Motor Rating Scale* (MDS-NMS),
4. na posúdenie wearing off symptómov *9-Item Wearing Off Questionnaire* (WOQ-9),
5. na posúdenie dyskinéz a ich funkčného dopadu *Unified Dyskinesia Rating Scale* (UDyaRS),
6. na posúdenie gastrointestinálnej dysfunkcie *Gastrointestinal Dysfunction Scale for Parkinson's Disease* (GIDS-PD),
7. na posúdenie autonómnych príznakov *Scales for Outcomes in Parkinson's Disease – Autonomic Dysfunction* (SCOPA-AUT),
8. na posúdenie kvality života *Parkinson's Disease Questionnaire* (PDQ-8).

Všetci pacienti pred zaradením do štúdie podpísali informovaní súhlas a štúdia bola schválená Etickou komisiou Nemocnice akad. L. Dérera.

Základné demografické a klinické parametre sme analyzovali pomocou deskriptívnej štatistiky. Na zistenie rozdielov medzi skupinami sme použili Kruskal-Wallisov test. Na zistenie efektu intervencie sme použili Mann-Whitneyho test.

Výsledky

Do intervenčnej štúdie bolo zaradených 42 pacientov (14 žien, 28 mužov). Pacienti v pokročilom štádiu PCH boli rozdelení do 3 skupín: pacienti liečení LCIG (N=15), pacienti liečení LECIG (N=17) a pacienti na OMT (N=10) – Tabuľka 1.

Tabuľka 1: Základná charakteristika súboru

	Celý súbor (N=42)	Skupina LCIG (N=15)	Skupina LECIG (N=17)	Kontrolná skupina (N=10)	Hodnota p
Ženské pohlavie	14 (33,3%)	3 (20,0%)	7 (41,2%)	4 (40,0%)	NS
Mužské pohlavie	28 (66,7%)	12 (80,0%)	10 (58,8%)	6 (60,0%)	NS
Vek	72,5 (10,5)	75,0 (73,7)	67,0 (68,7)	73,0 (71,7)	NS
Trvanie PCH	10,5 (6,0)	11,0 (10,9)	12,0 (10,4)	6,5 (7,2)	NS
Štádium HY	3,0 (3,0)	19,7 (4,5)	17,4 (3,6)	14,5 (3,5)	NS
LEDD	1477,5 (683,3)	1550,0 (734,5)	1324,5 (362,0)	1268,5 (420,0)	NS
MoCA	22,0 (7,0)	21,0 (7,0)	24,0 (7,3)	24,0 (4,8)	NS
MDS-UPDRS celkové skóre	72,0 (32,0)	89,5 (32,0)	72,0 (24,0)	69,0 (29,6)	NS
MDS-UPDRS I	12,0 (9,0)	15,5 (10,8)	12,0 (10,0)	11,0 (3,0)	NS
MDS-UPDRS II	15,0 (13,0)	20,0 (15,3)	14,0 (11,0)	9,0 (11,0)	NS
MDS-UPDRS III	38,0 (16,0)	42,0 (11,3)	38,0 (9,0)	35,0 (9,3)	NS
MDS-UPDRS IV	8,0 (4,0)	7,0 (3,8)	9,0 (4,0)	4,5 (1,8)	NS
MDS-NMS	86,0 (59,3)	122,0 (71,0)	70,0 (58,0)	76,0 (20,0)	0,044
NMF	*5,5 (13,5)*	*10,0 (16,0)*	*1,0 (10,0)*	*4,5 (3,2)*	*NS*
WOQ-9	3,5 (3)	4,0 (4,0)	3,0 (3,0)	3,5 (1,0)	NS
UDyaRS	11,0 (20,5)	8,0 (15,0)	19,0 (15,0)	0,0 (8,3)	NS
GIDS-PD	11,0 (6,8)	12,0 (14,5)	11,0 (8,0)	10,5 (1,8)	NS
SCOPA-AUT	13,0 (10,8)	14,0 (11,5)	13,0 (11,0)	12,0 (2,3)	NS
QUIP-RS	0 (3,8)	0,0 (3,0)	0,0 (7,0)	0,0 (0,0)	NS
PDQ-8	9,0 (7,0)	10,0 (4,5)	6,0 (7,0)	8,5 (5,5)	NS

Numerické premenné sú prezentované ako medián (interkvartilový rozptyl), kategorické premenné ako počet (%). HY – štádium podľa modifikovanej škály Hoehnovej a Yahra; LEDD – levodopová ekvivalentná denná dávka (mg). Štatisticky signifikantné hodnoty (p < 0,05) sú označené numericky, nesignifikantné hodnoty ako NS.

Štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými skupinami pred zahájením liečby neboli zistené v žiadnych klinických parametroch a ani sledovaných škálach, okrem nemotorických fluktuácií, ktorými boli výraznejšie postihnutí pacienti v skupine LCIG.

V skupine LCIG sme po 6 mesiacoch liečby zistili signifikantné zmiernenie motorických komplikácií (MDS-UPDRS IV, p=0,009) a dyskinéz (UDyaRS, p=0,021). Tiež sa zaznamenalo celkové zlepšenie nemotorických príznakov (MDS-NMS, p=0,032), najmä na zlepšenie

príznakov depresie (p=0,04), ortostatickej hypotenzie (p=0,036) a trendy zlepšenia impulzívnych porúch (p=0,073) a spánku (p=0,057). Z gastrointestinálnych príznakov sa zaznamenal trend zlepšenia dráždivosti (p=0,056).V skupine LECIG sme po 6 mesiacoch liečby zistili signifikantné zmiernenie motorických komplikácií (MDS-UPDRS IV, p=0,002), ako aj dyskinéz (UDyaRS, p=0,037) a bol zaznamenaný trend zmiernenia nemotorických fluktuácií (MDS-NMF, p=0,060). Celkové zmiernenie nemotorických príznakov sa u LECIG skupiny nezistilo, avšak pri detailnejšej analýze jednotlivých domén sme zistili zlepšenie prejavov ortostatickej hypotenzie (p=0,015), spánku (p=0,047) a bolesti (p=0,02). Z gastrointestinálnych príznakov sme zaznamenali zlepšenie prejavov z horného gastrointestinálneho traktu (p=0,044). V obidvoch skupinách sme zaznamenali signifikantné zlepšenie kvality života (p=0,036 vs. 0,028). V skupine OMT v žiadnom zo sledovaných parametrov neboli zistené signifikantné zmeny (Tabuľka 2).

Tabuľka 2 : Porovnanie medzi skupinami pacientov pred zahájením terapie a po 6 mesiacoch

		Baseline	Po 6 mesiacoch	Hodnota p
MoCA	LCIG	21,0 (7,0)	20,0 (6,0)	NS
	LECIG	24,0 (7,3)	24,0 (3,0)	NS
	OMT	24,0 (4,8)	26,5 (3,3)	NS
MDS-UPDRS	LCIG	89,5 (32,0)	72,5 (31,0)	NS
	LECIG	72,0 (24,0)	49,0 (13,0)	0,01
	OMT	48,5 (29,8)	39,0 (4,0)	NS
MDS-UPDRS I	*LCIG*	*15,5 (10,8)*	*12,5 (9,8)*	*NS*
	LECIG	*12,0 (10,0)*	*7,0 (7,0)*	*NS*
	OMT	*11,0 (3,0)*	*11,0 (6,0)*	*NS*
MDS-UPDRS II	*LCIG*	*20,0 (15,3)*	*13,0 (13,8)*	*NS*
	LECIG	*14,0 (11,0)*	*9,0 (6,0)*	*0,069*
	OMT	*9,0 (11,0)*	*5,0 (0,0)*	*NS*
MDS-UPDRS III	*LCIG*	*42,0 (11,3)*	*39,0 (15,0)*	*NS*
	LECIG	*38,0 (9,0)*	*28,0 (9,0)*	*NS*
	OMT	*21,0 (9,3)*	*18,5 (4,0)*	*NS*
MDS-UPDRS IV	*LCIG*	*7,0 (3,8)*	*3,5 (2,8)*	*0,009*
	LECIG	*9,0 (4,0)*	*4,0 (4,0)*	*0,002*
	OMT	*4,5 (1,8)*	*6,0 (0,0)*	*NS*
MDS-NMS	LCIG	122,0 (71,0)	78,0 (32,5)	0,032
	LECIG	70,0 (58,0)	53,0 (55,0)	NS
	OMT	76,0 (20,0)	51,0 (31,0)	NS
Depresia	*LCIG*	*10,0 (7,8)*	*2,0 (9,0)*	*0,04*
	LECIG	*2,0 (5,0)*	*2,0 (3,0)*	*NS*
	OMT	*1,5 (3,0)*	*1,0 (2,0)*	*NS*
Úzkosť	*LCIG*	*8,0 (7,5)*	*4,0 (3,0)*	*NS*
	LECIG	*4,0 (7,0)*	*2,0 (4,0)*	*NS*
	OMT	*3,5 (3,0)*	*2,0 (0,0)*	*NS*

Apatia	*LCIG*	*0,5 (4,3)*	*1,0 (2,0)*	*NS*
	LECIG	*0,0 (2,0)*	*0,0 (2,0)*	*NS*
	OMT	*1,0 (2,8)*	*2,0 (2,0)*	*NS*
Psychóza	*LCIG*	*0,0 (3,3)*	*0,0 (1,5)*	*NS*
	LECIG	*1,0 (2,0)*	*0,0 (0,0)*	*NS*
	OMT	*0,0 (1,5)*	*1,0 (2,0)*	*NS*
Kontrola impulzov a príbuzné poruchy	*LCIG*	*1,5 (3,8)*	*0,0 (0,0)*	*0,073*
	LECIG	*0,0 (2,0)*	*0,0 (1,0)*	*NS*
	OMT	*1,0 (0,8)*	*0,0 (1,0)*	*NS*
Kognitívne funkcie	*LCIG*	*10,5 (6,5)*	*6,0 (6,0)*	*NS*
	LECIG	*4,0 (5,0)*	*2,0 (3,0)*	*NS*
	OMT	*3,0 (9,8)*	*1,0 (4,0)*	*NS*
Ortostatická hypotenzia	*LCIG*	*5,0 (8,8)*	*0,0 (5,5)*	*0,036*
	LECIG	*3,0 (3,0)*	*0,0 (2,0)*	*0,014*
	OMT	*7,0 (3,5)*	*4,0 (3,0)*	*NS*
Močenie	*LCIG*	*5,0 (11,5)*	*5,0 (5,0)*	*NS*
	LECIG	*4,0 (11,0)*	*2,0 (4,0)*	*NS*
	OMT	*7,0 (13,0)*	*7,0 (8,0)*	*NS*
Sexualita	*LCIG*	*13,5 (5,0)*	*16,0 (5,5)*	*NS*
	LECIG	*6,0 (4,0)*	*12,0 (8,0)*	*NS*
	OMT	*2,0 (1,5)*	*6,0 (16,0)*	*NS*
Trávenie	*LCIG*	*11,0 (14,8)*	*3,0 (16,0)*	*NS*
	LECIG	*4,0 (5,0)*	*4,0 (5,0)*	*NS*
	OMT	*4,0 (2,3)*	*2,0 (3,0)*	*NS*
Spánok a bdenie	*LCIG*	*9,5 (12,8)*	*6,0 (5,0)*	*0,057*
	LECIG	*8,0 (10,0)*	*5,0 (4,0)*	*0,047*
	OMT	*12,0 (5,0)*	*6,0 (8,0)*	*NS*
Bolesť	*LCIG*	*12,0 (12,8)*	*6,0 (5,5)*	*0,097*
	LECIG	*8,0 (11,0)*	*4,0 (6,0)*	*0,02*
	OMT	*7,0 (4,0)*	*3,0 (2,0)*	*NS*
Iné	*LCIG*	*13,0 (11,8)*	*15,5 (17,0)*	*NS*
	LECIG	*15,0 (9,0)*	*12,0 (12,0)*	*NS*
	OMT	*14,0 (11,3)*	*8,0 (6,0)*	*NS*
MDS-NMF	*LCIG*	*10,0 (16,0)*	*0,0 (8,0)*	*NS*
	LECIG	*1,0 (10,0)*	*0,0 (6,0)*	*0,060*
	OMT	*4,5 (3,3)*	*6,0 (2,0)*	*NS*
GIDS-PD	LCIG	12,0 (14,5)	13,0 (14,0)	NS
	LECIG	11,0 (8,0)	6,0 (7,0)	NS
	OMT	10,5 (1,8)	6,0 (5,0)	NS
Zápcha	*LCIG*	*11,0 (13,5)*	*7 (9,5)*	*NS*
	LECIG	*5,0 (7,0)*	*3,0 (7,0)*	*NS*
	OMT	*3,0 (2,3)*	*4,0 (2,0)*	*NS*

Dráždivosť	*LCIG*	*2,0 (3,5)*	*1,0 (1,5)*	*0,056*
	LECIG	*2,0 (2,0)*	*0,0 (3,0)*	*NS*
	OMT	*2,0 (1,5)*	*1,0 (1,0)*	*NS*
Horný GIT	*LCIG*	*3,0 (2,0)*	*3,0 (4,5)*	*NS*
	LECIG	*2,0 (3,0)*	*0,0 (1,0)*	*0,044*
	OMT	*4,0 (2,3)*	*3,0 (2,0)*	*NS*
WOQ-9	LCIG	4,0 (4,0)	2,0 (2,5)	NS
	LECIG	3,0 (3,0)	3,0 (3,0)	NS
	OMT	3,5 (1,0)	4,0 (1,0)	NS
UDyaRS	LCIG	8,0 (15,0)	4,0 (8,5)	0,021
	LECIG	19,0 (15,0)	4,5 (11,0)	0,037
	OMT	0,0 (8,3)	17,0 (12,0)	NS
SCOPA-AUT	LCIG	14,0 (11,5)	12,0 (8,5)	NS
	LECIG	13,0 (11,0)	11,0 (9,0)	NS
	OMT	12,0 (2,3)	8,0 (7,0)	NS
PDQ-8	LCIG	10,0 (4,5)	6,0 (5,5)	0,036
	LECIG	6,0 (7,0)	3,5 (5,0)	0,028
	OMT	8,5 (5,5)	3,0 (0,0)	NS

Numerické premenné sú prezentované ako medián (IQR). Štatisticky signifikantné hodnoty (p < 0,05) sú označené numericky boldom, trendy v signifikancii (p < 0.1) sú označené numericky, nesignifikantné hodnoty ako NS.

Diskusia

Pokročilé štádium PCH je sprevádzané motorickými fluktuáciami a dyskinézami, ktoré sú dôsledkom vyčerpania endogénneho dopamínu, krátkeho polčasu levodopy a jej nepravidelnej absorpcie z gastrointestinálneho traktu. Intestinálne infúzne terapie zabezpečujú dodávku liečiva do jejuna a tým zabezpečujú kontinuálnu dopamínergickú stimuláciu a tým zabezpečujú u pacientov vyváženejší stav počas dňa (6).

Výsledky našej štúdie potvrdzujú, že intestinálne infúzne terapie – LCIG aj LECIG – významne redukujú motorické komplikácie u pacientov s pokročilou PCH. V oboch skupinách došlo k signifikantnému zníženiu skóre MDS-UPDRS IV (LCIG p = 0,009; LECIG p = 0,002) a k redukcii dyskinéz (LCIG p = 0,021; LECIG p = 0,037). Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami pri LCIG, ktoré ukazujú skrátenie OFF fáz a zlepšenie motorického stavu (7,8).

Pri LCIG sme pozorovali aj celkové zlepšenie nemotorických príznakov (MDS-NMS, p = 0,032), najmä v oblasti depresie (p = 0,04) a ortostatickej hypotenzie (p = 0,036), čo korešponduje s výsledkami viacerých štúdií (7,9). U pacientov liečených LECIG sa celkové skóre MDS-NMS síce signifikantne nezmenilo, no detailnejšia analýza ukázala zlepšenie v niektorých doménach – ortostatická hypotenzia (p = 0,014), bolesť (p = 0,02) a spánok (p = 0,047). Pri LECIG terapií ešte štúdie z reálnej klinickej praxe absentujú. Lepší efekt LECIG na niektoré prejavy môže súvisieť s lepšou biologickou dostupnosťou levodopy vďaka COMT inhibícii.

Približne jedna tretina pacientov v pokročilom štádiu PCH trpí ortostatickou hypotenziou, ktorá je asociovaná s pádmi a zvýšenou kardiovaskulárnou morbiditou a mortalitou. Práve

kontinuálna dopamínergická stimulácia má za následok zlepšovanie týchto prejavov a môže prispievať k redukcii pádov u týchto pacientov (10,11).

V oboch skupinách intestinálnej liečby došlo aj k signifikantnému zlepšeniu kvality života, čo podčiarkuje klinický prínos týchto terapií v každodennej praxi. V skupine s optimalizovanou perorálnou liečbou (OMT) neboli pozorované žiadne významné zmeny, čo zvýrazňuje limitácie štandardnej liečby v pokročilom štádiu PCH (12,13).

Zatiaľ čo LCIG je dlhodobo etablovanou a dobre preskúmanou terapiou, LECIG je relatívne novou možnosťou a zatiaľ chýbajú rozsiahle klinické štúdie, ktoré by jeho účinnosť a bezpečnosť komplexne porovnali s LCIG (14,15).

Výber vhodnej intestinálnej terapie by mal byť výsledkom dôsledného indikačného procesu, ktorý zohľadňuje klinický profil pacienta – najmä dominujúce symptómy (motorické, nemotorické), toleranciu liečby, kognitívny status a preferencie pacienta. Personalizovaný prístup je kľúčový pre maximalizáciu terapeutického efektu a kvality života pacientov s pokročilou PCH. Tieto dáta aktuálne naberajú na význame aj s príchodom nových subkutánnych foriem terapií (12).

Zoznam použitej literatúry

1. Stocchi F, Bravi D, Emmi A, Antonini A. Parkinson disease therapy: current strategies and future research priorities. Nat Rev Neurol. december 2024;20(12):695–707.
2. Dardiotis E, Tsouris Z, Mentis AFA, Siokas V, Michalopoulou A, Sokratous M, et al. H. pylori and Parkinson's disease: Meta-analyses including clinical severity. Clinical Neurology and Neurosurgery. december 2018;175:16–24.
3. Soliman H, Coffin B, Gourcerol G. Gastroparesis in Parkinson Disease: Pathophysiology, and Clinical Management. Brain Sciences. 23. jún 2021;11(7):831.
4. Wang L, Li J, Chen J. Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Neurol. 30. júl 2018;9:620.
5. Senek M, Nielsen EI, Nyholm D. Levodopa-entacapone-carbidopa intestinal gel in Parkinson's disease: A randomized crossover study: Levodopa-Entacapone-Carbidopa Intestinal Gel. Mov Disord. február 2017;32(2):283–6.
6. Chaudhuri KR, Rizos A, Sethi KD. Motor and nonmotor complications in Parkinson's disease: an argument for continuous drug delivery? J Neural Transm. september 2013;120(9):1305–20.
7. Fasano A, Gurevich T, Jech R, Kovács N, Svenningsson P, Szász J, et al. Concomitant Medication Usage with LEVODOPA-CARBIDOPA Intestinal Gel: Results from the COSMOS Study. Movement Disorders. august 2021;36(8):1853–62.
8. Nyholm D, Jost WH. Levodopa–entacapone–carbidopa intestinal gel infusion in advanced Parkinson's disease: real-world experience and practical guidance. Ther Adv Neurol Disord. január 2022;15:17562864221108018.
9. Ray Chaudhuri K, Antonini A, Robieson WZ, Sanchez-Soliño O, Bergmann L, Poewe W, et al. Burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease patients predicts improvement in quality of life during treatment with levodopa-carbidopa intestinal gel. Euro J of Neurology. apríl 2019;26(4):581.

10. Stanková S, Straka I, Košutzká Z, Valkovič P, Minár M. Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel Improves Symptoms of Orthostatic Hypotension in Patients with Parkinson's Disease—Prospective Pilot Interventional Study. JPM. 29. apríl 2022;12(5):718.
11. Galli S, De Carolis L, Bianchini E, Alborghetti M, Caliò B, Pacilio P, et al. Effects of levodopa/carbidopa intestinal gel infusion on autonomic symptoms in advanced Parkinson's disease: a systematic review. Clin Auton Res. december 2024; 10.1007/s10286-024-01090-9
12. Antonini A, Pahwa R, Odin P, Isaacson SH, Merola A, Wang L, et al. Comparative Effectiveness of Device-Aided Therapies on Quality of Life and Off-Time in Advanced Parkinson's Disease: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-analysis. CNS Drugs. december 2022;36(12):1269–83.
13. Constantin V, Szász J, Dulamea AO, Valkovic P, Kulisevsky J. Impact of Infusion Therapies on Quality of Life in Advanced Parkinson's Disease. NDT. september 2023;Volume 19:1959–72.
14. Chaudhuri KR, Antonini A, Pahwa R, Odin P, Titova N, Thakkar S, et al. Effects of Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel on Dyskinesia and Non-Motor Symptoms Including Sleep: Results from a Meta-Analysis with 24-Month Follow-Up. Journal of Parkinson's Disease. 12. júl 2022;12(7):2071–83.
15. Santos-García D, López-Manzanares L, Muro I, Lorenzo-Barreto P, Casas Peña E, García-Ramos R, et al. Effectiveness and safety of levodopa–entacapone–carbidopa infusion in Parkinson disease: A real-world data study. Euro J of Neurology. január 2025;32(1):e16535.

2. Efekt fekálnej mikrobiálnej transplantácie u detského pacienta s rekurentnými akútnymi pyelonefritídami

Vladimír Harvan

(všeobecné lekárstvo, 5.ročník)

Spoluautori: Ivan Hric[4], Eva Baranovičová[5] ,Jakub Gécz[1], Marcel Brenner[1], Vladimír Harvan[2], Peter Bartoň[2], Ján Breza[2], Andrea Černianska[6], Jakub Zieg[7], Paul J. Planet[8], Viktor Bielik[9]

Školiteľ: MUDr. Barbora Piteková, PhD.[1,2,3]

[1]Oddelenie urgentného príjmu, Národný ústav detských chorôb, Bratislava, Slovensko, [2]Klinika Pediatrickej urológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Národný ústav detských chorôb, Bratislava, Slovensko, [3]Klinika pre deti a dorast, Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Bratislava, Slovensko, [4]Biomedicínske centrum, Ústav klinického a translačného výskumu, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovensko, [5]Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko, [6]Katedra detskej nefrológie, Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave a Univerzitná nemocnica v Bratislave, Bratislava, Slovensko, [7]Pediatrická klinika 2. Lekárskej fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol, Praha, Česká republika, [8]Children´s Hospital of Philadelphia, Pennsylvania, USA, [9]Katedra biologických a lekárskych vied, Fakulta telesnej výchovy a športu, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

Úvod

Infekcie močového systému (IMC) patria medzi časté bakteriálne infekcie detského veku. Ako akútnu pyelonefritídu (APN) alebo febrilnú IMC (fIMC) označujeme zápal obličiek (1). Práve vrodené chyby uropoetického traktu sú významná príčina, ktorá vedie k rekurencii fIMC. Medzi časté vrodené príčiny patrí chlopňa zadnej uretry. Aktuálne štandardom v manažmente detských pacientov s rekurentnými fIMC je dlhodobé podávanie profylaktickej antibiotickej liečby, avšak ani tento prístup nedokáže zabrániť rekurencii fIMC.

Rekurentné fIMC predstavujú významnú terapeutickú výzvu, lebo môžu viesť k dlhodobým následkom, ako jazvenie obličiek a následný rozvoj chronickej renálnej insuficiencie. (2)

Ľudský mikrobióm predstavuje súhrn celkovej genetickej informácie mikroorganizmov, ktoré prirodzene osídľujú telo. Ľudské telo obsahuje rozličné mikrobiálne populácie v rôznych anatomických oblastiach. (3) Zloženie črevného mikrobiómu sa stabilizuje po 2.-3. roku života, kedy má rovnaké zloženie ako v dospelosti. Črevný mikrobióm zohráva úlohu v metabolizme, zabezpečuje funkciu intestinálnej bariéry a podieľa sa na udržiavaní homeostázy imunitného systému. Narušenie jeho fyziologickej kompozície zohráva úlohu v patogenéze rôznych gastrointestinálnych, autoimunitných, neuropsychiatrických a metabolických ochorení. (4) Do tejto skupiny patria aj IMC, ktoré sú rovnako asociované s črevnou dysbiózou. (5)

Princípom fekálnej mikrobiálnej transplatnácie je transfer stolice od zdravého darcu s cieľom optimalizovať u recipienta patologické zloženie mikrobiómu. Aktuálne sa v klinickej praxi začína používať stále častejšie. (4)

Prípadová štúdia

Pacientom je 10 ročný chlapec narodený s chlopňou zadnej uretry, u ktorého bola postnatálne diagnostikovaná bilaterálna hydroureteronefróza so signifikantne zvýšenými hladinami kreatinínu (257 mmol/l). V dôsledku progresie renálnej insuficiencie bola bilaterálne realizovaná punkčná nefrostómia. V druhom týždni života sa u pacienta rozvinul prvý atak fIMC. Po rezolúcii stavu bola iniciovaná antibiotická profylaxia. V septembri 2014 bola operatívne vykonaná disekcia chlopne zadnej uretry. V rokoch 2018-2022 podstúpil pacient kvôli rekurencii epizód fIMC viaceré formy chirurgickej derivácie moču – vezikostómia (2018-2021), cievkovanie pacientom (2021-2022), epicystostómia (2022-doteraz). Napriek tejto snahe sa nepodarilo zabrániť rekurencii epizód fIMC. Do dnešného dňa prekonal pacient 28 epizód fIMC, poslednú v novembri 2023. Každá epizóda sa klinicky manifestovala urosepsou a vyžadovala intravenózne podanie širokospektrálnych antibiotík v dôsledku multirezistentných uropatogénov.

Rekurencia fIMC viedla k jazveniu obličiek a progresívnej strate funkčného parenchýmu a rozvoju chronickej renálnej insuficiencie 3. štádia. DMSA vyšetrenie preukázalo hypofunkciu pravej obličky. Pravá oblička bola považovaná za primárny fokus rekurentných infekcií, preto bol pacient indikovaný na nefrektómiu v auguste 2023. Avšak pred realizáciou výkonu sme sa rozhodli u pacienta pre experimentálnu liečbu – podanie FMT.

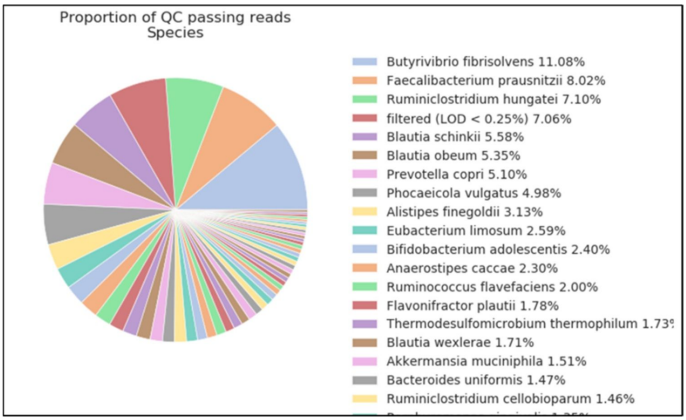
Materiál a metódy

FMT procedúra

Donorom FMT bol zdravý dospelý pacient, s presne definovaným optimálnym zložením črevného mikrobiómu zobrazenom na obrázku číslo 1. Prvý blok transplantácie prebehol 8/2023 v režime 1 dávka každé tri dni v celkovom množstve 3 dávok. V krátkosti po poslednej aplikácii sa u pacienta rozvinula ďalšia epizóda fIMC, ktorá vyžadovala podanie širokospektrálnej antibiotickej liečby. Retransplantácia FMT prebehla 9/2023 v skrátenom režime (1 dávka/deň, celkovo 3 dávky). Posledná, udržiavacia dávka bola aplikovaná 4/2024, pričom celkovo bolo podaných 7 dávok FMT.

Zber a analýza vzoriek

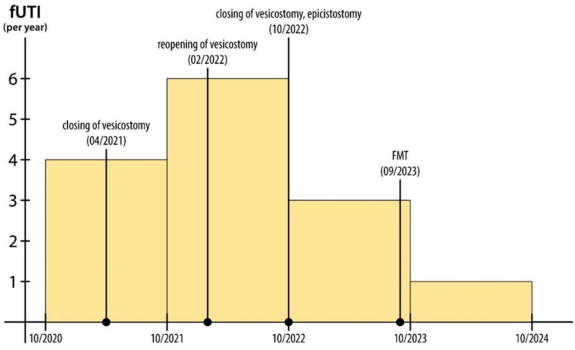
Pacientovi bola odobratá jedna vzorka stolice a moču pred administráciou FMT a po nej sa odoberala vzorka moču a stolice každý mesiac. Fekálna DNA bola purifikovaná pomocou súpravy ZymoBIOMICS DNA/RNA (Zymo Research, USA) podľa pokynov výrobcu. Sekvenovanie novej generácie (NGS) bolo pripravené pomocou 16S Microbiome NGS Assay (ViennaLab, Rakúsko). Taxonomické informácie na klasifikáciu sekvencií boli získané z databázy taxonómie NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/). Vo vzorkách stolice bolo analyzovaných 21 metabolitov, ktoré môžeme zaradiť do skupín– mastné kyseliny s krátkym reťazcom, aminokyseliny, jednoduché organické kyseliny, alkoholy.



Obr. 1 Profil darcovho mikrobiómu

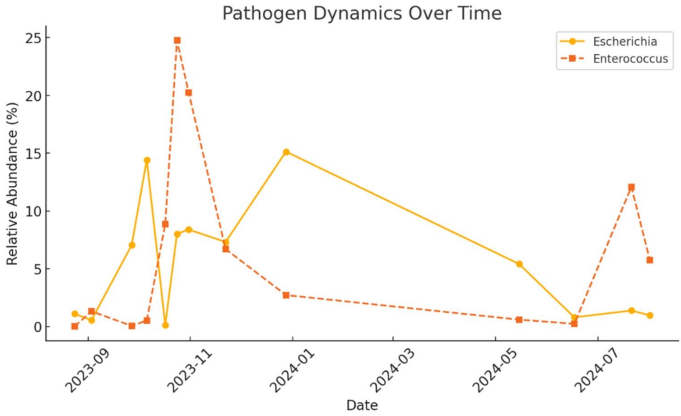
Výsledky

Posledná epizóda fIMC sa u pacienta rozvinula v novembri 2023. V predchádzajúcom roku prekonal 6 epizód. Pokles atakov fIMC po administrácii FMT možno sledovať na grafe č. 1. V dôsledku dobrého klinického stavu pacienta prišlo k rozhodnutiu pozastaviť antibiotickú profylaxiu. Pozastaveniu profylaxie predchádzalo podanie udržiavacej dávky FMT v apríli 2024. Následne od apríla 2024 po jún 2024 nedošlo napriek zastaveniu antibiotickej profylaxie k rozvinutiu novej epizódy fIMC. V júli 2024 bola antibiotická profylaxia obnovená pre psychologické dôvody. Do dnešného dňa je to 16 mesiacov, čo nedošlo k rozvoju nového ataku fIMC.



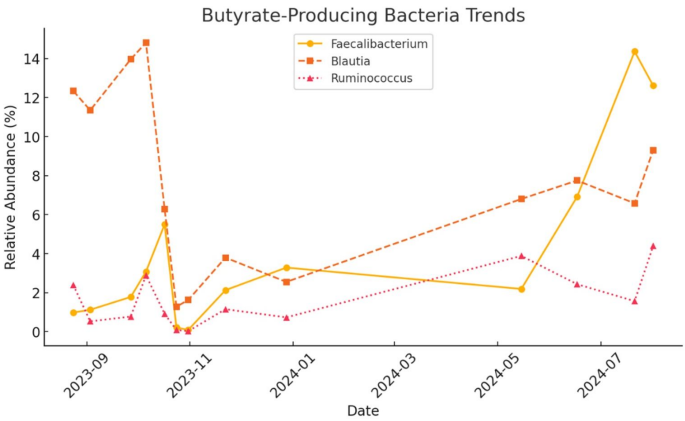
Obr.2 Počet epizód fIMC za rok v období október 2020 až október 2024 u prezentovaného pacienta

V rámci iniciálnej mikrobiálnej analýzy pred podaním FMT dominovali u pacienta patogénne rody *Escherichia* a *Enterococcus.* Po retransplantačnom cykle FMT v septembri 2023 relatívne zastúpenie *Escherichia coli (E. coli)* kleslo z pôvodných 16,97% na 9,87%. Pokles relatívneho zastúpenia *E. coli* vystriedal za krátku dobu jeho nárast na 14,02% pred 28. atakom fIMC v októbri 2023. Po stabilizácii FMT v máji 2024 nastal progresívny pokles celkového relatívneho zastúpenia patogénov z 27,31% v apríli 2024 na 15,62% v júni 2024. Na druhej strane spätné nasadenie antibiotickej profylaxie korelovalo so zvýšením relatívneho zastúpenia rodu *Enterococcus* v auguste 2024.



Obr.3 Relatívne zastúpenie druhu Escherichia a Enterococcus u prezentovaného pacienta počas 12 mesačného sledovania

V črevnom mikrobióme sú najvýznamnejšie a najprospešnejšie baktérie, ktoré produkujú butyrát. U nášho pacienta relatívne zastúpenie butyrát produkujúcich baktérií preukázal opačný trend ako patogénnych baktérií. Pred FMT predstavovalo kumulatívne relatívne zastúpenie butyrát produkujúcich baktérií 17,39%. Retransplantácia a rekurencia epizód fIMC viedla k ich rapídnemu poklesu s minimom 0,82% v októbri 2023. Po stabilizácii FMT a pozastavení antibiotickej profylaxie v máji 2024 nastal progresívny nárast ich relatívneho zastúpenia, od 9,46% v máji 2024, po vrchol 22,98% v auguste 2024. Zmeny v koncentrácii metabolitov – butyrát, acetát, propionát sledovali zmeny v zastúpení jednotlivých druhov baktérií. Počas vysadenia antibiotickej profylaxie sme zaznamenali najvyššie koncentrácie butyrátu. Pri ostatných metabolitoch – acetát a propionát sme sledovali podobný trend ako pri butyráte.



Obr. 4 Relatívne zastúpenie Butyrát produkujúcich baktérií

Diskusia

Rekurentné fIMC sú aj v súčasnosti klinickou výzvou, ktorá vedie k závažným následkom v podobe jazvenia obličiek a každoročne k množstvu hospitalizácii s nutnosťou podávania širokospektrálnej antibiotickej liečby. Predpokladáme, že črevný mikrobióm a fIMC spolu úzko súvisia, nakoľko uropatogény, ktoré spôsobujú fIMC majú pôvod v čreve. (6). U detských pacientov s fIMC je podobne ako u nášho pacienta pozorované vyššie zastúpenie *Enterobacteriae* vo vzorke stolice. (7) Medzi dlhodobé následky fIMC patrí jazvenie obličiek, postupný pokles obličkovej funkcie, hypertenzia a chronická renálna insuficiencia. (2) V súčasnosti je podľa medzinárodných odporúčaní hlavnou prevenciou rekurencie fIMC podávanie dlhodobej antibiotickej profylaxie. (8) Antibiotická profylaxia nedokáže preukázateľne zastaviť rekurenciu fIMC a navyše vedie k alternácii fyziologického zloženia mikrobiómu a selekcii multirezistentných uropatogénnych kmeňov. (9)

FMT predstavuje metódu, pomocou ktorej dochádza k transferu črevného mikrobiómu od zdravého darcu recipientovi. Cieľom je obnoviť fyziologické zloženie recipientovho mikrobiómu. V súčasnosti ide o schválenú liečbu na rekurentné infekcie *Clostridium difficile*. Využitie FMT sa ďalej v experimente rozširuje aj na iné ochorenia asociované s črevnou dysbiózou. Zmena mikrobiálnej kompozície vedie k narušeniu metabolických procesov a imunitnej odpovede, čo zohráva významnú úlohu v patogenéze ochorení, ako napríklad idiopatické črevné zápaly, ochorenia autistického spektra, metabolický syndróm.(4) Úloha FMT ako modality v terapii rekurentných fIMC nie je zatiaľ úplne jasná. Obzvlášť to platí pre pediatrickú populáciu, kde sú dáta zatiaľ limitované na jednu prípadovú štúdiu. V spomínanej publikácii bola FMT podaná pediatrickému pacientovi na liečbu rekurentných fIMC, ktoré spôsobovala multirezistentná *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Po FMT sa u pacientky vyskytli epizódy fIMC spôsobené *E. coli*, ktorá bola citlivá na bežne podávané antibiotiká, ktoré mohli byť podávané per os a nevyžadovali hospitalizáciu pacientky. Táto kazuistika dokumentuje, že manipulácia s črevnou mikrobiotou môže ovplyvniť priebeh opakovaných

fIMC. Priebeh opakovaných fIMC sa môže zmeniť v dôsledku kompetície medzi bakteriálnymi kmeňmi a zvýšenej rezistencie voči kolonizácii po zavedení darcovskej mikrobioty. (10,11)

Pacient v našej prípadovej štúdii trpel opakovanými fIMC – v roku 2022 prekonal až 6 epizód, čo viedlo k závažným komplikáciám, ako sú renálne jazvy, chronická renálna insuficiencia a infekcie spôsobené multirezistentnými uropatogénmi. Kvôli urosepse a potrebe širokospektrálnych intravenóznych antibiotík si každá epizóda fIMC vyžadovala minimálne dvojtýždňovú hospitalizáciu. Od podania FMT sa však pacientov klinický stav výrazne zlepšil a epizódy fIMC sa zastavili. Okrem významného zlepšenia kvality života, kedy už nebolo potrebné pacienta opakovane hospitalizovať, prevenciou nových atakov APN ochrániť hypofunkčnú obličku. Oddialilo sa tak poškodenie druhej obličky a rozvoj terminálneho štádia chronického zlyhania obličiek, ktoré by si vyžadovalo dialýzu.

Záver

Naša prípadová štúdia dokumentuje FMT ako sľubnú inovatívnu liečbu u detských pacientov s rekurentnými fIMC. Aktuálne sa na našom pracovisku realiazuje prospektívna intervenčná štúdia zameraná na využitie FMT v tejto indikácii.

Podporené grantom Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže APVV-22-0047 a VEGA 1/0313/25

Zoznam použitej literatúry

1. Harvan V, Konopásek P, Zieg J et al: Current management of pediatric patients with acute pyelonephritis in the Bratislava region. Česko-slovenská pediatrie 2025; *80*(1): 26–29.
2. Tullus K, Shaikh N: Urinary tract infections in children. The Lancet 2020; *395*(10237): 1659–1668.
3. Neugent ML, Hulyalkar NV, Nguyen VH, Zimmern PE, De Nisco NJ: Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. mBio 2020; 11(2).
4. Oliva-Hemker M, Kahn SA, Steinbach, et al: Fecal Microbiota Transplantation: Information for the Pediatrician. Pediatrics 2023; *152*(6).
5. Worby CJ, Schreiber HL, Straub TJ, et al: Longitudinal multi-omics analyses link gut microbiome dysbiosis with recurrent urinary tract infections in women. Nature Microbiology 2022; *7*(5), 630–639.
6. Thänert R, Reske KA, Hink T, et al: Comparative Genomics of Antibiotic-Resistant Uropathogens Implicates Three Routes for Recurrence of Urinary Tract Infections. mBio 2019; *10*(4).
7. Paalanne N, Husso A, Salo J, et al: Intestinal microbiome as a risk factor for urinary tract infections in children. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2018; *37*(10), 1881–1891.
8. Mattoo TK, Shaikh N, Nelson, CP: Contemporary Management of Urinary Tract Infection in Children. Pediatrics 2021; 147(2).

9. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ: Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology 2015; 13(5), 269–284.
10. Tariq R, Pardi DS, Tosh PK, Walker RC, Razonable RR, Khanna S: Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent Clostridium difficile Infection Reduces Recurrent Urinary Tract Infection Frequency. Clinical Infectious Diseases 2017; 65(10), 1745–1747.
11. Vendrik KEW, De Meij TGJ, Bökenkamp A, et al: Transmission of Antibiotic-Susceptible *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections in a Fecal Microbiota Transplantation Recipient: Consequences for Donor Screening? Open Forum Infectious Diseases 2022; 9(7).

3. Vplyv omamných a psychotropných látok na vedenie motorového vozidla

Martina Fričová
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Spoluautori: RNDr. Žofia Nižnanská, PhD[1]. , doc. MUDr. Roman Kuruc, PhD.[2], Mgr. Ing. Ľuboš Nižnanský, PhD[3].
Školiteľ: Mgr. Ing. Ľuboš Nižnanský, PhD.,[1] Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou[1], Ústav súdneho lekárstva LFUK v Bratislave[2]

Úvod

Vedenie motorového vozidla pod vplyvom omamných a psychotropných látok (OPL) výrazne zvyšuje riziko vzniku dopravnej nehody, nakoľko tieto látky môžu negatívne ovplyvniť psychomotorické, kognitívne, senzorické a ďalšie schopnosti vodiča. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že drogami navodené zhoršenie vyššie spomenutých schopností, vzrastá so zvyšujúcou sa koncentráciou drogy v krvi. Je však potrebné brať do úvahy výrazné rozdiely medzi jednotlivcami ako aj prítomnosť iných látok v organizme. [1] Meranie koncentrácie týchto látok u vodičov je na Slovensku zahrnuté do odboru Súdnolekárskej toxikológie. ČO však na Slovensku nie je, je že v zahraničí je Súdnolekárska toxikológia (niekedy označovaná ako forénzná toxikológia) rozdelená na viacero pod odborov a jedným z nich je aj tzv. „humans performance toxicology" – toxikológia ,,ľudského výkonu,,. Skúma a hodnotí účinky drog a alkoholu na ľudský výkon s právnymi dôsledkami ich užívania. Najčastejšie využívanou vzorkou na kvantifikáciu drogy/alkoholu a zistenie vzťahu medzi koncentráciou a vplyvom pri ovládaní motorového vozidla je krv. Krv obmýva všetky orgány a preto sa predpokladá, že čo sa nachádza v krvi, je aj v príslušnom orgáne, kde sa nachádzajú receptory pre konkrétnudrogu/alkohol. Alternatívnymi vzorkami môžu byť moč, sliny, pot a vlasy. V uvedených biologických materiáloch je možné detegovať ich prítomnosť v rozmedzí niekoľkých hodín (krv, sliny), dní (moč) alebo až mesiacov (vlasy). [2] Epidemiologické štúdie preukázali, že spomedzi jednotlivých látok predstavujú amfetamíny po alkohole druhé najvyššie riziko účasti na dopravných nehodách. [3]. Amfetamíny patria do skupiny pôsobiacich látok na centrálny nervový systém. Potláčajú pocit únavy, zvyšujú bdelosť, energiu a posilňujú sebavedomie, čím zvyšujú pravdepodobnosť podstupovania rizík. [4]. Viacerý výskumníci dospeli k záveru, že MDMA, MAMP, AMP, COC môžu zlepšiť výkon v určitých aspektoch jazdy s motorovým vozidlom, ako je napr. sledovanie cesty, ale môžu spôsobiť zhoršenie v iných aspektoch, ako je presnosť a prispôsobenie rýchlosti počas jazdy. V rámci behaviorálnych prejavov je prítomná zrýchlená a zmätená reč, agitácia, paranoja, prípadne agresívne správanie. Medzi abstinenčné príznaky patria depresia, únava a hypersomnolencia. Všetky tieto faktory predstavujú kľúčové determinanty, ktoré s vysokou pravdepodobnosťou prispievajú k mnohým nehodám. Frekventované je kombinované užívanie látok amfetamínového typu a marihuany. [5] Marihuana je psychoaktívna látka patriaca do skupiny kanabinoidov. THC (delta-9-tetrahydrocannabinol) je základnou psychoaktívnou zložkou nachádzajúcou sa v kanabise. Vo vysokých dávkach pôsobí halucinogénne. Má schopnosť

navodiť poruchy krátkodobej pamäte a vnímania plynutia času. Vo väčšine prípadov je dôvodom poklesu výkonnosti práve strata motivácie a neschopnosť sústrediť sa na vykonávané činnosti. Užívateľ sa stáva ľahko rozptýliteľným [2]. Amfetamín, metamfetamín a THC sú zaradené do zoznamu omamných a psychotropných látok v Prílohe č. 1 k zákonu č. 139/1998.

Existujú 3 metódy, ktoré sú využívané na zistenie vplyvu omamných a psychotropných látok na vedenie motorového vozidla u vodičov. Ide o experimentálne, epidemiologické a ,,real-case,, štúdie [3]. My sme si v našej práci zvolili poslednú menovanú metódu. Podľa nášho vedomia, ide o vôbec prvú takúto štúdiu, ktorá bola realizovaná na Slovensku. Naším cieľom bolo nadobudnúť prehľad o výskyte konkrétnych zakázaných látok u vodičov, ktorí vedú motorové vozidlo pod ich vplyvom a takto predstavujú obrovské riziko pre ostatných účastníkov cestnej premávky. Ďalej, ktoré látky sú najčastejšie zneužívané a navrhnúť spôsob ako vôbec znížiť prítomnosť týchto vodičov v cestnej premávke.

Materiál a metódy

V tejto práci sme sa zamerali iba na prípady vodičov, ktorí javili známky ovplyvnenia omamnými a psychotropnými látkami (OPL) na základe pozorovaných prejavov orgánmi činnými v trestnom konaní (OČTK), t. j. políciou. Tá po zastavení vozidla vykonala orientačný skríningový test zo slín (prístrojom Dräger DrugCheck 3000) na dôkaz OPL. V prípade pozitívneho výsledku bol alebo nebol v nemocnici vykonaný predbežný skríningový test zo vzorky krvi alebo moču. Ošetrujúci lekár zhodnotil alebo nezhodnotil, či vodič javí známky užitia látok. Po zrealizovaní odberov bol biologický materiál zaslaný na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu do Laboratória toxikologicko-chemickej analýzy v Bratislave. Vo všetkých prípadoch boli vzorky zmerané validovanou metódou plynovej chromatografie s hmotnostnospektrometrickým detektorom (GCMS). Validačnými parametrami bola minimálne 6 bodová kalibračná krivka lineárna v celom rozsahu zisťovaných koncentrácii, výťažnosti analytov z krvi/séra, limit kvantifikácie a limit detekcie. Na validáciu boli použité komerčné štandardy amfetamínu, metamfetamínu, THC a jeho metabolitu THC COOH. Základnými štatistickými metódami pomocou programu excel sme vyhodnotili zozbierané dáta.

Výsledky

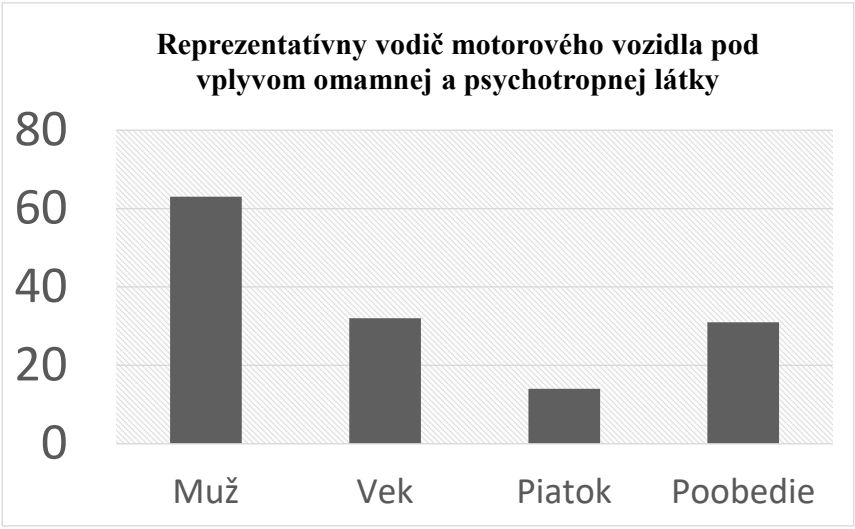
V roku 2024 bolo analyzovaných 843 vzoriek krvi vodičov na skríning omamných a psychotropných látok. Je nutné uviesť, že niektoré vzorky ostali nekvantifikované v dôsledku viacerých skutočností. V niektorých prípadoch bolo požadované iba vykonanie konfirmácie formou kvalitatívnej analýzy z ktorej nie je možné zhodnotiť ovplyvnenie alebo bzorky boli po skríningu odovzdané polícií bez ďalšej analýzy. Vyše 80 vzoriek účastníkov cestnej premávky bolo pozitívnych prevažne na pervitín-metamfetamín (MAMP) a jeho metabolit amfetamín AMP a delta-9 tetrahydrokanabinol (THC) alebo jeho neaktívny metabolit 11-nor-9-karboxy-delta-9-tetrahydrokanabinol (THC COOH-neovplyvňuje vodiča).

Na mieste skutku, t.j. v cestnej premávke hliadka policajného zboru PZ zastavila a následne kontrolovala vodičov motorových vozidiel, nakoľko javili známky užitia omamných a psychotropných látok. Po spracovaní komplexného súboru dát sme si všimli nasledovné opakujúce sa javy. Najčastejšie išlo o podozrivé presúvanie medzi jazdnými pruhmi,

oneskorené zapínanie smerových svetiel, jazda bez evidenčného čísla vozidla, cúvanie na križovatke, jazdu neustálenou, vysokou rýchlosťou alebo podozrivo pomalou jazdou. Často sledovaným javom bol nevyhovujúci technický stav vozidla. V piatich prípadoch boli vodiči účastníkmi dopravnej nehode. Štyria vodiči viedli motorové vozidlo aj napriek skutočnosti, že nie sú držiteľmi vodičského oprávnenia, nakoľko majú uložený zákaz činnosti viesť motorové vozidlo. V jednom prípade išlo o zastavenie vodiča hliadkou policajného zboru v dôsledku vzniknutého podozreniu na vykradnutie predajne. Jedna skupina vodičov bola zastavená v dôsledku podozrivej jazdy. Hliadky PZ majú rôzne možnosti a vlastné spôsoby pozorovania vodičov, respektíve jeho správania sa, ktoré považujeme za účinne, z ktorých sme zosumarizovali nasledovné. Pozorované boli telesné a psychické prejavy ako nekoordinované a prudké pohyby, atypické pohybové stereotýpie, spomalené reflexy, nesúvislá reč, zhoršená artikulácia, mydriáza, sklenené pohľady, ľahostajnosť a agitovanosť. Niektorý vodiči sa aj sami priznali k užitiu látky na otázku či užili pred jazdou omamné a psychotropné látky (7 prípadov. Čas a typ látky bol bližšie špecifikovaný piatimi vodičmi. Hliadka PZ na mieste skutku vykonala slinný skríningový test na dôkaz prítomnosti omamných a psychotropných látok s pozitívnym výsledkom v 19 prípadoch. Časový interval, ktorý ubehol od momentu skutku po odber biologického materiálu bol v priemere 2 hodiny. Najdlhší interval trval 6,5 hodiny a najkratší 15 minút. Pozitívnych vzoriek moču na dôkaz omamných a psychotropných látok odobratých a vyšetrovaných v nemocnici bolo 28. Príznaky požitia omamných a psychotropných látok boli na žiadanke na toxikologické vyšetrenie zaznamenané ošetrujúcim lekárom iba v 25 prípadoch. Šestnásťkrát boli označené formou „javí známky užitia“ a v deväťkrát ako „nejaví“. Vo všetkých negatívne označených poliach bola kvantitatívnou metódou preukázaná ich prítomnosť.

Z celkového počtu vzoriek krvi bola dokázaná prítomnosť látok amfetamínového typu v 50 prípadoch. Priemerná koncentrácia amfetamínu (AMP) v krvi bola 57 ng/ml, medián bol 35 ng/ml. Najvyššia koncentrácia AMP bola 233 ng/ml, najnižšia koncentrácia bola 4,88 ng/ml.. V prípade metamfetamínu (MAMP) bola priemerná koncentrácia 258 ng/ml, medián 117 ng/ml. Najvyššia koncentrácia MAMP bola 1812 ng/ml, najnižšia koncentrácia bola 3,05 ng/ml. Iba v 5 prípadoch bol zaznamenaný výskyt samotného MAMP bez jeho metabolitu. Simultánna prítomnosť MAMP a THC bola dokázaná iba v jednej vzorke a koexistencia metamfetamínu a neaktívneho metabolitu THC-COOH v štyroch prípadoch. U deviatich vodičov bola zachytená samotná prítomnosť THC a THC-COOH. V 1 prípade bola u vodiča preukázaná prítomnosť kokaínu v koncentrácii 35 ng/ml a jeho metabolitu metyl ekgonínu v hladine 795 ng/ml. Okrem vyššie menovaných látok, bola u vodičov kvantitatívne preukázaná prítomnosť, kofeínu, nikotínu, kotinínu, alprazolamu a ketamínu. Jediná látka, ktorá pri predbežnom testovaní LTCHA vyšla pozitívna, no následne nebola kvantifikovaná bola extáza (MDMA).

Okrem spomínaných vzoriek krvi, bolo kvantifikovaných osem vzoriek moču s prítomnosťou látok amfetamínoveho typu. Iba v jednom prípade bol prítomný pozitívny nález v moči so súčasným negatívnym nálezom v krvi. Najvyššia incidencia bola zaznamenaná v mesiacoch máj a október.



Graf 1: Na osi y je počet zaznamenaných prípadov.

ŽENY	MUŽI	AMP [ng/ml]	MAMP [ng/ml]	THC [ng/ml]	THC - COOH [ng/ml]
6	63	53,58	253,23	45,79	128,6

Tab.1: Zobrazuje priemerné hodnoty látok ovplyvňujúcich jazdu motorovým vozidlom a to AMP- amfetamín, MAMP- metamfetamín, THC- delta-9-tetrahydrocannabinol), THC- COOH-1-Nor-9-carboxy-THC (THC-COOH).

Diskusia

Látky amfetamínového typu v našej jurisdikcii nemajú stanovenú limitnú hodnotu, pri ktorej by boli vodiči považovaní jednoznačne za ovplyvneného. Štandardne sa však dá riadiť podľa kritéria medzinárodného výskumného projektu DRUID (Driving under influence of drugs, alcohol and medicines) = Riadenie motorových vozidiel pod vplyvom drog, alkoholu a liečiv. Za pozitívny výsledok vyšetrenia sa považuje koncentrácia metamfetamínu rovná alebo vyššia ako 20 ng/ml v krvi. Za pozitívny výsledok vyšetrenia sa považuje koncentrácia THC rovná alebo vyššia ako 1 ng/ml v krvi. Niektoré krajiny majú minimálnu koncentráciu THC 2 ng/ml. Koncentrácia > 5 ng/ml THC bola štatisticky zhodnotená, že je nebezpečnejšia ako vodič s alkoholom v krvi od 1-1,5 promile. V Českej Republike sú hladiny pre amfetamín a metamfetamín stanovené koncentráciou 25 ng/ml [7]. Či už vodiči vykonali trestný čin alebo priestupok nie je v našej jurisdikcii stanovené. V českej republike sa viacerými odborníkmi (potom aj v stanovisku najvyššieho súdu) stanovila koncentrácia na trestný čin pre AMP a MAMP 150 ng/ml a pre THC 10 ng/ml. V 39 prípadoch sme zaznamenali vyššie koncentrácie metamfetamínu ako 25 ng/ml, takže môžme konštatovať, že títo vodiči prekročili limitné

hladiny podľa DRUID a boli ovplyvnení. Podľa jurisdikcie českej republiky by viacero z nich spáchalo aj trestný čin (priemerná koncentrácia MAMP bola 253,23 ng/ml). Podobne by to bolo aj v prípade THC, kde jeho koncentrácia presahovala hodnoty v DRUID ako aj hodnoty v českej jurisdikcii (zhodnotené nižšie).

V štúdii z roku 2006 boli vodiči rozdelení do viacerých skupín. Cieľom bolo sledovať vzťah medzi koncentráciou amfetamínov v krvi a zhoršením schopností vodiča viesť motorové vozidlo. Prvá skupina vodičov užila 10-40 mg amfetamínu s následnou koncentráciou 40-100 ng/ml, druhá skupina prijala 30-80 mg amfetamínu a hodnoty koncentrácie dosahovali 110-260 ng/ml, tretia skupina vodičov požila 70-150 mg s výslednou koncentráciou 270-530 ng/ml, štvrtá skupina vodičov prijala 140-300 mg s výslednou koncentráciou 540-1000 ng/ml. Sledovanie vzťahu medzi koncentráciou amfetamínov v krvi a zhoršením schopností vodiča malo stúpajúcu tendencia a stropový efekt, bol pozorovaný pri koncentráciach 270 – 530 ng/ml. Priemerný vek vodiča pod vplyvom omámnych látok bol 31rokov [8]. V našej práci sme zaznamenali priemerne koncentrácie amfetamínu 53,58 ng/ml čo by pri podobnom priemernom veku vodičov (33 rokov) pod vplyvom OPL mohlo znamenať užitie dávky amfetamínu od 10-40 mg. V prípade metamfetamínu pri užití priemernej dávky 52 mg boli zaznamenané koncentrácie 190-300 ng/ml. [9]. V našej práci sme zaznamenali priemerné koncentrácie 253,23 ng/ml, čo by mohlo tiež zodpovedať vyššie uvedenej dávke. Je nutné však poznamenať, že keďže priemerná koncentrácia MAMP skoro 5 krát prevyšuje koncentráciu AMP (Tabuľka 1), vodiči v našej štúdii veľmi pravdepodobne užili MAMP a AMP pochádza hlavne z jeho metabolizmu. Prejavy pozorované políciou na mieste skutku korelujú s príznakmi pozorovanými pri užívaní látok amfetamínoveho typu [4].

Je náročné stanoviť vzťah medzi koncentráciou THC vo vyšetrovanej krvi vodiča a ovplyvnením jeho jazdných schopností. Koncentrácia THC a jeho metabolitu závisí od formy, množstva a pravidelnosti užívania. Počas fajčenia je najvyššia koncentrácia THC v krvi a najvyššia koncentrácia 11-OH THC je zachytená po 9 – 23 minútach od fajčenia. Koncentrácie oboch parametrov s plynutím času prudko klesajú. Častokrát dochádza k poklesu < 5 ng/ml po 3 hodinách hodinách. Už po prvom inhalovaní z cigarety môže byť zachytená výrazne signifikantná koncentráciá THC (7-18 ng/ml). Po 10 minútach od vyfajčenia 8,8 mg THC sú zachytené najvyššie koncentrácie (46 – 188 ng/ml). V prípade chronických užívateľov marihuany môžu byť po 12 hodinách hladiny na úrovni 45 ng/ml. Najvyššia koncentrácia THC-COOH je prítomná približne po 2 – 4 hodinách. Vo všeobecnosti sa teda neodporúča predikovať účinky marihuany na vodiča iba na základe koncentrácie THC v krvi a zároveň je nemožné predvídať efekt na základe hladiny THC-COOH. Vedomosť o čase od expozície marihuany môže byť využitá na predikciu psychomotorických a kognitívnych účinkov. [6]. Ani jeden z nami sledovanej skupiny vodičov neuviedol, že užil marihuanu. Napriek tejto skutočnosti vodičom, ktorí javili známky užitia tejto OPL, boli dokázané koncentrácie v intervale (9, 61 – 80 ng/ml). Nakoľko limitná hodnota THC v krvnej vzorke (v Českej Republike), pri ktorej je vodič považovaný za ovplyvneného danou látkou sú 2 ng/ml [7] možno konštatovať, že vo všetkých prípadoch vodiči boli ovplyvnený sledovanou látkou. Problematickým faktorom v našej práci bola skutočnosť, že kvantifikácia THC vo vzorkách krvi bola možná iba v 5 prípadoch. Vysvetlenie tejto skutočnosti môže byť v dôsledku neskorého odberu biologického materiálu od času skutku alebo chyba v testovaní.

Záverom možno konštatovať, že najviac vyskytujúcou sa látkou u vodičov v Trnavskom a Bratislavskom kraji bol pervitín (MAMP) a jeho metabolit AMP. Aj keď sme pozorovali výskyt THC, v mnohých prípadoch túto koncentráciu nebolo možné zachytiť hlavne kôli jeho krátkej dobe v krvi. Čo sa týka ojedinelých látok ako ketamín alebo alprazolam, tieto látky predstavujú veľké riziko pre vedenie vozidla v dôsledku ich utlmujúceho účinku na centrálny nervový systém. Limitáciami našej štúdie bol nízky počet bližšie špecifikovaných prejavov, ktoré mohli byť zahliadnuté hliadkou policajného zboru. Ani v jednom prípade sme nedisponovali lekárskou správou od ošetrujúceho lekára alebo neboli vyplnené údaje o fyzikálnom vyšetrení pacienta. Odstránením týchto limít spolu so skrátením času medzi odberom vzorky a skutkom v cestnej premávke by výrazne zvýšilo počet odhalených vodičov s nájdenými látkami ako AMP, MAMP a THC a skončilo následným odobraním ich vodičského preukazu. Výsledkom by bol nižší počet týchto vodičov a tým aj riziko vzniku dopravných nehôd pod vplyvom MAMP a THC. Výsledky, ku ktorým sme dospeli majú možnosť uplatnenia v súdnolekárskej toxikológii, v súdnom lekárstve, alebo v psychiatrii.

Zoznam použitej literatúry

1. Knut Hjelmeland, Gerrit Middelkoop, Jørg Mørland, Gudrun Høiseth: The relationship between clinical impairment and blood drug concentration: Comparison between the most prevalent traffic relevant drug groups. Forensic Science International, 2024; Volume 363, 112180,
2. Kunsman, G. W., & Hartman, R. L. : *Human Performance Toxicology*. In B. S. Levine & S. Kerrigan (Eds.), *Principles of Forensic Toxicology* 2020;. pp. 15–33. Springer Nature Switzerland AG.
3. Gjerde H, Strand MC, Mørland J: Driving under the influence of non-alcohol drugs—An update. Forensic Science Review 2015; 27(2): 89–113
4. Musshoff, F., & Madea, B. (2012). Driving under the influence of amphetamine-like drugs. *Journal of Forensic Sciences, 57*(2), 413–419.
5. Blandino, A., Cotroneo, R., Tambuzzi, S., Di Candia, D., Genovese, U., & Zoja, R.: Driving under the influence of drugs: Correlation between blood psychoactive drug concentrations and cognitive impairment. A narrative review taking into account forensic issues. Forensic Science International: 2022; Synergy, 4, 100224.
6. Couper, Fiona J., et al.: *Drugs and Human Performance Fact Sheets,* United States. Department of Transportation. National Highway Traffic Safety Administration, 2024.
7. Czech Republic: *Sbírka zákonů č. 17/2014*. (2014).
8. Gustavsen, I., Mørland, J., & Bramness, J. G. (2005). *Impairment related to blood amphetamine and/or methamphetamine concentrations in suspected drugged drivers*. Accident Analysis and Prevention 2005; 38(3), 490–495.
9. Melega, W. P., Cho, A. K., Harvey, D., & Laćan, G.: *Methamphetamine blood concentrations in human abusers: Application to pharmacokinetic modeling*. Neuropsychopharmacology, 2007; 32(3), 665–672.

4. Účinok prírodných látok na dynamiku metabolizmu etylalkoholu

Ondrej Tomášik
(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.[1]
[1]Ústav patologickej anatómie LF UK a UN Bratislava

Úvod

Etylalkohol a jeho metabolity sú toxické látky, ktoré vedú k akútnemu poškodeniu organizmu najmä pri vyšších koncentráciách. Metabolizmus etanolu sprostredkuje najmä alkoholdehydrogenázový systém (ADH) a v menšej miere tiež mikrozomálny etanol oxidujúci systém (MEOS) a kataláza. Tieto metabolické dráhy zabezpečujú oxidáciu etanolu na acetaldehyd, ktorý je v druhom kroku oxidovaný na acetát v reakcii katalyzovanej aldehyddehydrogenázou (ALDH) (1). Všetky tieto mechanizmy majú pomerne konštantnú rýchlosť. Existujú však látky, ktorých prítomnosť v organizme dokáže dynamiku metabolizovania alkoholu ovplyvniť. Jednou z týchto látok je kurkumín, rastlinný polyfenol s protizápalovými a antioxidačnými účinkami, ktorý zároveň ovplyvňuje aj rýchlosť enzymatických reakcií. Pri pokusoch na modeloch potkanov bolo zistené, že premedikácia extraktom z kurkumy zvýšila aktivitu alkoholdehydrogenázy (ADH) a aldehyddehydrogenázy (ALDH) v pečeni aj v sére pri jednorazovom požití nadmerného množstva alkoholu (3 g/kg). Zároveň bola pozorovaná aj urýchlená dynamika metabolizmu etylalkoholu, kedy skupiny, ktoré požili kurkumín, mali nižšie hladiny etanolu, aj acetaldehydu v krvi po 30 minútach, 1, 3 a 5 hodinách po podaní etanolu (2). V ďalšej štúdii na obéznych myšiach suplementácia kurkumínom zvýšila aktivitu ADH, ALDH aj pri chronickom užívaní alkoholu (3). Na základe poznatkov z výskumov na zvieracích modeloch sa dá predpokladať, že kurkumín urýchľuje metabolizmus alkoholu aj u ľudí. V tejto práci sme sa zamerali na kvantitatívne zhodnotenie účinku kurkumínu na rýchlosť eliminácie etanolu a tým potenciálne zníženie toxických účinkov po konzumácii alkoholu.

Materiál a metódy

Experimentálnu štúdiu dokončilo 20 zdravých dobrovoľníkov (10 mužov a 10 žien) vo veku 20 - 25 rokov. Štúdia prebiehala v 2 fázach, ktoré boli od seba oddelené 13 dní, pričom oboch fáz sa zúčastnili identickí účastníci štúdie. Účastníci boli poučení, aby 3 dni pred oboma fázami klinického experimentu nekonzumovali žiadny alkohol a 3 hodiny pred začiatkom konzumácie alkoholu nekonzumovali žiadne jedlo.

Vo fáze A účastníci v priebehu 10 minút skonzumovali alkohol v koncentrácii 40 % (vodka) v množstve 0,82 g/kg u mužov a 0,7 g/kg u žien, ku ktorému dostali na zapitie 200 ml nápoja, ktorý pozostával zo 100 ml 100 % pomarančového džúsu a 100 ml vody. Počas celej doby testovania (3 hodiny po ukončení konzumácie alkoholu) účastníci pokračovali v lačnení a neprijímali žiadne ďalšie tekutiny.

Vo fáze B bol účastníkom podaný extrakt z kurkumy (2100 mg) s piperínom (15mg), ku ktorému dostali účastníci na zapitie 2 dcl čistej vody. Následne po 30 minútach skonzumovali v priebehu 10 minút alkohol v rovnakej dávke ako v prvej fáze (0,82 g/kg, resp. 0,7 g/kg), na zapitie mali k dispozícii 200 ml nápoja zloženého z pomarančového džúsu s vodou v pomere 1:1.

V oboch fázach bola účastníkom zmeraná hladina alkoholu vo vydychovanom vzduchu 30, 90 a 180 minút po ukončení konzumácie alkoholu. Meranie bolo vykonávané nepriamou metódou, meraním koncentrácie pár alkoholu vo vydychovanom vzduchu, tzv. dychovou skúškou prístrojom Alcovisor MarkX.

Na výskum bol použitý prípravok Curcumin Complex od firmy Swanson so štandardizovaným obsahom kurkuminoidov minimálne 95 % a 5 mg bioperínu® so štandardizovaným obsahom piperínu minimálne 95 %. Účastníkom bol podaný v dávke 2100 mg extraktu z kurkumy, resp. 15 mg bioperínu. Piperín obsiahnutý v prípravku zvyšuje biologickú dostupnosť kurkumínu o 2000 % (4).

Získané údaje sme štatisticky spracovali s využitím softvéru GraphPad Prism (verzia 10.3.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Výsledné hodnoty pre jednotlivé fázy merania boli vyjadrené ako priemer ± štandardná chyba priemeru (SEM). Normalita distribúcie dát bola overená pomocou D'Agostino Pearsonovho omnibus testu a Shapiro-Wilk testu. Na identifikáciu odľahlých hodnôt sme použili test ROUT (robust regression and outlier removal), ktorý je vhodný na detekciu odľahlých dátových bodov s vysokou presnosťou, pričom minimalizuje stratu relevantných údajov. Na porovnanie rozdielov medzi jednotlivými fázami merania bol použitý parametrický párový t-test. Výsledky boli považované za štatisticky významné pri hodnote p menšej ako 0,05. Výsledky boli vyhodnocované pre obe pohlavia zvlášť.

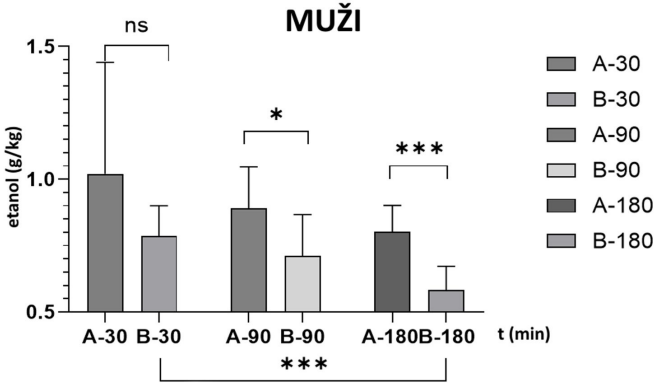
Výskum bol schválený Etickou komisiou LFUK a Nemocnice Staré Mesto UNB. Od účastníkov bol získaný informovaný súhlas, ktorý podpísali pred začiatkom klinického výskumu po oboznámení s priebehom výskumu a požiadavkami ich účasti.

Výsledky

Výsledky dokázali nižšie hladiny alkoholu vo fáze B v 90. a 180. minúte u oboch pohlaví.

U mužov bola vo fáze B (po premedikácii kurkuminoidmi) zaznamenaná nižšia koncentrácia alkoholu vo všetkých meraných časoch. V 30. minúte bola hladina alkoholu vo fáze A (1,020 ± 0,420 g/kg) vyššia oproti hladine alkoholu v fáze B (0,788 ± 0,112 g/kg), rozdiel však bol nesignifikantný. V 90. minúte bola hladina vo fáze A (0,891 ± 0,156 g/kg) signifikantne vyššia ($p < 0,05$) oproti hladine alkoholu vo fáze B (0,710 ± 0,157 g/kg). V 180. minúte bola hladina vo fáze A (0,802 ± 0,099 g/kg) tiež signifikantne vyššia ($p < 0,001$) ako hladina vo fáze B (0,584 ± 0,088 g/kg) (Graf 1).

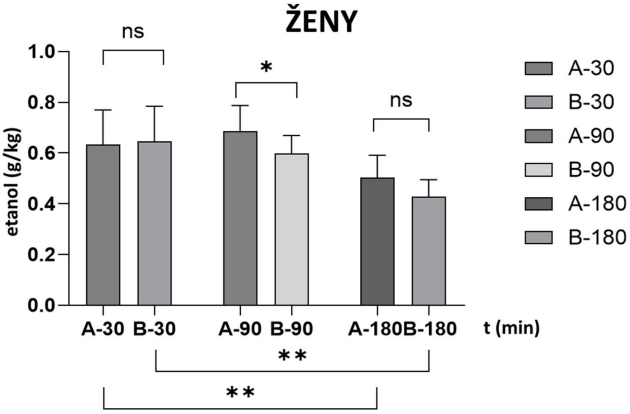
Pri porovnaní hladiny etanolu u mužov v 30. a 180. minúte nastal vo fáze B signifikantný pokles (0,204 ± 0,031 SED) ($p < 0,001$). Vo fáze A bol tento pokles výraznejší (0,218 ± 0,130 SED), avšak nebol signifikantný.



Graf 1. Vplyv extraktu z kurkumy na hladinu alkoholu u mužov. Hladina alkoholu v fáže A (A-30, 90, 180) v porovnaní s hladinou alkoholu po podaní extraktu z kurkumy s piperínom vo fáze B (B-30, 90, 180). Výsledky sú zobrazené ako priemerná hodnota ± SD.

Hladina alkoholu u žien bola v 30. minúte približne rovnaká v oboch fázach, zatiaľ čo v 90. a 180. minúte bola nižšia vo fáze B (po premedikácii kurkuminoidmi). V 30. minúte bola hladina alkoholu vo fáze A (0,635 ± 0,136 g/kg) na podobnej úrovni ako vo fáze B (0,646 ± 0,139 g/kg) a rozdiel medzi fázami bol nesignifikantný. V 90. minúte bola hladina alkoholu vo fáze A (0,688 ± 0,100 g/kg) signifikantne vyššia ($p < 0,05$) ako vo fáze B (0,599 ± 0,070 g/kg). V 180. minúte bola hladina alkoholu vo fáze A (0,503 ± 0,088 g/kg) vyššia ako vo fáze B (0,429 ± 0,067 g/kg), tento rozdiel bol však nesignifikantný (graf 2).

Pri porovnaní hladín alkoholu v 30. minúte a v 180. minúte nastal signifikantný pokles ($p < 0,01$) v oboch fázach. Vo fáze A (0,131 ± 0,0277 SED) bol pokles menej výrazný ako vo fáze B (0,217 ± 0,043 g/kg SED).



Graf 2. Vplyv kurkuminoidov na hladinu alkoholu u žien. Hladina alkoholu vo fáze A (A-30, 90, 180) v porovnaní s hladinou alkoholu po podaní extraktu z kurkumy s piperínom vo fáze B (B-30, 90, 180). Výsledky sú zobrazené ako priemerná hodnota ± SD.

Diskusia

V našej štúdii sme preukázali, že kurkuminoidy v kombinácii s piperínom majú potenciál urýchliť metabolizmus etylalkoholu u ľudí. V 180. minúte od ukončenia konzumácie etanolu bola hladina alkoholu po užití prípravku nižšia u 18 z 20 účastníkov, z toho u 10 z 10 mužov a u 8 z 10 žien. So zreteľom na výsledky iných prác môžeme predpokladať, že sa tak deje na základe indukcie aktivity dehydrogenáz, ktoré sa zúčastňujú na metabolizme alkoholu. V nami sledovanom parametri sa jedná najmä o indukciu alkoholdehydrogenázy (ADH), keďže sme sledovali výlučne hladinu alkoholu, ktorý je pre ADH substrátom. Efekt podávaného rastlinného prípravku vykázal vyšší účinok u probandov mužského pohlavia. Účinok kurkumínu na dynamiku metabolizmu etylalkoholu teda môže byť závislý od pohlavia.

Rovnaký efekt, aký sme pozorovali v našom projekte, sledovali aj japonskí autori v klinickej štúdii na 7 účastníkoch mužského pohlavia, ktorým bol podaný theracurmin, forma kurkumínu so zlepšenou biologickou dostupnosťou. V danej štúdii bola monitorovaná nielen hladina etanolu, ale aj hladina acetaldehydu. Z výsledkov meraní vyplýva, že theracurmin mal vplyv na zníženie hladín acetaldehydu, nie však na zníženie hladín alkoholu v krvi (5). Treba však poznamenať, že v danej štúdii bol účastníkom podaný theracurmin v dávke 30 mg, čo je omnoho nižšia dávka v porovnaní s našou štúdiou, v ktorej bol účastníkom podaný kurkumín v dávke 2100 mg. Môžeme preto predpokladať, že nami podaný prípravok mal v počiatočnej fáze po užití alkoholu výraznejší vplyv na aktivitu ADH. Naše výsledky napovedajú, že extrakt z kurkumy môže mať vplyv nielen na zníženie hladiny acetaldehydu, ale aj na zníženie hladiny etanolu. Vzhľadom na tieto skutočnosti má kurkumín výrazný potenciál pri zmierňovaní prejavov intoxikácie alkoholom, ako aj prejavov stavu po intoxikácii alkoholom (tzv. hangover).

Výsledky našich meraní sa zhodujú s výsledkami štúdie na laboratórnych potkanoch, u ktorých po podaní extraktu z kurkumy rovnako došlo ku zníženiu hladiny alkoholu v krvi a zároveň ku

zvýšeniu aktivity ADH a ALDH. Tieto pozorovania naznačujú, že extrakt z kurkumy by mal vďaka zlepšeniu eliminácie alkoholu a zníženiu hladiny acetaldehydu prispieť aj ku zmierneniu príznakov stavu po intoxikácii alkoholu. Taktiež by mal kurkumín prispievať k prevencii poškodenia pečene po dlhodobej expozícii etanolu, a to nielen cestou zníženia toxicity (2,3).

V ďalšom výskume, ktorý dokázal zvýšenie aktivity ADH a ALDH a zároveň zníženie hladín alkoholu po podaní zloženého prípravku z kurkumy u laboratórnych myší, boli sledované aj príznaky intoxikácie a ich zmeny v čase po podaní daného prípravku. Prípravok z kurkumy dokázal po podaní vyššej dávky etanolu (14 ml/kg) predĺžiť čas do objavenia príznakov intoxikácie (meraný od podania alkoholu do vymiznutia vzpriamovacieho reflexu) z 19,23 ± 6,29 minút na 304,5 ± 23,72 minút, signifikantne skrátiť čas do vytriezvenia (meraný od vymiznutia do znovuobjavenia vzpriamovacieho reflexu) z 661,43 ± 38,56 minút na 265,50 ± 27,2 minút, zvýšiť 24-hodinové prežívanie zo 67 % na 100 % a znížiť hladiny alkoholu počas všetkých meraní v priebehu prvých 6 hodín. Prípravok obsahoval okrem kurkumínu aj ďalšie aktívne zložky (6). Napriek tomu toto zistenie rovnako napovedá o schopnosti kurkumínu urýchliť metabolizmus alkoholu a zmierniť symptómy pri intoxikácii alkoholom.

V podmienkach *in vitro* nie je vplyv kurkumy na aktivitu ADH a ALDH úplne jednoznačný, pretože kurkuma síce indukovala aktivitu ADH o 10,73 ± 2,28 %, avšak inhibovala aktivitu ALDH o 23,79 ± 1,28 % (7). Tento vplyv však nemusí byť reprodukovateľný v podmienkach *in vivo*, pretože v podmienkach *in vitro* nedochádza k zvýšeniu počtu molekúl, zatiaľ čo v podmienkach *in vivo* môže dôjsť k zvýšeniu expresie enzýmu a tým pádom aj k zvýšeniu počtu aktívnych molekúl ADH, resp. ALDH. V podmienkach *in vivo* tiež môže dochádzať k rozdielnemu vplyvu kurkumínu na reoxidáciu koenzýmov enzymatických reakcii oproti podmienkam *in vitro*. Kurkuma teda síce aktivitu ADH v podmienkach *in vitro* zvyšovala, avšak aktivitu ALDH naopak znížila. To však nekorešponduje s výsledkami štúdii vykonávanými na zvieracích modeloch, pretože u tých došlo po podaní prípravkov s obsahom kurkumínu k zvýšeniu aktivity ADH aj ALDH (2,3,6).

Potenciál ďalšieho výskumu by mohol spočívať aj v obohatení záverov o výsledky ďalších látok či enzýmov. Spomedzi ďalších zložiek potravy bolo v *in vivo* podmienkach dokázané zvýšenie aktivity ADH a ALDH, resp. zníženie hladiny alkoholu po konzumácii manga, po podaní naringínu (flavonoid vyskytujúci sa v citrusoch), silymarínu (z Pestreca mariánskeho) či Dužistopky sladkej (lat. Hovenia dulcis) (8–11). V klinických štúdiách na zdravých dobrovoľníkoch bol dokázaný takýto vplyv po užití šťavy z Púpavy lekárskej (Taraxacum officinale) či Všehoja ázijského (Panax ginseng, ľudovo ženšen) (12,13).

Vďaka vplyvu na metabolizmus a zmiernenie toxických vplyvov alkoholu môže mať kurkumín a jemu podobné látky prínos v symptomatickej, resp. adjuvantnej terapii stavov spojených s intoxikáciou alkoholom. Potenciál využitia prípravkov s obsahom takýchto látok spočíva aj vo využití mimo klinického prostredia, kedy ich možno použiť ako podporný prostriedok pri náhodnej alebo neprimeranej nadmernej konzumácii alkoholu. V takýchto prípadoch by sa dal využiť potenciál týchto látok utlmiť nepríjemné subjektívne symptómy, redukovať toxické účinky etanolu na organizmus a urýchliť elimináciu alkoholu z organizmu.

Zoznam použitej literatúry

1. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. Clinics in Liver Disease. 2012; 16(4):667–85.

2. Lee HY, Lee GH, Hoang TH a spol. Turmeric extract (Curcuma longa L.) regulates hepatic toxicity in a single ethanol binge rat model. Heliyon. 2022; 8(9):e10737.
3. Lee HI, McGregor RA, Choi MS a spol. Low doses of curcumin protect alcohol-induced liver damage by modulation of the alcohol metabolic pathway, CYP2E1 and AMPK. Life Sciences. 2013; 93(18–19):693–9.
4. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas P. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. Planta Med. 1998; 64(04):353–6.
5. Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K a spol. Innovative Preparation of Curcumin for Improved Oral Bioavailability. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2011; 34(5):660–5.
6. Liang X ting, Wang Y yan, Hu X yu, Wang S bo. The Protective Effects of Water Extracts of Compound Turmeric Recipe on Acute Alcoholism: An Experimental Research Using a Mouse Model. Evid Based Complement Alternat Med. 2021; 2021:6641919.
7. Srinivasan S, Dubey KK, Singhal RS. Influence of food commodities on hangover based on alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities. Current Research in Food Science. 2019; 1:8–16.
8. Kim SH, K. Cho S, Min TS a spol. Ameliorating effects of Mango (Mangifera indica L.) fruit on plasma ethanol level in a mouse model assessed with 1H-NMR based metabolic profiling. J Clin Biochem Nutr. 2011; 48(3):214–21.
9. Seo HJ, Jeong KS, Lee MK a spol. Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats. Life Sciences. 2003; 73(7):933–46.
10. Kaviarasan S, Anuradha CV. Fenugreek (Trigonella foenum graecum) seed polyphenols protect liver from alcohol toxicity: A role on hepatic detoxification system and apoptosis. Pharmazie. 2007; (4):299–304.
11. Je J, Song M, Baek JH a spol. Combined Water Extracts from Oxidation-Treated Leaves and Branches of Hovenia dulcis Has Anti-Hangover and Liver Protective Effects in Binge Alcohol Intake of Male Mice. Nutrients. 2021; 13(12):4404.
12. Noh KH, Jang JH, Kim JJ, Shin JH, Kim DK, Song YS. Effect of Dandelion Juice Supplementation on Alcohol-Induced Oxidative Stress and Hangover in Healthy Male College Students. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2009; 38(6):683–93.
13. Lee MH, Kwak JH, Jeon G a spol. Red ginseng relieves the effects of alcohol consumption and hangover symptoms in healthy men: a randomized crossover study. Food Funct. 2014; 5(3):528.

5. Funkčná diagnostika žilovej hemodynamiky pri hĺbkovej žilovej trombóze

Dominik Melich
(všeobecné lekárstvo, 6.ročník)

Školiteľka: doc. MUDr. Denisa Čelovská, PhD
1. Interná klinika LF UK a UNB

Úvod

Chronické žilové ochorenia dolných končatín predstavujú významný medicínsky problém, ktorý môže viesť k závažným komplikáciám, ako sú opuchy, bolesti, vredy predkolenia, či zhoršenie kvality života pacientov. Poškodenie žilových chlopní, žilový reflux, žilová hypertenzia a zápal sú základné patofyziologické mechanizmy, ktoré sa navzájom potencujú a prispievajú k rozvoju ochorenia. Včasná diagnostika žilovej insuficiencie je kľúčová pre spomalenie progresie ochorenia a minimalizáciu komplikácií, pričom kompresívna terapia predstavuje jeden zo základných terapeutických prístupov (1).

Vzduchová pletyzmografia je jednou z používaných neinvazívnych diagnostických metód na hodnotenie venóznej hemodynamiky. Táto technika umožňuje kvantifikáciu zmien objemu žilového systému a posúdenie prítomnosti refluxu alebo obštrukcie. Princípom metódy je meranie zmien objemu krvi v dolnej končatine pomocou vzduchovej manžety, čím sa získavajú parametre ako funkčný žilový objem, index žilového plnenia a ejekčná frakcia. Viaceré štúdie (2, 3) potvrdili význam pletyzmografie pri výskumných účeloch, avšak jej využitie v klinickej praxi je stále predmetom diskusie (4).

Hĺbková žilová trombóza (ďalej HŽT) je ďalším významným ochorením žilového systému, ktoré môže viesť k závažným dlhodobým komplikáciám, ako je potrombotický syndróm. HŽT je charakterizovaná tvorbou krvnej zrazeniny v hlbokých žilách dolných končatín, čo vedie k obmedzeniu venózneho odtoku a zvýšenému riziku venózneho tromboembolizmu. Patofyziologicky sa pri vzniku trombov v žilovom riečisku uplatňujú 3 základné komponenty Virchowovej triády: poškodenie endotelu cievnej steny, hyperkoagulačný stav a stáza krvi. Výskyt HŽT stúpa s vekom a jej incidencia je vyššia v rozvinutých krajinách (5).

Anatomická lokalizácia HŽT môže ovplyvniť dlhodobé funkčné parametre žilového systému. Iliofemorálne HŽT sú často spojené s vyšším rizikom sekundárnej chronickej žilovej insuficiencie a rozvoja potrombotického syndrómu v porovnaní s distálnymi HŽT. Potrombotický syndróm sa vyskytuje u 20-50% pacientov v priebehu dvoch rokov po prekonaní proximálnej hĺbkovej žilovej trombózy a výrazne znižuje ich kvalitu života (6).

Cieľom tejto práce je zhodnotiť diagnostickú výpovednú hodnotu vzduchovej pletyzmografie pri diferenciácii pacientov s normálnou žilovou funkciou od pacientov s patologickými zmenami, predovšetkým v súvislosti s HŽT. Sekundárne sa štúdia zameriava na analýzu vplyvu anatomickej lokalizácie HŽT na venóznu hemodynamiku s cieľom poskytnúť podklady pre optimalizáciu diagnostických a terapeutických postupov v klinickej praxi.

Materiál a metódy

Meranie sme vykonávali na pôde I. internej kliniky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Univerzitnej nemocnici Bratislava od 14.11.2023 do 14.5.2024, v angiologickej ambulancii. Všetci pacienti a dobrovoľníci boli vyšetrovaní podľa štandardnej praxe daného pracoviska a všetci súhlasili s neinvazívnym vyšetrením.

Merania boli vykonané pomocou prístroja VLab-4000 (EKOVUK MEDI, s.r.o., Česká republika), ktorý funguje na princípe vzduchovej pletyzmografie. Pomocou tohoto prístroja je možné odmerať tepnový prítok, žilový reflux, pulzovú vlnu, prstové tlaky, a mnohé iné parametre (7). V tejto práci sme využili funkciu merania času žilového refluxu.

Prvým krokom bolo oboznámenie pacientov a dobrovoľníkov o povahe vyšetrenia. Jednotlivcom usadeným na stoličke boli tesne nad členky na obe dolné končatiny zbavené odevu nasadené tlakové meracie manžety. Po spustení prístroja jednotlivci dvíhali nahor špičky chodidiel podľa pokynov vyšetrujúceho. Po ukončení merania prístroja bolo vyšetrenie ukončené.

Inkluzívnym kritériom pre zaradenie jednotlivcov do súboru pacientov bola pozitívna osobná anamnéza minimálne dvoch epizód hĺbkovej žilovej trombózy, teda rekurentná HŽT. Exkluzívne kritériá boli HŽT s aktívnym žilovým vredom a nespolupracujúci pacient. Kontrolnú skupinu tvorili študenti Univerzity Komenského v Bratislave a pacienti angiologickej ambulancie, ktorí nespĺňali kritérium pre zaradenie do súboru pacientov. V prípade pacientov s rekurentnou hĺbkovou flebotrombózou sme ďalej analyzovali typ– či išlo o proximálne alebo distálne lokalizovanú flebotrombózu a ktoré dolné končatiny boli postihnuté.

Testovaný súbor zahŕňal 20 pacientov s rekurentnou hĺbkovou žilovou trombózou v anamnéze a kontrolnú skupinu tvorilo 14 osôb, čo predstavovalo celkovo 34 subjektov a 68 meraných dolných končatín. V súbore pacientov bolo 14 mužov a 6 žien s priemerným vekom 60 rokov. Kontrolná skupina pozostávala z 3 mužov a 11 žien s priemerným vekom 32,5 roka.

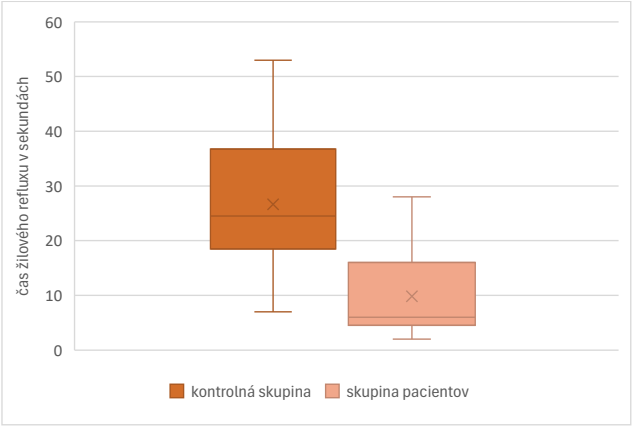
U pacientov s proximálne lokalizovanou trombózou, ktorí mali postihnuté obe dolné končatiny, boli do analýzy zahrnuté nižšie hodnoty času žilového refluxu. Do skupiny pacientov s proximálne lokalizovanou trombózou boli pri štatistickom porovnávaní s distálnou trombózou zaradení aj jedinci s kombinovanou proximálnou a distálnou lokalizáciou trombotických udalostí.

Získané údaje boli spracované pomocou programu Microsoft Office Excel, verzia 2402. Na testovanie významnosti rozdielu medzi dvomi konkrétnymi skupinami sme použili F-test a nepárový t-test. Výsledky boli považované za štatisticky signifikantné pri $p < 0,05$. Všetky grafy boli zobrazené ako boxploty, ktoré zobrazovali priemerné hodnoty a medián.

Výsledky

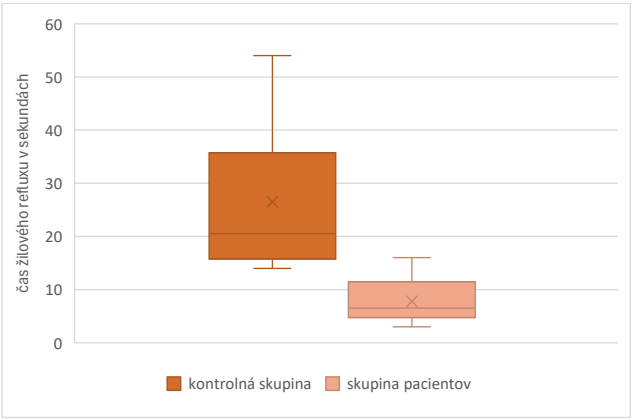
Pri porovnaní času žilového refluxu medzi pacientmi a kontrolnými subjektmi sme analyzovali zvlášť pravú a ľavú dolnú končatinu. Pacienti boli rozdelení na základe postihnutia konkrétnej končatiny flebotrombózou. U 13 pacientov bola rekurentná flebotrombóza prítomná na pravej dolnej končatine. Pri porovnaní s kontrolnou skupinou ($n = 14$) sme zaznamenali štatisticky signifikantné skrátenie času žilového refluxu u pacientov ($p \leq 0,01$, nepárový t-test).

Tento výsledok naznačuje narušenie venóznej funkcie u osôb s anamnesticky potvrdenou HŽT (Obr. 1).



Obrázok 1: Porovnanie času žilového refluxu medzi kontrolnou skupinou (n = 14) a pacientmi (n = 13) na pravej dolnej končatine (p ≤ 0,01, nepárový t-test).

Podobný trend bol pozorovaný aj pri ľavej dolnej končatine, kde bola rekurentná flebotrombóza diagnostikovaná u 14 pacientov. Porovnaním hodnôt s kontrolnou skupinou (n = 14) sme opäť zistili signifikantné skrátenie času žilového refluxu (p ≤ 0,01, nepárový t-test) (Obr. 2).



Obrázok 2: Porovnanie času žilového refluxu medzi kontrolnou skupinou (n = 14) a pacientmi (n = 14) na ľavej dolnej končatine (p ≤ 0,01, nepárový t-test).

Následne sme pacientov rozdelili na základe lokalizácie HŽT. Distálna HŽT bola diagnostikovaná u 5 pacientov, zatiaľ čo proximálna HŽT u 15 pacientov. Pri porovnaní časov žilového refluxu medzi týmito skupinami sme zistili signifikantne nižšie hodnoty u pacientov s proximálnou HŽT ($p \leq 0,01$, nepárový t-test), čo naznačuje väčší vplyv proximálne lokalizovanej trombózy na venóznu hemodynamiku (Obr. 3).



Obrázok 3: Porovnanie času žilového refluxu medzi pacientmi s distálnou (n = 5) a proximálnou (n = 15) flebotrombózou ($p \leq 0,01$, nepárový t-test).

Diskusia

Hlavným cieľom nášho výskumu bolo zhodnotiť diagnostickú výpovednú hodnotu vzduchovej pletyzmografie pri diferenciácii pacientov s normálnou žilovou funkciou od pacientov s patologickými zmenami. Predpokladali sme, že pacienti s rekurentnou HŽT budú mať štatisticky významne skrátený čas refluxu oproti kontrolnej skupine, čo je spôsobené poškodením funkcie žilového systému dolných končatín. To sa potvrdilo porovnaním časov refluxu nameraných na pravých a ľavých dolných končatinách pacientov a kontrolných subjektov. Proximálne lokalizovaná HŽT sa ukázala ako významný rizikový faktor pre alteráciu funkcie žilového systému dolných končatín v porovnaní s distálne lokalizovanou trombózou. Tento nález môže predstavovať dôležitý dôkaz pri vysvetľovaní patofyziológie poškodenia žilového systému dolných končatín. Zároveň má klinický význam pre manažment pacientov s prekonanou proximálnou flebotrombózou, pretože poukazuje na zvýšené riziko vzniku potrombotického syndrómu.

Naše výsledky korelujú s poznatkami iných štúdií, ktoré skúmali venóznu insuficienciu podobnými diagnostickými metódami. Fotopletyzmografia potvrdila schopnosť rozlíšiť regionálne zmeny v žilovom plnení, avšak oproti vzduchovej pletyzmografii je menej praktická kvôli zložitejšiemu spracovaniu a vyhodnocovaniu obrazových dát (8). Dynamická vzduchová pletyzmografia realizovaná pri chôdzi u pacientov s venóznym refluxom preukázala, že aj pri fyzickej záťaži pretrváva zhoršeniu funkcie žilového systému, čo poukazuje na jeho

poškodenie (9). V našej štúdii sme poškodenie žilového systému zaznamenali pomocou statickej vzduchovej pletyzmografie, a preto by bolo zaujímavé overiť, či by sa naše nálezy potvrdili aj pri použití dynamickej metódy v našom súbore pacientov.

Medzi limitácie našej štúdie patrí najmä nízky počet pacientov, vekový rozdiel medzi skupinou pacientov a kontrolnou skupinou. Nedostatkom je aj absencia dlhodobého sledovania, ktoré by umožnilo presnejšie posúdenie progresie venóznej dysfunkcie.

Záverom tejto štúdie je, že vzduchová pletyzmografia sa ukazuje ako efektívna metóda pri hodnotení venóznej funkcie u pacientov s rekurentnou HŽT. Naše výsledky podporujú význam pravidelného sledovania pacientov po extenzívnej a proximálnej HŽT s cieľom prevencie potrombotického syndrómu. Na základe týchto zistení by bolo vhodné stratifikovať pacientov s proximálne lokalizovanou HŽT, pričom dôraz by mal byť kladený na pravidelnú aplikáciu kompresívnej liečby, využitie intervenčných endovaskulárnych metód v akútnej fáze liečby extenzívnych HŽT, ako aj predĺženie antikoagulačnej liečby u rizikovej skupiny pacientov s nevyprovokovanou HŽT s cieľom minimalizovať riziko ďalšieho poškodenia venózneho systému dolných končatín.

Zoznam použitej literatúry

1. Sun CR, Liu MY, Ni QH, a spol.: Clinical Guidelines on Compression Therapy in Venous Diseases. Ann Vasc Surg 2025; 110(Pt B): 183-203.
2. Comerota AJ, Harada RN, Eze AR, Katz ML: Air plethysmography: a clinical review. Int Angiol 1995; 14(1): 45-52.
3. Maleti O, Nicolaides A, Guerzoni S, Bergamo G, Lugli M: Residual volume fraction during walking using wireless air plethysmography in patients with chronic deep venous disease. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord 2022; 10(2): 423-429.
4. Kurstjens RL, de Wolf MA, Alsadah SA, a spol.: The value of hemodynamic measurements by air plethysmography in diagnosing venous obstruction of the lower limb. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord 2016; 4(3): 313-319.
5. Siegal DM, Eikelboom JW, Lee SF, a spol.: Variations in incidence of venous thromboembolism in low-, middle-, and high-income countries. Cardiovasc Res 2021; 117(2): 576-584.
6. Visonà A, Quere I, Mazzolai L, a spol.: Post-thrombotic syndrome. Vasa 2021; 50(5): 331-340.
7. Advanced Medical Solutions. VLab [online]. 2024 [cit. 2025-04-04]. Dostupné z: https://www.amsolutions.cz/vlab
8. Badiola I, Seleng J, Silva D, a spol.: Low-cost camera-based assessment of venous hemodynamics in the lower limbs: a study on young healthy volunteers. Biomed Opt Express 2025; 16(2): 520-534.
9. Maleti O, Lugli M, Bergamo G, Nicolaides A. A Venous Hemodynamic Model and Measurement of Venous Reflux in the Lower Limb During Walking-Proof of Concept. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord. Publikované online Marec 20, 2025.

6. Effectiveness of Multimodal Analgesia in Postoperative Pain Management (Abdominal Surgery)

Abdulhamid Haydarov
(general medicine, 5. Year)

Supervisor: doc. MUDr. Roman Zahorec, CSc.
2nd department of anestesilogy and intensive medicine, Bratislava

Introduction

Postoperative pain remains a prevalent and challenging issue in patient care. Nearly 20% of surgical patients experience severe acute pain in the first 24 hours after surgery – a statistic that has changed little in decades [1]. Inadequately controlled pain not only impairs recovery and quality of life but also increases the risk of postoperative complications and persistent postsurgical pain [2].

Traditionally, opioid analgesics have been the mainstay for treating moderate to severe postoperative pain. However, reliance on opioids alone can lead to dose-limiting side effects such as respiratory depression, sedation, and gastrointestinal disturbances (nausea, vomiting, ileus), and carries risks of prolonged use or dependence [3]. These concerns have catalyzed a shift toward multimodal analgesia (MMA) – an approach combining multiple analgesic classes or techniques to achieve synergistic pain relief while sparing opioids.

Multimodal analgesia may include systemic non-opioid medications (e.g., NSAIDs, acetaminophen, local anesthetics, gabapentinoids) and regional anesthesia techniques (e.g., nerve blocks or epidurals) alongside opioids. By targeting different pain pathways, MMA can provide superior analgesia with lower doses of each agent, thereby reducing opioid requirements and opioid-related side effects [4].

Clinical evidence strongly supports MMA: randomized trials and reviews have demonstrated that combining analgesic modalities yields better pain control and decreased opioid consumption compared to a single modality [5]. Consequently, current pain management guidelines strongly recommend routine use of multimodal analgesia for postoperative pain whenever feasible [6].

This thesis examines the effectiveness of MMA by comparing pain control strategies in surgical patients receiving opioids alone versus those receiving opioids combined with an NSAID or a regional anesthetic block. We hypothesize that multimodal approaches will result in lower pain scores, reduced opioid use, and fewer opioid-related side effects without compromising recovery.

Methods

Study Design:

A retrospective comparative study was conducted at a tertiary hospital. Adult patients (≥18 years) undergoing major elective surgery between 2020 and 2024 were reviewed. Patients were grouped as follows:

1. Opioids Only (monotherapy)
2. Opioids + NSAIDs
3. Opioids + Regional Block (e.g., epidural, TAP block)

Patients receiving both NSAIDs and regional blocks or with chronic pain or opioid use were excluded. A total of 150 patients (50 per group) were analyzed.

Data Collection:

We collected demographics, surgery types, pain scores (0–10 NRS), 24h opioid use (converted to oral morphine equivalents), PONV incidence, sedation, and hospital length of stay (LOS). Pain scores were recorded at 8, 24, and 48 hours.

Statistical Analysis:

Means and standard deviations were used for continuous variables, compared via one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. Categorical variables were analyzed using chi-square or Fisher's exact tests. A p-value < 0.05 was considered significant.

Results

Groups were comparable in age (mean 55 ± 12 years), sex (52% male), and surgical type.

Pain Scores (24h): Opioids Only: 6.0 ± 2.0, Opioids + NSAIDs: 4.5 ± 1.5, Opioids + Regional: 3.5 ± 1.0 ($p < 0.001$)

Opioid Use (mg OME): Opioids Only: 50 ± 15, Opioids + NSAIDs: 30 ± 10, Opioids + Regional: 20 ± 8 ($p < 0.001$)

PONV Incidence: Opioids Only: 40%, Opioids + NSAIDs: 25%, Opioids + Regional: 15% ($p = 0.01$)

Length of Stay: No significant difference (mean ~3.5–4.0 days, $p = 0.18$)

Discussion

Multimodal analgesia significantly outperformed opioid monotherapy in pain control and opioid reduction. NSAID addition reduced opioid use by ~40%, while regional blocks reduced it by ~60%, with improved pain scores and lower side effect rates.

Our findings are consistent with multiple studies. Meta-analyses show NSAIDs reduce opioid use by 20–30% [7], and regional anesthesia provides superior pain control [8]. Guidelines from the American Pain Society and others strongly endorse MMA [6].

Though hospital stay length was similar across groups, reduced side effects and improved comfort support MMA's clinical value. MMA may also lower risks of long-term opioid use [9].

Limitations:
Retrospective design, moderate sample size, and absence of long-term outcome data.

Conclusion

Multimodal analgesia—either via NSAIDs or regional blocks—offers superior postoperative pain control, significantly reduces opioid use, and minimizes side effects compared to opioids alone. These findings support guideline recommendations and encourage widespread adoption of MMA in surgical care.

References

1. Small C, Laycock H. Acute postoperative pain management. Br J Surg. 2020;107(2):e70–e80.
2. Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, et al. Management of postoperative pain. J Pain. 2016;17(2):131–157.
3. Carter JA, Hunter TS, Smith DJ, Boyd RJ. Non-opioid analgesics meta-analysis. BMC Anesthesiol. 2020;20:272.
4. Wick EC, Grant MC, Wu CL. Multimodal pain strategies. JAMA Surg. 2017;152(7):691–697.
5. Ma CH, Tworek KB, Lau VI, et al. NSAIDs for post-op analgesia. Crit Care Explor. 2023;5(7):e0938.
6. Kessler J, Marhofer P, Hopkins PM, Hollmann MW. Peripheral anesthesia outcomes. Br J Anaesth. 2015;114(5):728–745.
7. Marret E, Kurdi O, Zufferey P, Bonnet F. NSAID effect on opioid side effects. Anesthesiology. 2005;102(6):1249–1260.
8. Memtsoudis SG, Poeran J, Zubizarreta N, et al. MMA impact on outcomes. Anesthesiology. 2018;128(5):891–902.
9. Cozowicz C, Gerner HD, Zhong H, et al. MMA and hysterectomy outcomes. J Clin Med. 2023;13(18):5431.

7. Remisia bez liečby - nový cieľ v manažmente pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou

Mária Lojová
(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: MUDr. Katarína Slezáková, PhD.
Klinika hematológie a transfuziológie LF UK a UN Bratislava

Úvod

Onkologické ochorenia majú veľký dopad ako na samotného človeka, tak aj na celosvetovú populáciu a štatisticky patria medzi jednu z hlavných príčin úmrtí. Chronická myelocytová leukémia (CML) patrí medzi myeloproliferatívne ochorenia. Determinujúcim faktorom kľúčovým pre diagnózu je nález Filadelfského chromozómu a/alebo patologického fúzneho génu BCR: :ABL1 v kostnej dreni (KD) a/alebo periférnej krvi (PK). Patrí medzi zriedkavé leukémie a väčšinou postihuje populáciu ľudí vo vekovej skupine od 49 do 60 rokov. Predstavuje asi 15 % leukémií vyskytujúcich sa u dospelých pacientov(4).

Do roku 2000 nebolo prežívanie pacientov optimálne a bez transplantácie KD išlo o fatálne ochorenie. V posledných dvoch desaťročiach sa prognóza pacientov s CML výrazne zlepšila, za čo vďačíme objaveniu a zaradeniu tyrozínkinazových inhibítorov (TKI) do liečby. Od roku 2001 sa v liečbe CML používa TKI 1. generácie imatinib, ktorý vo výsledku zlepšil prežívanie pacientov a aj v súčasnosti má stále svoje uplatnenie. Jeho výhodou v porovnaní s TKI 2. generácie je priaznivý bezpečnostný profil aj z dlhodobého hľadiska. Asi 1/3 pacientov však nevykazuje optimálnu liečebnú odpoveď na imatinib a z tohto dôvodu je u nich potrebné zmeniť liečbu na vyššiu líniu. Pre týchto pacientov sú v súčasnosti dostupné TKI druhej a tretej generácie. Vďaka objaveniu TKI sa dnes CML považuje za modelovú ukážku efektivity cielenej terapie (3).

S chronickou terapiou sa však spája množstvo nežiaducich účinkov (NÚ) a to najmä v súvislosti s rozvojom orgánovej toxicity, čo spôsobuje u pacientov dyskomfort a neraz vedie až k zmene terapie. Hoci sa dnes pacienti liečia ambulantne vďaka perorálne užívaným liekom, aj tak nedosahujú takú kvalitu života, akú má zdravá populácia. Chronická liečba sa ale nespája len s medicínskou toxicitou, no aj s takzvanou finančnou toxicitou - vysokou finančnou záťažou pre zdravotnícky systém. Novým cieľom v liečbe je preto možnosť treatment-free remisie (TFR), a to u pacientov so stabilnou hlbokou molekulovou odpoveďou. Posledné štúdie ukazujú, že vysadenie je bezpečné u istej skupiny pacientov a jej najdôležitejším podkladom je stabilná hlboká molekulová odpoveď (DMR) trvajúca aspoň 2 roky u pacientov v chronickej fáze CML pri liečbe TKI trvajúcej minimálne 3 roky (6).

Prvý krát prebehol pokus o vysadenie TKI v pilotnej štúdii (publikovaná the French CML group), ktorá ukázala, že koncept vysadenia TKI by mohol byť v určitej skupine pacientov dosiahnuteľný. Tento výsledok bol následne potvrdený v štúdiách ako STIM1, STIM2, TWISTER a ďalších (1, 2, 7, 8, 10, 12). S vývojom nových generácií TKI prišlo do úvahy si položiť aj otázku porovnania úspešnosti TFR u pacientov po liečbe druhogeneračným TKI oproti pacientom

liečených imatinibom. Vedecké štúdie poukazujú na mierne vyššiu efektivitu po liečbe druhogeneračným TKI a zároveň sa s frekvenciou liečby druhogeneračným TKI zvyšuje aj možnosť pokusu o TFR vďaka rýchlejšie dosiahnutej a hlbšej DMR.

Cieľom našej práce bolo retrospektívne identifikovať a vyhodnotiť NÚ TKI v súbore pacientov a zanalyzovať a porovnať priebeh TFR u pacientov za účelom poukázania na vyššiu úspešnosť udržania TFR po liečbe dasatinibom ako po liečbe imatinibom.

Materiály a metódy

V našej štúdii sme zvolili súbor 10 pacientov, tvorený 4 mužmi a 6 ženami, ktorým bolo diagnostikovaná CML od septembra 1999 do januára 2017. Pacientov sme vyberali v archíve Kliniky hematológie a transfuziológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice Bratislava (KHaT LFUK a UNB). Všetci pacienti splnili podmienky ELN z roku 2020 pre výber pacientov k TFR a zároveň boli informovaní o možných rizikách aj benefitoch súvisiacich s TFR. Kritériom pre výber pacientov bolo úspešné alebo neúspešné absolvovanie TFR a zároveň predchádzajúca liečba imatinibom resp. dasatinibom pred TFR. Priemerný vek súboru v čase diagnózy je 45 rokov a medián veku 44 rokov.

Pacientov sme ďalej rozdelili na dve skupiny. Prvú skupinu tvorili pacienti, ktorí vstupovali do TFR z prvolíniovej liečby a druhá skupina pozostávala z pacientov liečených druhou líniou TKI pred pokusom o TFR. Hodnotili sme ich rizikové skóre v čase diagnózy, komorbidity, dĺžku terapie, priebeh terapie, toxicitu terapie, druh TKI pred začiatkom TFR, dôvod prerušenia liečby, priebeh TFR (sledovaný na základe kompletnej hematologickej odpovede (CHR), DMR, kompletnej cytogenetickej odpovede (CCyR)), jej výsledok a zvolenú liečbu pri molekulovom relapse.

Tabuľka 1: Súhrn pacientov a druh TKI pred TFR

Pacienti	Pohlavie	Rok dg	Vek v čase dg	Fáza CML v čase dg	Rizikové skóre v čase dg podľa Sokala	Rizikové skóre v čase dg podľa EUTOS	1. línia liečby	2. línia liečby	3. línia liečby
1	Muž	2010	40r	CP	stredné	nízke	Imatinib	Nilotinib	Dasatinib
2	Žena	2009	17r	CP	nízke	nízke	Imatinib	Dasatinib	-
3	Muž	2017	45r	CP	nízke	nízke	Imatinib	-	-
4	Žena	2016	57r	CP	nízke	nízke	Imatinib	-	-
5	Žena	2012	60r	CP	nízke	nízke	Imatinib	-	-
6	Žena	2016	62r	CP	nízke	nízke	Imatinib	Dasatinib	-
7	Muž	2000	40r	CP	nízke	nízke	Imatinib	Dasatinib	-
8	Muž	1999	40r	CP	vysoké	vysoké	Imatinib	-	-
9	Žena	1999	43r	CP	nízke	nízke	Imatinib	Dasatinib	-
10	Žena	2006	46r	CP	nízke	nízke	Imatinib	-	-

Výsledky

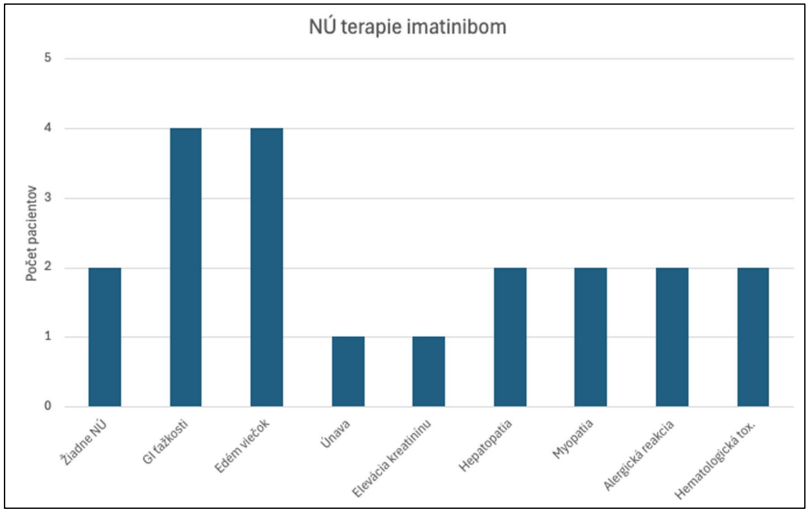
Medián celkovej dĺžky terapie súboru pacientov je 123 mesiacov (75 - 253 mesiacov). Iniciálne bol všetkým pacientom v prvej línii podávaný imatinib. Z rôznych dôvodov bol 5 pacientom do

liečby zavedený TKI 2. generácie, z toho 4 pacienti dostali dasatinib ako liečbu 2. línie a 1 pacient dostal dasatinib v 3. línii po predchádzajúcej liečbe nilotinibom.

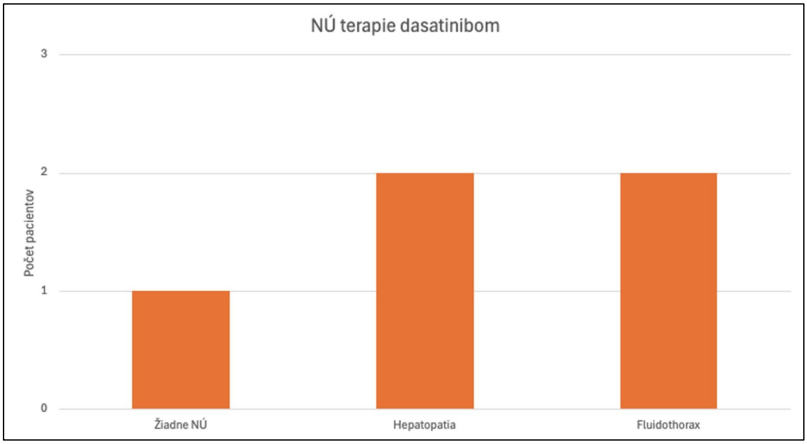
U 2 pacientov sa na prvogeneračnom TKI nevyvinuli žiadne ťažkosti. Nehematologická toxicita sa rozvinula u 80 % pacientov. 4 pacienti vykazovali ťažkosti vo forme gastrointestinálnej (GI) intolerancie v podobe nauzey, vracania a hnačiek. 1 pacient trpel únavou a neskôr sa pri odberoch dokázal aj mierne elevovaný kreatinín. 4 pacientom sa rozvinul edém viečok, ktorý u niektorých pacientov do pár hodín od podania zregredoval, u niektorých pretrvával počas celej terapie a u 2 pacientiek bol sprevádzaný aj slzením alebo zhoršením zraku. 2 pacientky sa prezentovali rôznym stupňom myopatie. Hematologická toxicita sa vyskytla u 2 pacientov vo forme leukopénie a neutropénie rôzne závažného stupňa.

U 1 pacienta sa v súvislosti s druhogeneračným TKI nevyskytli žiadne NÚ. Hepatopatia ľahkého stupňa sa vyskytla u pacientky č. 2 a pacienta č. 7. Najzávažnejším NÚ v súvislosti s liečbou dasatinibom bol rozvoj fluidothoraxu u pacienta č. 1 a pacientky č. 9. V obidvoch prípadoch sa pristúpilo k prerušeniu terapie s cieľom TFR a k liečbe boli pridané diuretiká, po ktorých fluidothorax zregredoval.

Nilotinib užíval pacient č. 1 a po 30 mesiacoch liečby udával ťažkosti sexuálneho charakteru, čo viedlo k zmene terapie na dasatinib.



Graf 1 Nežiaduce účinky imatinibu v súbore pacientov



Graf 2 Nežiaduce účinky dasatinibu v súbore pacientov

Začiatok TFR bol u pacientov zaznamenaný od novembra 2019 do marca 2024 a medián TFR nášho súboru je 10 mesiacov (3 - 58 mesiacov) . 80 % pacientov ukončilo liečbu z dôvodu toxicity terapie TKI, pacientke č. 2 bola po predchádzajúcej dlhoročnej liečbe TKI ukončená terapia na jej žiadosť a pacientke č. 10 bola liečba ukončená kvôli zníženiu NÚ sprievodnej chemoterapie pri adjuvantnej liečbe malígneho tumoru prsníka. Celková úspešnosť TFR v našom súbore je 60 %, čo znamená, že 6 z 10 pacientov sa podarilo udržať si DMR do konca nášho sledovania (september 2024). Z týchto 6 pacientov boli pred pokusom o TFR 4 pacienti liečení dasatinibom a 2 pacienti liečení imatinibom. Úspešnosť TFR v skupine pacientov liečených druhogeneračným TKI (dasatinibom) je 80 % (4/5 pacientov) a úspešnosť TFR v skupine pacientov liečených prvogeneračným TKI je 40 % (2/5 pacientov).

4 z 10 pacientov vykazovali v rôzne dlhom časovom okne od 3 do 11 mesiacov (medián = 6,5 mesiaca) incipientný molekulový relaps (MR3). 3 z nich boli pred pokusom o TFR liečení imatinibom a 1 pacientka dasatinibom. 3 zo 4 pacientov bol ako retreatment do liečby nasadený rovnaký typ TKI ako pred pokusom o TFR. Pacientke č. 4 bol s ohľadom na toxicitu v podobe klinicky závažnej myopatie nasadený ako retreatment TKI 2. generácie dasatinib. Všetci pacienti, ktorým bola nasadená retreatment terapia, promptne na liečbu zareagovali vo forme DMR, no aj napriek rýchlej odpovedi na liečbu bola u všetkých pacientov zachytená rôzna forma toxicity, ktorá sa objavila aj v predchádzajúcich rokoch počas aktívnej liečby TKI.

Diskusia

V predchádzajúcich rokoch sa zvažovalo zahrnutie rizikových skóre do podmienok pre pokus o TFR. V našom súbore 8 z 10 pacientov vstupovalo do TFR s nízkym Sokalovým aj EUTOS rizikovým skóre. 1 pacient mal v čase diagnózy intermediárne Sokalovo rizikové skóre a 1 pacient mal v čase diagnózy vysoké aj Sokalovo aj EUTOS rizikové skóre. Nepreukázali sme však výraznú súvislosť medzi rizikovým skóre a výsledkom TFR, čo môžeme dať do súvislosti

jednak s veľkosťou súboru, jednak s neistou súvislosťou rizikového skóre v čase diagnózy s výsledkom TFR, čo potvrdzuje aj nesúmernosť výberu prognostických faktorov naprieč odbornými štúdiami - kritériá podľa ESMO a Hughesa a Rossa zohľadňujú Sokalovo skóre pri výbere pacienta k TFR, no NCCN ani ELN Sokalovo rizikové skóre nezohľadňujú - ELN dáva prednosť najnovšiemu ELTS skóre (6).

Všetci pacienti s významnými NÚ liečby TKI po jej ukončení udávali výrazné zlepšenie príznakov až ich úplné odoznenie. Pacientom s pleurálnym výpotkom sa tekutina po ukončení liečby a pridaní diuretík do liečby promptne vstrebala. Príznaky aj po ukončení liečby pretrvávali len u pacientky s rozvinutou klinicky závažnou myopatiou, ktoré sa však po vysadení imatinibu nezhoršovali. Pacienti, u ktorých musela byť liečba znovu obnovená z dôvodu incipientného molekulového relapsu, udávali prinavrátenie ťažkostí po znovuobnovení liečby a pacientke s myopatiou, aj napriek zmene imatinibu na dasatinib, progreduje zhoršovanie symptomatiky. Na súbore pacientov sa dá pozorovať fluktujúci výskyt NÚ, ktorý kolíše spolu so zmenami v terapii - pri chronickej liečbe sa výskyt NÚ u pacientov zvyšoval a klinické prejavy naberali s časom na intenzite, po ukončení liečby prejavy postupne ustupovali a po retreatmente sa príznaky začali u pacientov znovu objavovať.

V rámci analýzy súboru sme sa zamerali aj na porovnanie efektivity TFR po liečbe imatinibom, resp. dasatinibom. Podľa našich zistení úspešnosť TFR po imatinibe bola 40 % (2/5 pacientov si zachovali DMR) v porovnaní po dasatinibe 80 % (4/5 pacientov si zachovali DMR). V porovnaní s odbornými štúdiami nám vyšli korelujúce výsledky, jedine v prípade dasatinibu boli výsledky nadhodnotené, pravdepodobne v súvislosti s malým počtom pacientov (1, 2, 7, 8, 9). V štúdii sme preukázali, že pacienti liečení druhogeneračným dasatinibom si udržiavali dlhšiu a hlbšiu DMR ako pacienti v TFR po liečbe imatinibom. Tento významný fakt môže v budúcnosti smerovať k liečbe pacientov pred TFR druhogeneračným dasatinibom, čo by mohlo významne ovplyvniť spektrum pacientov vhodných k TFR. Stále však treba zvážiť risk verzus benefit, keďže dasatinib má síce menšie spektrum, ale za to väčšiu závažnosť NÚ ako imatinib.

Z odborných štúdií ako aj z nášho pozorovania konštantujeme, že TFR má podstatné miesto v manažmente pacienta s CML. Pri každom pacientovi je však potrebné zvážiť benefit verzus riziko ukončenia terapie, zvoliť personalizovaný prístup ku každému pacientovi a poctivo sledovať hĺbku DMR počas TFR. Zároveň, pokiaľ sa u pacienta vyskytne incipientný molekulový relaps, je potrebné promptne ukončiť TFR a opäť zahájiť liečbu TKI.

Zoznam použitej literatúry

1. Cortes, J., Rea, D., Lipton, J. H. Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors. American Journal of Hematology. 2019, 94 (3): 346- 357.
2. Etienne, G., et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. Journal of Clinical Oncology. 2017, 35(3): 298-305.
3. García-Gutiérrez, V., Hernández-Boluda, J. C. Tyrosine Kinase Inhibitors Available for Chronic Myeloid Leukemia: Efficacy and Safety. Front Oncol. 2019, 9: 603
4. Greksák, R. Chronic myeloid leukemia and its treatment in patients with repeated intolerance of tyrosine kinase inhibitors. Onkológia. 2020, 15 (2): 140- 144.

5. Han, J. J. Treatment-free remission after discontinuation of imatinib, dasatinib, and nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia. Blood research. 2023, 58 (1): 58-65.
6. Hochhaus A., et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2020, 34 (4): 966- 984.
7. Kumagai, T., et al. Discontinuation of Dasatinib after Deep Molecular Response for over 2 Years in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia and the Unique Profiles of Lymphocyte Subsets for Successful Discontinuation: A Prospective, Multicenter Japanese Trial (D-STOP Trial). Blood. 2016, 128 (22): 791.
8. Perusini, M. A., et al. Final report of TKI discontinuation trial with dasatinib for the second attempt of treatment-free remission after failing the first attempt with imatinib: Treatment-free Remission Accomplished by Dasatinib (TRAD) study. British Journal of Haematology. 2023, 203 (5): 781- 791.
9. Ross, D. M., et al. Long-Term Follow-up of the ALLG CML8 Twister Study of Treatment-Free Remission (TFR) in Patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML). Blood. 2017,130 (1): 1597.
10. Rousselot, P., et al. Late molecular recurrences in patients with chronic myeloid leukemia experiencing treatment-free remission. Blood Advances. 2020, 4 (13): 3034-3040.
11. Saussele, S., et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. The Lancet Oncology. 2018, 19 (6): 747- 757.

8. Vplyv stresu na akademickú úspešnosť študentstva na skúške z fyziológie

Tomáš Bezák
(všeobecné lekárstvo, 4.ročník)

Školiteľ: RNDr. Jaroslava Babková, PhD.
Fyziologický Ústav

Úvod

Definovať stres sa pokúšalo už mnoho autorov, každým rokom sú stabilné definície vyvracané rôznymi štúdiami. V súčasnosti sa stres často opisuje ako komplexná reakcia organizmu na vonkajšie alebo vnútorné podnety, ktorých intenzita presahuje schopnosť bežných kompenzačných mechanizmov tela. Táto reakcia zahŕňa fyziologické, emocionálne a behaviorálne zmeny, ktoré pripravujú jedinca na zvládnutie záťažovej situácie (Mravec, Blažíček, Kvetňanský, 2016). Stres predstavuje všeobecne prítomný fenomén. Takmer každý jedinec sa denne stretáva s pôsobením stresorov – podnetov, ktoré vyvolávajú stresovú reakciu. Aj keď sa môže zdať, že stres predstavuje niečo negatívne, samotná stresová reakcia je veľmi dôležitá v prípade, že organizmu hrozí nebezpečenstvo. Nebezpečným sa stres stáva vtedy, keď na organizmus pôsobí dlhodobo (Mravec, 2011). Etiológia stresorov sa však v dnešnej dobe presúva z tých evolučne starších a prirodzenejších (hypoglykémia z hladovania alebo zachovanie telesnej teploty v extrémnych teplotách) skôr k tým psychosociálnym. Medzi psychosociálne stresory zaraďujeme psychologické, napr. pocity beznádeje, úzkosti, depresiu, a sociálne, ako napr. narušené pracovné vzťahy a pod.

Študenti medicíny, sú veľmi špecifickí, vzhľadom na pôsobenie dĺžky a intenzity stresu na nich. Jedna štúdia ukázala, že študenti medicíny zažívajú vyššie úrovne stresu v porovnaní so študentmi iných profesijných odborov. Hlavnými zdrojmi stresu sú akademický tlak, obrovské množstvo učiva a neustály tlak na výkon (Aamir 2017). Študenti medicíny sú neustále pod tlakom, aby dosahovali vynikajúce výsledky, čo vedie k porovnávaniu sa s ostatnými a k zvýšenej miere úzkosti. (Khatake, Twinkle, a Salgar 2022). Ranné vstávanie na vizity, nočné služby a neustály kolobeh prednášok a stáží spôsobujú stres, najmä keď sa kombinuje s písaním správ a hodnotením zo strany učiteľov. Rodinné očakávania, ekonomický tlak a obmedzený čas na voľnočasové aktivity tiež prispievajú k vysokému stresu. (Kiatkittpong 2017). Veľkým problémom v dnešnej dobe, ktorý si často veľa ľudí neuvedomuje, je množstvo a hlavne dostupnosť informácií v medicíne. Obrovské množstvo informácií je neustále vyvracaných, spochybňovaných, a teda neaktuálnych, čo prispieva k frustrácii študentov, a tým aj k chronickému stresu.

Otázkou však ostáva, ako čo najobjektívnejším spôsobom zmerať stres, ktorý pôsobí na študentov medicíny. Istou možnosťou sa ukázala byť variabilita srdcovej frekvencie (*heart rate variability-HRV*), Štúdia na medikoch ukázala, že počas stresujúcich skúšok dochádza k zníženiu HRV, čo znamená vyššiu sympatickú aktivitu a stresovú reakciu organizmu. Analýza HRV môže byť preto efektívnym spôsobom na objektívne hodnotenie stresu u študentov

medicíny počas akademického roka (Kumar, Agarwal, a Gautam 2013). HRV (je indikátor autonómneho nervového systému a odráža rovnováhu medzi sympatickou (stresová reakcia) a parasympatickou (relaxačná) aktivitou. Vyššia HRV naznačuje lepšiu schopnosť tela reagovať na stres a zotaviť sa, zatiaľ čo nižšia HRV súvisí s chronickým stresom a vyčerpaním (Kaur et al. 2014).

Vplyv stresu na pohodu a psychické zdravie je celosvetovo kľúčovou témou a stáva sa aj predmetom vedeckého záujmu. Medici predstavujú citlivú skupinu, vystavenú zvýšeným nárokom a tlaku. Zahraničné univerzity sa postupne zaväzujú k tomu, aby sa starali nielen o výuku študenta ale aj o ich psychickú pohodu. Na Slovensku doposiaľ podobný zámer chýbal. Cieľom nášho projektu je preto zmapovať prežívanie stresu v populácii študentstva medicíny 2 ročníka a dopad stresu n ich akademickú úspešnosť stanovili sme si nasledovné čiastkové ciele:

1. Posúdiť mieru subjektívneho prežívania stresu na základe vybranej série dotazníkov.
2. Zmerať aktuálne prežívanie stresu objektívnym meraním parametrov HRV
3. Pozrieť sa na to, ako stres ovplyvňuje ich akademickú úspešnosť.
4. Informovať a edukovať o dôležitosti prevencie a stres manažmentu

Naše hypotézy sú:

H1: Muži a ženy sa líšia v prežívaní stresu na základe dotazníkov

H2: Muži a ženy sa líšia v prežívaní stresu na základe objektívnych meraní HRV parametrov

H3: Prežívanie stresu koreluje s akademickým skóre dosiahnutým na skúške z fyziológie

Metódy

Účastníci štúdie

Štúdia bola realizovaná na študentstve 2. ročníka všeobecného lekárstva. Do štúdie zapojilo 196 žien (priemerný vek 20,97 ± 1,40) a 65 mužov (priemerný vek 21,18 ± 2,66). Všetci probandi súhlasili s účasťou na štúdii podpísaním informovaného súhlasu, v ktorom boli informovaní o účele štúdie a všetkých postupoch.

Psychologické dotazníky:

Škála úzkosti (STAI-X1) (Spielberger, Gorsuch, a Lushene 1970)zachytáva aktuálnu úroveň zažívanej úzkosti. Jedná sa o 20-položkový dotazník s vlastným hodnotením, hodnotený na štvorbodovej Likertovej škále. Používame celkové skóre, pričom vyššie skóre naznačuje vyššiu úroveň úzkosti. Rozsah skóre je 20-80.

Škála vnímaného stresu *PSS-10* meria ako ľudia vnímajú svoj život ako nepredvídateľný, nekontrolovateľný a zaťažujúci za posledný mesiac. Je to dotazník s 10 otázkami, hodnotené na päťbodovej Likertovej škále(Journal of Health and Social Behavior 1983b)

Neuroticizmus ako tendencia prežívať negatívne emócie ako úzkosť, hnev, smútok a ďalšie bola hodnotená dotazníkom *NEO-FFI* (Ruisel, Halama, 2007). Seba-výpoveďový dotazník obsahujúci 12 otázok. Vychádzajúc z Big-five teórie osobnosti, táto škála chápe neuroticizmus ako osobnostnú črtu.

Meranie variability srdcovej frekvencie

Tri EKG elektródy boli upevnené v ľahu na vyšetrovacej posteli v oblasť zápästia ľavej a pravej ruky pričom poslednú, tretiu elektródu, sme upevnili na ľavú nohu v oblasti členku. Samotné EKG prebiehalo 5 minúť v ľahu. EKG záznamy boli získané pomocou vysokovýkonného hardvéru pre získavanie dát PowerLab 26T Model ML856 a počítačového softvéru LabChart 7 verzia 7.1 (oba poskytnuté spoločnosťou ADInstruments, Austrália). Záznam bol vyhodnotený pomocou počítačového softvéru Kubios HRV Scientific 4.1.1 (Kubios oy, Fínsko). Pre úplnú jednoduchosť sme si zo všetkých parametrov zvolili STRESS INDEX, ktorý je priamo počítane softvérom a zrkadlí celkovú mieru stresu ktorý prežíva kardio vaskulárny systém jedinca.

Akademická úspešnosť

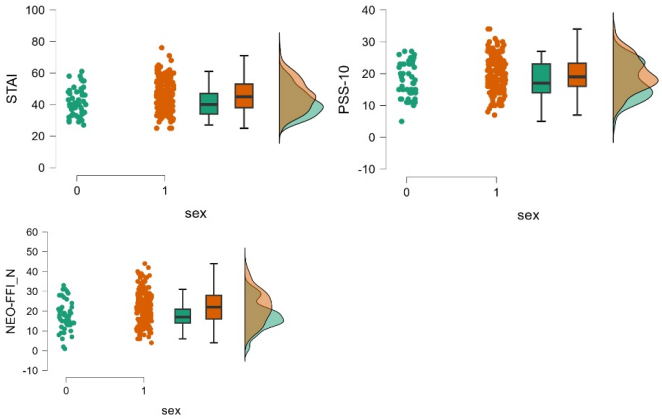
Koeficient úspešnosti na skúške z fyziológie bol vypočítaný na základe aktuálnej známky a počtu pokusov potrebných na úspešné zvládnutie skúšky. Známka A reprezentuje 1, B - 1,5, C - 2, D - 2,5, E – 3. Ak bola skúška urobená v riadnom termíne (na prvý krát), ku koeficientu známky bola pripočítaná nula, ak na druhý krát, tak bola k hodnoteniu pripočítaná 1, a v prípade že bola skúška urobená až na tretí pokus, tak skóre bolo zvýšené o 2. Známka C na tretí pokus zodpovedá skóre 4. Čím nižšia hodnota akademického skóre, tým je jedinec úspešnejší.

Štatistická analýza

Vzhľadom na nenormálnu distribúciu dát boli na analýzy použité neparametrické testy. Rozdiely boli hodnotené Mann-Whitney testom. Korelácie boli analyzované Pearsonovým korelačným testom. Hladina významnosti bola P menšia ako 0,05

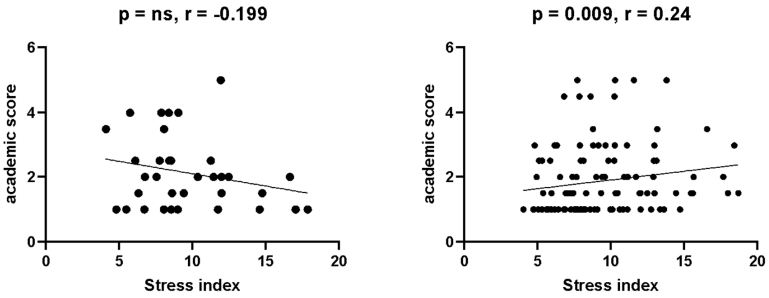
Výsledky

Na základe dotazníkových odpovedí sme potvrdili medzipohlavné rozdiely v miere prežívaného stresu. Štatistické rozdiely boli prítomné pri dotazníku STAI = aktuálna úzkosť (Mann Whitney test, 3412.5, P= 0.003) aj pri PSS-10 =stres za posledný mesiac (Mann Whitney, 3667.5, p = 0.018). Taktiež bol štatisticky signifikantný rozdiel v miere neurotizmu medzi pohlaviami (Mann Whitney test, 3284.0, P= 0.001)



Obrázok 1: Porovnanie mužov a žien v prežívaní stresu reportovaný dotazníkmi. 0-muži, 1-ženy.

Výsledky prežívania stresu merané objektívnymi metódami parametrami HRV neboli štatisticky signifikantné. Porovnali sme stress index priamo nameraný z HRV analýzy u mužov a žien bez významného rozdielu (p >0.05). Naša druhá hypotéza očakávajúca prítomné rozdiely aj v objektívne meraných parametroch nebola potvrdená. (grafy pre obmedzený rozsah práce neuvádzame)



Obrázok 2: Korelácie medzi stres indexom nameraného priamo z HRV analýzy a akademickým skóre. U žien (vpravo) je štatisticky významný vzťah medzi STRESS INDEX-om a akademickou úspešnosťou. Čím viac stresu tým horšie akademické skóre U mužov (vľavo) vzťah medzi STRESS INDEX-om a akademickým skóre nie je štatisticky významný, ale naznačuje opačný trend ako u žien

Miera objektívne prežívaného stresu, ktorú reflektuje tzv. STRESS INDEX bola korelovaná s dosiahnutým akademickým skóre na skúške z fyziológie. Tu sa ukazujú rozdiely v populácii mužov a žien. U mužov (obrázok 2 vľavo) vidíme nesignifikantný trend naznačujúci, že čím vyšší STRESS INDEX u mužov, tým lepšie akademické skóre, ktorý však neprekonal hladinu významnosti. U žien (obrázok 2 vpravo) je štatisticky významná závislosť, ktorá ukazuje že čím vyšší STRESS INDEX u ženy, tým horšie akademické skóre.

Diskusia

Na základe dotazníkov prežívania stresu sme potvrdili, že ženy prežívajú signifikantne vyššiu mieru krátkodobého aj dlhodobého stresu a majú vyššiu tendenciu k neurotickejšiemu správaniu a prežívaniu ako muži. Ženy častejšie používajú emocionálne zvládanie (napr. hľadanie sociálnej podpory), zatiaľ čo muži majú tendenciu riešiť stres aktívnym riešením problémov alebo vyhýbaním sa stresovým situáciám (Tamres, Janicki, a Helgeson 2002). Aj keď v otázke vplyvu hormónov na CNS a psychiku stále prevláda viac nepoznaného, existujú dôkazy, že rozdiely v stresovej reakcii medzi mužmi a ženami môžu byť čiastočne vysvetlené hormonálnymi faktormi, ako je vplyv estrogénu a kortizolu(Kajantie a Phillips 2006).

Hoci dotazníkové metódy sú štandardizované a poskytujú cenné informácie o individuálnom prežívaní, ich spoľahlivosť môže byť ovplyvnená rôznymi faktormi, ako sú osobnostné črty respondentov alebo ich momentálny psychický stav. Z tohto dôvodu bola v rámci tejto štúdie zvolená aj objektívnejšia metóda, ktorá umožňuje presnejšie kvantifikovať skúmané premenné a eliminovať potenciálne skreslenie spojené so subjektívnym hodnotením. Z merania HRV sme získali tzv. stress index, ktorý odzrkadľuje mieru prežívania stresu. Medzi pohlaviami nebol pozorovaný žiadny štatisticky významný rozdiel v hodnotách prežívaného stresu. Možným vysvetlením je, že v našom súbore mužov a žien boli všetko mladí, zdraví ľudia bez akejkoľvek patológie. Mladý a zdravý kardiovaskulárny systém dokáže tolerovať a adaptovať sa na stresové podmienky. Napriek tomu že prežívajú muži a ženy stres rôznou mierou, tento fakt sa neprejaví na HRV aktivite a preto sme nepozorovali rozdiely v stress indexe u mužov a žien. Zároveň je potrebné spomenúť metodickú limitáciu. Čas merania vzhľadom na akademický harmonogram, keďže študenti boli meraní na začiatku semestra, kedy je tendencia vnímania stresu všeobecne nižšia ako ku koncu, keď sa blíži skúškové obdobie, kedy by sa teoreticky isté rozdiely mohli demonštrovať viac.

Pri korelácii stress indexu s mierou akademickej úspešnosti sme ukázali, že u žien vyššia miera prežívaného stresu negatívne ovplyvňuje akademickú úspešnosť. Teda čím menší stres medičky pociťovali, tým lepšie na skúške obstáli. U mužov sme nepreukázali signifikantný vzťah. Pozorovali sme však trend opačný. Čím bol stress index vyšší, tým lepší výsledok daný študent dosiahol. U študentov medicíny istá miera stresu môže fungovať ako motivácia zvyšujúca efektívnosť a produktivitu pri skúške. Naopak ženám medičkám akademický stres skôr škodí.

Veríme, že výsledky tejto práce pomôžu k vytvoreniu intervencií, ktoré špecificky pomôžu v zvládaní stresu a celkovo povedú k zlepšeniu kvality života študentstva a zlepšeniu ich výkonnosti.

Zoznam použitej literatúry

1. Aamir, Iram. 2017. "Stress Level Comparison of Medical and Nonmedical Students: A Cross Sectional Study done at Various Professional Colleges in Karachi, Pakistan". *Acta Psychopathologica* 03 (január). https://doi.org/10.4172/2469-6676.100080.
2. Journal of Health and Social Behavior. 1983a. *Perceived Stress Scale (Cohen, 1983)*. http://archive.org/details/cohen1983.
3. Kajantie, Eero, a David I. W. Phillips. 2006. "The Effects of Sex and Hormonal Status on the Physiological Response to Acute Psychosocial Stress". *Psychoneuroendocrinology* 31 (2): 151–78. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.07.002.
4. Kaur, Balvinder, Joseph J. Durek, Barbara L. O'Kane, Nhien Tran, Sophia Moses, Megha Luthra, a Vasiliki N. Ikonomidou. 2014. "Heart rate variability (HRV): an indicator of stress". V *Independent Component Analyses, Compressive Sampling, Wavelets, Neural Net, Biosystems, and Nanoengineering XII*, 9118:177–84. SPIE. https://doi.org/10.1117/12.2051148.
5. Khatake, Pratima, Havilah Twinkle, a Akshay Salgar. 2022. "Stress among medical students and its impact on academic performance". *Biomedicine*. https://doi.org/10.51248/.v42i3.1212.
6. Kiatkittpong, ŏNisa. 2017. "Factors associated with stress in medical students" 28:1–7.
7. Kumar, Yogesh, V. Agarwal, a Savita S. Gautam. 2013. "Heart Rate Variability During Examination Stress in Medical Students". *International Journal of Physiology*. https://www.semanticscholar.org/paper/Heart-Rate-Variability-During-Examination-Stress-in-Kumar-Agarwal/b0e99eb7f7d2ffe73d9ecf58cde9e7038c30b372?utm_source=consensus.
8. Matud, M. Pilar. 2004. "Gender differences in stress and coping styles". *Personality and Individual Differences* 37 (7): 1401–15. https://doi.org/10.1016/j.paid.2004.01.010.
9. Ponnamperuma, G. 2014. "The curriculum of a 21st century Medical College". V . https://www.semanticscholar.org/paper/The-curriculum-of-a-21st-century-Medical-College-Ponnamperuma/31c00318ef040afcb16a850366b4a249e783f7c3?utm_source=consensus.
10. Spielberger, C., R. Gorsuch, a R. Lushene. 1970. "Manual for the State-Trait Anxiety Inventory". V . https://www.semanticscholar.org/paper/Manual-for-the-State-Trait-Anxiety-Inventory-Spielberger-Gorsuch/e6d09d04fc8737094c193da471e2a50a809f77d4.
11. Tamres, Lisa K., Denise Janicki, a Vicki S. Helgeson. 2002. "Sex Differences in Coping Behavior: A Meta-Analytic Review and an Examination of Relative Coping". *Personality and Social Psychology Review* 6 (1): 2–30. https://doi.org/10.1207/S15327957PSPR0601_1.

9. Prítomnosť mikroplastov v ľudskej placente: Detekcia a lokalizácia pomocou Nile Red farbenia a fluorescenčnej mikroskopie

Martin Vrždiak
(všeobecné lekárstvo, 4. ročník)

Školiteľ: MUDr. Miriam Bollová
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB

Úvod:

Prítomnosť mikroplastov v ľudských tkanivách vyvoláva rastúce obavy z ich možných negatívnych účinkov na zdravie. Je mnoho foriem ako sú mikroplasty (MP) prijímané do ľudského organizmu. Nachádzajú sa vo vode, pôde neskôr sa stávajú súčasťou potravinového reťazca, čím postupne môžu mať nepriaznivý účinok na organizmus (1). V ľudskom tele boli mikroplasty detegované v rôznych štúdiách v kardiovaskulárnom, tráviacom, endokrinnom, dýchacom, lymfatickom aj urogenitálnom systéme. Boli nájdene aj v biologických materiáloch ako sú napríklad materské mlieko, mekónium, ejakulát, spútum, stolica alebo moč (2). Okrem toho, že MP môžu predstavovať vektory pre iné toxické látky, jedným z opísaných negatívnych vplyvov MP na bunkovej úrovni je mechanizmus zvyšovania oxidačného stresu prostredníctvom kyslíkových radikálov a to často po ich fagocytovaní makrofágmi, ktorej môžu podliehať MP veľkosti až do 0,5µm (3, 4).

Mikroplasty môžeme klasifikovať podľa niekoľkých kritérií a to podľa veľkosti samotných častíc na nanoplasty (5) rozmerov do 1000nm a mikroplasty (6) v rozmedzí 1µm-5mm, a taktiež podľa genézy ich vzniku na primárne, ktoré sú zvyčajne produktami častíc, ktoré už vznikajú ako nízko-rozmerové (napríklad mikrovlákna zo syntetických materiálov) a sekundárne - vznikajúce degradáciou alebo fragmentáciou väčších plastových partikúl.

Základom našej štúdie sa stala metóda farbenia MP pomocou Nile Red. Hoci metóda NR farbenia bola úspešne aplikovaná na environmentálne vzorky, ako aj na rôzne potraviny a spotrebiteľské produkty, jej aplikácia na biologické materiály, ako sú animálne modely a tkanivové homogenizáty, zostala menej preskúmaná. Chýba jednotný prístup na spracovanie biologických vzoriek, čo môže viesť k obmedzenej spoľahlivosti metódy pri detekcii MP v zložitejších biologických vzorkách. Metóda ešte nebola plne validovaná pre prípadové štúdie zahŕňajúce analýzu MP v biologických systémoch, čo predstavuje dôležitý krok v jej ďalšom vývoji (7). V tomto výskume sme sa zamerali na optimalizáciu farbenia vzoriek bez narušenia architektoniky placentárneho tkaniva a následnú, presnú lokalizáciu MP v kruciálnych štruktúrach placenty.

Placenta ako kľúčový orgán zachovania gravidity je zložená ako z maternálnej tak fetálnej tkanivovej zložky. Predstavuje viacmembránovú bariéru medzi materským organizmom a plodom. Časť maternice sa po zahniezdení zárodku transformuje a diferencuje na deciduálnu platničku, ktorá v ďalšom vývine predstavuje materskú časť placenty. Fetálnou štruktúrou placenty je choriová platnička z ktorej vyrastajú terciárne chóriové klky (8). Akýkoľvek

patologický proces v placentárnom tkanive môže zásadne ovplyvniť priebeh gravidity a zdravie plodu, s následkom prenatálneho úmrtia alebo inej závažnej komplikácie. Je kľúčovým orgánom procesov imunitnej tolerancie, prestupu dýchacích plynov, nutrientov a odpadových látok medzi vyvíjajúcim sa plodom a jeho matkou (9). Pracuje súčasne aj ako orgán s vnútornou sekréciou a v rámci tejto funkcie od druhého trimestra produkuje hormóny preberajúce funkciu žltého telieska, ktoré sú nevyhnutné pre kontinuálny priebeh gravidity (8). Z histologického pohľadu je placenta komplexný orgán a skladá sa z množstva rozličných buniek, z ktorých má každá inú úlohu. V našom výskume sme sa zamerali na základné stavebné a funkčné jednotky placentárneho tkaniva ako sú placentárne klky, intervilózny priestor a maternálna zložka placenty. Práve v týchto pre fyziologický vývoj plodu esenciálnych štruktúrach dochádza k detekcií MP.

Materiál a metódy:

Pri výskume sme použili 20 vzoriek biopticky odobraného placentárneho tkaniva, ktoré boli fixované v 10% formalíne (4% roztok formaldehydu) a zaliate do parafínových bločkov. Parafínove bločky boli štandardným postupom odparafínované a mikrotómom spracované na histologické rezy aplikovateľné na podložné sklo. Pre výskum bolo použitých 10 vzoriek placentárneho tkaniva, zahŕňajúcich prípady s patologickými zmenami ako sú chorioamnionitída, infarkt placenty, hematóm, kompletná mola, malperfúzia a mezenchymálna dysplázia. Zvyšných 10 použitých vzoriek pochádzalo z fyziologického tehotenstva a nevykazovalo výraznejšie patologické zmeny.

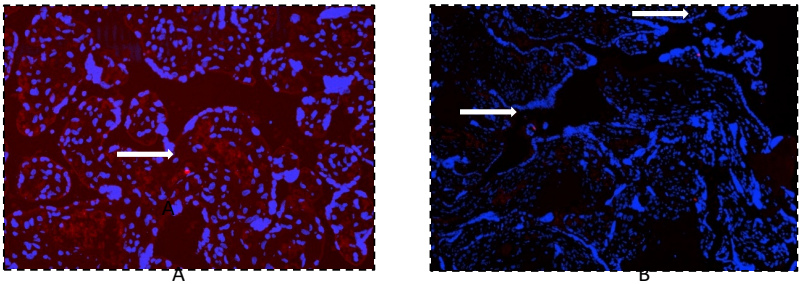
Zásobný roztok NR (10 mg NR v 1 ml DMSO) bol pred použitím inkubovaný po dobu jednej hodiny pri teplote 50-60 stupňov Celzia. V prvej fáze farbiaceho postupu bolo nevyhnutné eliminovať agregáciu farbiva Nile Red (NR) optimalizáciou jeho riedenia. Za týmto účelom boli otestované viaceré experimentálne varianty. Roztok obsahujúci 25 % DMSO riedený etanolom s koncentráciou NR 35 ug/ml sa preukázal ako najvhodnejší, a to vzhľadom na výrazne nižšiu mieru agregácie farbiva a kvalitnejší výsledný fluorescenčný signál. Bioptické vzorky placenty pripravené vo forme 3 ug hrubých rezov boli inkubované v kyvete vo vertikálnej polohe 2 hodiny v termostate pri teplote 55 stupňov Celsia a následne opláchnuté etanolom pri izbovej teplote za účelom odstránenia prebytočného farbiva. Na suchý povrch rezu bol následne aplikované fluorescenčné prikrývacie médium s DAPI (Vector laboratories, Newark, Kalifornia, USA). Takto pripravený materiál sa skladoval pri teplote 4°C, v tmavom prostredí až do vizualizácie fluorescenčným mikroskopom.

Vizualizáciu a kvantifikáciu vzoriek sme realizovali prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie s použitím filrov TRITC (570-580nm)/ DAPI (461nm) pri 200 násobnom zväčšení na 30 zorných polí. Vo výsledku sme boli schopní identifikovať častice so zvýšením fluorescenčným signálom než má okolité tkanivo a to v rozličných štruktúrach placenty. Tieto partikuly signálom, tvarom ale aj veľkosťou zodpovedajú MP identifikovaným v iných štúdiách (6).

Výsledky:

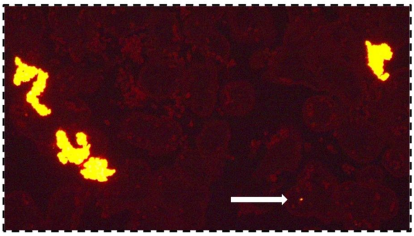
Z celkovo 1140 hodnotených zorných polí boli častice so zvýšením fluorescenčným signálom lokalizované v klkoch, intervilóznom priestore, bunkách extravilózneho trofoblastu, decidui, stenách ciev a perivaskulárnom prostredí. V celkovo 10 patologických vzorkách placenty bolo

vizualizovaných 219 partikúl vyššieho fluorescenčného signálu. Z toho sa nachádzalo 154 častíc v klkoch (tvoriac 70% celkového počtu častíc), 17 v extravilóznom trofoblaste (8%), 16 v bunkách decidui (7%), 29 v intervilóznom priestore (13%) a 3 priamo v stenách ciev (2%).



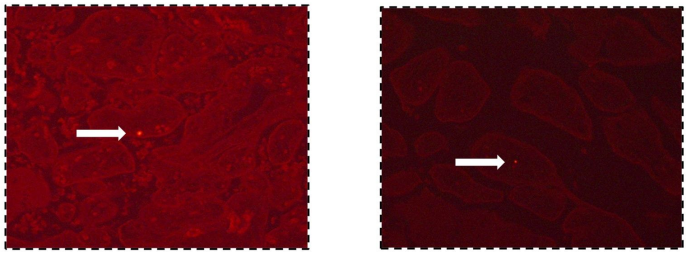
A B

Obr. A, B Vizualizácia častíc menších ako 8µm DAPI (461nm)



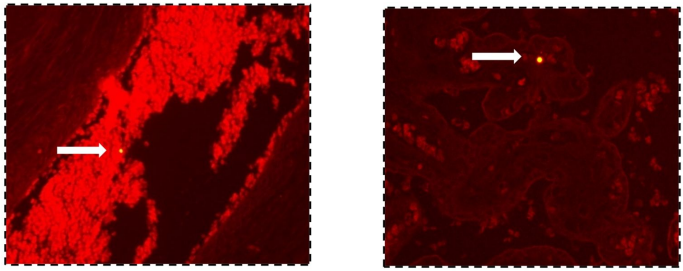
C

Obr. C Vizualizácia častíc väčších ako 8 µm TRITC (570-580nm) bola hodnotená ako kontaminácia v porovnaní s v tkanive umiestnenými časticami menšími ako 8 µm (biela šípka)



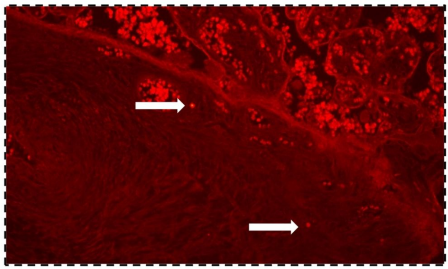
D E

Obr. D, E Vizualizácia častíc TRITC (570-580nm) v placentárnych klkoch



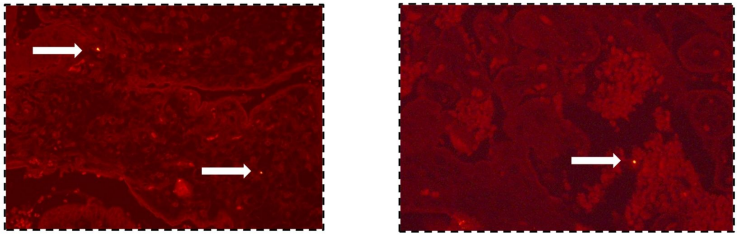
F G

Obr. F, G Vizualizácia častíc TRTC (570-580nm) intravaskulárne

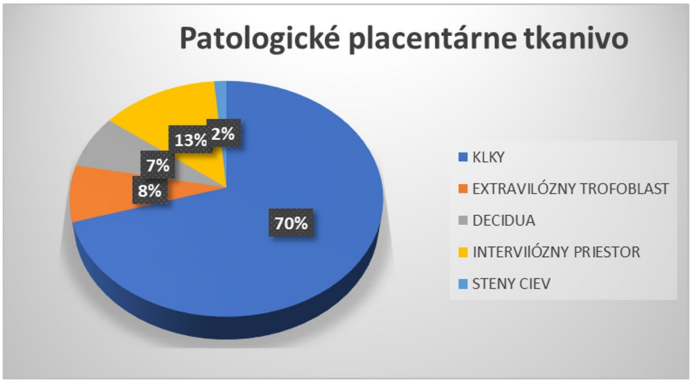


H

Obr. H Vizualizácia častíc TRTC (570-580nm) v perivaskulárne

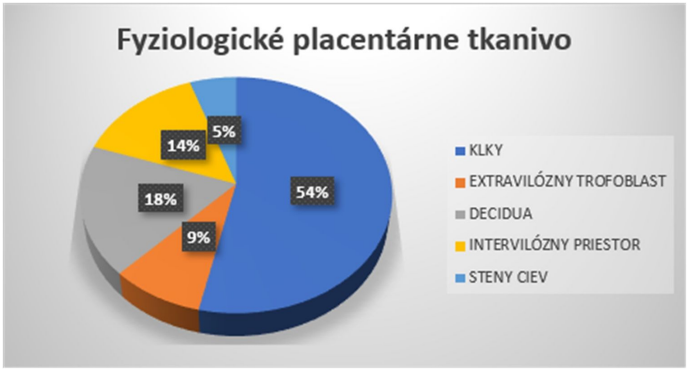


Obr. I, J Vizualizácia častíc TRTC (570-580nm) v extravilóznom trofoblaste (I) a intervilóznom priestore (J)



Graf. 1 Výskyt partikúl v patologicky zmenenom placentárnom tkanive

Vo fyziologických vzorkách placentárneho tkaniva (690 zorných polí) sa nachádzalo 624 častíc, a to 334 v klkoch (54%), 55 v extravilóznom trofoblaste (9%), 112 v bunkách decidui (18%), 90 v intervilóznom priestor (14%) a 33 v stenách ciev (54%).



Graf. 2 Výskyt partikúl v placentárnom tkanive bez prítomnej patológie

V patologicky zmenených vzorkách tkaniva sa priemerne vyskytovalo na jednu vzorku 14,6 častíc a to 10,26 v klkoch, 1,13 v extravilóznom trofoblaste, 1,06 v bunkách decidui, 1,93 v interilóznom priestore a 0,2 v stenách ciev.

Vo fyziologických placentárnych vzorkách tkaniva sa v priemere vyskytovalo na jednu vzorku 27,1 častíc a to 14,52 v klkoch, 2,39 v extravilóznom trofoblaste, 4,86 v bunkách decidui, 3,91 v interilóznom priestore a 1,43 v stenách ciev.



Graf. 3 Porovnanie celkového priemerného výskytu častíc v placentárnych vzorkách

Diskusia

Viaceré štúdie identifikovali prítomnosť mikroplastov (MP) v tkanive a kvantifikovali ich výskyt. V našej práci sme sa rozhodli použiť farbenie Nile Red (7). Ide o hydrofóbne, metachromatické a fotochemicky stabilné farbivo, ktoré sa považuje za ideálne vo výskume MP. Ide o neiónovú, organickú a heterocyklickú zlúčeninu, tvorenú 5H-benzo[a]fenoxazín-5-ónom s dietylamino skupinou substituovanou v 9. pozícii. Farbenie Nile red je uvádzané ako ideálne na podklade hneď niekoľkých faktorov, akými sú jej afinita k časticiam MP, výrazná fluorescencia v nepolárnom prostredí a aplikovateľnosť aj na veľmi malé MP (< 20 µm).

Limitom viacerých publikovaných štúdií (6, 10) je metodika založená na homogenizácii tkaniva. Hoci táto technika umožňuje presnejšiu kvantifikáciu mikroplastových častíc a detailnú chemickú analýzu ich zloženia, zároveň neumožňuje spoľahlivo určiť ich presnú lokalizáciu v rámci tkaniva ani posúdiť ich priestorový vzťah k patologickým zmenám. Tým dochádza k strate informácií o potenciálnej biologickej interakcii častíc s konkrétnymi štruktúrami alebo bunkovými typmi. Výsledky našej štúdie ukazujú, že sme schopní adaptovať publikované metódy na histologické rezy a súčasne detegovať častice, ktoré svojim vzhľadom, veľkosťou a charakterom NR pozitivity zodpovedajú MP dokázaným analýzou v iných štúdiách.

Nile Red (NR) vykazuje vysokú adsorpciu k širokej škále plastových polymérov, čím sa preukazuje ako jedno z najefektívnejších farbív pre identifikáciu MP. V porovnaní s inými bežne testovanými farbivami, ako sú Oil Red EGN, Rose Bengal či Rhodamine B, má NR výrazne vyššiu schopnosť väzby na plasty (11). Napriek tomu že vo vode sa jedná o farbivo takmer nesolubilné, je dobre rozpustné v polárnych rozpúšťadlách, v ktorých zároveň vykazuje výrazný nárast fluorescenčnej intenzity (12). Práve pre tento fakt sme v našom výskume použili rozpúšťadlo Dimethyl sulfoxid (DMSO). Použitie NR v iných prácach umožnilo detekciu a kvantifikáciu MP s veľkosťou menšou ako 20 µm, ktoré sú inak ťažko identifikovateľné tradičnými metódami. Jeho schopnosť zvýrazniť „skryté“ mikroplasty podporuje dôkladnejšie monitorovanie kontaminácie (13).

Na základe dostupných údajov z publikovaných štúdií (1) možno predpokladať, že so zvyšujúcou sa akumuláciou MP v placentárnom tkanive môže stúpať aj pravdepodobnosť vzniku patologických zmien. Zaujímavé je, že v rámci nášho súboru sme tento predpoklad nepotvrdili. Prítomnosť častíc so zvýšením fluorescenčným signálom bola detegovaná najmä vo fyziologických vzorkách bez zjavných známok patologického procesu.

Napriek tomu, že proces fluorescenčného farbenia pomocou Nile Red prebehol úspešne, je potrebné zvážiť možnosť agregácie samotného farbiva. Takáto agregácia by mohla ovplyvniť kvalitu fluorescenčného signálu a následnú kvantifikáciu častíc. Pre overenie špecificity farbenia bude potrebné doplniť našu analýzu o Ramanovu mikroskopiu, ktorá umožní identifikáciu presného chemického zloženia častíc a tým aj preukázanie ich polymérneho pôvodu. Najväčším limitom našej štúdie je práve skutočnosť, že chemické zloženie detegovaných častíc nebolo jednoznačne potvrdené vlastnou analýzou. Namiesto toho sme sa pri ich identifikácii museli opierať o dáta a závery z predchádzajúcich publikovaných štúdií. Kombináciou detekcie nami fluorescenčne značených častíc v tkanive a analýzou, ktorú umožňuje Ramanov mikroskop by sa tak mohla výrazne zvýšiť špecificita aj spoľahlivosť detekcie mikroplastov vo vzorkách a bude predmetom ďalšieho výskumu.

Podporené projektom VEGA 1/0646/25 „Zmeny glykokódu tkaniva placenty asociované s poruchami metabolizmu glukózy u matky ovplyvňujúce priebeh tehotenstva.“

Zoznam použitej literatúry

1. Yong C.Q.Y., Valiyaveettil S., Tang B.L. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020;17:1509; doi: 10.3390/ijerph17051509.
2. Roslan N.S., Lee Y.Y., Ibrahim Y.S., Tuan Anuar S., Yusof K.M.K.K., Lai L.A., et al. Detection of microplastics in human tissues and organs: A scoping review. J Glob Health. 2024;14:04179; doi: 10.7189/jogh.14.04179.
3. Praveena S.M., Shamsul Ariffin N.I., Nafisyah A.L. Microplastics in Malaysian bottled water brands: Occurrence and potential human exposure. Environ Pollut. 2022;315:120494; doi: 10.1016/j.envpol.2022.120494.
4. Shengchen W., Jing L., Yujie Y., Yue W., Shiwen X. Polystyrene microplastics-induced ROS overproduction disrupts the skeletal muscle regeneration by converting myoblasts into adipocytes. J Hazard Mater. 2021;417:125962; doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125962.
5. Gigault J., Halle A. ter, Baudrimont M., Pascal P.-Y., Gauffre F., Phi T.-L., et al. Current opinion: What is a nanoplastic? Environmental Pollution. 2018;235:1030–4; doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.024.
6. Lv L., Qu J., Yu Z., Chen D., Zhou C., Hong P., et al. A simple method for detecting and quantifying microplastics utilizing fluorescent dyes - Safranine T, fluorescein isophosphate, Nile red based on thermal expansion and contraction property. Environmental Pollution. 2019;255:113283; doi: 10.1016/j.envpol.2019.113283.
7. Shruti V.C., Pérez-Guevara F., Roy P.D., Kutralam-Muniasamy G. Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. Journal of Hazardous Materials. 2022;423:127171; doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127171.
8. Balko J., Tonar Z., Varga I. Memorix histologie. Praha: Triton; 2021.
9. Khorami-Sarvestani S., Vanaki N., Shojaeian S., Zarnani K., Stensballe A., Jeddi-Tehrani M., et al. Placenta: an old organ with new functions. Front Immunol. 2024;15; doi: 10.3389/fimmu.2024.1385762.
10. Li J., Huang F., Zhang G., Zhang Z., Zhang X. Separation and flow cytometry analysis of microplastics and nanoplastics. Front Chem. 2023;11; doi: 10.3389/fchem.2023.1201734.
11. Prata J.C., Reis V., Matos J.T.V., da Costa J.P., Duarte A.C., Rocha-Santos T. A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT). Science of The Total Environment. 2019;690:1277–83; doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.060.
12. Martinez V., Henary M. Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. Chemistry. 2016;22:13764–82; doi: 10.1002/chem.201601570.
13. Yaranal N.A., Subbiah S., Mohanty K. Identification, extraction of microplastics from edible salts and its removal from contaminated seawater. Environmental Technology & Innovation. 2021;21:101253; doi: 10.1016/j.eti.2020.101253.

10. Vplyv quercetínu na poškodenie obličiek pri diabetes mellitus druhého typu

Marek Ujpál
(všeobecné lekárstvo, 5.ročník)

Spoluautori: Mgr. Barbora Kaločayová, PhD.[1,2], doc. RNDr. Monika Barteková, PhD.[1,3], prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD.[4]

[1] Centrum experimentálnej medicíny SAV v. v. i., Bratislava, Slovenská republika, [2] Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, [3] Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, [4] Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Úvod

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je komplexné metabolické ochorenie, ktoré je charakterizované chronickým zvýšením glykémie nad normálne hodnoty pri kombinácií inzulínovej rezistencie a relatívne (neskôr aj absolútne) zníženej inzulínovej sekrécie. Jednou zo závažných mikrovaskulárnych komplikácií tohto ochorenia je vznik diabetického ochorenia obličiek (v minulosti označovaného ako diabetická nefropatia). Diabetické ochorenie obličiek patrí medzi mikrovaskulárne komplikácie diabetu ktoré pomaly progreduje. Na začiatku je charakteristická glomerulárna hyperfiltrácia, nárast albuminúrie a neskôr proteinúrie. S rozvojom postihnutia dochádza k znižovaniu glomerulárnej filtrácie a k znižovaniu renálych funkcii, čo môže viesť až do štádia renálneho zlyhania [1]. V súčasnosti sa jedná o nevyliečiteľné ochorenie, terapia je založená na dobrej kompenzácii diabetu a adekvátnej liečbe arteriálnej hypertenzie, ktorá vzniká ako dôsledok diabetického ochorenia obličiek. V štádiu renálneho zlyhania obličiek sú pacienti závislí od dialyzačnej liečby ako náhrady funkcie obličiek, pričom optimálnou terapeutickou možnosťou zostáva transplantácia obličky [2]. Preto je na mieste otázka, či existuje látka, ktorá by mohla zabrániť rozvoju mikrovaskulárnej dysfunkcie. Veľký počet štúdií preukázal, že quercetín (QCT), polyfenol vyskytujúci sa v mnohých druhoch ovocia a zeleniny, môže chrániť obličky zmierňovaním renálnej toxicity, apoptózy, fibrózy a zápalu pri rôznych ochoreniach obličiek. QCT by tak mohol predstavovať jeden z perspektívnych prístupov v liečbe diabetického ochorenia obličiek [3,4].

Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť vplyv QCT na expresiu vybraných proteínov zapojených do procesu fibrózy tkaniva (Smad 2/3 a Transformujúci rastový faktor beta; TGF-β) a markera poškodenia obličiek (neutrofilný s gelatinázou asociovaný lipokalín; NGAL). Zároveň sme analyzovali aj histologické preparáty obličiek u animálneho modelu DM2.

Materiál a metódy

Štúdia bola vykonaná na 12-mesačných samcoch potkanov kmeňa Zucker diabetic fatty (ZDF), ktoré sú geneticky predisponované k rozvoju DM2. Tento zvierací model sa vyznačuje hyperfágiou, obezitou a genetickou mutáciou v géne pre leptínový receptor, ktorá spôsobuje

pretrvávajúci pocit hladu. Výsledkom je rozvoj obezity, ktorá vedie k nástupu DM2. Experimentálne skupiny zahŕňali normoglykemické a hyperglykemické jedince, ktorým bol podávaný QCT (p.o., 20 mg/kg/deň, 6 týždňov), alebo samotný nosič (piškóta). Potkany boli rozdelené do 4 skupín (v každej skupine n=6): C - kontrolné potkany, CQ - kontrolné potkany liečené QCT, D - diabetické potkany, DQ - diabetické potkany liečené QCT. Potkanom bola podávaná štandardná granulovaná diéta a pitná voda *ad libitum*. Svetelný režim zahŕňal pravidelné striedanie 12-hodinového obdobia svetla a 12-hodinového obdobia tmy. Prostredie zverinca bolo udržiavané pri teplote 22–24 °C a relatívnej vlhkosti vzduchu 45–65 % [4]. Na konci experimentu boli potkany uspané Tiopentalom (65 mg/kg hmotnosti) a usmrtené vybratím srdca. Obličky boli rýchlo premyté v chladnom fyziologickom roztoku, zvážené a zmrazené v kvapalnom dusíku. Všetky vzorky boli uskladnené pri -60 °C až do spracovania.

Izolácia proteínov bola vykonaná pomocou homogenizačného roztoku (50 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl, 250 $mmol \cdot l^{-1}$ sacharózy, 1,0 $mmol \cdot l^{-1}$ dithiothreitolu, 1,0 $mmol \cdot l^{-1}$ fenylmetylsulfonylfluoridu). Po navážení vzorky tkaniva obličiek do mikrocentrifugačných skúmaviek sa pridalo päťnásobné množstvo homogenizačného roztoku. Vzorka bola homogenizovaná ručným piestom a následne sonifikovaná (UP 100 H – Hielsher, Nemecko). Počas celého procesu boli skúmavky udržiavané na ľade. Homogenizovaná vzorka bola následne centrifugovaná (800 x g, 5 min, 4 °C). Supernatant (S1) bol opatrne odobratý a centrifugovaný pri 16 100 x g (30 min, 4 °C) na získanie cytosolovej frakcie (S2). Pelet (P2) bol resuspendovaný v homogenizačnom roztoku s 0,2% Triton X-100, a opätovne centrifugovaný, čím sa získala partikulárna frakcia (S3). Koncentráciu proteínov sme stanovili vo vzorkách použitím Bradfordovej metódy [5].

Western blot analýza bola vykonaná podľa štandardného protokolu. Izolované proteíny boli denaturované pridaním vzorkového pufra s β-merkaptoetanolom a brómfenolovou modrou, následne boli vzorky denaturované varom (95 °C/5 min) a okamžite ochladené na ľade. Proteíny boli separované pomocou SDS-PAGE elektroforézy na 10 % polyakrylamidovom géli pri konštantnom napätí 90 V (120 V po prenesení vzorky do separačného gélu).

Po elektroforéze boli proteíny prenesené na nitrocelulózovú membránu pri konštantnom prúde 50 mA cez noc pri 4°C. Membrána bola následne farbená roztokom Ponceau red na kontrolu kvality prenosu proteínov. Blokácia nešpecifických väzieb bola uskutočnená inkubáciou membrány v 5 % nemastnom mlieku v roztoku TBS-Tween počas 2 hodín pri izbovej teplote. Primárne protilátky (NGAL: sc-515876, v riedení 1:1000, Smad2/3: sc-133098, v riedení 1:1000, TGF beta 1: sc-130348, v riedení 1:1000) boli riedené v TBS a inkubované s membránou cez noc pri 4 °C. Sekundárne protilátky konjugované s peroxidázou (Anti-Mouse IgG, sc-2005, v riedení 1:2000) boli pridané a inkubované 1,5 až 2 hodiny pri izbovej teplote. Normalizačný proteín β-aktín (mAbcam 8226, v riedení 1:1000) bol použitý pre každú membránu ako loading control. Detekcia bola uskutočnená pomocou chemiluminiscenčného substrátu, pričom signál bol vizualizovaný zariadením pre detekciu chemiluminiscencie (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švédsko). Optická denzita vo forme „bandov" – pásikov bola analyzovaná v programe ImageJ.

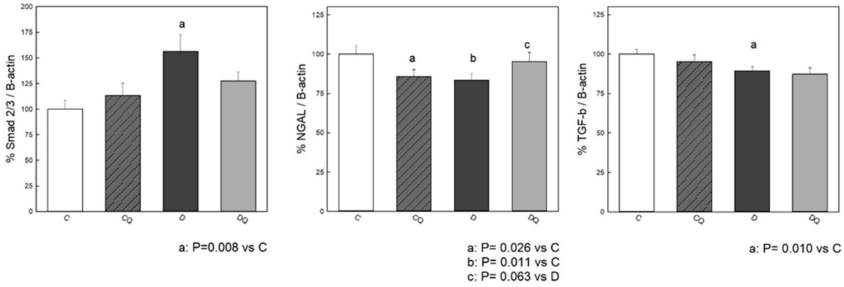
Rezy tkaniva boli vyzualizované histologickým farbením hematoxilín-eozín a farbením podľa Van Giesona. Farbenie hematoxilín-ozínom začalo fixovaním vzorky vo 4 % formaldehydovom roztoku počas 5 minút. Po fixácii nasledovalo premytie destilovanou vodou po dobu 1 minúty. Následne prebehlo farbenie hematoxylínom po dobu 5 minút, po ktorom nasledovalo krátke premytie destilovanou vodou (1 s) a oplach v tečúcej vode počas 10 minút. Po tomto kroku

boli rezy ponorené do eozínu na 1 minútu. Následne boli premyté destilovanou vodou (1 min) a postupne odvodnené cez etylalkohol 70 % (1 až 2 s) a etylalkohol 96 % (3 min). Po odvodnení nasledovalo prečistenie v karboxyléne počas 3 minút a v dvoch kúpeľoch xylénu, pričom každý trval 5 minút. Na záver boli rezy pokryté kanadským balzamom. Rezy tkaniva farbené podľa Van Giesona začali s fixáciou vo 4 % formaldehyde po dobu 5 minút. Nasledovalo farbenie Weigertovým železitým hematoxylínom (1 min). Po premytí destilovanou vodou boli farbené roztokom kyseliny pikrovej v kombinácii s pikrofuksínom na identifikáciu špecifických štruktúr (20 s). Následne boli opláchnuté v destilovanej vode a odvodnené cez etanol rôznych koncentrácií (70 %, 96 %) a karboxylén. Nakoniec boli rezy prečistené v dvoch kúpeľoch xylénu a uzatvorené pomocou kanadského balzamu. Podiel kolagénu sme kvantifikovali programom ImageJ (verzia 1.54f).

Štatistické vyhodnotenie oboch metodík bolo vykonané pomocou T-testu. Všetky údaje sú vyjadrené ako priemer ± SEM. Za štatisticky významnú sme považovali hodnotu p <0,05.

Výsledky

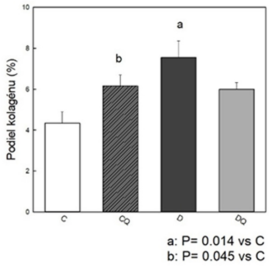
Skupine diabetických neliečených zvierat sme zaznamenali signifikantný nárast proteínovej expresie Smad 2/3 (Graf 1a) 1, na druhej strane proteíny NGAL (Graf 1b) a TGF-β (Graf 1c) boli znížené v porovnaní s neliečenou kontrolnou skupinou.



Graf 1a Graf 1b Graf 1c

Graf 1 (a,b,c): Výsledky Western blot analýzy vybraných proteínov vo vzorkách obličiek.

Podávanie QCT diabetickým zvieratám bolo sprevádzané normalizáciou proteínov NGAL a Smad2/3 takmer na úroveň kontrolných neliečených zvierat, čo naznačuje zlepšenie remodelácie tkaniva obličiek. Hodnoty NGAL, markera poškodenia obličiek, boli nižšie v skupine kontrolných zvierat s podávaním QCT, čo potvrdzuje jeho protektívny účinok. Analýzou histologických preparátov obličiek ZDF potkanov sme potvrdili signifikantne zvýšené množstvo kolagénu u diabetických neliečených potkanov v porovnaní s kontrolami. Podávanie QCT diabetickým zvieratám redukovalo množstvo kolagénu v obličkách. Zaujímavým zistením bolo zmnoženie kolagénu u nediabetických zvierat, ktorým bol podávaný QCT (Graf 2).



Graf 2: Výsledky analýzy podielu kolagénu vo vzorkách obličiek.

Diskusia

V našej štúdii sme zaznamenali signifikantný nárast expresie proteínu Smad 2/3 v skupine diabetických neliečených zvierat, zatiaľ čo expresia NGAL a TGF-β bola znížená v porovnaní s kontrolnou neliečenou skupinou. Predpokladá sa, že rôzne rastové faktory, cytokíny, metabolické toxíny a stresové molekuly sa podieľajú na progresívnej renálnej fibróze pri diabetickom ochorení obličiek, pričom klasická signalizácia TGF-β/Smad. sa považuje za kľúčovú dráhu a sľubný terapeutický cieľ. Nami pozorovaný nárast expresie Smad 2/3 v obličkovom tkanive bol pozorovaný aj v inej zahraničnej štúdii zaoberajúcej sa výskumom DM [6]. Nami pozorované zmeny v expresii proteínu TGF-β, však neboli pozorované v podobnej zahraničnej štúdii, kde sa ukázalo, že DM vedie k zvýšenej expresii TGF-β v obličkových kapilárach a podporuje rozvoj renálnej fibrózy [7]. Histologická analýza ukázala signifikantné zvýšenie kolagénových depozitov v renálnom tkanive diabetických neliečených zvierat, čo je v súlade s poznatkami ďalšej zahraničnej štúdie [8]. Výsledky tiež naznačili, že podávanie QCT redukovalo množstvo kolagénu v obličkovom tkanive, čo podporuje jeho antifibrotický účinok. Tento nález je v súlade s ďalšou štúdiou, kde identifikovali, že kombinácia QCT a dasatinibu (tyrozínkinázový inhibítor) zlepšuje funkciu obličiek u diabetických myší tým, že potláča renálnu fibrotizáciu. Avšak, na rozdiel od tejto štúdie, v našom experimente bol použitý výlučne QCT, pričom aj bez prítomnosti dasatinibu sme pozorovali redukciu kolagénových depozitov, čo poukazuje na jeho nezávislý antifibrotický účinok [9]. Zaujímavým zistením bolo zmnoženie kolagénu u nediabetických zvierat, ktoré neboli liečené QCT. Tento fenomén môže súvisieť s prirodzenými procesmi remodelácie tkaniva, keďže vekom dochádza k zvýšenej akumulácii extracelulárnej matrix a poklesu schopnosti obličiek efektívne odbúravať kolagén [3,10]. Presnú príčinu zmnoženia kolagénu treba ešte preskúmať.

Podávanie QCT diabetickým zvieratám v našej štúdii nebolo sprevádzané zmenami v proteínovej expresii TGF-β. Na druhej strane, v štúdii Hossein a kol. (2024) zaznamenali výrazný pokles tohto proteínu po 6 týždňov trvajúcom podávaní QCT, avšak koncentrácia QCT bola vyššia v porovnaní s našim experimentom (50 mg/kg/deň vs 20 mg/kg/deň) a taktiež použili rozdielny experimentálny model diabetu (DM1 indukovaný streptozotocínom) [7]. Na druhej strane, z našich analýz vyplýva, že podávanie QCT diabetickým zvieratám bolo sprevádzané s poklesom proteínu Smad 2/3. Podobný efekt bol zaznamenaný aj v *in vitro*

štúdii na mezangiálnej bunkovej línii izolovanej z glomerulov (línia SV40 MES 13), ktorú vystavili hyperglykemickým podmienkam (20 mM glukóza) a následne liečili QCT [11].

Získané výsledky poukazujú na dôležitosť ďalšieho výskumu účinkov vplyvu QCT na diabetické ochorenie obličiek, pričom budúce štúdie by sa mohli zamerať na presnejšie objasnenie molekulárnych mechanizmov jeho pôsobenia, ako aj na možnosť klinického využitia ako doplnkovej terapie pri pacientoch trpiacich diabetickým ochorením obličiek.

Tento projekt bol financovaný z grantov: VEGA: 2/0148/22, 2/0159/24, 2/0123/24, 2/0147/25, APVV-20-0421 a APVV-21-0194

Zoznam použitej literatúry

1. Češka R a kol.: Diabetes mellitus. In Češka R., ed. Interná medicína. 3. vydanie. Praha, Triton, 2020, 247-280.
2. Rodríguez Faba O, Boissier R, Budde K, Figueiredo A, Hevia V, Lledó García E, Regele H, Hassan Zakri R, Olsburgh J, Bezuidenhout C, Breda A. European Association of Urology Guidelines on Renal Transplantation: Update 2024. Eur Urol Focus. 2024.
3. Rahmani, Arshad Husain et al. "Quercetin, a Plant Flavonol Attenuates Diabetic Complications, Renal Tissue Damage, Renal Oxidative Stress and Inflammation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." Metabolites vol. 13,1 130. 15 Jan. 2023
4. Ferenczyova, Kristina et al. "Quercetin Exerts Age-Dependent Beneficial Effects on Blood Pressure and Vascular Function, But Is Inefficient in Preventing Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Zucker Diabetic Fatty Rats." Molecules (Basel, Switzerland) vol. 25,1 187. 2 Jan. 2020
5. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1-2): 248–254.
6. Ural, Cemre et al. "The renoprotective effects of taurine against diabetic nephropathy via the p38 MAPK and TGF-β/Smad2/3 signaling pathways." Amino acids vol. 55,11 (2023): 1665-1677.
7. Hossein A, Firouzeh G, Zeinab K, Gholamreza D. Quercetin prevents kidney against diabetes mellitus (type 1) in rats by inhibiting TGF-β/apelin gene expression. *Mol Biol Rep.* 2024; 51(6)
8. Zhang L, Wang X, Chang L, Ren Y, Sui M, Fu Y, et al. Quercetin improves diabetic kidney disease by inhibiting ferroptosis and regulating Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail.* 2024
9. Guo X, Wen S, Wang J, Zeng X, Yu H, Chen Y, et al. Senolytic combination of dasatinib and quercetin attenuates renal damage in diabetic kidney disease. *Phytomedicine.* 2024
10. Zhang Y, Yu C, Li X. Kidney Aging and Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(6585).
11. Widowati, Wahyu et al. "Quercetin prevents chronic kidney disease on mesangial cells model by regulating inflammation, oxidative stress, and TGF-β1/SMADs pathway." PeerJ vol. 10 e13257. 2 Jun. 2022

11. Stopy mikroplastov v nádoroch endometria

Matej Kühnel
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Spoluautor: MUDr. Miriam Bollová
Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.
Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta UK a UNB, Bratislava

Úvod

Endometriálne nádory (EN) sú štvrté najčastejšie nádory u žien a najčastejšie nádory ženských pohlavných orgánov obecne (1). Napriek pomerne dobrej diagnostike a liečbe pozorujeme nárast nových prípadov aj úmrtí (2). V posledných rokoch sledujeme rastúci trend aj u predmenopauzálnych žien, pričom podľa niektorých štúdií tvoria až 32,4% zo všetkých prípadov. Tento nárast pacientiek v reprodukčnom veku znamená nové výzvy v oblasti patofyziológie a terapie, ktorá sa v súčasnosti opiera hlavne o včasnú chirurgickú intervenciu (2). U EN pozorujeme určité provokujúce faktory ako hormonálny imbalans, syndróm polycystických ovárií, obezitu či fajčenie, ale aj protektívne faktory ako počet tehotenstiev alebo dĺžka doby kojenia. Významná je aj anamnéza diabetu, keďže hyperinzulinémia je tumorgénna pre tkanivá citlivé na estrogén (1). Podľa aktuálnej FIGO klasifikácie delíme EN do 4 základných štádií z hľadiska molekulárnych a histologických znakov (3).

V posledných rokov sa do popredia záujmu dostáva prítomnosť mikroplastov, ktoré sa ukazujú ako možný faktor pri mnohých ochoreniach. Mikroplasty (MP) sú tuhé, hydrofilné polyméry menšie ako 5mm a väčšie ako 1µm. Najčastejšie vznikajú pôsobením fyzikálnych alebo chemických faktorov ako je UV žiarenie, zmena pH alebo mechanickou degradáciou (4). MP delíme na primárne, ktoré boli už priamo vyrobené ako mikroplasty alebo sekundárne, ktoré vznikli fragmentáciou väčších plastových častíc (4, 5). Vďaka ich malej veľkosti sa za pomoci kolobehu vody dostali do rôznych oblasti po celej zemi. a v súčasnosti je to najhojnejšia forma tuhého odpadu na zemi (5).

Do tela sa dostávajú najčastejšie cez vzduch a alimentárnou cestou, ale aj cez kožu či parenterálne (5). V jednotlivých orgánoch je akumulácia MP rôzna. Vysoké kontaminácie s MP majú orgány s priamym kontaktom s vonkajším prostredím ako časti tráviaceho a dýchacieho systému (6, 7). Animálne modely ukázali znepokojúce výsledky o rastovej retardácii, reprodukčnej a neuro-toxicite, v zmene správania, placentárnom prenose a vplyvoch na potomstvo (4, 8). Štúdie naznačujú, že mikroplasty môžu slúžiť aj ako vektor prenosu nie len pre mikroorganizmy, ktoré ich masívne kolonizujú a tvoria biofilm ale aj môžu na seba naväzovať pesticitídy, antibiotika a iné potencionálne škodlivé látky vďaka ich pórovitému povrchu (5, 6). Mnohé monoméry sú aj oni samotné, respektíve ich aditíva toxické alebo karcinogénne ako napríklad polyuretán alebo polyvinylchlorid (9). Aktivita MP závisí okrem zloženia aj na veľkosti danej častice. Menšie častice dokážu vyvolať väčšiu prozápalovú reakciu na animálnych modeloch a častice menšie ako 0,25µm pravdepodobne podporujú metastatickú aktivitu buniek (5).

Onkogénny potenciál MP naznačujú viaceré štúdie (6, 10, 11). MP propagujú nádorové bujnenie vyvolaním chronickej zápalovej odpovede, imunitnou dysreguláciou a poškodením na úrovni DNA. Tá sa deje za pomoci tvorby reaktívnych molekúl kyslíka. Ďalej poškodzujú mitochondrie depolarizáciou ich membrán, spúšťajú množstvo signálnych dráh ako p53 alebo estregénové. Ukázalo sa, že mikroplasty polystyrénu spôsobujú poškodenie DNA žalúdočných buniek potkanov (6). Pri kolorektálnom karcinóme sa uvažuje zvýšenej autofágií v a mikrobiálnej dysbióze vplyvom MP (10). Na kultúrach buniek kože bol zaznamenaný abnormálny rast a poruchu bunkového cyklu (6).

Je teda očividné, že MP sa stávajú vážnym problémom v onkológii. Treba však poznamenať, že výskum MP v ľudskom organizme v súčasnosti naráža na významné obmedzenia. Jednou z hlavných limitácií v tejto oblasti je absencia štúdií, ktoré by hodnotili mikroplasty v histologických rezoch so zachovanou štruktúrou. Väčšina dostupných výskumov používa metódy založené na analýze vzoriek po ich predchádzajúcej homogenizácii, čím sa stráca priestorová informácia o lokalizácii mikroplastov v rámci tkaniva. Rovnako chýbajú štúdie, ktoré by analyzovali prítomnosť alebo aktivitu mikroplastov v endometriu (EN) za patologických podmienok. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli preskúmať prítomnosť mikroplastov v bioptickom nádorovom tkanive pomocou fluorescenčnej mikroskopie a zároveň posúdiť možný vzťah medzi gradingom nádoru a množstvom detegovaných mikroplastov.

Metodika:

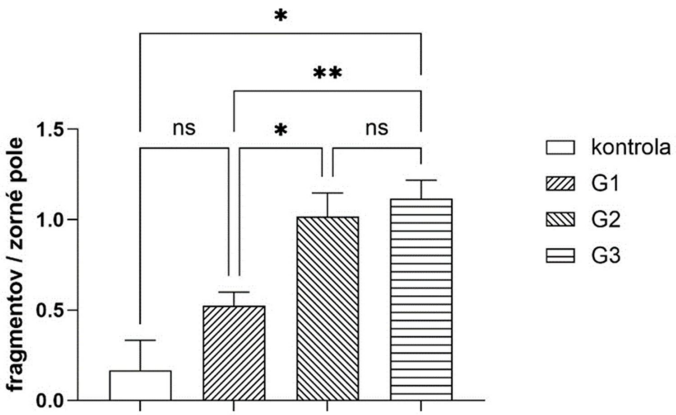
Pre štúdiu bolo vybratých 26 vzoriek obsahujúcich endometriálny karcinóm grade 1 až 3. Taktiež boli vybraté 4 vzorky nenadorového tkaniva ako kontrola. Tri vzorky endometriálneho karcinómu sa ukázali ako nevyhovujúce a boli z výskumu vyradené. Vzorky boli získané od pacientiek v rámci výskumu BIOMEDIRES II. Pacientky boli poučené o zaradení do výskumu a podpísali informovaný súhlas. Štúdia bola schválená príslušnou etickou komisiou. Pre zamedzenie kontaminácie mikroplastami, boli časti ktoré mohli prísť do kontaktu s plastovým materiálom odstránené. Takto pripravené vzorky boli narezané na hrúbku 4µm, odparafínované a uložené na podložné sklíčko bez použitia plastových pomôcok.

Na farbenie sme na odporúčanie zo štúdie Li a spol. (12) použili Nílsku červenú (NR) rozpustenú v dimetylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Japonsko). Testovaním sme stanovili vhodný pomer NR v DMSO tak aby výsledné prifarbovanie pozadia bolo minimálne. Pri použití NR v 100% DMSO bola vzorka nehodnotiteľná, optimálne výsledky sme dosiahli pri riedení NR v množstve 35 ug/1 ml 25% DMSO v etanole. Zásobný roztok NR bol pripravený v koncentrácii 10mg na 1 ml DMSO a inkubovaného 1 hodinu pri teplote 60°C. Pred použitím bol roztok znova inkubovaný 1 hodinu pri 55°C aby sa rozpustili vzniknuté agregáty. Sklenenou pipetou sme pri príprave finálneho roztoku odobrali 10ml DMSO do kyvety a za pomoci Mikrostriekačky Hamilton 705 N sme pridali 140µl zásobného roztoku NR a nariedili 30ml 96% etanolom. Do takto pripraveného roztoku v kyvete sme uložili vzoky na podložných skličkach, uzavrali a následne uložili na inkubáciu na 2 hodiny pri teplote 55°C. po Inkubácii boli vzorky oplachnuté 96% etanolom, osušené, pridané krycie medium (VECTASHIELD Vibrance® Antifade Mounting Medium) s DAPI a prekryté krycím skličkom. Takto pripravené vzorky boli krátkodobo skladované v tme a pri teplote 5°C, kým neboli pozorované pod fluorescečným mikroskopom pod 10 násobným zväčšením.

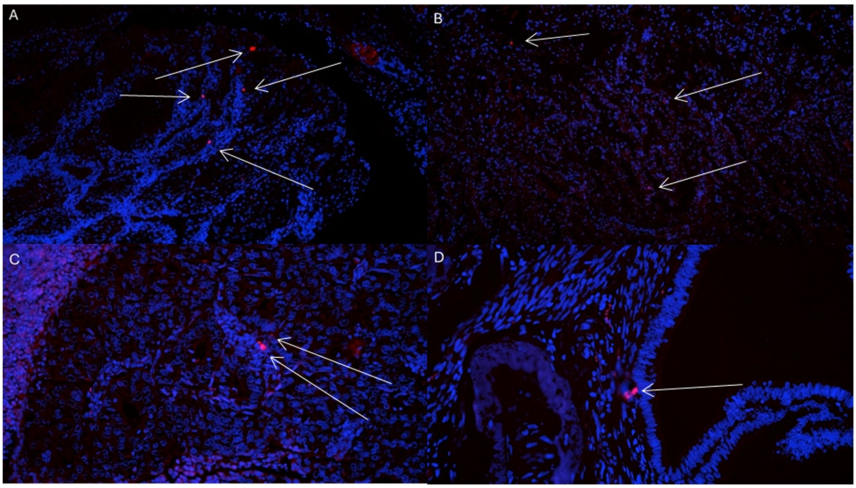
Endometrium vo vzorke sme rozdelili na zorné polia a v každom sme kvantifikovali zobrazené fragmenty (obr. 1) ktoré svojim farbením, veľkosťou a tvarom zodpovedali MP preukázaným v iných štúdiách (12). MP mimo tkaniva alebo MP zobrazené v inej rovine ako tkanivo boli vyhodnotené ako kontaminácia a neboli hodnotené.Následne sme vyhodnotili priemerný počet MP na zorné pole v tkanive. Tieto hodnoty sme následne štatisticky zhodnotili s Gradingom nádorov metódou Brown-Forsythe a Welch ANOVA za pomoci GraphPad Prism (v .10.4.2) Výsledky sme graficky znázornili (obr. 2).

Výsledky:

V hodnotených vzorkách sme pozorovali NR+ fragmenty, ktoré svojím farbením, veľkosťou a tvarom zodpovedajú mikroplastom (obr 2). V tkanive boli tieto častice rozložené nerovnomerne s najväčšou hustotou v endometriu. V myometriu boli častice skôr sporadické a boli uložené pozdĺž ciev. V nádorovom tkanive narastal počet týchto častíc vzhľadom k rastúcemu grade nádorového tkaniva. Preukázala sa štatistická významnosť medzi množstvom NR+ častíc v nádorom nezmenenom tkanive (kontrola) a nádorom G2 ($p<0,01$) a nádorom G3 ($p<0,001$). Taktiež sa preukázala štatistická významnosť medzi nádormi G2 a G3 ($p<0,001$) a medzi nádormi s G1 a G3 ($p<0,01$). Zmeny v množstve fragmentov medzi kontrolou a nádorom G1 alebo medzi nádormi G1 a G2 sú ako štatisticky nesignifikantné.



*Obr 1: Priemerný počet mikroplastových fragmentov na 1 zorné pole v porovnaní s typom vzorky. Môžeme pozorovať nárast priemerného počtu mikroplastových fragmetov na jedno zorné pole vzorky * p<0,0005 ** p<0,0036*



Obr2: Zobrazenie Mikroplastových fragmentov pod fluorescenčným miktroskopom. Pod mikroskopom sú modrou zobrazené jadra buniek tkaniva maternice alebo nádoru. MP sa zobrazili ako ostro ohraničené červené fragmenty rôznej veľkosti. Jednotlivé zorné polia: A: 4 MP častice v endometriálnom nádore G1nerovnomerne rozložené v zornom poli. V pravom hornom kvadrante je vidieť cievu s erytrocytmi zafarbenými NR B: V G2 nádore sú zobrazené nerovnomerne rozptýlene MP rôznej veľkosti. C: V G3 nádore je zobrazený potencionálne fragmentovaný MP alebo zhluk MP. Taktiež je tam zobrazený aj MP v stróme. D: zobrazenie kontaminácie ako častice ktorá sa nenachádza v rovnakej rovine ako nádor a tým sa ani nemôže v tom tkanive nachádzať.

Diskusia:

Nádory endometria patria v súčasnosti medzi onkologické ochorenia s narastajúcou incidenciou, pričom tento trend sa čoraz častejšie pozoruje aj u mladších pacientiek. Klesajúci vek novo diagnostikovaných žien vytvára tlak na hĺbkovejší výskum environmentálnych faktorov, ktoré by mohli prispievať k vzniku týchto nádorov (1). Jedným z takýchto faktorov sú aj mikroplasty, predstavujúce environmentálnu záťaž, ktorých prítomnosť v ľudských tkanivách vrátane endometria, bola preukázateľne dokázaná. Ich klinický význam a potenciálny vplyv na zdravie ostáva zatiaľ neobjasnený.

Väčšina doterajších štúdií sa opiera o analýzu vzoriek po ich homogenizácii, ktorá umožňuje koncentráciu a následnú chemickú identifikáciu častíc. Hoci tieto metódy zvyšujú analytickú citlivosť, znemožňujú lokalizáciu častíc v rámci tkanivovej architektúry a obmedzujú hodnotenie ich vzťahu k patologickým zmenám. V našej štúdii sme sa preto rozhodli adaptovať dostupné metodiky na použitie v histologických rezoch, pričom sme sa zamerali na zachovanie tkanivovej architektúry. Tento prístup nám umožnil sledovať distribúciu podozrivých fragmentov priamo v nádorovom tkanive.

Preukázali sme, že v tkanive endometria vrátane nádorov sa nachádzajú častice, ktoré svojím tvarom, farbením a veľkosťou zodpovedajú mikroplastom opísaným v iných štúdiách.

Pozorovali sme nerovnomerné rozloženie takýchto častíc v tkanive s dominanciou výskytu v sliznici. V myometriu sa nachádzali fragmenty len ojedinele a to aj v okolí ciev. Výskyt mikroplastov v endometriálnom tkanive bol preukázaný aj v iných štúdiách. He a spol. ukázali zvýšený výskyt MP v endometriálnych polypoch v porovnaní so zdravou endometriálnou sliznicou. Identifikované boli najmä polyvinylové, polystyrénové a polyetylénové mikročastice. Pri polypoch endometria sa na bunkových kultúrach prejavil aj efekt polystyrenových častíc na zvýšenú proliferáciu a migráciu buniek (13). Takéto správanie pri bunkách endometriálneho karcinómu zatiaľ nebolo dokázané. Akumulácia MP v tkanivách by mohla závisieť aj od životného štýlu pacientiek, ako ukázali niektoré štúdie. V tumoroch prostaty sa preukázalo ako významný faktor frekvencia využívania donáškovej služby na jedlo (11). Ani takáto súvislosť v endometriálnom nádore, napríklad s predmetmi každodennej potreby zatiaľ nie je známa. Na objasnenie potenciálnych vplyvov je preto potrebný ďalší výskum.

Zaujímavá je práve súvislosť medzi diferenciáciou nádora a množstvom mikroplastov v tkanive a naopak z nízkym množstvom MP v myometriu. V našej analýze sme ukázali, že so stúpajúcim gradeom nádoru stúpa počet takýchto častíc. Predpokladáme, že nádorový rast ovplyvňuje cievy v okolí, ich zmenená štruktúra môže súvisieť s vyšším výskytom v tkanive nádoru (15). Takto by sa dalo vysvetliť aj zvýšené množstvo MP v málodiferencovaných nádoroch endometria.

Mechanizmus vstupu mikroplastov (MP) do endometriálneho tkaniva zatiaľ nie je presne objasnený. Predpokladá sa, že do organizmu sa môžu dostávať predovšetkým cez dýchací alebo tráviaci trakt. Práve v súvislosti s mikroplastmi prítomnými v tráviacom systéme sa ukázalo, že môžu podporovať vznik rezistencie na chemoterapeutiká (6, 7). V kombinácii s najnovšími poznatkami o ich schopnosti zasahovať do endokrinných cyklov sa v prípade endometriálneho karcinómu javí ako potenciálne významný aj ich vplyv na funkciu estrogénov. Spolu s dostupnými faktami o potencionálnej schopnosti MP zasahovať do endokrinných cyklov, pri endometriálnom karcinóme by sa mohol práve zásah MP do funkcií estrogénov javiť ako významný. Potenciálnym vplyvom na bunkový cyklus a DNA sa ukazujú byť MP ako zaujímavý faktor ovplyvňujúci liečbu nádorov v budúcnosti.(6, 11, 13, 14). Tieto súvislosti si však vyžadujú ďalší cielený výskum.

Metodickou limitáciou predloženej štúdie je, že sme neoverovali chemickú identitu detegovaných fragmentov. Pri identifikácii sme vychádzali z údajov z predchádzajúcich štúdií a za mikroplasty sme považovali tie fragmenty, ktoré zodpovedali známym morfologickým charakteristikám – farbeniu, veľkosti a tvaru – opísaným v literatúre. Pre konkrétnu typizáciu fragmentov je vhodné použiť Ramanovú mikrospektroskopiu, ktorú plánujeme v najbližšom období.

Táto publikácia vznikla 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. Hüsing A., Dossus L., Ferrari P., Tjønneland A., Hansen L., Fagherazzi G., et al. An epidemiological model for prediction of endometrial cancer risk in Europe. Eur J Epidemiol. 2016;31:51–60; doi: 10.1007/s10654-015-0030-9.

2. Bassette E., Ducie J.A. Endometrial Cancer in Reproductive-Aged Females: Etiology and Pathogenesis. Biomedicines. 2024;12:886; doi: 10.3390/biomedicines12040886.
3. Berek J.S., Matias-Guiu X., Creutzberg C., Fotopoulou C., Gaffney D., Kehoe S., et al. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2023;162:383–94; doi: 10.1002/ijgo.14923.
4. Afreen V., Hashmi K., Nasir R., Saleem A., Khan M.I., Akhtar M.F. Adverse health effects and mechanisms of microplastics on female reproductive system: a descriptive review. Environ Sci Pollut Res. 2023;30:76283–96; doi: 10.1007/s11356-023-27930-1.
5. Blackburn K., Green D. The potential effects of microplastics on human health: What is known and what is unknown. Ambio. 2022;51:518–30; doi: 10.1007/s13280-021-01589-9.
6. Hacettepe University, Cancer Institute, Department of Medical Oncology, Gullu I.H. The Relationship Between Microplastics and Nanoplastics with Cancer: An Emerging Health Concern. UHOD. 2024;34:102–12; doi: 10.4999/uhod.247607.
7. Jenner L.C., Rotchell J.M., Bennett R.T., Cowen M., Tentzeris V., Sadofsky L.R. Detection of microplastics in human lung tissue using μFTIR spectroscopy. Science of The Total Environment. 2022;831:154907; doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154907.
8. Lim C., Kim N., Lee J., Yoon Y. Potential of Adsorption of Diverse Environmental Contaminants onto Microplastics. Water. 2022;14:4086; doi: 10.3390/w14244086.
9. Lithner D., Larsson Å., Dave G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. Science of The Total Environment. 2011;409:3309–24; doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.04.038.
10. Pan W., Han Y., Zhang M., Zhu K., Yang Z., Qiu M., et al. Effects of microplastics on chemo-resistance and tumorigenesis of colorectal cancer. Apoptosis. 2025; doi: 10.1007/s10495-025-02085-1. https://doi.org/10.1007/s10495-025-02085-1.
11. Deng C., Zhu J., Fang Z., Yang Y., Zhao Q., Zhang Z., et al. Identification and analysis of microplastics in para-tumor and tumor of human prostate. eBioMedicine. 2024;108; doi: 10.1016/j.ebiom.2024.105360.
12. Li J., Huang F., Zhang G., Zhang Z., Zhang X. Separation and flow cytometry analysis of microplastics and nanoplastics. Front Chem. 2023;11; doi: 10.3389/fchem.2023.1201734.
13. He S., Zhang Y. Detection and quantification of microplastics in endometrial polyps and their role in polyp formation. Reproductive Toxicology. 2025;132:108757; doi: 10.1016/j.reprotox.2024.108757.
14. Wu H., Xu T., Chen T., Liu J., Xu S. Oxidative stress mediated by the TLR4/NOX2 signalling axis is involved in polystyrene microplastic-induced uterine fibrosis in mice. Science of The Total Environment. 2022;838:155825; doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155825.
15. Nagy J.A., Chang S.-H., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? Br J Cancer. 2009;100:865–9; doi: 10.1038/sj.bjc.6604929.

12. *Post-mortem* testovanie *MTHFR* C677T variantu u plodov s anencefáliou

Juraj Hutník

(všeobecné lekárstvo, 4.ročník)

Spoluautori: RNDr. Petra Priščáková, PhD.[1], prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH.[1], MUDr. Lajos Gergely[1]

Školiteľ: MUDr. Lajos Gergely[1]

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

Úvod

Rázštepy nervovej trubice (*Neural Tube Defects* - NTDs) predstavujú heterogénnu skupinu malformácií postihujúcich približne 1 z 1000 gravidít v Európe. Môžu sa vyskytovať izolovane, alebo ako súčasť syndrómu. Tieto malformácie môžu byť spôsobené mnohými etiologickými faktormi vrátane chromozómových aberácií, génových mutácií, teratogénnych expozícií, avšak vo väčšine prípadov etiológia je nejasná – multifaktoriálna. Medzi najčastejšie NTDs patrí *spina bifida*, anencefália a encefalokéla, pričom anencefália je vždy letálna (1-3).

Patologická sekvencia exencefália–anencefália je väčšinou multifaktoriálne podmienená, takže kombináciou genetických aj environmentálnych faktorov. Začína zlyhaním uzáveru *neuroporus anterior* približne 10–20 dní po ovulácii. Spočiatku sa vyvíja mozog bez lebky a obalov (exencefália), no chemickým vplyvom plodovej vody a mechanickými faktormi dochádza k jeho dezintegrácii, čo vedie k anencefálii (3).

Perikoncepčná suplementácia kyseliny listovej je účinná v znižovaní rizika NTDs, preto sa predpokladá súvis patogenézy s metabolizmom folátu (4). Viaceré gény boli testované ako potencionálne biologické kandidáty, pričom jeden z génov záujmu je *MTHFR* (metylén-tetrahydrofolát reduktáza), ktorý kóduje cytosolový enzým premieňajúci homocysteín na metionín. Varianty v tomto géne boli asociované s niektorými NTDs, avšak výsledky sú nekonzistentné (4,5).

Jedným z variantov je *MTHFR* C677T, ktorý na základe aktuálnej meta-analýzy bol asociovaný so zvýšeným rizikom NTDs v kaukazskej a ázijskej populácii (6).

Vo všeobecnosti sa štúdie zameriavajú vo väčšom množstve na malformácie ako *spina bifida*, pravdepodobne na základe ich vyššieho výskytu u živonarodených kvôli nižšej mortality v porovnaní s anencefáliou, kde je zber materiálu limitovaný na *post-mortem* vyšetrenie.

Cieľom tejto štúdie bolo stanoviť, či existuje asociácia medzi *MTHFR* C677T genotypom plodu a rizikom anencefálie, ktorá by bola relevantná hlavne pre posúdenie rizika pre budúce gravidity.

Materiál a metódy

Charakteristika súboru

Do štúdie bolo zaradaných 20 archivovaných prípadov anencefálie, ktoré boli v minulosti indikované na *post-mortem* cytogenetické vyšetrenie..

Klinické charakteristiky skúmaného súboru sú uvedené v Tabuľke 1. V skratke, z celkového počtu 20 gravidít bolo 18 umelo prerušených z medicínskej indikácie (UPT) a dva plody odumreli spontánne. Gestačné týždne variovali od 12. do 30. týždňa. U 12 plodov sa vyskystli okrem anencefálie aj ďalšie vývinové anomálie.

DNA z archivovaných vzoriek choriových klkov alebo pupočníka bola izolovaná komerčnou súpravou *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) podľa odporúčaní výrobcu.

Genotypizácia metódou RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*)

Pre stanovenie genotypu *MTHFR* v pozícii 677, bola zvolená metóda založená na reštrikčnom štiepení amplifikovaného regiónu (RFLP). Sekvencie primerov, anelačná teplota pre primery a reštrikčný enzým boli zvolené na základe publikácie Ou a spol. (7) (*forward primer*: 5'-AAGGATGCCCATGTCGGTGCATGCCT-3', *reverse primer*: 5'-GAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCT-3´). *GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix* (Promega) bol použitý pre PCR (*polymerase chain reaction*). Reštrikčné štiepenie bolo vykonané pomocou *FastDigest TaqI* (Thermo Scientific). Veľkosť amplifikovaného regiónu pomocou PCR bola 142 bázových párov (bp). V prípade, že amplifikovaný región obsahuje C alely, produkt nie je štiepený reštrikčným enzýmom. Ak sú prítomné T alely, reštrikčný enzým štiepi PCR produkt na 84 bp a 58 bp fragmenty. V heterozygotnom stave obsahuje PCR produkt po štiepení 3 fragmenty – 142 bp, 84 bp a 58bp. Pre stanovenie genotypu boli reštrikčne štiepené PCR produkty separované elektroforeticky na 3 % agarózovom (Serva) géli pri 80V 3 hodiny v chladničke (Obr. 1).

Štatistická analýza

Frekvencie zistených alel v nami skúmanom súbore boli porovnané s publikovanými dátami štúdie Šutovský a spol. (8), kde bol stanovený genotyp u 534 zdravých dospelých ľudí z rovnakej populácie (Slovenská republika). Chí-kvadrát test bol použitý pre určenie štatistickej významnosti.

Výsledky

V skúmanom súbore bol pomocou metódy RFLP stanovený genotyp CC v 8 prípadoch (40 %), genotyp CT (55 %) v 11 prípadoch a genotyp TT v 1 prípade (5 %). Pri porovnaní nami získaných výsledkov s výsledkami skúmaných na zdravých kontrolných vzorkách rovnakej populácie (8), neboli pozorované štatisticky signifikantné rozdiely (X^2 = 1.3979, p hodnota = 0.497107). Použitím presnejšej metodiky založenej na absolútnej kvantifikácii – digitálnou PCR sme overili 7 vzoriek (2 vzorky CC genotypu, 4 vzorky CT genotypu a jednu vzorku TT genotypu), kde boli výsledky konkordantné s metódou RFLP a pri heterozygotných vzorkách neboli pozorované alelické imbalancie, ktoré by značili materskú kontamináciu.

Tab. 1: Charakteristika skúmaného súboru.

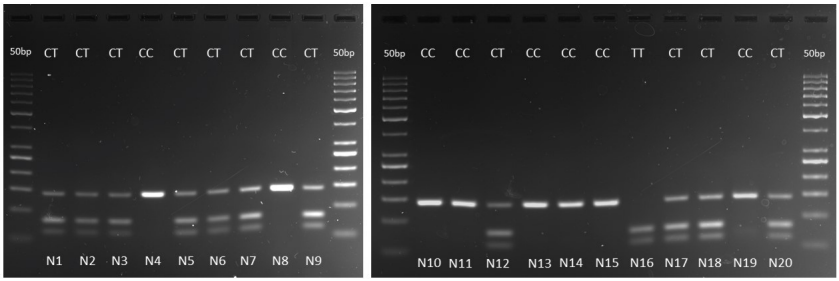
Číslo vzorky	Ukončenie gravidity	Gestačný týždeň	Iné vývinové anomálie	*MTHFR* C677T genotyp
N1	UPT	21	-	CT
N2	UPT	17	-	CT
N3	UPT	20	Rázštep pery	CT
N4	UPT	21	-	CC
N5	UPT	18	-	CT
N6	UPT	19	-	CT
N7	UPT	13	-	CT
N8	MAb	12	Omfalokéla	CC
N9	UPT	19	Rázštep podnebia, hypoplázia *labia majora*	CT
N10	UPT	22	Rázštep pery a podnebia, syndróm amniových pruhov, *pes equinovarus*	CC
N11	UPT	19	-	CC
N12	UPT	17	*Spina bifida*	CT
N13	UPT	18	*Spina bifida*	CC
N14	UPT	20	Cervikálna meningokéla, syndróm amniových pruhov, *pes equinovarus*	CC
N15	UPT	18	*Spina bifida*, omfalokéla	CC
N16	UPT	21	-	TT
N17	UPT	12	-	CT
N18	UPT	16	-	CT
N19	UPT	15	-	CC
N20	IUFD	30	Rázštep podnebia, *pes equinovarus*	CT

UPT – umelé prerušenie tehotenstva z medicínskej indikácie, MAb – zadržaný potrat, IUFD – vnútromaternicová smrť plodu

Tab. 2: Porovnanie genotypových frekvencií skúmaného anencefalitického súboru so zdravými kontrolami.

Genotyp	Anencefalitické plody (n=20)	Zdravé kontroly (n=534) – Šutovský a spol. 2020
CC	8 (40%)	272 (50,9%)
CT	11 (55%)	223 (41,8%)
TT	1 (5%)	39 (7,3%)

X^2 = 1.3979, p hodnota = 0.497107



Obr. 1: Separácia PCR produktov po štiepení reštrikčným enzýmom TaqI Reštrikčne štiepené PCR produkty boli separované elektroforeticky na 3 % agarózovom géli. 142 bp dlhý PCR produkt značí prítomnosť C alely, zatiaľ čo 84bp a 58bp fragemnty značia prítomnosť T alely. Prítomnosť 3 fragmentov značí heterozygotný stav (CT). N1-N20 – číslo vzorky, 50bp – 50 bp DNA ladder (O'GeneRuler – Thermo Scientific).

Diskusia

Vzhľadom na 100% letalitu anencefálie dochádza často k odkladaniu genetickej diagnostiky až do *post-mortem* periódy. Výsledky genetických vyšetrení zohrávajú kľúčovú úlohu v posúdení rizika pre budúce gravidity, preto je dôležité zvoliť správnu metodiku analýzy (9,10). Aj keď homozygotný stav T allely C677T variantu v *MTHFR* géne v plodoch je v literatúre považovaný za rizikový faktor pre NTDs (6,7), naše výsledky nepreukázali štatisticky významný rozdiel medzi zdravou populáciou Slovenska a anencefalitickými plodmi.

Dnes, v dobe množstva dostupných, no nie vždy vedecky podložených genetických testov, môže byť výber správneho testu zložitý. Príkladom je testovanie variantov *MTHFR* na hereditárnu trombofíliu, ktoré ponúka mnoho laboratórií, hoci je preukázané, že *MTHFR* varianty nezvyšujú riziko trombózy (11). Podobne, kvôli nejednoznačnej súvislosti s rizikom NTDs, *The American College of Obstetricians and Gynecologists* neodporúča rutinný skríning variantov *MTHFR* (12).

Variant C677T génu *MTHFR* bol skúmaný ako možný rizikový faktor mnohých ochorení, vrátane cievnych, neurologických a psychiatrických chorôb, neplodnosti či rakoviny. Výsledky sú však často nejednoznačné, čo spochybňuje jeho klinický význam (13).

Naše výsledky naznačujú, že genotypizácia *MTHFR* C677T u anencefalitických plodov môže viesť k nesprávnej interpretácii údajov v dôsledku nadhodnotenia klinického významu tohto bežného genetického variantu. To môže potenciálne odviesť pozornosť od dôležitejšej diagnostiky cytogenetických aberácií alebo monogénových ochorení. Hoci je preukázaná asociácia anencefálie s poruchami metabolizmu kyseliny listovej a kľúčová úloha perikoncepčnej suplementácie folátu v prevencii NTDs je jasná (4), tento metabolický proces je vysoko komplexný a nemožno ho redukovať len na analýzu niekoľkých bežných variantov.

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00253 a grantom VEGA 1/0198/24.

Schválené etickou komisiou Univerzitnej nemocnice Bratislava – Nemocnice sv. Cyrila a Metoda. Výskum bol vykonaný v súlade s Helsinskou deklaráciou (1975, rev. 2013). Všetky publikované údaje boli anonymizované podľa etických štandardov.

Zoznam použitej literatúry

1. Stallings EB, Isenburg JL, Rutkowski RE et al. National population-based estimates for major birth defects, 2016–2020. Birth Defects Res. 2024 Jan;116(1):e2301.
2. European Commission. EUROCAT. (2025, Marec) Folic Acid and Neural Tube Defects. Dostupné na: https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/prevention-and-risk-factors/folic-acid-neural-tube-defects_en#inline-nav-5 (citované 30.3.2025)
3. Monteagudo A. Exencephaly-anencephaly Sequence. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2020 Dec;223(6):B5–8.
4. Czeizel AE, Dudás I, Paput L, Bánhidy F. Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins? Ann Nutr Metab. 2011 Oct;58(4):263-71.
5. OMIM (2025, Marec). # 601634 NEURAL TUBE DEFECTS, FOLATE-SENSITIVE; NTDFS. Dostupné na: https://omim.org/entry/601634 (citované 30.3.2025)
6. Tabatabaei RS, Fatahi-Meibodi N, Meibodi B et al. Association of fetal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects: a systematic review and update meta-analysis. Fetal Pediatr Pathol. 2020;41(2):225-41.
7. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK et al. 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. Am J Med Genet. 1996 Jun 28;63(4):610–4.
8. Sutovsky S, Petrovic R, Fischerova M et al. Allelic Distribution of Genes for Apolipoprotein E and *MTHFR* in Patients with Alzheimer's Disease and Their Epistatic Interaction. Rektorova I, editor. Journal of Alzheimer's Disease. 2020 Sep 29;77(3):1095–105.
9. Ghi T, Dall'asta A, Pilu G, et al. Neural tube defects. In: Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care. 2nd ed. Elsevier; 2018. p. 213-26. ISBN: 9780323445481.
10. Quinlan-Jones E, Lord J, Williams D et al. Molecular autopsy by trio exome sequencing (ES) and postmortem examination in fetuses and neonates with prenatally identified structural anomalies. Genetics in Medicine. 2019 May;21(5):1065–73.
11. Deloughery TG, Hunt BJ, Barnes GD et al. A call to action: MTHFR polymorphisms should not be a part of inherited thrombophilia testing. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. 2022 Apr;6(4):e12739.
12. Practice Bulletin No. 187: Neural Tube Defects. (2017). *Obstetrics and gynecology*, *130*(6), e279–e290. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002412
13. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. European Journal of Medical Genetics. 2015 Jan;58(1):1–10.

13. Explorations at the Interface of Transmission Electron Microscopy and Drosophila Neuroscience: A Comparative Study of Contrast Agents in Brain and Muscle Tissue

Steven Arthur Calle

Supervisor: Paulína Gálfiová, MD., Ph.D,
Institute of Histology and Embryology

Introduction

Transmission Electron Microscopy (TEM) remains a cornerstone for ultrastructural analysis in biomedical research, particularly in neuroscience and connectomics due to its nanometer-scale resolution. However, TEM imaging quality depends heavily on techniques for sample preparation and reliable contrast enhancement [1,2]. Conventional uranyl acetate, a uranium-based stain, has long been the gold standard for enhancing the electron density of biological structures. However, it presents notable drawbacks: radioactivity, toxicity, and regulatory handling requirements [3,4].

In response to these limitations, newer non-radioactive alternatives like UranyLess, a lanthanide-based stain, have emerged and proved useful in previous studies [3-5]. These are promoted as safer and more practical, but comprehensive evaluations of their effectiveness in neural tissues are limited. Given the increasing reliance on TEM in neurobiology, as made evident by its pivotal role in mapping the whole-brain connectome in *Drosophila melanogaster* [6-8], evaluating viable contrast agents is critical as research efforts expand to elucidate connectivity in larger brains.

This study compares uranyl acetate and UranyLess in terms of qualitative and quantitative contrast in neural and muscle tissue from *Drosophila melanogaster*, using Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM). The objective of this work is inspired by the author's previous and ongoing work in TEM-based *Drosophila* neuroscience research – which, thus far, has consisted of only computational methods – and aims to expand expertise into the pre-computational benchwork of sample preparation and imaging. This enabled a deeper understanding of the whole pipeline of TEM data investigation, from sample preparation to quantitative analysis.

Methods

Sample Preparation

Adult *Drosophila* heads were dissected from etherized wild-caught flies to isolate neural and muscle tissues. Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde followed by post-fixation in 1% osmium tetroxide. Dehydration was performed using a graded ethanol series, followed by clearing with propylene oxide and embedding in Durcupan ACM resin. Polymerization occurred at 60°C for 72 hours.

Sectioning and Staining

Following resin curing, ultrathin sections ranging from 50 to 90 nanometers were produced. With the goal of comparing two serial sections, each section was collected on copper grids and divided into one of two experimental groups. The first group was stained using 2% uranyl acetate followed by Reynold's lead citrate. The second group underwent contrasting with UranyLess followed by lead citrate, per manufacturer protocol. The

STEM Imaging

Images were captured using a ZEISS EVO LS 15 scanning electron microscope fitted with a STEM detector. We attempted to standardize imaging parameters, including accelerating voltage, magnification, and focus, across both groups. Image acquisition targeted regions rich in neural profiles, synaptic vesicles, and muscle sarcomeres.

Image Analysis

Qualitative assessments focused on the visibility and definition of subcellular structures such as synaptic membranes, mitochondria, and myofibrillar arrangements. For quantitative contrast analysis, grayscale pixel intensity histograms were generated in R using the EBImage package. Key metrics calculated from the resulting plots included standard deviation (SD) and area under the curve (AUC), reflecting pixel intensity distribution and overall image intensity, respectively. Imaging artifacts such as section folding, wrinkling, and contamination were noted and classified.

Results

Only eight STEM images were deemed suitable for analysis—seven stained with uranyl acetate and one with UranyLess. Four uranyl acetate images captured well-preserved CNS tissue, revealing axonal profiles, glial processes, mitochondria, and microtubules with strong membrane contrast. An example of CNS tissue stained with uranyl acetate can be seen in Figure 1. The UranyLess-stained image successfully revealed striations in muscle tissue, but with lower overall resolution compared to muscle tissue stained with uranyl acetate (Figure 2). A key limitation was the lack of two serial sections of brain tissue treated with different staining and captured at the same magnification, allowing for a more direct comparison between contrasting agents. Despite the differences observed in the samples, both staining protocols enabled the visualization of subcellular architecture, suggesting UranyLess may serve as a viable alternative under optimized conditions.

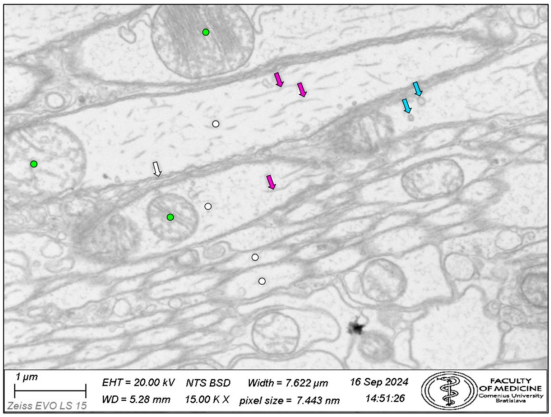


Figure 1. STEM image – neuronal tissue, uranyl acetate. This image highlights several key features, including neuronal processes from individual neurons (white circles) of various diameters, neuronal cell membranes (white arrows), mitochondria (green circles), vesicles (blue arrows), and microtubules (magenta arrow). Additionally, an artifact is present in the bottom-right quadrant of the image, likely due to contamination.

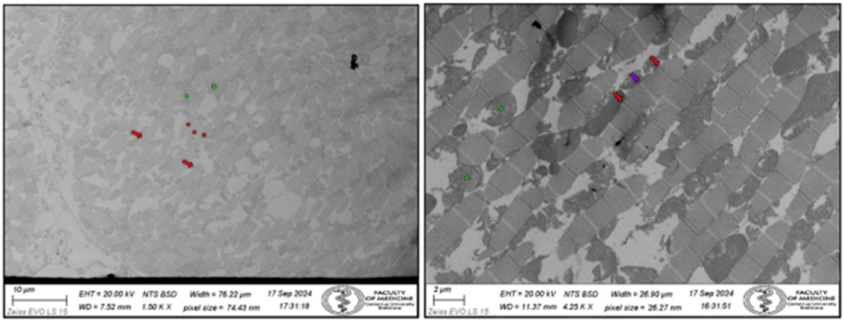
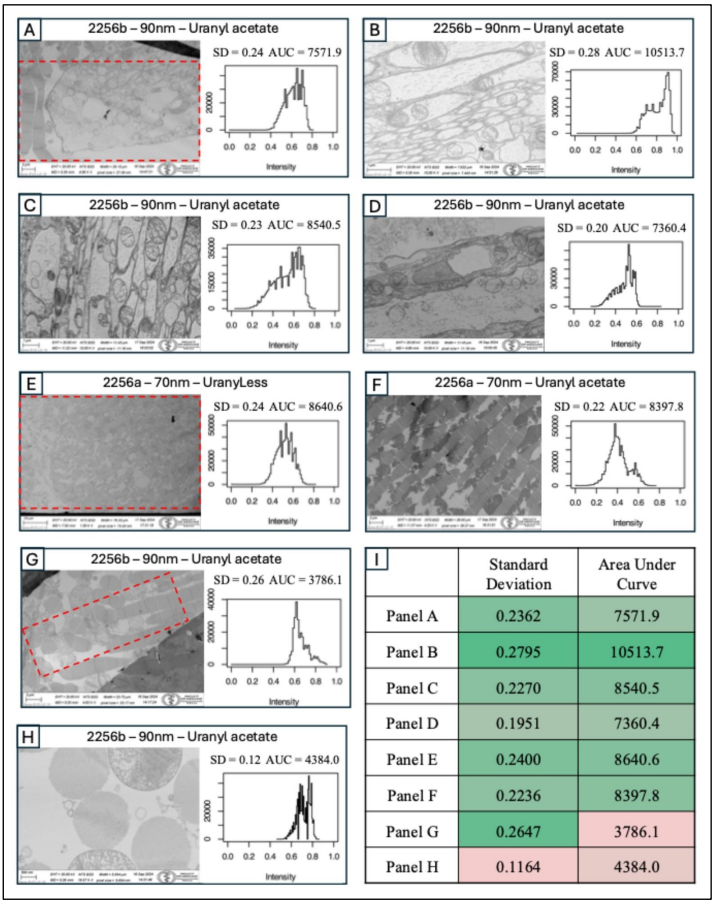


Figure 2. STEM image – muscle tissue, UranylLess (left) versus uranyl acetate (right). (Left) The larger field of view highlights the overall organization of the muscle tissue, including myofibrils (red circles) revealing faint striations (red arrows) indicative of sarcomeres, and interspersed mitochondria, albeit with lower visibility of fine structures compared to samples stained with uranyl acetate. The artifact in the top-right quadrant of this image is due to contamination, whereas the artifact visible along the entire bottom portion of the image reflects a portion of the grid on which the sample is fixed. (Right) Key structural features include mitochondria (green circles), Z-disks (red arrows) marking the boundaries of individual sarcomeres, and the M-line (purple arrow) at the center of each sarcomere.



I

	Standard Deviation	Area Under Curve
Panel A	0.2362	7571.9
Panel B	0.2795	10513.7
Panel C	0.2270	8540.5
Panel D	0.1951	7360.4
Panel E	0.2400	8640.6
Panel F	0.2236	8397.8
Panel G	0.2647	3786.1
Panel H	0.1164	4384.0

Figure 22. Comparison of pixel intensity distributions in STEM images. Panels A-H display representative STEM images alongside their corresponding pixel intensity histograms, illustrating the distribution of grayscale values in each image. The histograms provide a quantitative image contrast analysis, with standard deviation (SD) reflecting the spread of pixel intensity values and the area under the curve (AUC) quantifying overall image intensity. Panel B shows the highest SD (0.28) and AUC (10,513.7), representing the broadest range of intensity values. UranyLess-stained image (Panel E) demonstrates an AUC of 8,640.6 and SD of 0.24, showing comparable intensity and contrast to uranyl acetate-stained samples. Where applicable, cropped regions are represented as dashed red lines (Panels A, E, G) and were selected to avoid major artifacts, resulting in lower AUC values despite maintaining intensity distribution (i.e., SD). The table in Panel I summarizes all panels' SD and AUC values, highlighting the variability in intensity and contrast across different images. This comparison underscores the contrast differences between staining methods and sample conditions.

Pixel intensity distribution analysis of all 8 STEM images supported these findings, as seen in Figure 3. Histograms of uranyl acetate-stained images demonstrated broader intensity distributions (SD_{max} = 0.2795) with greater overall image intensity (AUC_{max} = 10513.7), indicating greater dynamic range in electron density. In comparison, the UranyLess image (SD_{max} = 0.2400; AUC = 8640.6) had narrower intensity distributions and lower overall image intensity. However, due to the inability to properly compare two serial sections of brain tissue at the same magnification – one stained with uranyl acetate and the next with UranyLess – the comparability of metrics across images is limited. Nevertheless, this work provides a framework for qualitative analysis of staining techniques used in biological sample preparation for TEM imaging, informing future work.

Discussion

The findings of this study demonstrate that uranyl acetate remains qualitatively superior to UranyLess in achieving high-contrast TEM imaging of neural and muscle tissues. The uranium-based stain's high atomic number facilitates stronger electron scattering, resulting in better definition of critical ultrastructural features. This is particularly important in neurobiology, where detailed visualization of synaptic membranes and vesicle distributions is often necessary for accurate circuit mapping and analysis [6-9].

Nonetheless, UranyLess demonstrated moderate effectiveness in enhancing biological contrast in muscle tissue. Follow-up investigations in which samples stained with UranyLess were imaged on a Hitachi TEM revealed qualitatively higher definition of muscle tissue compared to images captured in this study; however, these results are not showed here. In contexts where safety and environmental impact are primary concerns—such as in teaching laboratories or facilities with limited waste disposal infrastructure—UranyLess could serve as a viable alternative, albeit with reduced reliability. The variability observed in its staining performance highlights the need for protocol refinement and suggests that future studies should focus on rigidly standardized imaging of serial sections. In addition, future studies might investigate pH optimization, buffer compatibility, and post-staining drying times to enhance consistency [3,5].

This study shows that while uranyl acetate continues to provide superior contrast for high-resolution imaging in TEM, UranyLess offers a safer, non-radioactive alternative with moderate efficacy, particularly in muscle tissue. By integrating qualitative and quantitative analyses, this work highlights strengths and limitations of current staining methods and reinforces the importance of precision throughout the sample preparation pipeline. These findings contribute to ongoing efforts in refining TEM protocols for safer, more accessible, and reliable ultrastructural imaging. The integration of the author's previous computational work in *Drosophila* connectomics with hands-on sample preparation marks a full-circle approach to TEM-based neuroscience research. It reflects the growing trend in neuroscience toward multidisciplinary workflows that combine molecular biology, microscopy, and computational data analysis to reconstruct brain-wide circuitry [6-8].

References

1. Bozzola, J.J. and Russell, L.D. (2006) *Electron microscopy: Principles and techniques for Biologists*. 2nd edn. Boston, Massachusetts: Jones and Bartlett. ISBN 0080528090

2. Mielańczyk, Ł. *et al.* (2015) 'Transmission electron microscopy of biological samples', *The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications* [Preprint]. doi:10.5772/60680.
3. Benmeradi, N., Payre, B. and Goodman, S.L. (2015) 'Easier and safer biological staining: High contrast uranyless staining of TEM grids using mPrep/G capsules', *Microscopy and Microanalysis*, 21(S3), pp. 721–722. doi:10.1017/s1431927615004407.
4. Hosogi, N., Nishioka, H. and Nakakoshi, M. (2015) 'Evaluation of lanthanide salts as alternative stains to uranyl acetate', *Microscopy*, 64(6), pp. 429–435. doi:10.1093/jmicro/dfv054.
5. Mrazova, K. *et al.* (2023) 'Urany-less low voltage transmission electron microscopy: A powerful tool for ultrastructural studying of cyanobacterial cells', *Microorganisms*, 11(4), p. 888. doi:10.3390/microorganisms11040888.
6. Zheng Z, Lauritzen JS, Perlman E, et al.: A complete electron microscopy volume of the brain of adult *Drosophila melanogaster*. Cell 2018; 174(3): 730–743.e22
7. Dorkenwald S, Matsliah A, Sterling AR, et al.: Neuronal wiring diagram of an adult brain. Nature 2024; 634(8032): 124–138
8. Schlegel P, Yin Y, Bates AS, et al.: Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing of *Drosophila*. Nature 2024; 634(8032): 139–152.
9. Van Bockstaele, E.J. (2016) *Transmission electron microscopy methods for understanding the brain*. New York, NY: Humana Press. ISBN 978-1-4939-3638-0

14. Rapid diagnosis of uropathogens and their antimicrobial resistance by nanopore sequencing – a proof-of-concept report

Dominika Stoláriková

(general medicine, 5th year)

Co-authors: Mgr. Tomáš Strečanský[1]

Tutor: doc. MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH[1,2,3]

[1]Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, [2]Institue of Physiology, Faculty of Medicine, Comenius University, [3]Nemocnica Bory – Penta Hospitals, Bratislava, Slovakia

Introduction

Urinary tract infection (UTI) is an inflammatory response of the urothelium to pathogenic microorganisms within the urinary tract. It is among the most common bacterial infections in both community and healthcare settings.(1,2) Despite the advances in diagnosis and management, they are still related to high incidence and mortality rates.(3)

The clinical phenotypes of UTIs are heterogeneous ranging from rather benign, uncomplicated infections (urethritis, cystitis) to complicated UTIs (cUTIs) (pyelonephritis, bacteremia, severe urosepsis and septic shock)(1). Moreover, UTIs can be caused by diverse pathogenic microorganisms with a wide range of virulence factors and multidrug-resistant strains, thus complicating both diagnosis and treatment/management.(4)

The current gold standard method for identifying uropathogens in clinical laboratories is culture-based testing. Nevertheless, culture-based assays have substantial limitations, including long turnaround times (48-96 hours), the inability to grow certain pathogens, and the potential for false-negative and false-positive results. Therefore, the initial antibiotic (ATB) therapy remains solely empirical.(5) Furthermore, increasing antimicrobial resistance (AMR) of pathogens represent a major challenge, as delays in antibiotic administration can significantly increase the in-hospital mortality.(6)

There is an urgent need for rapid detection of pathogens and antimicrobial resistance profiling, even from samples with low microbial loads. It might significantly improve ATB management, leading to less adverse effect to patients, shorter in-hospital stay and lower mortality. We believe, that nanopore sequencing can provide faster and reliable method for detecting and identifying causative or emerging microorganisms in unexplained infectious disease syndromes, as well as in facilitating timely and targeted antibiotic therapy through the detection of antimicrobial resistance genes.

This research aims to present a proof-of-concept application of nanopore sequencing-based methodology to identify uropathogens and their AMR profiles and evaluate whether this would be a suitable method for point-of-care testing in clinical setting.

Materials and methods

Urine samples were obtained from three patients who were admitted to the Emergency department of Bory Hospital with severe UTIs. Each sample was collected into a 10 ml urine collection tube for standard microbiological testing conducted by the hospital microbiological service provider (UniLabs), and for further analysis using our proprietary PARADiX™ workflow via nanopore sequencing. Briefly, in the PARADiX workflow, 2 ml of the collected urine was first passed through a host depletion filter into a collection tube using a syringe. The filtrate was then centrifuged, and the supernatant was removed. The resulting pellet was used as a substrate for whole genome amplification. Quantification of the amplified DNA was performed using a Qubit 3.0 fluorometer.

Finally, 50-75 ng of DNA was used for sequencing library preparation using Rapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) according to manufacturer instructions. Briefly, the DNA was enzymatically fragmented using a fragmentation mixture. Sequencing adapters were diluted to an appropriate concentration before ligation to the fragmented DNA. Sequencing was performed on a MinION nanopore sequencing device using the smallest Flongle flowcell (R10.4.1) and the MinKNOW software (v24.11.10). Real-time data analysis was conducted using Epi2me software for taxonomic classification (epi2me-labs/wt-metagenomic v2.12.1), while the BugSeq platform was used for the identification of antimicrobial resistance genes.

Results

Case 1

A 70-year-old male patient was admitted to the emergency department of Bory Hospital at 9:28 in somnolent state. He was catheterized upon admission by attending physician, yielding 250 ml of turbid, dark yellow urine. Two urine samples were collected – one for conventional culture and sensitivity testing and another for nanopore sequencing. Empirical intravenous ceftriaxone therapy was initiated. The sample for sequencing was stored at 4°C and processed within 24 hours using PARADiX workflow. DNA quantification revealed 1,23 ng/μl of DNA.

The conventional microbiological culture identified *Klebsiella pneumoniae* with ESBL-positive impermeability (extended spectrum beta-lactamases) after 72 hours. In contrast, nanopore sequencing identified *Klebsiella pneumoniae, Aerococcus mictus, Klebsiella variicola and Escherichia coli* as most prevalent bacteria in urine within 24 hours. The detailed identification results are presented in Tab.1. Given these findings, we expanded our investigation into microbial resistance in subsequent patients to enhance early detection.

Tab. 1: Table comparing culture, sensitivity and nanopore-sequencing results from the case 1 urine sample of 70-year-old male patient from Bory Hospital, AMR – antimicrobial resistance.

	BACTERIA	PERCENTAGE	AMR
CULTURE	*Klebsiella pneumoniae*		ESBL
NANOPORE SEQUENCING	*Klebsiella pneumoniae*	67,3 %	not tested
	Aerococcus mictus	13,5 %	
	Unknown	10,6 %	
	Homo sapiens	2,7 %	
	Klebsiella variicola	1,6 %	
	Escherichia coli	1,2 %	
	Others	3,1 %	

Case 2

A 51-year-old male was admitted to the Emergency department of Bory Hospital at 14:00 due to urinary catheter obstruction. Catheterization yielded 700 ml of fractionally turbid and odorous yellow urine. After post-rinse permanent catheter insertion, empirical intravenous ceftriaxone was administered. Again, two urine samples were collected – one for traditional culture and sensitivity and another for nanopore sequencing.

The sample for sequencing was stored at 4°C and processed within next 24 hours according to the protocol. DNA quantification revealed a concentration of 87 ng/μl. AMR was analyzed using BuqSeq.

Microbiological culture identified *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* producing ESBL and carbapenemase after 4 days. Nanopore sequencing detected *Klebsiella pneumoniae* with 6-fold genome coverage within 2 hours along with *Streptococcus constellatus* and *Morganella morganii*. The latter obtained data likely represents a misidentification of *Proteus mirabilis* by MALDI-TOF, as both belong to the *Morganellaceae* family. BugSeq AMR analysis showed a 100% match with culture results and identified ESBL- and carbapenemase-producing strains. The detailed results are shown in Tab.2.

Tab. 2: Table comparing culture, sensitivity and nanopore-sequencing results from the case 2 urine sample of 51-year-old male patient from Bory Hospital, AMR – antimicrobial resistance.

	BACTERIA	PERCENTAGE	AMR
CULTURE	*Klebsiella pneumoniae*		ESBL, carbapenemase
	Proteus mirabilis		ESBL
NANOPORE SEQUENCING	*Klebsiella pneumoniae*	64 %	ESBL, carbapenemase
	Streptococcus constellatus	12 %	ESBL
	Morganella morganii	10 %	ESBL
	Unknown	4 %	ESBL
	Others	10 %	

Case 3

A 78-year-old female was admitted to the Emergency department of Bory Hospital with burning pain during urination, lower abdominal pain, fever and hematuria and pus. The patient was on ciprofloxacin for 3 months due to hip joint infection. Upon catheterization, she was treated with intravenous ciprofloxacine and gentamicine.

Tab. 3: Table comparing results from culture and nanopore sequencing of case 3 urine samples, AMR – antimicrobial resistance.

	BACTERIA	AMR
CULTURE	*Enterococcus faecium*	beta-lactams, fluoroquinolones and nitrofurantoin
NANOPORE SEQUENCING	*Enterococcus faecium*	beta-lactams, quinolones, nitrofurantoin, aminoglycosides, and macrolides

The sequencing sample was stored at 4°C and processed within 24 hours after collection according to the protocol, yielding 3,71 ng/μl of DNA. AMR was analyzed by BugSeq.

Conventional microbiological culture identified *Enterococcus faecium* resistant to beta-lactamases, fluoroquinolones and nitrofurantoin after 2 days. The most prevalent bacteria using nanopore sequencing was *Enterococcus faecium*. BugSeq AMR analysis detected

resistance to beta-lactams, aminoglycosides, macrolides and quinolones within 24 hours (Tab.3). Nanopore sequencing turn-around time was less than 24 hours, with hands-on about 90 minutes. Additionally, the nanopore sequencing detected in minor abundance also additional species, mostly from urine microbiome beyond culture results. AMR analysis also matched culture results.

Discussion

This study evaluated the potential of nanopore sequencing (NPS) against conventional culture-based assays for pathogen identification and AMR profiling in patients with urinary infection. NPS achieved 100% concordance with culture results for commonly detected pathogens and their AMR profiles. Moreover, NPS demonstrated enhanced sensitivity by identifying additional pathogens missed by culture, suggesting that it provides a more comprehensive microbial assessment than traditional methods.

The increased pathogen detection by NPS likely reflects the limitations of culture-based methods, which can underestimate microbial diversity.(7) While this enhanced sensitivity may proof advantageous for detecting overlooked pathogens, it also necessitates careful clinical interpretation to differentiate true infectious agents from contaminants. Nevertheless, the ability of NPS to simultaneously identify pathogens and their AMR profiles highlights its clinical utility, particularly in scenarios requiring rapid diagnostics.

Despite our promising results, this study has several limitations. Firstly, while nanopore sequencing offers the potential for rapid turnaround times, the current protocol still requires multiple pipetting steps, which can impede with its implementation as a point-of-care diagnostic tool.

Secondly, the reliance on specific third-party reagents and bioinformatics analysis presents a potential vulnerability. Discontinuation of these products or services could pose a significant challenge to the method's future application and reproducibility.

Future work will focus on optimizing the NPS workflow for speed and accessibility. We also plan to investigate its clinical impact on patient management, outcomes and healthcare costs. Nevertheless, while NPS needs further optimization, it also shows a significant promise for rapid infectious disease diagnostics of UTIs.

References

1. Wagenlehner FME, Bjerklund Johansen TE, Cai T, Koves B, Kranz J, Pilatz A, et al. Epidemiology, definition and treatment of complicated urinary tract infections. Nat Rev Urol. 2020 Oct;17(10):586–600.
2. Onorato L, Allegorico E, Macera M, Monari C, Migliaccio B, Nasta C, et al. Prevalence and impact of multidrug resistance in a cohort of patients admitted to emergency department for urinary tract-infections: The UTILY study, a prospective multicentre study. European Journal of Internal Medicine. 2025 Mar 1;133:93–9.
3. Yang X, Chen H, Zheng Y, Qu S, Wang H, Yi F. Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. Front Public Health [Internet]. 2022 Jul 27 [cited 2025 Mar 8];10. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/public-health/articles/10.3389/fpubh.2022.888205/full

4. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May;13(5):269–84.
5. Ippolito M, Cortegiani A. Empirical decision-making for antimicrobial therapy in critically ill patients. BJA Education. 2023 Dec 1;23(12):480–7.
6. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health - PMC [Internet]. [cited 2025 Apr 1]. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10340576/
7. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. Annu Rev Pathol. 2019 Jan 24;14:319–38.

15. Asociácia genetických variantov s výskytom ochorenia Covid-19 u jedincov s diabetom

Nikola Janoštiaková

(lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: Patrik Krumpolec[2], Dominik Hadžega[2], Michaela Hýblová[2], Vanda Repiská[1], Gabriel Minárik[2]

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH [1]

[1]Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, [2]Medirex Group Academy, Nitra

Úvod

Pandémia ochorenia Covid-19, spôsobená vírusom SARS-CoV-2, predstavovala výnimočnú globálnu zdravotnú krízu s rozsiahlymi dôsledkami na verejné zdravie. Hoci Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) 5. mája 2023 oficiálne zrušila stav globálnej núdze súvisiaci s touto infekciou [1], poznatky získané počas pandémie zostávajú dôležitým zdrojom informácií o imunitnej odpovedi organizmu, genetických predispozíciách k infekčným ochoreniam a komplexných mechanizmoch interakcie medzi vírusom pri akútnom respiračnom vírusovom ochorení (AVRO) a hostiteľom.

Klinický priebeh infekcie SARS-CoV-2 vykazuje výraznú variabilitu – od asymptomatických prípadov až po ťažké formy ochorenia vedúce k syndrómu akútnej respiračnej tiesne (ARDS), multiorgánovému zlyhaniu a úmrtiu [2, 3]. Epidemiologické štúdie identifikovali viacero faktorov spojených so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, vrátane vyššieho veku, obezity a sprievodných ochorení [4]. Medzi týmito komorbiditami sa ako významný rizikový faktor opakovane potvrdilo ochorenie *diabetes mellitus* (DM), ktoré je spojené s vyšším výskytom komplikácií a nepriaznivými klinickými výsledkami pri infekcii Covid-19 [5, 6, 7]. Napriek týmto zisteniam nie je jasné, či ide o priamy kauzálny vzťah alebo dôsledok synergického pôsobenia viacerých faktorov vrátane genetickej predispozície, zápalových mechanizmov a metabolických abnormalít. Navyše, vplyv ďalších pridružených ochorení na túto asociáciu zostáva predmetom intenzívneho výskumu.

Genetické faktory zohrávajú dôležitú úlohu v individuálnej citlivosti na SARS-CoV-2 a môžu ovplyvniť závažnosť priebehu ochorenia. Genomové asociačné štúdie (GWAS) a analýzy kandidátnych génov umožnili identifikovať genetické varianty spojené s imunitnou odpoveďou a zápalovými procesmi, ktoré prispievajú k patogenéze Covid-19 [8].

V nadväznosti na tieto poznatky sa naša štúdia zameriava na analýzu genetických faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať priebeh akútnych vírusových respiračných ochorení, pričom osobitnú pozornosť venujeme vzťahu medzi Covid-19 a DM. Naším cieľom je prehĺbiť porozumenie mechanizmom vedúcim k variabilným klinickým prejavom SARS-CoV-2 infekcie a identifikovať potenciálne biomarkery alebo terapeutické ciele. Skúmame konkrétne genetické varianty, ktoré sa predtým preukázali ako asociované so závažným priebehom infekcie a metabolickými

poruchami, čím chceme prispieť k rozšíreniu poznatkov v tejto oblasti a poskytnúť podklady pre budúce výskumy.

Materiál a metódy

Pracovali sme so vzorkami periférnej krvi 326 pacientov, ktorí v minulosti prekonali Covid-19. Vzorky boli rozdelené do troch skupín: pacienti s DM, pacienti bez DM a kontrolná populačná skupina. Pacienti s DM boli ďalej kategorizovaní podľa závažnosti príznakov Covid-19. Odber vzoriek bol vykonaný v rámci klinických štúdií schválených: Etickou komisiou Bratislavského samosprávneho kraja pod identifikátorom 03228/2021/HF z 12.1.2021; Etickou komisiou Univerzitnej Nemocnice Bratislava Nemocnica Ružinov pod identifikátorom 137/2022 z 26.9.2022 a Etickou komisiou Nemocničnej a.s. Malacky zo dňa 15.12.2022. Pri extrakcii DNA z plnej krvi sme postupovali podľa protokolu *DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen).* Na prípravu celogenómových (WGS) knižníc sme použili protokol *TruSeq Nano Library Preparation Kit (Illumina)*. Postup zahŕňal mechanické štiepenie DNA pomocou ultrasonifikátora *Covaris M220 (Covaris*). Sekvenovanie bolo vykonané na platforme *NovaSeq X Plus (Illumina)* s cieľovým pokrytím 30x. Genetické varianty boli identifikované a anotované pomocou bioinformatickej pipeline, ktorá zahŕňala detekciu a genotypizáciu variantov v porovnaní s referenčným genómom GRCh38, pričom bol použitý nástroj *Qiagen Clinical Insight* (QCI). Pre analýzu distribúcie genotypov medzi skupinami sme použili chí-kvadrát test.

Výsledky

Tab. 1 poskytuje prehľad o charakteristikách pacientov s DM, ktorí prekonali Covid-19, vrátane rozdelenia podľa priebehu ochorenia, typu diabetu, pohlavia, očkovania proti SARS-CoV-2, priemerného veku a BMI. Celkový počet analyzovaných vzoriek bol 326, pričom účastníci boli rozdelení do troch skupín: pacienti s DM (Covid19+DM+, n = 45), jedinci bez DM (Covid19+DM−, n = 120) a reprezentatívna vzorka populácie (Covid19+, n = 161).

Tab. 2 obsahuje zoznam vybraných jednonukleotidových polymofrizmoch (SNP) spojených s DM2 a faktormi, ktoré môžu ovplyvniť závažnosť priebehu Covid-19, ako sú obezita a vysoký krvný tlak. Analýza genotypových frekvencií medzi skupinami odhalila štatisticky významné rozdiely pri SNP rs1412234 (p = 0,0186) a rs17836088 (p = 0,0022), čo naznačuje ich možnú úlohu v patogenéze ochorenia u diabetických pacientov (Tab. 3). Tieto rozdiely poukazujú na potenciálnu genetickú predispozíciu k závažnejšiemu priebehu Covid-19 u jedincov s DM.

Na porovnanie pozorovaných a očakávaných genotypových frekvencií medzi skúmanými skupinami sme použili chí-kvadrát test. Výsledky podporujú hypotézu o genetickej väzbe medzi DM a priebehom Covid-19.

Tab. 1: Špecifické rozdelenie diabetických pacientov, ktorí prekonali Covid-19, do jednotlivých podskupín. Zároveň poskytuje informácie o počte vzoriek v závislosti od závažnosti priebehu ochorenia, typu DM, očkovania proti SARS-CoV-2, pohlavia a priemerných hodnôt veku a indexu telesnej hmotnosti (BMI).

Klinický prejav Covid-19	Typ DM	Počet vz.		Očkovanie Áno/ Nie	Muži/ Ženy		Priem. vek	Priem. BMI
Asymptomatický	DM1	4	6	4/2	5/1	29/16	47	26,41
	DM2	2						
Mierny priebeh	DM1	8	38	29/9	24/14		54,42	30,68
	DM2	30						
Závažný priebeh	DM1	1	1	1/0	0/1		49	19,88

Tab. 2: Prehľad SNP lokusov súvisiacich s DM2 a faktormi zvyšujúcimi riziko závažného priebehu Covid-19, na základe dostupných databázových zdrojov. Obsahuje informácie o desiatich SNP, ktoré vykazujú asociáciu s DM2 a vybranými rizikovými faktormi (obezita / hypertenzia). Charakteristiky jednotlivých SNP a zodpovedajúce p-hodnoty boli spracované podľa údajov [9]. Hodnota p vyjadruje mieru štatistickej významnosti medzi sledovanými genetickými variantmi a príslušnými fenotypmi. Frekvencie referenčných (ref.) a alternatívnych (alt.) alel v európskej populácii boli získané z databázy NCBI dbSNP [10].

SNP	Charakteristika	P-hodnota	Ref. alela	Alt. alela	Frekvencia ref. alely	Frekvencia alt. alely
rs11688682	DM2; hypertenzia	3.32E-07	G	C	0.72834	0.27166
rs10195252	DM2; hypertenzia	3.28E-06	T	C	0.593202	0.406798
rs2307111	DM2; obezita	3.00E-12	T	C	0.596982	0.403018
rs1562396	DM2; hypertenzia	4.08E-08	A	G	0.71112	0.28888
rs17689007	DM2; hypertenzia	1.26E-08	G	A	0.53380	0.46620
rs10097617	DM2; hypertenzia	1.54E-06	T	C	0.48462	0.51538
rs1412234	DM2; obezita – trieda 1	5.60E-06	T	C	0.74493	0.25507
rs10830963	DM2; obezita	4.00E-08	C	G	0.71908	0.28092
rs17836088	DM2; obezita - trieda 1	3.50E-06	G	C	0.77761	0.22239
rs1421085	DM2; hypertenzia	5.00E-14	T	C	0.580259	0.419741

Tab. 3: Genotypové frekvencie vybraných SNP v analyzovaných skupinách a výsledky chí-kvadrát testu. Tabuľka obsahuje rozdelenie genotypov pre skúmané SNP medzi tromi skupinami: pacientmi s Covid-19 a DM (Covid19+DM+), pacientmi s COVID-19 bez DM (Covid19+DM−) a referenčnou populáciou (Covid19+). Pre každý SNP sú uvedené zaznamenané genotypové frekvencie v jednotlivých skupinách, hodnota chí-kvadrát (χ^2) a p-hodnota testu, pričom prahová hodnota významnosti bola stanovená na < 0,05, čím bola hodnotená štatistická významnosť rozdielov medzi skúmanými skupinami.

SNP	Genotyp	Kategória			X^2	p-hodnota
		Covid19+DM+ (n = 45)	Covid19+DM- (n = 120)	Covid19+ (n = 161)		
rs11688682	GG	27	52	88	7.03	0.1342
	GC	16	60	69		
	CC	2	8	4		
rs10195252	TT	13	50	47	6.94	0.1391
	TC	24	48	88		
	CC	8	22	26		
rs2307111	TT	13	38	53	5.50	0.2399
	TC	21	61	90		
	CC	11	21	18		
rs1562396	AA	15	48	54	2.36	0.6692
	AG	22	59	84		
	GG	8	13	23		
rs17689007	GG	15	45	51	1.44	0.837
	GA	19	50	76		
	AA	11	25	34		
rs10097617	TT	7	32	35	8.51	0.075
	TC	30	50	83		
	CC	8	38	43		
rs1412234	TT	14	62	73	11.84	0.0186
	TC	24	55	74		
	CC	7	3	14		
rs10830963	CC	15	61	79	5.43	0.246
	CG	27	49	68		
	GG	3	10	14		
rs17836088	GG	22	85	86	16.68	0.0022
	GC	17	33	66		
	CC	6	2	9		
rs1421085	TT	13	36	27	9.185	0.0566
	TC	20	62	98		
	CC	12	2	36		

Diskusia

Predchádzajúce epidemiologické výskumy opakovane potvrdili, že diabetes mellitus (DM) predstavuje významný rizikový faktor pre ťažší priebeh infekcie SARS-CoV-2 [5, 6, 7]. Avšak stále nie je jednoznačne preukázané, či ide o priame kauzálne spojenie, alebo je to výsledok kombinácie viacerých faktorov, ako sú genetická predispozícia, chronické zápalové procesy a metabolické zmeny. S cieľom lepšie pochopiť túto problematiku sme sa rozhodli analyzovať genetické varianty, ktoré by mohli ovplyvniť priebeh Covid-19 u pacientov s DM.

V tejto práci sme sa zamerali na analýzu genotypových rozdelení vybraných SNP medzi tromi skupinami pacientov, ktorí prekonali infekciu SARS-CoV-2: diabetikmi, nediabetikmi a kontrolnou populačnou skupinou. Na základe našich výsledkov sme zistili, že SNP rs1412234 a rs17836088 vykazovali signifikantné rozdiely medzi skupinami. Genotyp TT pre SNP rs1412234 bol častejší v kontrolnej a nediabetickej skupine, zatiaľ čo varianty TC a CC boli prevažne prítomné u pacientov s DM. Tento nález naznačuje, že alela C môže predstavovať rizikový faktor pre vznik DM, zatiaľ čo genotyp TT by mohol pôsobiť protektívne. Podobné výsledky boli pozorované aj pri SNP rs17836088, kde genotyp GG bol častejší v kontrolnej a nediabetickej skupine, pričom genotypy GC a CC sa vyskytovali vo vyššej frekvencii u diabetikov.

Tieto výsledky podporujú hypotézu, že niektoré genetické faktory môžu predisponovať jednotlivca nielen k rozvoju DM, ale aj k odlišnej reakcii imunitného systému na infekciu SARS-CoV-2. Tento predpoklad je v súlade so štúdiou [11], ktorá identifikovala SNP rs1412234 a rs17836088 ako súčasť polygenického rizikového skóre pre DM a preukázala ich spojitosť so zvýšenou inzulínovou rezistenciou a metabolickými poruchami. Vzhľadom na to, že DM je známy rizikový faktor pre komplikácie spojené s Covid-19, vyššia frekvencia rizikových genotypov u diabetikov môže naznačovať ich možný vplyv na priebeh infekcie SARS-CoV-2.

Interpretácia našich zistení však musí zohľadniť niekoľko obmedzení. Jedným z nich je veľkosť skúmaného súboru, ktorá mohla ovplyvniť našu schopnosť identifikovať určité genetické asociácie. Napriek tomu, že naše údaje naznačujú zaujímavé potenciálne genetické predispozície, na potvrdenie týchto zistení by bolo potrebné zahrnúť väčšie kohorty. Ďalším obmedzením je nemožnosť priamo vyhodnotiť vplyv genetických variantov na závažnosť priebehu Covid-19. Hoci sme mali k dispozícii klinické údaje o priebehu infekcie u pacientov s DM, rozdelenie do podskupín (asymptomatickí, mierny priebeh, závažný priebeh) nebolo dostatočne veľké na vykonanie robustnej štatistickej analýzy. Navyše nebolo možné presne určiť, či genetické faktory ovplyvňujú priebeh infekcie priamo alebo prostredníctvom interakcie s inými faktormi, ako je obezita, hypertenzia či iné pridružené ochorenia.

Ďalším dôležitým faktorom, ktorý mohol ovplyvniť naše výsledky, sú demografické charakteristiky pacientov a faktory prostredia. Naša kohorta zahŕňala údaje o veku, pohlaví, BMI a očkovaní proti SARS-CoV-2, no tieto premenné neboli zapracované do genetických analýz. Keďže vek a komorbidity, ako napríklad obezita, sú považované za významné rizikové faktory pre závažný priebeh Covid-19, budúce výskumy by mali zahŕňať detailnejšie analýzy genotypovo-fenotypových interakcií. Tieto výskumy si však budú vyžadovať širšie kohorty s dostatočnou štatistickou silou na identifikáciu relevantných vzorcov.

Pri genetických asociačných štúdiách je tiež dôležité brať do úvahy frekvenciu referenčných a alternatívnych alel v skúmanej populácii. Údaje z databázy NCBI dbSNP [10] ukazujú, že pomer majoritnej a minoritnej alely sa môže líšiť medzi populáciami, čo ovplyvňuje detekciu

štatistických rozdielov. V prípade SNP rs17836088 sme zaznamenali signifikantné rozdiely medzi skupinami, pričom pomer alel v európskej populácii bol 0,77761:0,22239, čo naznačuje dostatočný genetický kontrast. Naopak pri SNP rs17689007, kde sme nezistili signifikantné rozdiely, bol tento pomer 0,53380:0,46620, čo naznačuje menší genetický kontrast a nižšiu pravdepodobnosť detekcie významných asociácií.

Na záver, naše výsledky prispievajú k doterajším štúdiám, ktoré naznačujú, že vzťah medzi DM a priebehom Covid-19 je obojsmerný a multifaktoriálny – DM zvyšuje riziko komplikácií pri SARS-CoV-2 infekcii, zatiaľ čo samotná infekcia môže zhoršiť metabolickú rovnováhu a prispieť k rozvoju diabetických komplikácií [12]. Pre hlbšie pochopenie týchto vzorcov sú potrebné ďalšie štúdie, ktoré integrujú genetické údaje s podrobnými klinickými a epidemiologickými informáciami.

Práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a s podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja; Závažné civilizačné ochorenia a COVID-19, kód ITMS: 313011AVH7, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. https://news.un.org/en/story/2023/05/1136367 dostupné dňa 28.2.2025
2. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., … Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet. 395(10223):497-506.
3. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. The Lancet. 395(10229):1033-1034.
4. Tian, J., Yuan, X., Xiao, J., Zhong, Q., Yang, C., Liu, B., Cai, Y., Lu, Z., Wang, J., Wang, Y., Liu, S., Cheng, B., Wang, J., Zhang, M., Wang, L., Niu, S., Yao, Z., Deng, X., Zhou, F., … Wang, Z. (2020). Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study. The Lancet Oncology. 21(7):893-903.
5. Scheen, A. J., Marre, M., & Thivolet, C. (2020). Prognostic factors in patients with diabetes hospitalized for COVID-19: Findings from the CORONADO study and other recent reports. Diabetes and Metabolism. 46(4):265-271.
6. Shi, Q., Zhang, X., Jiang, F., Zhang, X., Hu, N., Bimu, C., Feng, J., Yan, S., Guan, Y., Xu, D., He, G., Chen, C., Xiong, X., Liu, L., Li, H., Tao, J., Peng, Z., & Wang, W. (2020b). Clinical Characteristics and Risk Factors for Mortality of COVID-19 Patients with Diabetes in Wuhan, China: A Two-Center, Retrospective Study. Diabetes Care. 43(7):1382-1391.
7. Varikasuvu, S. R., Varshney, S., & Dutt, N. (2021). Markers of coagulation dysfunction and inflammation in diabetic and non-diabetic COVID-19. Journal of Thrombosis and Thrombolysis. 51(4):941-946.

8. Velavan, T. P., Pallerla, S. R., Rüter, J., Augustin, Y., Kremsner, P. G., Krishna, S., & Meyer, C. G. (2021). Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. EBioMedicine. 72:103629.
9. Ni, J., Qiu, L. J., Yin, K. J., Chen, G. M., & Pan, H. F. (2023). Shared genetic architecture between type 2 diabetes and COVID-19 severity. Journal of endocrinological investigation. 46(3), 501–507.
10. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/. dostupné dňa 28.2.2025
11. Yajnik, C. S., Wagh, R., Kunte, P., Asplund, O., Ahlqvist, E., Bhat, D., Shukla, S. R., & Prasad, R. B. (2023). Polygenic scores of diabetes-related traits in subgroups of type 2 diabetes in India: a cohort study. The Lancet Regional Health - Southeast Asia. 14:100182.
12. Krumpolec, P., Kodada, D., Nyáriová, N., Repiská, V., Minárik, G. (2023). COVID-19 and Diabetes Mellitus: Mutual Interplay of Two Diseases. Curr Diabetes Rev. 19(9):e130922208761.

16. Molekulové markery karcinómu endometria

Mgr. Dominik Kodada
(lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: Patrik Krumpolec[2], Dominik Hadžega[2], Nikola Janoštiaková[1], Gabriel Minárik[2], Vanda Repiská[1]
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH[1]
[1]Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, [2]Medirex Group Academy, Nitra

Úvod

Rakovina tela maternice je najčastejšou gynekologickou malignitou vo vyspelých krajinách sveta (1, 2), pričom najčastejším typom je endometriálny karcinóm (EC) (3). Slovenská populácia je zvlášť zasiahnutá vysokou incidenciou EC, pričom v mnohých oblastiach je molekulárny výskum u pacientok v našom regióne limitovaný (4). Potenciál využitia molekulových markerov však už viac ako 10 rokov napomáha pri kategorizácii vážnosti prognózy pre pacientky (5) a rovnako by mohli slúžiť aj pri diagnostike pacientok, ktorá je doposiaľ limitovaná na relatívne invazívne zákroky (6).

Cieľom nášho výskumu teda bolo opísať niekoľko typov molekulových markerov z EC (germinálne a somatické mutácie, diferenciálne exprimované gény) a germinálnych mutácií u žien s endometriálnou prekancerózou v kohortách slovenských pacientok a preskúmať potenciál detekcie mutácií v cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) metódou tekutej biopsie, nakoľko tá by mohla predstavovať diagnostický/skríningový postup, ktorý by výrazne znížil potrebu invazívnej kyretáže a znížil tak diskomfort žien.

Materiál a metódy

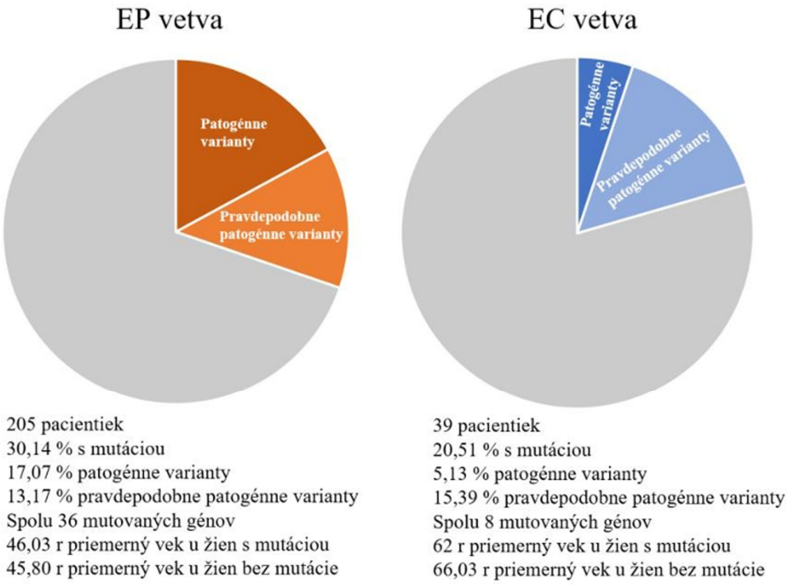
Pri analýze germinálnych mutácii sme izolovali DNA z 205 vzoriek periférnej krvi žien s prekancerózou (EP vetva) a z 39 vzoriek zdravého maternicového tkaniva žien s diagnostikovaným EC (EC vetva). Celogenómové knižnice pre WGS boli pripravené využitím TruSeq Nano Library Preparation Kit (Illumina) a sekvenované na platforme NovaSeq X Plus (Illumina). Po sekundárnej analýze na platforme DRAGEN Bio-IT (Illumina) boli varianty anotované využitím QIAGEN Clinical Insight (QCI) a filtrované na detekciu patogénnych a pravdepodobne patogénnych variantov v pripravenom paneli 415 génov s najvyššou frekvenciou mutácií pri EC.

Pri analýze diferenciálnej expresie u EC sme pracovali s nádorovými a zdravými maternicovými tkanivami pochádzajúcimi od 21 pacientok. Izolovaná RNA bola reverzne transkribovaná a využitá na prípravu knižníc pomocou RNA HyperPrep Kitu s RiboErase (KAPA Biosystems). Tie boli sekvenované na platforme NextSeq 500 (Illumina). Čítania boli mapované pomocou RNA-STAR softvéru. Na vizualizáciu expresiou ovplyvnených dráh sme využili termíny z Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databázy.

Pri testovaní tekutej biopsie sme pracovali s periférnou krvou a nádorovým tkanivom pochádzajúcim od 21 pacientok s EC. Na prípravu sekvenačných knižníc z ctDNA izolátov sme využili TruSight Oncology 500 ctDNA (Illumina) protokol a z FFPE získaných DNA a RNA izolátov TruSight Oncology 500 High-Throughput (Illumina) protokol. Následne sme knižnice sekvenovali na NovaSeq 6000 (Illumina) platforme. Na spracovanie sekvenačných dát sme využili DRAGEN Somatic Pipeline (Illumina) a na anotáciu Ingenuity Variant Analysis (QIAGEN) platformu.

Výsledky

V rámci EP vetvy boli prevládajúcimi stavmi hyperplázia endometria rôznych typov a endometriálne polypy. Ďalšie prekancerózy neboli bližšie špecifikované, ale zahŕňali zhrubnutia častí maternice, prípadne príznaky ako nepravidelné krvácanie. Germinálne 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 %). Zo zdravých tkanív pacientok z EC vetvy sme germinálne patogénne alebo pravdepodobne patogénne varianty identifikovali spolu v 8 génoch (*PMS2*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *ERCC2*, *NUP93*, *SLX4*, *WRAP53*). Sumár detekcie germinálnych mutácií uvádzame v Obr.1. Mnoho patogénnych variantov génov je možné zaradiť do dvoch najčastejších skupín pri EC a to HBOC (asociované so syndrómom hereditárneho karcinómu prsníka a ovárií) a LS (asociované s Lynchovým syndrómom).



Obr.1 Sumár detekcie germinálnych mutácii

V druhej časti práce sme identifikovali 2483 diferenciálne exprimovaných transkriptov (1724 podexprimovaných, 759 nadexprimovaných). Z funkčného hľadiska sme vedeli zatriediť 1841 z nich ako proteín kódujúce gény, 166 ako dlhé nekódujúce RNA, 32 ako pseudogény, 16 ako mikro-RNA a 17 ako malé jadierkové RNA. Výsledky sme využili na analýzu dráh/procesov prostredníctvom KEGG databázy, ktorá sumarizovala podregulované dráhy v nádorovom tkanive, ako cGMP-PKG a AGE-RAGE signálnu dráhu, signálnu dráhu oxytocínu, Wnt signálnu dráhu a interakcie v rámci buniek a extracelulárnej matrix. Naopak najsignifikantnejšie nadregulované boli bunkový cyklus, glykolýza a biosyntéza aminokyselín.

Pri testovaní potenciálu tekutej biopsie sme u každej pacientky úspešne identifikovali potenciálne klinicky signifikantné mutácie pre EC na úrovni ctDNA. Priemerný počet mutácií pre každé štádium a stupeň je uvedený v Tab. 1. Aspoň 1 spoločnú potenciálne klinicky relevantnú mutáciu na oboch úrovniach sme identifikovali u dvoch tretín pacientok (14/21). Spomedzi najčastejšie mutovaných génov na úrovni ctDNA vynikajú mutácie v génoch *DNMT3A* (52 %) a *TET2* (14 %), pričom tieto mutácie neboli v žiadnom prípade prítomné na úrovni FFPE-DNA. V ctDNA sme ich ale identifikovali až u 4 z 5 vysokorizikových pacientok. Ďalšie najčastejšie identifikované mutované gény v ctDNA boli *CHEK2* (24 %), *PTEN* (19 %), *ZFHX3* (19 %), *PIK3CA* (14 %) a *TP53* (14 %).

Štádiá	FFPE-DNA	ctDNA	Stupne	FFPE-DNA	ctDNA
IA (11)	4,09	2,73	G1 (4)	5,75	1,75
IB (7)	6,86	5,43	G2 (12)	5,58	4,25
II (1)	5,00	2,00	Nízky (16)	5,63	3,63
IIIA (2)	1,00	9,00	G3 (5)	2,00	6,00

Tab. 1: Priemerný počet onkomutácií pri analýze tekutej biopsie

Diskusia

Odborná literatúra venuje identifikácii germinálnych mutácií v kontexte prekanceróz EC len limitovanú pozornosť. Kral a kol. (2023) (7) identifikovali germinálne mutácie v géne *BRCA1* (patrí medzi HBOC gény) u 2 žien a u 1 z nich aj LS mutáciu v súbore 8 pacientok s intraepiteliálnou neopláziou, teda so závažnou formou hyperplázie. V našej mnohonásobne väčšej kohorte sme však podobne identifikovali LS mutáciu len u 1 pacientky s hyperpláziou endometria, konkrétne v géne *MSH6*. Spomedzi germinálnych patogénnych variantov HBOC génov sme identifikovali vyššiu frekvenciu mutácií v génoch *CHEK2* a *ATM*, kým mutácie v ďalších génoch boli sporadické. Patogénne varianty práve týchto 2 HBOC génov boli najčastejšie mutovanými aj u EC pacientok v spomínanej štúdii (7). Na základe našich pozorovaní teda možno, podľa očakávaní, odvodiť, že u prekanceróz sú častejšie dedičné mutácie v HBOC génoch ako v LS génoch.

Kvôli pomerne nízkej početnosti pacientok v EC vetve našej štúdie bol počet identifikovaných germinálnych patogénnych variantov veľmi nízky, no frekvencia mutácií v LS génoch

(konkrétne v géne *PMS2*) bola 5,13 %, čo je porovnateľné aj s niekoľkonásobne väčšími štúdiami (7, 8). Platí tiež, že väčšina týchto pacientok mala rovnako nádory I. štádia (7).

Z najsignifikantnejšie diferenciálne exprimovaných proteín-kódujúcich génov bolo množstvo už popísaných v súvislosti s EC (↑*CTSV*, *CEACAM1*, *PDIA3*, *IDH1*, *NQO1*, *GGCT*, *PDIA3*, *CASP6*, *GCNT2*,↓*SELE*, *KLF2*, *NRXN1*, *DUSP1*, *HOXA13*, *IGFBP6*, *RBFOX3*, *CRISPLD2*, *GPM6A* a *ST8SIA1*) (9-21), a ďalšie (↑*CYP2J2*, *GRB14*, *GALNT12*, *MFAP3L*, *MANSC1*, *CLGN*, *ZSCAN16*, *LAMA1*, *MYO6*,↓*APOLD1*, *NR4A3*, *ITGA8*, *FAM133A*, *CCDC80*) s inými malígnymi zmenami (22-35). V posledných rokoch sa do pozornosti dostávajú nekódujúce RNA, pri ktorých sme podobne identifikovali deregulovanú expresiu u niekoľkých známych diferenciálne exprimovaných génov (↓*CMAHP*, *MAGI2-AS3*, *LINC02613*, *LINC00667*, *MBNL1-AS1*, *MEG8* a *TPTEP1*), ktorá už bola v minulosti opísaná pri EC (36-41), a podobne, zmeny expresie ďalších (↓*PGM5-AS1*, *ACTA2-AS1*, *RAMP2-AS1*, *MEG3*) už sú známe pri iných malignitách (42-45) a mohli by byť biomarkermi tumorigenézy aj u EC.

Pri porovnaní detekcie onkomutácií sme podľa predpokladov vo vzorkách z tkanív identifikovali viac onkogénnych mutácií. Z prognosticky relevantných biomarkerov (5) sme identifikovali *POLE* mutácie u 2 pacientok, instabilita mikrosatelitov bola vysoká tiež u 2 žien a u ďalšej bola prítomná mutácia v géne *MLH1*. U 3 pacientok bol mutovaný gén *TP53* a podobne u 3 gén *CTNNB1*. Na úrovni ctDNA sme však *POLE* mutácie ani instabilitu mikrosatelitov nepozorovali, ba čo viac identifikované onkomutácie génov *MLH1* a *TP53* boli prítomné u iných pacientok ako pri FFPE-DNA. Z toho usudzujeme, že potenciál tekutej biopsie z periférnej krvi ako prognostického nástroja pri EC je veľmi limitovaný.

Pozoruhodný je prípad pacientky, u ktorej sme v FFPE-DNA identifikovali onkomutáciu v géne *POLE*, dve mutácie v géne *MSH6*, instabilitu mikrosatelitov aj mutáciu v géne *TP53*. V literatúre sa tieto situácie označujú ako *multiple-classifier*, no podľa prognózy by sa mali zaraďovať do menej závažnejšej kategórie (46).

Mutácie v génoch *DNMT3A* a *TET2* sú okrem EC asociované najmä s klonálnou hematopoézou. Tá vzniká v dôsledku somatických mutácii v hematopoetických bunkách, je asociovaná s vysokým vekom a zvýšenou mortalitou na kardiovaskulárne ochorenia (47). Štandardne sa vyskytuje asi u 5 % ľudí vo veku nad 60 rokov (48). Vysoká miera incidencie týchto dvoch mutácii najčastejšie prítomných u pacientov s klonálnou hematopoézou v našej kohorte a ich prítomnosť na úrovni ctDNA napovedajú o asociácii s vekom, ale mohli by tiež predstavovať negatívny prognostický faktor, ktorý by bol dobre identifikovateľný z ctDNA.

Naša štúdia teda ponúka pilotné výsledky v rámci germinálnych mutácii prekanceróz a využitia tekutej biopsie ako diagnostického nástroja pre EC. Opísanie pomerov germinálnych mutácii v endometriálnych nádorových tkanivách a zmien v expresii medzi tkanivom karcinómu a priľahlým zdravým tkanivom sú zase analýzy, ktoré v prezentovanom rozsahu neboli v slovenskej populácii uskutočnené a prispievajú k poznaniu molekulárneho základu malígnych zmien endometria.

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 a vďaka grantom Univerzity Komenského GUK2023 – UK/124/2023 a GUK2024 – UK/3051/20

Zoznam použitej literatúry

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015; 136{5): E359-E386.
2. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E: Endometrial cancer. Lancet 2016; 387{10023): 1094-1108.
3. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, Byrnes G, Antilla A, Ferlay J, Renehan AG, Forman D, Soerjomataram I: Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. Eur J Cancer 2015; 51{9): 1164-1187.
4. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A: Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA Cancer J Clin. 2024; 74{3): 229-263.
5. 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.
6. Terzic MM, Aimagambetova G, Terzic S, Norton M, Bapayeva G, Garzon S: Current role of Pipelle endometrial sampling in early diagnosis of endometrial cancer. Transl Cancer Res 2020; 9{12): 7716-7724.
7. 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, Krutilkova 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.
8. 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.
9. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk JM, Brunnström H, Glimelius B, Sjöblom T, Edqvist P-H, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Ponten F: A pathology atlas of the human cancer transcriptome. Science 2017; 357{6352): eaan2507.
10. Bai M, Yang L, Liao H, Liang X, Xie B, Xiong J, Tao X, Chen X, Cheng Y, Chen X, Feng Y, Zhang Z, Zheng W: Metformin sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy

through IDH1-induced Nrf2 expression via an epigenetic mechanism. Oncogene 2018; 37{42): 5666-5681.
11. Atiomo W, Shafiee MN, Chapman C, Metzler VM, Abouzeid J, Latif A, Chadwick A, Kitson S, Sivalingam VN, Stratford IJ, Rutland CS, Persson JL, Ødum N, Fuentes-Utrilla P, Jeyapalan JN, Heery DM, Crosbie EJ, Mongan NP: Corrigendum: Expression of NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) is increased in the endometrium of women with endometrial cancer and women with polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) 2017; 87{6): 886.
12. Xu S, Yang Y, Wang X, Liu X, Jin C, Ma M, Wu S, Li Y: γ-Glutamyl cyclotransferase contributes to endometrial carcinoma malignant progression and upregulation of PD-L1 expression during activation of epithelial-mesenchymal transition. Int Immunopharmacol 2020; 81: 106039.
13. Yu S, Feng W, Zeng J, Zhou S, Peng Y, Zhang P: GALNT12 promotes fibrosarcoma growth by accelerating YAP1 nuclear localization. Oncol Lett 2023; 26{6): 543.
14. Gong X, Wang Z, You J, Gao J, Chen K, Chu J, Sui X, Dang J, Liu X: Pyroptosis-associated genes and tumor immune response in endometrial cancer. Discov Oncol 2024; 15{1): 433.
15. Liu Z, Hong Z, Ma H, Yu D, Qu P: Key factors mediated by PI3K signaling pathway and related genes in endometrial carcinoma. J Bioenerg Biomembr 2020; 52{6): 465-473.
16. Shi Z, Li C, Tarwater L, Li J, Li Y, Kaliney W, Chandrashekar DS, Stack MS: RNA-seq Reveals the Overexpression of IGSF9 in Endometrial Cancer. J Oncol 2018; 2018: 2439527.
17. Jin Q, Jiang X, Du X, Hu W, Bai S, Wang X, Xu B, Zhao W: Integrated Transcriptome and Multiple Activated Pathways in Endometrial Cancer. Front Genet 2021; 12: 680331.
18. Perron G, Jandaghi P, Moslemi E, Nishimura T, Rajaee M, Alkallas R, Lu T, Riazalhosseini Y, Najafabadi HS: Pan-cancer analysis of mRNA stability for decoding tumour post-transcriptional programs. Commun Biol 2022; 5{1): 851.
19. Luan X, Ma C, Wang P, Lou F: HMGB1 is negatively correlated with the development of endometrial carcinoma and prevents cancer cell invasion and metastasis by inhibiting the process of epithelial-to-mesenchymal transition. Onco Targets Ther 2017; 10: 1389-1402.
20. Zhang S, Pei L, Qu J, Sun L, Jiang W, Li W, Lin Z, Chen D: CRISPLD2 attenuates pro-inflammatory cytokines production in HMGB1-stimulated monocytes and septic mice. Am J Transl Res 2021; 13{5): 4080-4091.
21. Liu Y, Hua T, Chi S, Wang H: Identification of key pathways and genes in endometrial cancer using bioinformatics analyses. Oncol Lett 2019; 17{1): 897-906.
22. Zou X, Mo Z: CYP2J2 Is a Diagnostic and Prognostic Biomarker Associated with Immune Infiltration in Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. Biomed Res Int 2021; 2021: 3771866.
23. Huang O, Jiang M, Zhang X, Xie Z, Chen X, Wu J, Liu H, Shen K: Grb14 as an independent good prognosis factor for breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Jpn J Clin Oncol 2013; 43{11): 1064-1072.
24. Yu S, Feng W, Zeng J, Zhou S, Peng Y, Zhang P: GALNT12 promotes fibrosarcoma growth by accelerating YAP1 nuclear localization. Oncol Lett 2023; 26{6): 543.
25. Lou X, Kang B, Zhang J, Hao C, Tian X, Li W, Xu N, Lu Y, Liu S: MFAP3L activation promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis. Biochim Biophys Acta 2014; 1842{9): 1423-1432.

26. Urbiola-Salvador V, Jabłońska A, Miroszewska D, Huang Q, Duzowska K, Drężek Chyła K, Zdrenka M, Śrutek E, Szylberg Ł, Jankowski M, Bała D, Zegarski W, Nowikiewicz T, Makarewicz W, Adamczyk A, Ambicka A, Przewoźnik M, Harazin Lechowicz A, Ryś J, Filipowicz N, Piotrowski A, Dumanski JP, Li B, Chen Z: Plasma protein changes reflect colorectal cancer development and associated inflammation. Front Oncol 2023; 13: 1158261.
27. Cui Z, Wang J, Chen G, Li D, Cheng B, Lai Y, Wu Z: The upregulation of CLGN in hepatocellular carcinoma is potentially regulated by hsa-miR-194-3p and associated with patient progression. Front Oncol 2023; 12: 1081510.
28. Li X, Shang D, Shen H, Song J, Hao G, Tian Y: Corrigendum to "ZSCAN16 promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via regulating NF-kB, AKT, mTOR, P38 and other genes". Biomed Pharmacother 2020; 130: 110858.
29. Zhang S, Fang Y, Su F, Jiang T, Yu J, Lin S, Lv L, Long T, Pan H, Qi J, Zhou Q, Tang W, Ding G, Wang L, Tan L, Yin J: Association of LAMA1 Single Nucleotide Polymorphisms with Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma among the Eastern Chinese Population. J Oncol 2023; 2023: 6922909.
30. Yoshida H, Cheng W, Hung J, Montell D, Geisbrecht E, Rosen D, Liu J, Naora H: Lessons from border cell migration in the Drosophila ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101{21): 8144-8149.
31. Cheung HH, Lee TL, Davis AJ, Taft DH, Rennert OM, Chan WY: Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. Br J Cancer 2010; 102{2): 419-427.
32. Yousefi H, Fong J, Alahari SK: NR4A Family Genes: A Review of Comprehensive Prognostic and Gene Expression Profile Analysis in Breast Cancer. Front Oncol 2022; 12: 777824.
33. Li X, Zhu G, Li Y, Huang H, Chen C, Wu D, Cao P, Shi R, Su L, Zhang R, Liu H, Chen J: LINC01798/miR-17-5p axis regulates ITGA8 and causes changes in tumor microenvironment and stemness in lung adenocarcinoma. Front Immunol 2023; 14: 1096818.
34. Keathley R, Kocherginsky M, Davuluri R, Matei D: Integrated Multi-Omic Analysis Reveals Immunosuppressive Phenotype Associated with Poor Outcomes in High Grade Serous Ovarian Cancer. Cancers (Basel) 2023; 15{14): 3649.
35. Christian JI, Pastula A, Herbst A, Neumann J, Marschall MK, Ofner A, Zierahn H, Schneider MR, Wolf E, Quante M, Kolligs FT: Loss of DRO1/CCDC80 in the tumor microenvironment promotes carcinogenesis. Oncotarget 2022; 13: 615-627.
36. Yang Q, Yu B, Sun J: TTK, CDC25A, and ESPL1 as Prognostic Biomarkers for Endometrial Cancer. Biomed Res Int 2020; 2020: 4625123.
37. Xiong Y, Wei Y, Gu Y, Zhang S, Lyu J, Zhang B, Chen C, Zhu J, Wang Y, Liu H, Zhang Y: DiseaseMeth version 2.0: a major expansion and update of the human disease methylation database. Nucleic Acids Res 2017; 45{D1): D888-D895.
38. Gokulnath P, de Cristofaro T, Manipur I, Di Palma T, Soriano AA, Guarracino MR, Zannini M: Long Non-Coding RNA MAGI2-AS3 is a New Player with a Tumor Suppressive Role in High Grade Serous Ovarian Carcinoma. Cancers (Basel) 2019; 11{12): 2008.

39. Cui M, Liu Y, Cui L: Long non-coding RNA LINC02613 is a prognostic biomarker for breast cancer and correlates with the cell cycle and immune infiltration based on TCGA data. Transl Cancer Res 2022; 11{4): 615-628.
40. Xin W, Gao X, Zhao P, Wang T, Ding X, Wu Q, Hua K: Long non-coding RNA RP11-379k17.4 derived microRNA-200c-3p modulates human endometrial cancer by targeting Noxa. J Cancer 2021; 12{8): 2268-2274.
41. Takenaka K, Curry-Hyde A, Olzomer EM, Farrell R, Byrne FL, Janitz M: Investigation of Transcriptome Patterns in Endometrial Cancers from Obese and Lean Women. Int J Mol Sci 2022; 23{19): 11471.
42. Zhang Q, Ding Z, Wan L, Tong W, Mao J, Li L, Hu J, Yang M, Liu B, Qian X: Comprehensive analysis of the long noncoding RNA expression profile and construction of the lncRNA-mRNA co-expression network in colorectal cancer. Cancer Biol Ther 2020; 21{2): 157-169.
43. Zhou RJ, Lv HZ: Knockdown of ACTA2-AS1 promotes liver cancer cell proliferation, migration and invasion. Mol Med Rep 2019; 19{3): 2263-2270.
44. Li L, Gan YP, Peng H: RAMP2-AS1 inhibits CXCL11 expression to suppress malignant phenotype of breast cancer by recruiting DNMT1 and DNMT3B. Exp Cell Res 2022; 416{2): 113139.
45. Guo Q, Qian Z, Yan D, Li L, Huang L: LncRNA-MEG3 inhibits cell proliferation of endometrial carcinoma by repressing Notch signaling. Biomed Pharmacother 2016; 82: 589-594.
46. 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.
47. Cobo I, Tanaka T, Glass CK, Yeang C: Clonal hematopoiesis driven by DNMT3A and TET2 mutations: role in monocyte and macrophage biology and atherosclerotic cardiovascular disease. Curr Opin Hematol 2022; 29{1): 1-7.
48. Gaulin C, Kelemen K, Arana Yi C: Molecular Pathways in Clonal Hematopoiesis: From the Acquisition of Somatic Mutations to Transformation into Hematologic Neoplasm. Life (Basel) 2022; 12{8): 1135.

17. Molekulárna signalizácia v endometriálnom karcinóme v kontexte jeho biologického správania sa

Mgr. Tereza Kuracinová
(patologická anatómia)

Spoluatori: doc. MUDr. Pavol Janega PhD., MUDr. Andrea Janegová, PhD.
Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega PhD.
Ústav patologickej anatómie LFUK, Bratislava

Úvod

Endometriálny karcinóm (EC) je najčastejším typom rakoviny ženského reprodukčného systému na svete (1). Jeho stúpajúca incidencia, zdôrazňuje potrebu efektívnych diagnostických a terapeutických stratégií. Klasifikácia nádorov je podľa histologickej klasifikácie WHO, avšak genomická analýza je kľúčová pre určenie prognózy. V štúdii The Cancer Genome Atlas (TCGA) boli identifikované 4 prognosticky signifikantné skupiny endometriálneho karcinómu s rozličnými klinickými, patologickými a molekulárnymi zmenami: mutácia polymerázy ε (POLE), MSI -porucha mismatch repair systému, skupina s malou variáciou počtu kópií (CNL) a s veľkou variáciou počtu kópií (CNH) (2). Všetky nádory zaradené do skupiny POLE a CNL majú vyšší výskyt mutácii iných génov ako napríklad gén *PTEN*. Tento gén je priamo zapojený do signálnej dráhy PI3K/AKT/mTOR, ktorá reguluje biologické procesy ako bunkový metabolizmus, rast, proliferáciu, angiogenézu a prežitie bunky. Táto dráha je mutovná pri low grade-EC a až 80% endometriálnych tumorov nesie jednu alebo viac somatických mutácií ovplyvňujúcich túto dráhu. Hlavným negatívnym regulátorom PI3K dráhy je PTEN tumor supresor, ktorý môže byť v tumoroch inaktivovaný ako následok metylácie promótoru alebo génovej mutácii. Fosfatázová aktivita tohoto proteínu inhibuje migráciu buniek a práve preto strata jeho funkcie môže viesť k aberantnému rastu buniek a ich úniku pred apoptózou (3). Glykány sú komplexné sacharidy pripojené na proteíny a lipidy, ktoré uľahčujú dôležité bunkové procesy, ako sú komunikácia, adhézia a imunitná odpoveď (4). Variabilita glykokódu nádorov má vzťah k správaniu nádorových buniek a môže byť terapeuticky zasiahnutá. Glykozylácia je komplexný bunkový proces, pri ktorom sa skladajú oligosacharidy cez systematický enzýmovo katalyzovaný aparát, ktorý tvorí glykány rôznej diverzity a heterogenity. Pri endometriálnom karcinóme sa často pozorujú aberantné glykozylácie, čo naznačuje, že tieto modifikácie by mohli slúžiť ako biomarkery na detekciu a prognózu ochorenia. Zmeny v štruktúrach glykánov môžu ovplyvňovať rast nádoru, metastázovanie a únik pred imunitným systémom, čím sa zvýrazňuje ich potenciál v diagnostike (5). Lektíny predstavujú skupinu proteínov, ktoré viažu sacharidy a rozpoznávajú špecifické štruktúry glykánov na povrchu buniek (6). Pri endometriálnom karcinóme niektoré lektíny ukázali selektívne viazanie na glykány spojené s nádorom, čím sa stávajú cennými nástrojmi na štúdium biológie nádoru (7). Korelácia zmien glykozylácie nádorových buniek v súvislosti s molekulárnym rozdelením predstavuje potencionálny diagnostický cieľ. Cieľom našej štúdie je opísať zmeny glykozylácie povrchových glykokonjugátov buniek nádorov

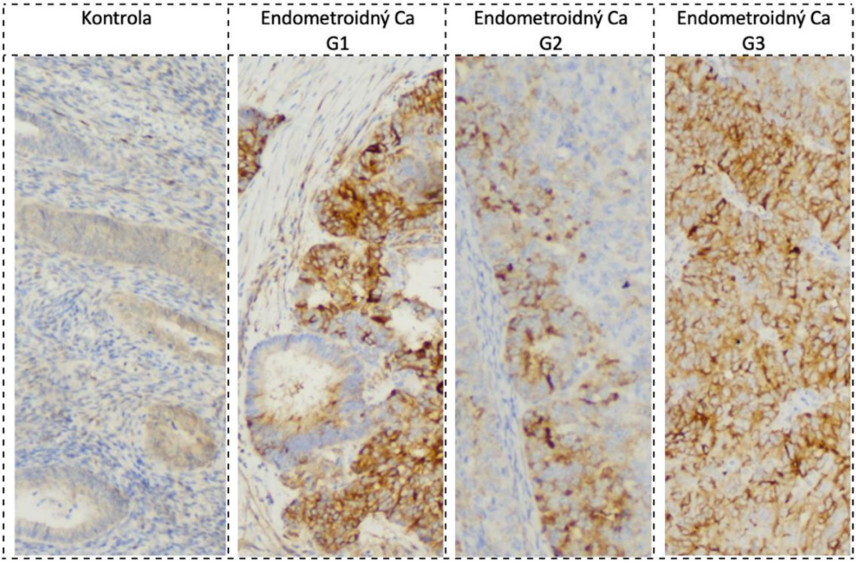
endometria a korelovať ich k súčasnému molekulárnemu rozdeleniu. Druhým cieľom je opísať zmeny dráhy PI3K/Akt/PTEN, ktoré sú v nádoroch endometria najčastejšie a majú známy súvis so zmenami sialylácie proteínov.

Metodika

K dispozícii sme mali vzorky zo štúdie BIOMEDIRES 2, ktorá je orientovaná na výskum nových inovatívnych diagnostických a prognostických markerov a terapeutických cieľov v oblasti nenádorových a nádorových ochorení žien, so zameraním primárne na endometriálny karcinóm a na prednádorové zmeny endometriálneho karcinómu s využitím moderného multidisciplinárneho prístupu. Projekt bol realizovaný na LF UK v spolupráci s Univerzitným parkom. Súčasťou bolo vytvorenie biobanky nádorov endometria, ktorá obsahuje fixované v parafíne zaliate vzorky od 340 pacientiek, ktoré podstúpili hysterektómiu. Z tejto biobanky sme si najprv vytvorili vlastnú databázu prípadov a vybrali histologicky reprezentatívne vzorky tumorov, dokopy 26 vzoriek aj s kontrolnými vzorkami zdravého endometria. Vytvorené sady sme imunohistochemicky testovali s lektínmi, ktoré viažu kyselinu sialovú *Maackia amurensis leukoaglutinín* (MAL) viažúca preferenčne α 2,3- väzbu a *Sambucus nigra aglutinín* (SNA) viažúca preferenčne α 2,6- väzbu. Pozitivitu vo vzorkách sme vyhodnotili ako ++ čo je veľmi silná pozitiva, + silná pozitivita a +- slabá pozitivita. Využijeme hlavne morfometrickú analýzu, ktorá nám umožní získať presné a navzájom porovnateľné a štatisticky vyhodnotiteľné výsledky. Touto fázou si overíme distribúciu sialyzovanách glykokonjugátov v tkanive fyziologického a nádorovo zmeneného endometria. Imunohistochemicky sme ďaľej testovali sady vzoriek s protilátkami PTEN (Anti PTEN, Lot:4177442, Merck) a AKT (Anti-Akt, Lot: 210406, Sigma-Aldrich).

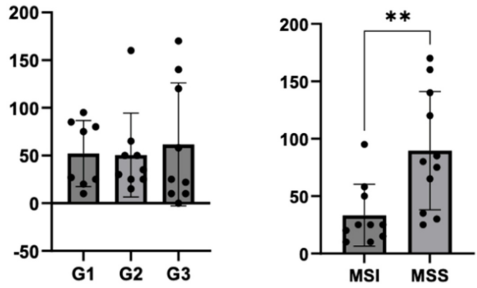
Výsledky

Prvú sadu 26 vzoriek sme testovali s protilátkou PTEN, kde sme hodnotili parametre ako cytoplazmovú a luminálnu pozitivitu, difúznu alebo fokálnu pozitivitu. Pozitivita markera PTEN vykazuje v EC nepravidelný často fokálny charakter. Intenzita sa líši medzi jednotlivými prípadmi, pričom v niektorých prípadoch je pozorovaná slabá až nevýrazná intenzita, zatiaľ čo v iných je zvýraznená (Obrázok 1). Tieto variácie naznačujú heterogenitu v expresii PTEN v rámci rôznych nádorových ložísk. Taktiež nepozorujeme signifikantný rozdiel v pozitivite PTEN vo vzťahu ku histologickému gradingu nádoru (Obrázok 2).



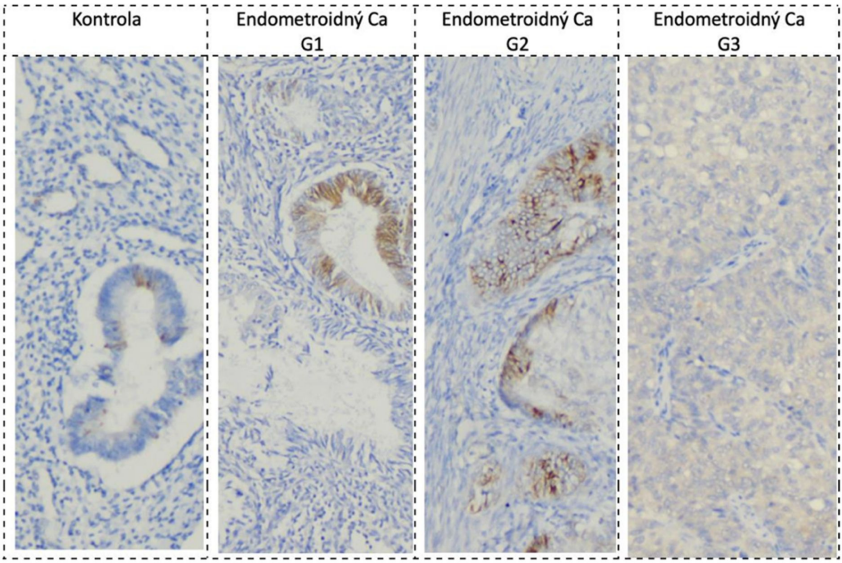
Obrázok 1: Expresia PTEN v endometroidnom karcinóme endometria

Výška stĺpcov reprezentuje priemernú expresiu PTEN, zatiaľ čo jednotlivé body ukazujú distribúciu hodnôt pre každú vzorku v danej kategórii. Ukázalo sa, že expresia PTEN je v nádoroch mikrosatelitne stabilných (MSS) signifikantne vyššia v porovnaní s mikrosatelitne nestabilnými (MSI) nádormi. Vyššia expresia v MSS môže súvisieť s genetickou stabilitou a zachovaním tumor supresorových funkcií, zatiaľ čo nižšia expresia v MSI nádoroch môže byť dôsledkom genetickej nestability.



Obrázok 2: Vľavo: zobrazenie expresie PTEN pri rôznych gradoch, Vpravo: porovnanie expresie PTEN medzi MSI a MSS

Druhá sada vzoriek bola otestovaná na prítomnosť AKT kde sme hodnotili pozitivitu v invazívnom fronte, izolované bunky, pozitivitu na hĺbku a na povrch. Tiež sme hodnotili difúznu alebo fokálnu pozitivitu (Obrázok 3).



Obrázok 3: Expresia AKT v endometroidnom karcinóme endometria

Pozitivita AKT bola vo väčšine prípadov (61%) slabá a nepravidelná. Zujímavým zistením je výrazná pozitivita AKT pozorovaná v ložiskách invazívneho frontu až v 31% prípadov. Slabá difúzna pozitivita AKT bola ale signifikantne častejšia pri G3 nádoroch. Tento nález môže naznačovať úlohu AKT v skorších štádiách karcinogenézy alebo ako možný mechanizmus spojený s lepšie diferencovanými a menej agresívnymi nádormi.

Pri lektínovej imunohistochémii sme vyhodnocovali luminálnu a cytoplazmovú pozitivitu. V nádoroch endometria dominuje najmä pozitivita SNA, čo naznačuje význam α2,6 sialylácie v procese nádorovej transformácie. Naopak, expresia MAL, reprezentujúca α2,3 viazanú sialovú kyselinu, je prevažne len slabá.

Diskusia

Naše výsledky pri hodnotení markera PTEN ukazujú nepravidelnú, často fokálnu pozitivitu bez jednoznačnej korelácie s gradingom, čo poukazuje na heterogenitu expresie PTEN medzi jednotlivými prípadmi. Tento nález je v súlade s literatúrou (8), kde sa uvádza, že strata expresie PTEN bola častejšie detegovaná imunohistochemicky než pomocou genetickej analýzy. To podporuje hypotézu, že funkčná strata PTEN nemusí byť vždy podmienená priamo mutáciou, ale aj inými mechanizmami, ako sú epigenetické zmeny. V článku je tiež zdôraznená

vyššia frekvencia PTEN straty pri endometrioidných karcinómoch v porovnaní s neendometrioidnými, čo zodpovedá aj našim výsledkom – vyššej strate PTEN expresie v nádoroch MSI a genomickou nestabilitou.

Pri hodnotení markera AKT sme pozorovali vo väčšine prípadov (61%) slabú a nepravidelnú pozitivitu. Výraznú pozitivitu sme pozorovali v ložiskách invazívneho frontu až v 31% prípadov. Tento fenomén zatiaľ nie je opísaný a môže naznačovať možnú úlohu AKT v procesoch invázie a progresie nádoru. Zároveň bolo zistené, že slabá difúzna pozitívna expresia AKT je signifikantne častejšia pri G3 nádoroch, čo môže poukazovať na jeho úlohu v skorších štádiách karcinogenézy. Tento mechanizmus by mohol byť spojený s lepšie diferencovanými a menej agresívnymi nádormi, čo naznačuje, že AKT by mohol zohrávať významnú rolu pri udržiavaní nižšej agresivity týchto nádorov. Zníženú expresiu AKT v G3 nádoroch uvádza aj štúdia (9), čo podporuje hypotézu úlohy v skorších štádiach. Táto korelácia podporuje hypotézu, že signálna dráha PI3K/AKT/mTOR môže byť aktívnejšia v skorších fázach karcinogenézy a jej aktivita môže klesať s narastajúcou malignitou.

Tieto výsledky podporujú potrebu ďalšieho skúmania úlohy AKT v nádorovej progresii a diferenciácii. Tiež poukazujú na význam sledovania AKT expresie v rámci nádorovej heterogenity so zameraním na invazívny front nádoru pri štúdiu invazívnych mechanizmov.

Pri lektínovej imunohistochémii sme vyhodnocovali pozitivitu lektínov MAL a SNA. Výraznejšia bola expresia SNA, čo naznačuje význam α2,6 sialylácie v procese nádorovej transformácie, pričom expresia MAL, ktorá preferuje α2,3 väzbu bola prevažne slabá. Dominancia α2,6 sialylácie v nádoroch endometria tak môže naznačovať špecifické mechanizmy transformácie pre tento typ nádoru. Sialylácia je dôležitá modifikácia v rámci bunkovej glykozylácie, keďže sialylované glykány zohrávajú kľúčovú úlohu v bunke pri rozpoznávaní buniek, adhézii buniek a bunkovej signalizácii. Zvýšenie globálnej sialylácie – najmä v α2,6- a α2,3- viazanej sialylácii je úzko spojené s výskytom rakoviny.

Vo väčšine typov nádorov je práve prítomná 2,3 sialylácia, preto ide o zaujímavý nález. α2,6 viazané sialylované glykokonjugáty sú prítomné v nádoroch endometria tak cytoplazmaticky, ako aj viazané na lumiálnu membránu. Membránová distribúcia by mohla naznačiť ich možnú úlohu v bunkovej signalizácii a interakcii s mikroprostredím nádoru. Pozorujeme signifikantný vzostup cytoplazmovej pozitivity SNA v súvislosti so vzostupom grade tumoru. Tento nález naznačuje, že vyššia expresia α2,6 viazaných sialylovaných glykokonjugátov môže byť spojená s agresívnejšími formami nádorov. Cytoplazmatická lokalizácia SNA by mohla odrážať zmeny v glykozylácii, ktoré podporujú progresiu a invazívne správanie nádorových buniek. Pozorované nálezy zdôrazňujú potenciálnu úlohu SNA ako biomarkeru pre hodnotenie nádorov endometria. Zaujímavým zistením je signifikantná korelácia medzi silnou cytoplazmatickou pozitivitou SNA a slabou pozitivitou AKT.

Výskum biomarkerov v endometriálnych nádoroch prispieva k lepšiemu pochopeniu ich heterogenity a agresivity. Naše zistenia v súvislosti s expresiou PTEN a AKT potvrdzujú, že tieto markery môžu zohrávať dôležitú úlohu v procese nádorovej progresie a diferenciácie, pričom naznačujú, že expresia týchto proteínov môže byť modulovaná nielen genetickými, ale aj epigenetickými faktormi. Zaujímavé výsledky v oblasti lektínovej imunohistochémie naznačujú, že α2,6 sialylácia, reprezentovaná SNA, môže byť špecifickým biomarkerom pre hodnotenie nádorov endometria a ich agresivity. Taktiež je potrebné sa sústrediť na podrobnejšiu analýzu úlohy sialylácie v nádorových procesoch, pretože jej vplyv na invazívnosť

a agresivitu nádorov naznačuje jej potenciál ako terapeutického cieľa. Získané poznatky prispievajú k lepšiemu pochopeniu komplexnej interakcie medzi zmenami v glykozylácii a aktivitou signálnych dráh, pričom podporujú potrebu ďalších štúdií zameraných na funkčné prepojenie sialylácie s PI3K/AKT/mTOR signalizáciou v kontexte rôznych molekulárnych podtypov endometriálneho karcinómu.

Finančná podpora: UK/1155/2024, VEGA 1/0646/25 Alterations in the placental tissue glycocode related to maternal glucose metabolism affecting the course of pregnancy.

Zoznam použitej literatúry

1. MAKKER, Vicky, et al. Endometrial cancer. *Nature reviews Disease primers*, 2021, 7.1: 88.
2. YEN, Ting-Tai, et al. Molecular classification and emerging targeted therapy in endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Pathology*, 2020, 39.1: 26-35.
3. PAVLIDOU, Athanasia; VLAHOS, Nikos F. Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: a therapeutic target in endometrial cancer. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014.1: 709736.
4. THOMAS, Divya; RATHINAVEL, Ashok Kumar; RADHAKRISHNAN, Prakash. Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2021, 1875.1: 188464.
5. DALL'OLIO, Fabio, et al. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Front Biosci*, 2012, 17.1: 670.
6. SANTOS, Andréa FS, et al. Lectins: Function, structure, biological properties andpotential applications. 2014.
7. AOKI, Daisuke, et al. Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma, with special reference to staining with Ulex europeus agglutinin 1 and peanut agglutinin. *Gynecologic oncology*, 1990, 37.3: 338-345.
8. DJORDJEVIC, Bojana, et al. Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing. *Modern pathology*, 2012, 25.5: 699-708.
9. EFSUN ANTMEN, S., et al. Relevance of lipogenesis and AMPK/Akt/mTOR signaling pathway in endometrial cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25.2: 687-695.

18. Mutačný status génu *FGFR3* u pacientov s urotelovým nádorom močového mechúra – pilotné výsledky

Mgr. Lucia Neuschlová[1]
(lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: RNDr. Róbert Petrovič, PhD.[1], doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.[1]
Školiteľ: doc. MUDr. Stanislav Žiaran, PhD., MPH
[1] Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, [2] Urologická klinika LF UK a UNB

Úvod

Podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie je nádor močového mechúra (NMM) desiatou najčastejšie sa vyskytujúcou neopláziou v celosvetovom meradle. Ročne pribudne približne 600 000 nových prípadov a približne 200 000 pacientov ročne tomuto ochoreniu podľahne (1). Histologicky najbežnejším typom NMM je urotelový NMM, ktorý predstavuje cca 90 % zo všetkých novo diagnostikovaných prípadov (2). Urotelovým NMM trpia častejšie muži ako ženy a jeho incidencia stúpa so zvyšujúcim sa vekom pacientov (3,4). Na základe miery infiltrácie NMM do steny močového mechúra, prípadne mimo močový mechúr je možné rozlíšiť dva základné typy urotelových NMM – svalovinu neinfiltrujúci (NMIBC) a svalovinu infiltrujúci nádor (MIBC). NMIBC sa vyskytuje častejšie, je považovaný za menej agresívny typ, avšak pri tomto type nádoru existuje vysoké riziko rekurencie. MIBC predstavuje agresívnejší typ ochorenia a je diagnostikovaný približne 30 % novo zachytených prípadov (5,6). Výskum sa v posledných rokoch zameral na molekulárnu klasifikáciu urotelových NMM, nakoľko sa jasne ukázalo, že tieto nádory sú na molekulárnej úrovni rozdielne a aktuálne používané klasifikačné systémy (založené najmä na histologickom určení štádia a stupňa ochorenia) nie sú vždy dostačujúce pre odzrkadlenie tejto heterogenity. Molekulárne subtypy urotelových NMM sa vzájomne líšia najmä rozdielnymi profilmi mRNA expresie a mutačnými profilmi. Kľúčovými hráčmi pri rozdielnych expresných profiloch sú predovšetkým expresia markerov bazálnej (keratíny) či luminálnej (*GATA3, FOXA1*, uroplakíny) diferenciácie. Najvýraznejšie mutačné rozdiely medzi subtypmi NMM možno zasa badať pri prítomnosti či neprítomnosti patogénnych variantov v génoch *FGFR3, KDM6A, TERT, PIK3CA, CDKN2A, RB1* a *TP53* (7-11). Molekulárne rozdiely medzi jednotlivými subtypmi sa pretavujú do rozdielnych biologických vlastností a správania jednotlivých nádorov, ovplyvňujú ich agresivitu, progresiu ochorenia či terapeutické odpovede (12). Napriek tomu, že v súčasnosti sa molekulárna klasifikácia NMM zatiaľ v klinickej praxi nepoužíva, poznanie molekulárnych profilov NMM má jednoznačný potenciál zefektívniť výber vhodného terapeutického prístupu a celkového klinického manažovania pacienta. V tejto práci sme sa zamerali na mutačný status génu *FGFR3*, nakoľko v klinického hľadiska predstavuje aktuálne najvýznamnejší a najperspektívnejší gén ovplyvňujúci výber terapie pri NMM.

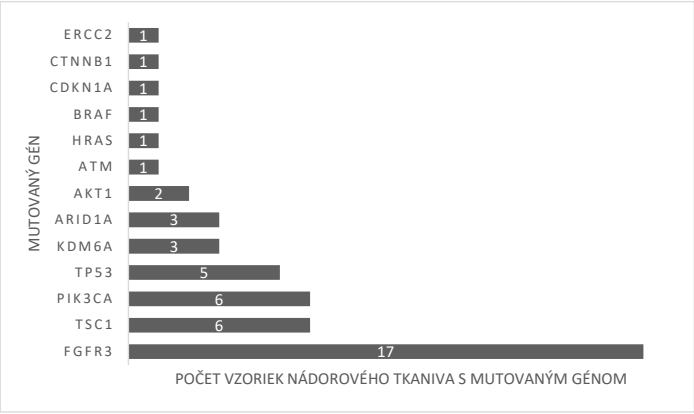
Materiál a metódy

Táto práca bola schválená etickou komisiou Univerzitnej nemocnice Bratislava pod referenčným číslom 05/2022. V práci boli analyzované vzorky 39 rôznych pacientov, ktoré boli získané počas 40 (pre jedného pacienta bola analyzovaná vzorka primárneho nádoru aj recidívy) operačných zákrokov – transuretrálna resekcia (TURBT) NMM. Pre každého pacienta bola analyzovaná vzorka nádorového tkaniva ako aj vzorka periférnej krvi – spoločne bolo analyzovaných 80 vzoriek DNA. DNA bola izolovaná použitím komerčného kitu GenElute™-E Single Spin Tissue DNA Kit (Sigma Aldrich) pre izoláciu z tkaniva a kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) pre izoláciu z krvi. V oboch prípadoch bol dodržaný postup odporúčaný výrobcom. Na zistenie mutačného statusu v analyzovaných vzorkách bola použitá metóda masívneho paralelného sekvenovania (NGS) za využitia komerčného kitu na prípravu NGS knižníc SSEL XT HS2 Starter Kit (1-16) 16rxn (Agilent) kombinovaného s komerčným kitom SSEL Cancer Bladder Assay Probes, DNA 16 rxn (Agilent) obsahujúcim špecifické próby umožňujúce selektívne obohatenie knižníc o želané úseky – kódujúce oblasti 25 génov typicky spájaných s NMM. Opäť bol dodržaný postup odporúčaný výrobcom. Vo všeobecnosti príprava NGS knižnice zahŕňala enzymatickú fragmentáciu vzoriek, opracovanie vzniknutých lepivých 3´ koncov, ligáciu fragmentovanej DNA s barkódovanými adaptérmi, purifikáciu knižnice využitím magnetických guličiek, amplifikáciu knižnice a opätovné prečistenie magnetickými guličkami. Nasledovala kontrola kvality a kvantity pripravenej knižnice metódou kapilárnej elektroforézy a knižnice boli následne hybridizované so špecifickými próbami. Následné prečistenie knižnice prebiehalo pomocou streptavidínových guličiek, a po amplifikácií a prečistení knižnice magnetickými guličkami boli knižnice opäť kontrolované kapilárnou elektroforézou. Hotové NGS knižnice boli po nariedení a poolingu sekvenované analyzátorom Miniseq System (Illumina) za použitia sekvenačného kitu Miniseq Mid Output kit (Illumina). Do ďalších analýz boli spracované len tie sekvencie, ktoré boli čítané minimálne 100x a len tie varianty, ktoré sa vo vzorke vyskytovali vo frekvencii minimálne 5%. Bioinformatické spracovanie dát prebiehalo využitím nástrojov Finalist, Franklin, Alissa Reporter v1.3.3. Na vyhodnotenie patogenicity a klinického významu zachytených variantov boli použité online databázy Varsome, ClinVar, dbSNP, Franklin Genoox.

Výsledky

V tejto práci boli sekvenované vzorky pochádzajúce zo 40 TURBT, avšak 4 vzorky (nádorové tkanivo aj periférna krv) boli z analýzy vylúčené – histológia nepotvrdila prítomnosť nádorových buniek vo vzorke. Uvádzané sú teda sekvenačné dáta vzťahujúce sa na 36 vzoriek nádorového tkaniva a k nim korešpondujúcich 36 vzoriek periférnej krvi. Použitím komerčnej NGS panel assay boli získané sekvenačné dáta ku kódujúcim oblastiam 25 génov typicky spájaných s NMM, avšak z klinického hľadiska sú najvýznamnejšie zachytené varianty v géne *FGFR3*, ktoré sú podrobnejšie rozoberané v nasledujúcich častiach práce. V práci sú rozoberané len patogénne a pravdepodobne patogénne varianty. Zachytené varianty s neznámym významom, pravdepodobne benígne a benígne varianty boli z analýz vylúčené. Všetky varianty uvedené nižšie boli zachytené len vo vzorkách nádorového tkaniva, nie vo vzorkách krvi – vo všetkých prípadoch ide teda o somatické varianty. Počas analýzy neboli zachytené žiadne zárodočné varianty. Gén *FGFR3* bol v rámci našej testovanej skupiny najčastejšie mutovaným génom (Obrázok 1), až 47,22% (n=17) analyzovaných vzoriek nieslo jednonukleotidovú zámenu (SNV) práve v tomto géne. Vo všetkých prípadoch išlo o varianty

nachádzajúce sa v exóne 7 alebo exóne 9, pričom boli identifikované 4 rôzne SNVs (Tabuľka 1). Krátke inzercie ani delécie (INDEL) tohto génu neboli zachytené.

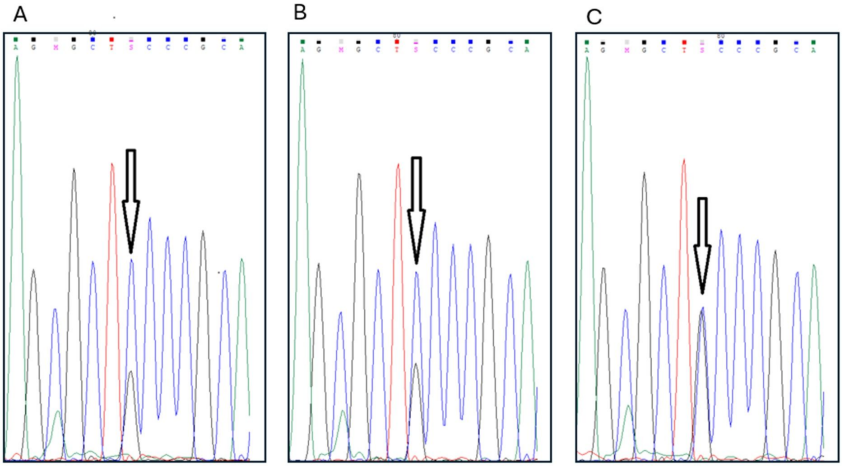


Obrázok 1: Znázornenie všetkých génov, ktorých patogénne/pravdepodobne patogénne varianty boli počas analýzy zachytené. Zobrazený je počet vzoriek nádorového tkaniva nesúceho patogénny/pravdepodobne patogénny variant v danom géne.

Tabuľka 1: Zoznam patogénnych/pravdepodobne patogénnych variantov zachytených v géne FGFR3 vo všetkých analyzovaných vzorkách s uvedením exónu, kde sa zámena nachádza a počtom vzoriek nádorového tkaniva, v ktorých bola daná zámena identifikovaná.

Zámena v géne *FGFR3* (proteínový zápis)	Exón, v ktorom sa nachádza zámena	Počet vzoriek nesúcich zámenu
FGFR3 R248C	7.	1
FGFR3 S249C	7.	11
FGFR3 S371C	9.	1
FGFR3 Y373C	9.	4

Patogénne/pravdepodobne patogénne SNV varianty v géne *FGFR3* sa v zachytených vzorkách nachádzali v rôznych frekvenciách (variant allele frequency – VAF). Obrázok 2 znázorňuje sekvenačné záznamy variantu v géne *FGFR3* vo vzorkách s rozdielnou VAF.



Obrázok 2: Chromatogramy znázorňujúce patogénny variant FGFR3 S249C v troch rôznych vzorkách nádorového tkaniva s rôznymi hodnotami VAF. A – VAF 12,20 %. B – VAF 23,60 %. C – VAF 43,40 %.

Diskusia

NGS sekvenovaním 80 vzoriek DNA bolo v našom projekte identifikovaných niekoľko patogénnych a pravdepodobne patogénnych variantov v rôznych génoch (Obrázok 1). Analýzou vzoriek DNA izolovanej z nádorového tkaniva a periférnej krvi každého pacienta boli získané informácie o pôvode variantu – či ide o variant zárodočný, teda zdedený alebo variant somatický, teda získaný počas života. Všetky identifikované varianty, nezávisle od hodnoty VAF daného variantu predstavovali somatické varianty. Táto skutočnosť je v súlade s etiológiou ochorenia NMM, pri ktorej dochádza k postupnému akumulovaniu DNA poškodenia v bunkách urotelu močového mechúra. Toto poškodenie je spôsobené najmä pôsobením karcinogénnych látok, ktoré sú počas života vylučované močom a urotel je s týmito látkami v prakticky nepretržitom kontakte a kombináciou so zhoršenými DNA reparačnými mechanizmami, ku ktorých zhoršeniu prirodzene dochádza so stúpajúcim vekom. Dôkazom vyššie spomenutého je fakt, že priemerný vek nástupu ochorenia sa pohybuje medzi 70 a 84 rokmi (13). Priemerný vek v našej analyzovanej vzorke pacientpov bol v čase odberu testovaného materiálu 67,6 roka. Táto práca bola zameraná na patogénne a pravdepodobne patogénne varianty v géne *FGFR3.* Varianty v tomto géne predstavujú klinicky najrelevantnejšie údaje zo získaných dát, nakoľko všetky nájdené varianty v géne *FGFR3*, okrem variantu S371C, patria to tzv. Tier I. Tier klasifikácia slúži na zhodnotenie klinickej relevantnosti molekulárneho nálezu, so zatriedením variantov do 4 tried – Tier. Tier I predstavuje varianty so silným klinickým významom, Tier II varianty s potenciálnym klinickým významom. Do Tier III patria varianty s neznámym či nejasným klinickým významom a do Tier IV patria benígne a pravdepodobne benígne varianty (14). Všetky Tier I varianty identifikované počas tohto projektu sa nachádzali výlučne v géne *FGFR3.* Len v januári 2024 americká FDA

(Food and Drug Administration) schválila použitie liečiva erdafitinib pre liečbu dospelých pacientov trpiacich rozšíreným či metastázujúcim NMM, pričom pacienti vhodný na túto liečbu nesú špecifické varianty v géne *FGFR3*, konkrétne zámeny G370C, R248C, S249C, Y373C a R48C (15). Gén FGFR3, okrem iných indikačných obmedzení, tak hrá dôležitú úlohu pri posúdení vhodnosti liečby erdafitinibom, pričom podanie takejto liečby je závislé od predošlej molekulárnej diagnostiky mutačného statusu génu *FGFR3*. Gén *FGFR3*, ktorý patrí medzi protoonkogény, kóduje membránový receptor – tyrozín kinázu, ktorý po väzbe so svojím ligandom za fyziologických podmienok spúšťa v bunke signálnu dráhu vedúcu k deleniu bunky. Zámeny G370C, R248C, S249C, Y373C a R48C v tomto géne vedú k autofosforylácii FGFR3 receptora, čo v konečnom dôsledku spôsobí neustálu aktiváciu signálnej dráhy spúšťajúcej nepretržité delenie bunky. Erdafitinib predstavuje inhibítor tyrozín kináz, ktorý blokuje enzymatickú aktivitu FGFR3 receptora tým, že zabráni jeho autofosforylácii (16). Týmto projektom bolo dokázané, že hodnotiac len jedno indikačné kritérium a to mutačný status génu *FGFR3*, takmer polovica analyzovaných vzoriek (pacientov) predstavuje vhodných kandidátov pre liečbu erfdafitinibom, Napriek tomu, že NCCN guideliny odporúčajú podanie erdafitinibu ako liečbu druhej voľby nasledujúcej po konvenčnej liečbe chemoterapiou založenej na cisplatine (17), už schválenie tohto liečiva a jeho použitie na základe molekulárnej diagnostiky genetického pozadia karcinómu predstavuje prvý krok smerom k persanalizovanej liečbe NMM. Veríme, že erdafitinib je len prvým liečivom z mnohých, ktorých podanie je naviazané na molekulárnu „companion“ diagnostiku a že v budúcnosti sa bude portfólio liečiv založených na molekulárnej analýze nádorov močového mechúra len zväčšovať.

Tento projekt bol čiastočne financovaný grantom Univerzity Komenského č. UK/41/2023 a grantom Univerzity Komenského č. UK/3020/2024.

Zoznam použitej literatúry

1. www.iarc.who.int/cancer-type/blad der-cancer/
2. Bellmunt J, Orsola A, Leow JJ. Wiegel T, De Santis M, Horwich A, ESMO Guidelines Working Group: Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology 2014; 25 (Suppl 3): iii40-48.
3. www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/about/key-statistics.html
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, a spol: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer 2015; 136(5): E359-386.
5. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, a spol: Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. Urology 2005; 66(6, supp 1): 4–34.
6. van den Bosch,S, Alfred Witjes J: Long-term Cancer-specific Survival in Patients with High-risk, Non–muscle-invasive Bladder Cancer and Tumour Progression: A Systematic Review. European Urology 2011; 60(3): 493–500.
7. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, a spol: Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. Cancer Cell 2016; 30(1): 27–42.

8. Lindskrog SV, Prip F, Lamy P, a spol: An integrated multi-omics analysis identifies prognostic molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder cancer. Nature Communications 2021; 12(1): 2301.
9. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, a spol: Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. Cell 2017; 171(3): 540-556.e25.
10. Sjödahl G, Lauss M, Lövgren K, a spol: A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research 2021; 18(12): 3377–3386.
11. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, a spol. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. European Urology 2020; 77(4): 420–433.
12. Seiler R, Gibb EA, Wang NQ, a spol: Divergent Biological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Cancer. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research 2019; 25(16): 5082–5093.
13. Shariat SF, Milowsky M, a Droller MJ: Bladder cancer in the elderly. Urologic Oncology 2009; 27(6) 653–667.
14. 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. J Mol Diagn 2017; 19 4–23.
15. https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-erdafitinib-locally-advanced-or-metastatic-urothelial-carcinoma
16. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/212018s001lbl.pdf
17. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf

19. Sledovanie asociácií medzi zmenami v črevnom mikrobióme a progresiou embryonálneho karcinómu testis *in vivo*

Mgr. Aneta Ševčíková
(onkológia)

Spoluautori: Viola Števurková[1], Mgr. Nataliia Nikolaieva, PhD.[1], Ing. Silvia Jochová, PhD.[1,2], Mgr. Natália Udvorková[1], Lucia Rojíková[1], RNDr. Silvia Tyčiaková, PhD.[1], RNDr. Ing. Katarína Kaľavská, PhD.[2], Mgr. Lucia Kučerová, DrSc.[2], prof. MUDr. Michal Mego, DrSc.[2]
Školiteľka: doc. RNDr. Soňa Čierniková, PhD.
[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

Nádorové ochorenia majú multifaktoriálny pôvod a predstavujú druhú najčastejšiu príčinu úmrtnosti v celosvetovom meradle. Veľká a rôznorodá komunita mikroorganizmov žijúcich v symbiotickom vzťahu s hostiteľom tvorí mikrobióm, ktorý zohráva dôležitú úlohu v udržiavaní integrity slizničných bariér, homeostáze, trávení, absorpcii vitamínov, ochrane pred patogénmi a napomáha aktivácii a dozrievaní imunitného systému. Zmenené zloženie črevného mikrobiómu s nízkou diverzitou sa môže spájať s rôznymi patologickými stavmi v tele, akými sú kardiovaskulárne, neurologické, metabolické a zápalové ochorenia, vrátane rozvoja onkologických ochorení.

Pribúdajúce dôkazy odhalili, že ľudský mikrobióm je asociovaný nielen so vznikom, ale aj s progresiou malignít, šírením metastáz a dokonca aj s efektivitou liečby. Ukazuje sa, že pri onkologických ochoreniach sa mikrobióm podieľa na všetkých štádiách tumorigenézy, pričom zmeny v mikrobióme môžu už slúžiť ako biomarker malígnej transformácie v tele. Prítomnosť priaznivých bakteriálnych druhov môže mať protinádorový efekt vďaka produkcii metabolitov, akými sú kyselina indol-3-propiónová, mastné kyseliny s krátkym reťazcom (SCFAs) a reuterín, ktoré znižujú proliferáciu buniek nádoru. SCFAs dokážu ovplyvniť nielen signálne dráhy v čreve, ale aj vo vzdialených orgánoch a tkanivách prostredníctvom krvného obehu. Prospešné baktérie aktivujú cytotoxické a pomocné T lymfocyty a NK bunky, čím inhibujú nádorový rast. Na druhú stranu, prítomnosť nepriaznivých bakteriálnych taxónov môže prispievať k vývoj nádoru prostredníctvom produkcie rôznych toxínov a reaktívnych foriem kyslíka, ktoré poškodzujú DNA, a zároveň aj prostredníctvom zmenenej signalizáciu dráh vedúcich k pretrvávajúcemu zápalu. Taktiež sa ukazuje, že nepriaznivé mikroorganizmy sa podieľajú na priamej indukcii zápalu vrátane produkcie prozápalových cytokínov, blokovania cytotoxicity NK buniek a T buniek a aktivácie protumorigénnych Th2 a Th17 imunitných reakcií (1, 2).

Úloha baktérií a mechanizmy ich vplyvu boli študované najmä v prípade gastrointestinálnych nádorov, v dôsledku ich asociácií s črevným mikrobiómom. Súčasné výskumy sa snažia posúdiť pozitívny aj negatívny vplyv baktérií, lipopolysacharidov, mikrobiálnych metabolitov a toxínov na vývoj a progresiu aj iných typov malignít. Navyše bola odhalená prítomnosť špecifických mikroorganizmov v nádorových tkanivách, ktoré absentujú v priľahlom zdravom tkanive, čo

môže byť rozhodujúce pri regulácii imunitných a nádorových dráh a tak ovplyvniť rast nádoru (3). Pribúdajúce štúdie úspešne identifikovali patogény nielen v črevnom, ale aj nádorovom mikrobióme, ktoré by mohli súvisieť so zlou odpoveďou na podávanú protinádorovú liečbu (4).

Cieľ

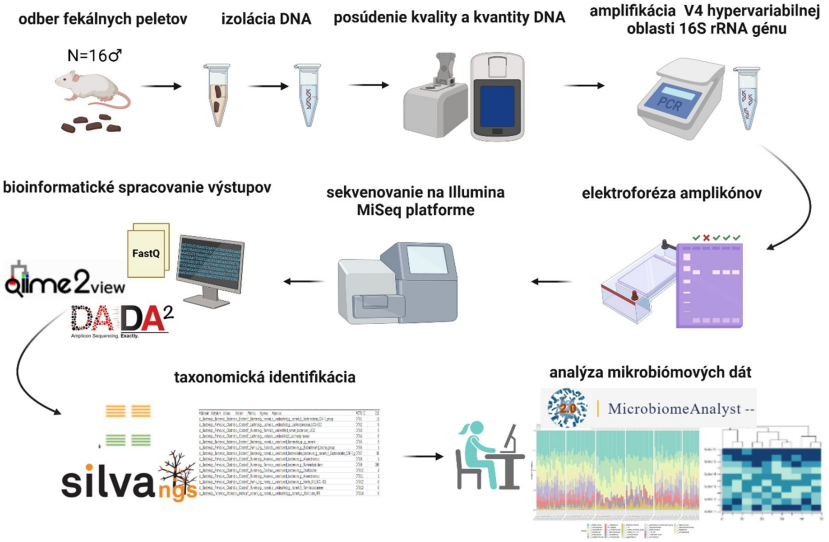
Cieľom našej pilotnej štúdie bolo zaviesť metódu na optimalizáciu izolácie DNA zo stolice s následnou mikrobiómovou analýzou pomocou sekvenovania V4 hypervariabilnej oblasti 16S rRNA génu v animálnom modeli myší s embryonálnym karcinómom testis. Napriek tomu, že testikulárne nádory zo zárodočných buniek tvoria väčšinu všetkých prípadov nádorov testis, embryonálny karcinóm je považovaný za vzácny, ale zato veľmi agresívny podtyp (5). V predkladanej práci sme sa zamerali na štúdium tohto histologického podtypu *in vivo* a našim hlavným cieľom bolo stanoviť diverzitu mikrobiómu a odhaliť špecifické bakteriálne taxóny, ktorých prítomnosť sa mení s dynamikou rastu nádorov a odlišuje sa od mikrobiómu kontrolných zvierat.

Materiál a metódy

V rámci pilotnej analýzy sme stanovili kompozíciu črevného mikrobiómu u animálneho modelu NOD *scid* gamma myší (NSG) vyvinutých v The Jackson Laboratory (USA). Tie predstavujú imunodeficientný kmeň považovaný za zlatý štandard v predklinických štúdiách pre výskum onkologických ochorení a na potenciálne využitie pre personalizovanú terapiu (6). Myšiam bola na ľavú a pravú dorzálnu oblasť tela subkutánne aplikovaná jedna z troch typov parentálnych nádorových línií ľudského embryonálneho karcinómu testis (4x 2102Ep, 4x NCCIT a 4x NTERA-2). Do každej experimentálnej kohorty xenograftov s rôznymi variantami nádorových línií boli zaradení samci vo veku 6 – 8 týždňov. Zvieratá boli chované individuálne, pričom mali zabezpečené rovnaké krmivo a identické podmienky prostredia. Do kontrolnej kohorty sme zaradili 4 samcov, ktorým bol subkutánne injekovaný fyziologický roztok.

Analýza črevného mikrobiómu prebiehala zo vzoriek stolice, ktoré sme odoberali 16 jedincom zaradeným do pilotného experimentu. Fekálne pelety boli umiestnené do sterilných mikroskúmaviek v týždňovom intervale v dĺžke trvania jedného mesiaca, pre posúdenie dynamiky zmien mikrobiómu s rastom nádoru. Pred aplikáciou nádorovej bunkovej línie vs. fyziologického roztoku sme odobrali aj vzorku bazálneho mikrobiómu, ktorý predstavuje počiatočné bakteriálne osídlenie čreva ešte pred akýmkoľvek experimentálnym zásahom. Takto odobraté vzorky boli použité na izolácia mikrobiálnej DNA pomocou Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research), ktorý je komerčne dostupným a vhodným na mikrobiómové analýzy vzoriek stolice a zabezpečuje aj dostatočné výťažky a kvalitu DNA. Amplifikácia získanej DNA prebehla pomocou dvojstupňovej PCR reakcie s využitím primerov 515F a 806R zacielených na V4 hypervariabilnú oblasť 16S rRNA génu. Profilovanie tohto génu, ktorý obsahuje 9 hypervariabilných oblastí (V1–V9) je štandardne využívané na identifikáciu taxonomických jednotiek pomocou sekvenovania novej generácie na rôznych platformách ako Illumina, Ion Torrent alebo Pacific Biosciences. Na základe mikrobiómových analýz v rôznych typoch vzoriek sa ako najoptimálnejší ukazuje výber jednej alebo kombinácia viacerých hypervariabilných oblastí génu. V prípade stanovenia zloženia fekálneho mikrobiómu výskumy poukázali na to, že V4 oblasť je najviac konzervovaná a má najoptimálnejšiu rozlišovaciu

schopnosť medzi blízko príbuznými druhmi baktérií. Vďaka začleneným barkódom sú vzniknuté PCR amplikóny z každej vzorky unikátne, čo umožňuje sekvenovanie všetkých vzoriek naraz. Na inkorporáciu barkódov sa využíva PCR, ktorá predstavuje jednoduchý prístup s nízkymi nákladmi. Štandardný pracovný postup na prípravu vzoriek pre sekvenovanie je zložený z dvoch nezávislých PCR reakcií. Prvá PCR1 amplifikácia prebiehajúca v 28 cykloch bola použitá na vytvorenie produktu V4 oblasti 16S rRNA génu. Súčasne došlo ku začleneniu tzv. linkerových sekvencií (CS1 a CS2) na 5´ konci každej molekuly. Takto vzniknuté produkty slúžili ako templát pre uskutočnenie PCR2 prebiehajúcej v 8 cykloch, v ktorej už boli použité Fluidigm Access Array primery so špeciálnymi barkódmi. Pred samotným sekvenovaním na Illumina MiSeq platforme boli vzorky zlúčené dokopy. Výstupné dáta sme spracovali pomocou dostupných softvérových balíkov a vizualizovali prostredníctvom webovej platformy MicrobiomeAnalyst, ktorá umožňuje použitie rôznych metód na spracovanie mikrobiómových údajov, štatistickú analýzu a funkčné profilovanie. Postup našej experimentálnej práce a mikrobiómovej analýzy je znázornený na Obrázku 1.



Obrázok 1. Pracovný postup mikrobiómovej analýzy. Po uskutočnení izolácie bakteriálnej DNA z myšacích fekálnych peletov a stanovení kvality a kvantity izolovanej DNA sme uskutočnili dvojstupňovú PCR amplifikáciu s následným sekvenovaním V4 hypervariabilnej oblasti 16S rRNA génu. Analýza kompozície mikrobiómu bola vykonaná prostredníctvom webovej platformy MicrobiomeAnalyst. Vytvorené pomocou Biorender.com

Výsledky

Na určenie rozmanitosti mikrobiómu vo vzorkách sme využili metriky α a β diverzity. Stanovenie α diverzity pomocou Shannon indexu, kombinujúceho bohatosť a rovnomernosť taxónov, neodhalilo štatisticky signifikantné rozdiely v rámci jednotlivých skupín ($p>0,05$) (Tabuľka 1). V ďalších krokoch sme sa zamerali aj na stanovenie diverzity medzi skupinami pomocou Bray-Curtis indexu, ktorý je z bežne používaných indexov najsenzitívnejší na rozdiely medzi skupinami (Tabuľka 2). Z výsledkov sme zistili štatisticky významnú odlišnosť ($p<0,05$) diverzity mikrobiómu u kohorty experimentálnych myší nesúcich embryonálny karcinóm v porovnaní s kontrolami a taktiež v 2. a 4. týždni rastu nádorov v porovnaní s kontrolným mikrobiómom v tom istom čase experimentu. Stanovenie počiatočného mikrobiómu neodhalilo rozdielnu diverzitu u experimentálnych zvierat ($p>0,05$), čo predstavuje kľúčový faktor pre zabezpečenie relevantnosti výsledkov štúdie. Myši boli následne rozdelené na skupiny s aplikovanými nádorovými bunkami a skupinu s podaným fyziologickým roztokom.

Tabuľka 1. Stanovenie α diverzity bakteriálnych komunít v rôznych porovnávaných skupinách.

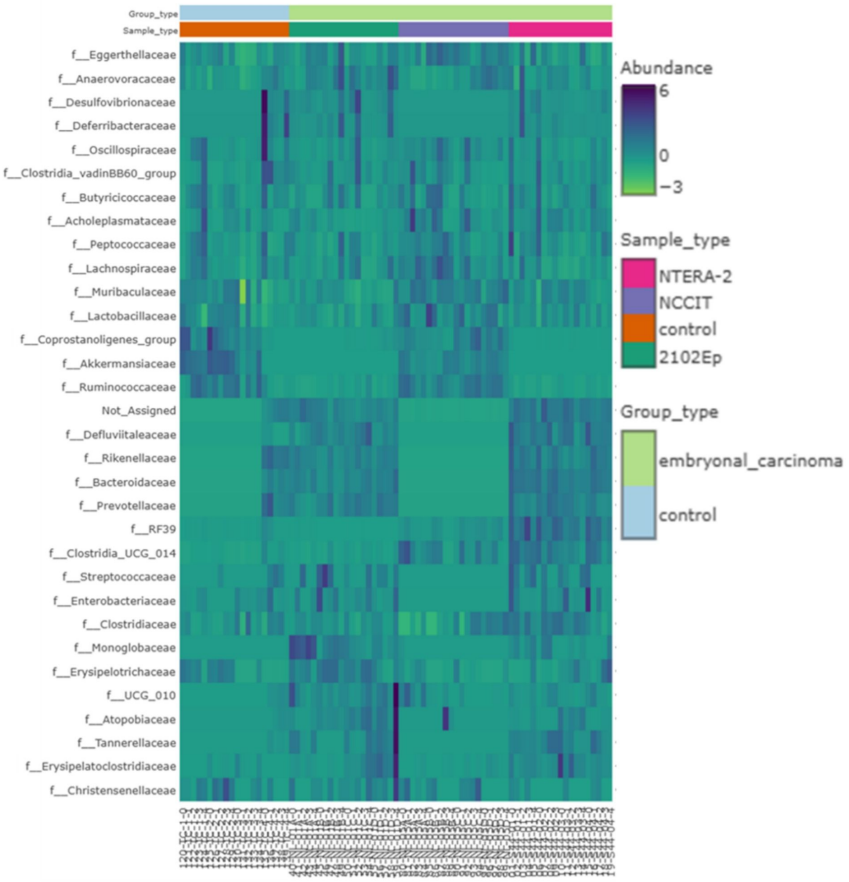
α diverzita (Shannon index)				
porovnávaná skupina 1	porovnávaná skupina 2	N1	N2	p hodnota
xenografty bazálny mikrobióm	kontroly bazálny mikrobióm	12	4	0,503
xenografty 1. týždeň	kontroly 1. týždeň	12	4	0,549
xenografty 2. týždeň	kontroly 2. týždeň	12	4	0,084
xenografty 3. týždeň	kontroly 3. týždeň	12	4	0,398
xenografty 4. týždeň	kontroly 4. týždeň	12	4	0,590
spolu - všetky xenografty	spolu - všetky kontroly	60	20	0,311

Popis: N1: počet vzoriek v 1 skupine; N2: počet vzoriek v 2 skupine

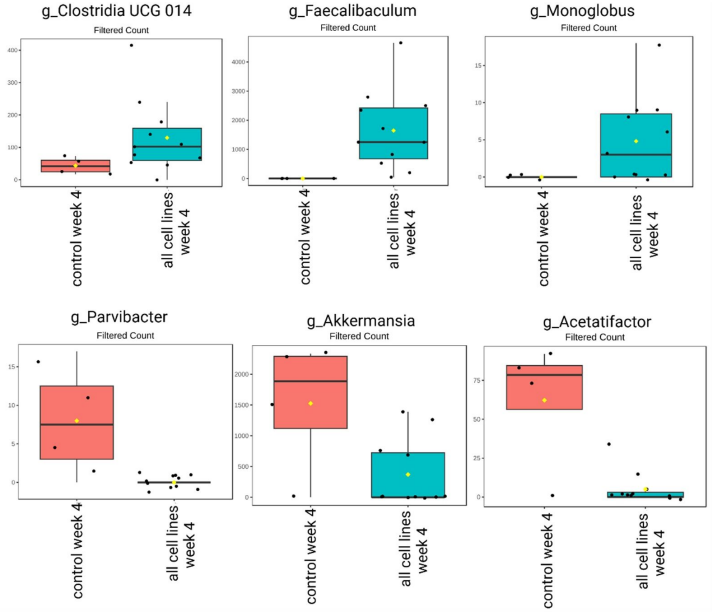
Tabuľka 2. Stanovenie β diverzity bakteriálnych komunít medzi rôznymi porovnávanými skupinami.

β diverzita (Bray-Curtis index)					
porovnávaná skupina 1	porovnávaná skupina 2	N	Permutations	F hodnota	p hodnota
xenografty bazálny m.	kontroly bazálny m.	16	9999	1,051	0,339
xenografty 1. týždeň	kontroly 1. týždeň	16	9999	0,793	0,518
xenografty 2. týždeň	kontroly 2. týždeň	16	9999	3,393	0,019
xenografty 3. týždeň	kontroly 3. týždeň	16	9999	1,092	0,392
xenografty 4. týždeň	kontroly 4. týždeň	16	9999	3,539	0,022
spolu – všetky xenografty	spolu - všetky kontroly	80	9999	4,787	0,009

Popis: N: počet vzoriek; m: mikrobióm



Graf 1. Teplotná mapa popisujúca zastúpenie bakteriálnych čeľadí medzi xenograftmi s podanými nádorovými líniami embryonálneho karcinómu testis a kontrolami s fyziologickým roztokom. Farebná škála od tmavej po bledozelenú vyjadruje zastúpenie taxónov vo vzorkách v rámci porovnávaných skupín myší. Riadky reprezentujú jednotlivé bakteriálne čeľade a stĺpce určujú jednotlivé vzorky. Na vizualizáciu bol použitý MicrobiomeAnalyst.



Graf 2. Analýza difereciálnej abundancie. DESeq2 algoritmus odhalil významne odlišne zastúpenie viacerých bakteriálnych rodov v 4. týždni experimentu medzi xenograftmi a kontrolami. Graf znázorňuje abundanciu taxónov Akkermansia, Acetatifactor, Clostridia UCG 014, Faecalibaculum, Monoglobus a Parvibacter v pozorovaných vzorkách v 4. týždni od subkutánne podanej nádorovej línie alebo fyziologického roztoku. Na osi x sú jednotlivé analyzované skupiny vzoriek. Na osi y je zaznamenaná prítomnosť rodu v porovnávanej skupine vzoriek. Na vizualizáciu bol použitý MicrobiomeAnalyst.

Pre vizualizáciu odlišností v mikrobiome kontrolných myší bez nádorov a skupiny všetkých myšacích xenograftov nesúcich embryonálny karcinóm sme použili teplotnú mapu tzv. heat map za využitia hierarchického klastrovacieho algoritmu Ward (Graf 1). Farebnou škálou sme odlíšili zastúpenie čeľadí v jednotlivých vzorkách v porovnávaných skupinách. Z výsledkov vyplynulo signifikantne vyššie zastúpenie čeľadí *Akkermansiaceae* a *Ruminococcaceae* u kontrolnej skupiny, zatiaľ čo u myší s nádormi sme zaznamenali vyššiu prítomnosť zástupcov 4 čeľadí *Tannerellaceae*, *Defluviitaleaceae, Bacteroidaceae* a *Monoglobaceae.*

Ďalším cieľom našej práce bolo odhaliť potenciálne bakteriálne taxóny na úrovni rodu, ktoré by sa mohli svojou prítomnosťou odlišovať v časových intervaloch rastu nádorov v porovnaní s kontrolným mikrobiómom. Taxonomické zloženie počiatočného mikrobiómu našich myší odhalilo zastúpenie čeľadí *Lachnospiraceae, Lactobacillaceae* a *Erysipelotrichaceae,* čo sa zhodovalo s kompozíciou mikrobiómu NSG myší chovaných v rámci The Jackson Laboratory, ktoré distribuuje tieto zvieratá do celého sveta (7). Analýzou diferenciálnej abundancie

pomocou DESeq2 algoritmu ($p<0,05$) (Graf 2) sa nám podarilo zistiť, že v 4. týždni od podania nádorových línií embryonálneho karcinómu bolo u týchto myší pozorované signifikantne vyššie zastúpenie rodu *Clostridia UCG 014* (z čeľade *Clostridia*), ktorý je v štúdiách označovaný ako prozápalový taxón (8). Zaujímavosťou bolo aj to, že 2 rody *Faecalibaculum* (z čeľade *Erysipelotrichaceae*) a *Monoglobus* (z čeľade *Monoglobaceae*) boli detegované len v mikrobióme xenografov v tomto časovom odbere, pričom u kontrol boli pod detekčným limitom. Na druhú stranu u kontrolných jedincov bez nádorov boli v 4. týždni experimentu viac zastúpené rody *Parvibacter* (z čeľade *Eggerthellaceae*), *Akkermansia* (z čeľade *Akkermansiaceae*) a *Acetatifactor* (z čeľade *Lachnospiraceae*).

Diskusia

Aktívnou oblasťou prebiehajúcich onkologických výskumov je pochopenie mechanizmov, ktorými nepriaznivé mikrobiálne druhy dokážu podporiť vznik a progresiu nádorov. Mnohé štúdie demonštrovali dôležitosť jednotlivých črevných bakteriálnych druhov pri odpovedi na protinádorovú liečbu, najmä chemoterapiu a imunoterapiu (2). Mikrobiómové analýzy v rámci prebiehajúcich klinických štúdií by mohli poskytnúť cenné informácie o prognostických a diagnostických mikrobiálnych biomarkeroch pri nádorových ochoreniach. Rozdiely v zložení a diverzite črevného mikrobiómu u zdravých ľudí a pacientov s kolorektálnym karcinómom poukázali na potenciálne využitie mikrobiálnych biomarkerov pri včasnej diagnostike so sľubnou citlivosťou, špecificitou a dokonca aj nákladovou efektívnosťou (9). Súčasný výskum popisuje korelácie medzi zložením mikrobiómu a genitourinárnymi malignitami u pacientov s nádormi prostaty a močového mechúra. Podobne aj animálne experimenty potvrdzujú asociáciu mikrobiómu s týmito malignitami prostredníctvom zložitých signálnych dráh, ktoré je potrebné ešte hlbšie preskúmať. V porovnaní s inými typmi nádorov sa genitourinárne malignity vyvíjajú pomaly a pri včasnej detekcii je ich liečba vysoko efektívna. Hoci bola popísaná existencia osi „mikrobióm-črevo-testis“ (10), rozsiahle štúdie zamerané na úlohu mikrobiómu pri testikulárnych nádoroch chýbajú. Štúdia z roku 2023 uskutočnená na základe dát z Finngen Konzorcia a UK Biobanky odhalila, že zastúpenie rodu *Subdoligranulum* v mikrobióme mužov znižovalo riziko nádorov testis. Na druhú stranu, vysoké zastúpenie rodu *Romboutsia* a čeľade *Peptostreptococcaceae* korelovalo s vyšším rizikom prítomnosti nádorov (11). Identifikácia biomarkerov v črevnom mikrobióme pacientov s nádormi semenníkov pomôže pochopiť, ako sa konkrétne mikroorganizmy podieľajú na progresii tohto ochorenia, ktoré v súčasnosti postihuje čoraz viac mladých chlapcov a mužov (10). Vykonanie pilotných analýz s nízkym počtom zvierat s rozsahom 5 až 20 myší sa dôrazne odporúča pri pokusoch na zvieratách, keď nie je dostatok informácií o danej výskumnej problematike (12). Naša animálna štúdia po prvýkrát poukázala na vplyv rastu embryonálneho karcinómu testis na kompozíciu a diverzitu mikrobiómu v pilotnom animálnom experimente u xenografov v porovnaní s kontrolami. Výsledky ukázali, že bakteriálne čeľade *Akkermansiaceae* a *Ruminococcaceae* boli hojnejšie zastúpené v kontrolnej skupine. Tieto čeľade sú známe pre svoju úlohu pri udržiavaní integrity črevnej bariéry vďaka schopnosti produkovať SCFAs, ktoré sú zdrojmi energie pre enterocyty (13). Získané výsledky naznačujú, že dynamika rastu nádorov testis spôsobila zmeny v mikrobióme a znížila hladiny týchto priaznivých čeľadí. Naše ďalšie zistenia týkajúce sa zvýšených hladín vybraných čeľadí u xenografov sa zhodujú so štúdiami pri rôznych iných typoch malignít, poukazujúcich na vyššie zastúpenie *Bacteroidaceae* pri kolorektálnom karcinóme (14). Čeľaď *Tannerellaceae* bola hojnejšie

zastúpená v mikrobióme pacientov s nádormi pľúc (15), zvýšenie čeľade *Defluviitaleaceae* podporovalo riziko nádorov hlavy a krku (16) a zástupcovia čeľade *Monoglobaceae* boli vo vyššej miere prítomní u obéznych pacientiek s nádormi prsníka (17). Aj mnohé ďalšie predklinické a klinické štúdie odhalili, že nami detegované bakteriálne rody, ktoré boli v 4. týždni experimentu viac zastúpené u myšacích xenograftov, zohrávajú úlohu pri rôznych typoch malignít (Tabuľka 3).

Tabuľka 3. Diferenciálne abundancia bakteriálnych rodov v mikrobióme myší v 4. týždni od podania nádorovej línie vs. fyziologického roztoku kontrolám.

Taxonomické zaradenie	Diferenciálna abundancia ($p<0,05$) zastúpenia taxónu	Vlastnosti bakteriálneho taxónu, úloha a výskyt
Akkermansia	↑ u kontrol v 4. týždni	+ biomarker odpovede na imunoterapiu ↑ SCFAs produkciu ↑ integritu črevnej bariéry ↓ u pacientov s rôznym typom malignít
Acetatifactor	↑ u kontrol v 4. týždni	+ blokuje prozápalové reakcie cez SCFAs + zlepšuje funkciu pečene/absorpciu tukov ↑ u potkanov s benígnou hyperpláziou prostaty
Clostridia UCG 014	↑ u xenograftov v 4. týždni	- prozápalový taxón ↑ toxicitu imunoterapie ↑ u pacientov s KRK ↑ u žien s nádormi ovárií, ktoré ochoreniu podľahli
Faecalibaculum	↑ u xenograftov v 4. týždni	+ protinádorový vplyv ↑ SCFAs produkciu ↓ počas KRK karcinogenézy
Monoglobus	↑ u xenograftov v 4. týždni	+ degraduje pektín - v orálnom mikrobióme spôsobuje zápal ↑ u pacientov a myší s KRK
Parvibacter	↑ u kontrol v 4 . týždni	↓ počas črevnej dysbiózy u myší ↑ SCFAs produkciu

Popis tabuľky: SCFAs mastné kyseliny s krátkym reťazcom, KRK kolorektálny karcinóm

Záver

Záverom môžeme potvrdiť, že v rámci našej experimentálnej práce sme odhalili viaceré bakteriálne taxóny na úrovni čeľade aj rodu, ktoré by mohli slúžiť ako potenciálne mikrobiálne biomarkery spojené s nádormi embryonálneho karcinómu testis. Predložené výsledky sú súčasťou pripravovanej experimentálnej publikácie (*in preparation*). Do budúcnosti môžu naše pilotné výsledky poslúžiť ako základ pre plánovanie ďalších výskumov zameraných na detailnejšie štúdium prepojenia mikrobiómu s nádormi semenníkov prostredníctvom osi „mikrobióm-črevo-testis" a aj možností ovplyvnenia mikrobiómu za účelom zlepšenia jeho zloženia. Napriek tomu, že nádory semenníkov sú dobre liečiteľné, časť pacientov vykazuje rezistenciu na liečbu. Práve modulácia mikrobiómu pomocou rôznych stratégií (18) by mohla viesť ku zlepšeniu odpovede na liečbu pacientov s refraktérnym ochorením.

Preto oblasť tohto výskumu zameraného na prepojenie testikulárnych nádorov s mikrobiálnym zložením by mohla pomôcť aj pri objavovaní nových stratégií pre prevenciu a skríning, čo by umožnilo lekárom identifikovať jedincov s vyšším rizikom na základe špecifického profilu črevného mikrobiómu a navrhnúť personalizované intervencie na zmiernenie rizika vzniku a rozvoja ochorenia.

Poďakovanie

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

Zoznam použitej literatúry

1. Ivleva EA, Grivennikov SI: Microbiota-driven mechanisms at different stages of cancer development. Neoplasia 2022; 32: 100829.
2. 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.
3. Ciernikova S, Sevcikova A, Stevurkova V, Mego M. Tumor microbiome - an integral part of the tumor microenvironment. Frontiers in oncology 2022; 12: 1063100.
4. Ciernikova S, Sevcikova A, Mego M: Targeting the gut and tumor microbiome in cancer treatment resistance. American journal of physiology. Cell physiology 2024; 327(6): C1433–C1450.
5. Tahri Y, Moueqqit O, Mokhtari M, Ramdani M, Nadir M, Bennani A, Barki A: Unusual Presentation of Embryonal Carcinoma of the Testis: A Case Report. Cureus 2023; 15(2): e35175.
6. Chandra PK, Datta A, Mondal D: Development of mouse models for cancer research. Animal biotechnology 2020; 77-102.
7. https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2019/august/building-reproducibility-through-microbiome-stability-in-jax-mice dostupné 2.4.2025
8. Ratto D, Roda E, Romeo M, a spol.: The Many Ages of Microbiome-Gut-Brain Axis. Nutrients 2022; 14(14): 2937.

9. Olovo CV, Huang X, Zheng X, Xu M: Faecal microbial biomarkers in early diagnosis of colorectal cancer. Journal of cellular and molecular medicine 2021; 25(23): 10783-10797.
10. Ciernikova S, Sevcikova A, Mego M: Exploring the microbiome-gut-testis axis in testicular germ cell tumors. Frontiers in cellular and infection microbiology 2025; 14: 1529871.
11. Yin Z, Liu B, Feng S, a spol.: A Large Genetic Causal Analysis of the Gut Microbiota and Urological Cancers: A Bidirectional Mendelian Randomization Study. Nutrients 2023; 15(18): 4086.
12. Sorzano COS, Tabas-Madrid D, Nunez F, Fernández-Criado C, Naranjo A: Sample size for pilot studies and precision driven experiments. arXiv preprint arXiv 2017*; 1707.00222*.
13. Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M, a spol.: Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. Nutrients 2023; 15(9): 2211.
14. Liu J, Dong W, Zhao J, Wu J, Xia J, Xie S, Song X: Gut microbiota profiling variated during colorectal cancer development in mouse. BMC genomics 2022; 23(Suppl 4): 848.
15. Liu F, Lu X, Tang M, Chen, Y, Zheng X: Gut Microbiome and Metabolite Characteristics Associated With Different Clinical Stages in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. Cancer management and research 2025; *17*: 45–56.
16. Lian M, Sun M, Han B, Baranova A, Cao H, Zhang F: Gut microbiome's causal role in head and neck cancer: findings from mendelian randomization. Frontiers in oncology 2024; 14: 1453202.
17. Cherwin CH, Hoang J, Roberts EK, Mangalam A: Gut Microbiome and Symptom Burden in Obese and Non-Obese Women Receiving Chemotherapy for Breast Cancer. Biological research for nursing 2025; 10998004251318397.
18. 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.

20. Výsledky liečby faricimabom u pacientov s diabetickým makulárnym edémom.

MUDr. Alena Trtolová
(oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Ján Juhás[2], MUDr. Samuel Pavlovič[1]
Školiteľ: doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD.[2]
[1]Očná klinika FNsP Nitra, [2]Klinika oftalmológie LFUK a UNB

Úvod

Diabetický makulárny edém (DME) je definovaný ako abnormálne zhrubnutie sietnice na podklade akumulácie tekutiny v makulárnej oblasti [1]. Postihuje približne 7% pacientov s ochorením diabetes mellitus a je jednou z hlavných príčin zhoršenia či dokonca straty zraku vo vyspelých krajinách. Patogenéza vzniku je multifaktoriálna, pričom hlavnými rizikovými faktormi sú hyperglykémia, systémová hypertenzia a hyperlipidémia [2]. Tieto faktory sa podieľajú na aktivácii patologickej kaskády, kde, okrem iných, zohrávajú dôležitú úlohu vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) a angiopoetín-2, ktoré prispievajú k poškodeniu endotelu ciev sietnice, poruche hematoretinálnej bariéry a následne k vzniku makulárneho edému. Liečbou prvej voľby u pacientov s DME sú anti-VEGF preparáty, podávané intravitreálne, ktoré zabezpečujú zvýšenie cievnej stability, zníženie permeability ciev a blokádu vazoproliferácie [3]. Na trh prichádzajú nové, efektívnejšie anti-VEGF preparáty s cieľom zabezpečiť čo najdlhšie trvajúce účinky. Jedným z nich je aj preparát faricimab, ktorý je na Slovensku registrovaný od 1.4.2024 [4].

Cieľom našej práce je porovnať anatomické a funkčné výsledky a dosiahnuté intervaly u pacientov liečených faricimabom na našej klinike s výsledkami z reálnej klinickej praxe.

Materiál a metódy

Zvolili sme retrospektívnu analýzu, v ktorej sme hodnotili výsledky 6-mesačnej anti-VEGF liečby u pacientov s diabetickým makulárnym edémom, ktorým bol intravitreálne aplikovaný preparát faricimab. Terapeutický režim prebiehal v súlade s dávkovaním uvedeným v SPC daného lieku, pričom sme prvé štyri dávky podali v mesačných intervaloch a následne sa liečba individualizovala za použitia prístupu „treat-and-extend“ (lieč a predlžuj interval medzi injekciami) podľa anatomickej a funkčnej odpovede na terapiu.

Do súboru sme zaradili pacientov z metabolicko-cievnej ambulancie Očnej kliniky Fakultnej nemocnice Nitra:

u ktorých bola liečba 6 mg faricimabom zahájená po 1.apríli 2024, s dokumentovanou dĺžkou liečby najmenej 6 mesiacov

ktorí spĺňali inklúzne kritériá pre zahájenie liečby faricimabom (pacienti s DM 1.typu alebo kompenzovaní diabetici 2. typu, u ktorých hodnota glykovaného hemoglobínu (HbA1C) (nie

staršia ako 3 mesiace) bola nižšia alebo rovná 8,0% DCCT; vstupná najlepšie korigovaná zraková ostrosť bola 20/25 – 20/200, u monokulov 20/25 – 20/320; centrálna hrúbka sietnice bola minimálne 400 µm u nelaserovaných pacientov a 300 µm u pacientov po laserovej liečbe)

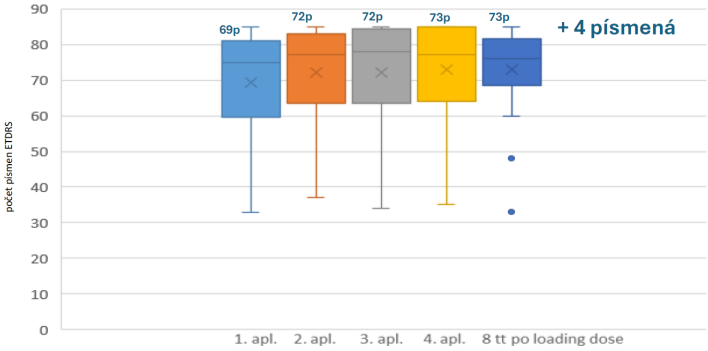
Vylučujúcim kritériom liečby bol infarkt myokardu, náhla cievna mozgová príhoda za obdobie predchádzajúcich 3 mesiacov alebo gravidita a zmeny v makule ireverzibilného charakteru [4].

Výsledky

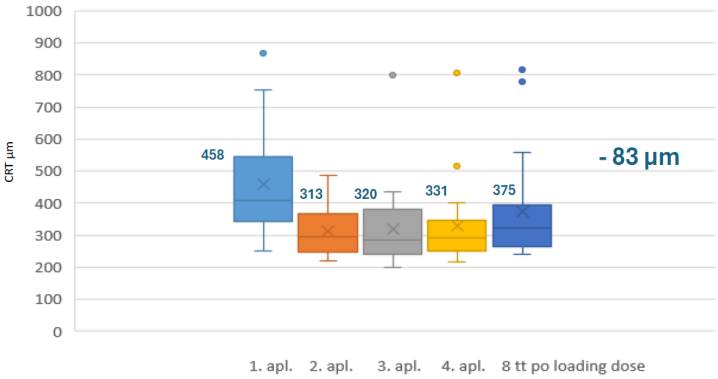
Do nášho súboru bolo celkovo zaradených 21 očí 17 pacientov, z toho 8 žien a 9 mužov. Priemerný vek pacientov bol 62,5 roka (SD 12,6), pričom najmladší pacient mal 36 rokov a najstarší pacient 82 rokov. V súbore bola prevaha pacientov s DM 2. typu (14 pacientov) voči pacientom s DM 1. typu (3 pacienti). 12 pacienti mali neproliferatívnu diabetickú retinopatiu a 5 pacientov proliferatívnu diabetickú retinopatiu. Všetci pacienti pred zahájením liečby faricimabom absolvovali predchádzajúcu anti-VEGF liečbu iným preparátom alebo kortikosteroidnú liečbu v priemernej dĺžke 61 mesiacov (SD 48). Jeden pacient v minulosti podstúpil chirurgickú intervenciu- pars plana vitrektómiu. Laserové ošetrenie periférnej sietnice pred liečbou absolvovalo 8 očí a fokálny laser makuly 2 oči.

Priemerná vstupná najlepšie korigovaná zraková ostrosť (NKCZO) bola 69 písmen ETDRS (SD 15,75). Priemerná vstupná centrálna hrúbka sietnice (CRT) bola 458 µm (SD 162,65).

Po 24 týždňoch liečby (po 4 intravitreálnych nasycovacích injekciách faricimabu) sa priemerná NKCZO zlepšila z 69 písmen na 73 písmen ETDRS (nárast o 4 písmená). Priemerná CRT sa po 4 aplikáciách znížila z 458 µm na 375 µm (pokles o 83 µm).

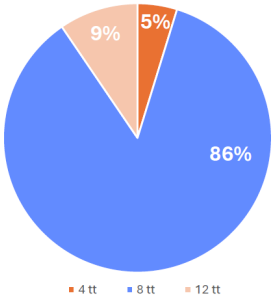


Graf č. 1: vývoj najlepšej korigovanej zrakovej ostrosti počas sledovania



Graf č. 2: vývoj centrálnej hrúbky sietnice počas sledovania

Všetci pacienti dostali 5. injekciu po 8 týždňovom intervale, pričom po 5. injekcii bolo 18 očí (86%) ponechaných na 8 týždňovom intervale, 2 oči (9%) sme predĺžili na 12 týždňový interval a 1 oko (5%) sme skrátili na aplikačný interval 4 týždne. Úplnú resorbciu intraretinálnej tekutiny po prvých 4 dávkach dosiahli 3 oči (14%).



Graf č. 3: rozdelenie pacientov podľa dĺžky aplikačného intervalu

Počas nášho sledovania sme u pacientov nezaznamenali žiadnu komplikáciu či nežiadúci účinok súvisiaci s aplikáciou faricimabu.

Diskusia

Cieľom anti-VEGF liečby pri DME je dosiahnuť maximálne zlepšenie zrakovej ostrosti spolu s redukciou centrálnej retinálnej hrúbky v makule, čo sa nám u našich pacientov potvrdilo.

Výsledky z nášho pracoviska sme porovnávali s výsledkami z Londýnskej nemocnice zo Spojeného kráľovstva. Priemerná vstupná NKCZO bola v našom súbore 69 ± 15,75 písmen ETDRS, čo je vyššia hodnota v porovnaní so štúdiou zo Spojeného kráľovstva, kde bola priemerná vstupná NKCZO 60,8 ± 14,6 písmen ETDRS. Priemerná vstupná CRT bola u našich pacientov nižšia (458 ± 162,65 µm) ako u tých zo Spojeného kráľovstva (492,5 ± 133,1 µm) [5].

V našej skupine pacientov sme pri 5. návšteve zaznamenali zlepšenie priemernej NKCZO o 4 písmená, čo je výrazne lepší výsledok v porovnaní so štúdiou zo Spojeného kráľovstva, kde sa priemerná NKCZO zlepšila o 2,5 písmen ETDRS. Priaznivejší výsledok v našej skupine pacientov pripisujeme lepšej vstupnej NKCZO, čo súvisí s nálezom menej pokročilého edému, ktorý lepšie reaguje na liečbu.

Zlepšenie NKCZO bolo sprevádzané poklesom CRT. Pri 5. návšteve bol pokles CRT v našej skupine pacientov menej výrazný (-83 µm) ako v skupine pacientov zo Spojeného kráľovstva, u ktorých CRT poklesla o 104 µm [5].

Čo sa týka anatomických výsledkov, pacienti vykazovali zlepšenie v hodnotených OCT biomarkeroch, ktoré súvisia s aktivitou ochorenia. Prítomnosť subretinálnej tekutiny (SRF) v našom súbore pacientov poklesla z 10% na 5% a intraretinálna tekutina (IRF), ktorú malo pred zahájením liečby 100% pacientov, bola pri 5. návšteve prítomná u 86% pacientov, čo je porovnateľný výsledok so štúdiou zo Spojeného kráľovstva, kde bol pokles SRF z 15,4% na 0% a pokles IRF zo 100% na 91,7% [5].

Po nasycovacej dávke sme postupovali v režime „treat-and-extend“, pričom po 5. injekcii bolo 86% očí nastavených na 8 týždňový interval, 9% očí sme predĺžili na 12 týždňový interval a 1 oko (5%) bolo skrátené na 4 týždňový interval. Naši pacienti dosiahli dlhšie intervaly v porovnaní so štúdiou FARWIDE, kde 8 a viac týždňový interval dosiahlo len 46,2% očí, 12 a viac týždňový interval 6,2% očí a menej ako 8 týždňový interval 47,6% očí [6].

Aplikácia faricimabu v našom súbore pacientov s DME priniesla sľubné funkčné a anatomické výsledky, na vyhodnotenie dlhodobej účinnosti tohto lieku však potrebujeme ďalšie zbieranie dát.

Zoznam použitej literatúry

1. Kalvodová B., Kalvoda J.: Nové trendy v diagnostice a léčbě diabetického makulárního edému. Interní medicína pro praxi 2013; 15(1): 19-21.
2. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. Eye and Vision. 2015;2 (1):17.
3. Amoaku WM, Ghanchi F, Bailey C, et al. Diabetic retinopathy and Diabetic Macular Oedema Pathways and Management: UK Consensus Working Group. Eye. 2020;34(S1):1–51.
4. Súhrn charakteristických vlastností lieku Vabysmo 120 mg/ml injekčný roztok [online]. www.ema.europa.eu. [cit. 2025-03-22]. Dostupné na internete: Vabysmo, INN-Faricimab.

5. Quah NQX, Javed KMAA, Arbi L, Hanumunthadu D. Real-World Outcomes of Faricimab Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Macular Edema. Clin Ophthalmol. 2024 May 27;18:1479-1490.
6. Reynolds R., Peto T., Bailey C., Downey L., Kiire Ch, Pearce I., Sivaprasad S., Chi G., James N., Rothwell A., Shah N., Downey A., Dodds M., Dayal P.; Real-world treatment patterns and outcomes in the first 6 and 12 months of faricimab use among eyes with diabetic macular edema (DME) in the UK: FARWIDE-DME. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2024;65(7):6237.

21. Comparison of inlays/onlays produces by conventional method and by the system CAD/CAM and of different materials and their properties

MDDr. Alexandros Tzigeris
(dentistry)

Školiteľ: prof. MUDr. Peter Stanko, PhD[1]
[1] Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

Introduction

In modern dentistry, Computer-Aided Design and Manufacturing (CAD/CAM) is a promising technology that allows fabrication of prosthetic restorations through milling procedures. Over years, with the continuous improvement of technology, direct CAD/CAM or ‘‘chairside” technology is becoming a widespread approach which offers immediate rehabilitation with long-term rates reported by several studies compared to conventional techniques. All steps are generally carried out in the dental office during the same treatment session. The most widespread chairside procedures nowadays in modern dentistry are the partial ceramic restorations, namely inlays and onlays (1). One of the most attractive things to hear for a patient is , that the clinician can change their old, amalgam fillings for new ceramic high-value, highly aesthetic ceramic restorations in one only appointment, impressions free. What is very important from the clinician’s aspect except the patient’s comfort and financial aspect, which are also very important, is to determine if clinically the restorations created digitally are equal or better in quality to those conventional ones, which were used with success for decades. Parameters such as impression accuracy, marginal and internal fitting, bonding, cementation as well as the ceramic material itself must be reviewed extensively and be taken into consideration (4). As the older metal, gold inlays and onlays were replaced with the aesthetically superior ceramic ones, now we are faced with a new evolution, from the analogue and conventional way of producing inlays with the assistance of a dental laboratory and technician, to the digital way using the CAD/CAM system.

Materials and Method

Null hypothesis: There is no difference in the marginal or internal fit and physical properties of ceramic inlays and onlays when using digital or conventional techniques. Difference depends on the type of ceramic material used.

A research is taking place in the Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery in Faculty of Medicine, Comenius University of Bratislava, in Heydukova 8.

The research is mainly conducted in vitro in 30 extracted human maxillary and mandibular 1st and 2nd molars. mimic the bite of a patient, the extracted teeth are placed in special articulated dental model with adjustable teeth. The inlays/onlays are produced by the method CAD/CAM using intraoral scanner Primescan, designed by Cerec 5 software, milled/manufactured by

Cerec Primemill , and finally sintered and glazed in Cerec Speedfire Furnace, all provided by the clinic. The inlays/onlays are cemented to the extracted teeth using PANAVIA™ SA Cement Universal, a self-adhesive resin cement.

Afterwards, a study is conducted in two parts.

With the help of the Faculty of Mechanical Engineering of the Slovak University of Technology in Bratislava, a 3D simulation study is conducted to determine the mechanical properties, post-fatigue fracture load and stress concentration of different materials used. The 3D model is designed by exportation of STL files of the intraoral maxillary and mandibular scan, conducted with Cerec Primescan mentioned above.

The second part of the search includes co-operation with the Institute of Histology and Embryology of the Faculty of Medicine Comenius University Bratislava. There is conducted the analysis of the marginal and internal fit of each and every material and inlay/onlay, to the extracted tooth.

Inlay/Onlay Materials Compared:

Celtra DUO zirconia-reinforced lithium silicate (Dentsply Sirona)

VITA ENAMIC made from composite resin with ceramic filler particles (VITA)

Cerec Tessera , advanced Lithium disilicate (Dentsply Sirona)



Figure 1. Zirconia-reinforced silicate inlay cemented on the working model lithium



Figure 2. Extracted first mandibular molar with Black I cavity preparation prepared on the articulated model

Additional to the in vitro research, a separate in vivo one is conducted in patients in the Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery of our Faculty. That involves a limited amount of inlays, which prevents this method from being an objective one. The in vivo method will be used in the form of subjective questionnaires filled by the patients after the cementation of the inlay, after 6 months of use in the mouth , and after a year . Questions will include patient satisfaction according to time, aesthetics, comfort and financially.

Evaluation

• Evaluation is done with consideration of 5 parameters: 1) Surface glossiness, shine 2) Aesthetic anatomical form 3) marginal adaptation 4) approximal occlusal form contact point 5) evaluator's general view

• Evaluation scale: 1-5 (1=excellent, 2= clinically good, 3=clinically satisfactory, 4= clinically unsatisfactory, 5= clinically poor/problematic)

• The marginal adaptation of inlays is checked with endodontic files (from 10 to 30) to evaluate the gap between the inlay and the preparation

• Surface shine, glossiness checked comparing all inlays with the enamel surface glossiness of a natural tooth

• Aesthetic anatomical form checked comparing all inlays with the anatomy of the contralateral teeth

• Occlusal form contact point measured with articulating paper



Figure 3. Removal of amalgam filling and cementation of zirconia-reinforced lithium silicate in a left first molar

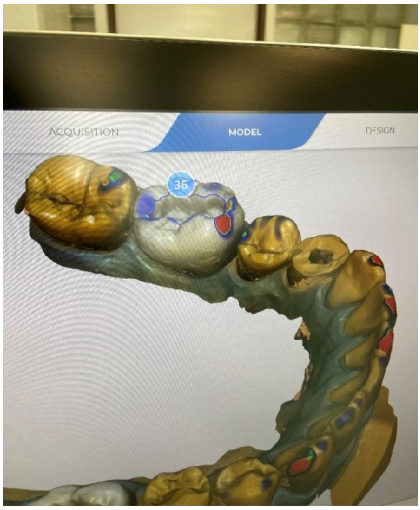


Figure 4. CAD system model and design of an inlay (ceramic filling) on a first left molar

Conventional VS CAD/CAM partial restorations

The analysis of the conventional technique shows that aesthetics has been improved (micro and macrotexture, shape and colour) through the years. The time spent for the clinical stage (except for the documentation and clinical preparation, which are the same for both techniques) takes around 30 minutes for the impressions, additionally the time needed for the impressions to be sent to the lab (which varies according to the laboratory location). Around two hours are spent in the dental laboratory casting and mounting the models in the semi-adjustable articulator (including the setting times of the plaster). The following steps take place: investing (30 minutes), preheating (45 minutes), pressing the ceramics (30 minutes), cooling and disinvesting (30 minutes), mechanical processing and finishing (30 minutes), painting and glazing (30 minutes), reaching a total time spent in the lab of 3 hours and a half. The technical process of creating a traditional inlay is guided by the dental technician's talent, experience, and vision.

The type of scanning may influence the marginal fit which, from a periodontal perspective, have a major effect on gingival health. The time required for intraoral scanning and sending the STL files via internet takes around 30 minutes, so there is no additional time for disinfection and transportation of the impressions. Creating the design takes from 40min to one hour depending on the restoration, milling the ingot around 20 minutes (depending again on the type of restoration), print the digital model and post-process around one hour and a half and paining and glazing 30 minutes. Time spent can be reduced to two hours if milling and printing are to be done simultaneously, which is possible.

Discussion

The introduction of tooth-coloured restorations fabricated from composite resin or ceramic has resolved many of the aesthetic concerns that patients have expressed about the use of silver amalgams or gold alloys. Patients' requests for exceedingly aesthetic restorations and patients' concerns about the side effects of the use of dental amalgam for dental restorations have prompted and expanded enthusiasm for the utilization of all-ceramic inlays and onlays to re-establish posterior teeth. Ceramic materials are a good choice for dental restorations because they can mimic the appearance of natural teeth. However, two things have limited the use of ceramics in the fabrication of dental prostheses: 1. brittleness that cause a lack of mechanical reliability and 2. these restorations required more effort and time for processing in comparison to metal alloys and dental composites. New advances in ceramic processing methods have made the work easier for the dental professionals to work with ceramic-made dental restorations and involve better quality control processes resulting in ceramic materials with raised mechanical reliability (3). As a result, the proportion of restorative treatments using all-ceramic prostheses is quickly growing. As previously mentioned, ceramic materials have been considered a great choice for dental restorations among patients with highly aesthetic demands since these restorations, meet patients standards of appearance coupled with wear resistance, especially in the case of wide posterior restorations. Moreover, ceramics with high flexural strength are also an option for restorations in patients with complicated dental prostheses needs. Failure of dental restorations is a major issue in dental practice, especially in the treatment of adults. Hence, placement and replacement of restorations still constitutes the real workload in general dental practice. The clinical assessment of restoration

failures varies as indicated by the diagnostic criteria and is commensurate with the variability among operators. Broad concerns about ceramic restorations are restoration failures from cyclic loading, material flexure, and propagation of fractures inherent in the ceramic material. Furthermore, ceramics made by different laboratory techniques, while the composition is similar, prompts the possibility of encountering manufacturer differences, for example, different division of flaws, depth of translucency, and the fit (2). These differences are important to the dentist because they can lead to the poor clinical performance of crowns and onlays.

Digital techniques are used more often in a daily practice that are constantly evolving and improving. The conventional method allows the dental technician to achieve better morphology in terms of macro- and micro-texture and better individualization of the restoration. The analogue process involves more clinical and technical steps which implies more time needed and implies potential human errors with minimum possibilities of correction at some stages. Even if dental equipment for conventional process implies more machines, they are less expensive than the tools needed for digital process. Comparing the conventional and digital workflow in order to obtain ceramic restorations in terms of time consuming, clinical and laboratory steps with the potential errors involved and ease in manufacturing, the digital workflow is less time consuming and involves less clinical and technical procedures with less possible human errors. Additionally, if errors occur at any stage, the corrections can be made easily. The possible contamination is eliminated for the digital method, meanwhile, for the conventional method there still exists the possibility of contamination during impression taking and pouring the dental models. Digital workflow is less dependent to the craftsmanship of a skilled dental technician and also the variety of industrial shaded ingots is higher. However, it is recommended to take into consideration the financial costs and multiple dedicated software needed for the digital workflow. The necessity of a constant update and the learning curve when choosing a digital approach are mandatory.

References

1. Ahlholm P, et al. Digital versus conventional impressions in fixed prosthodontics: A review. J. Prosthodont. 2018;27(1):35–41.
2. Anadioti E, Aquilion S, Gratton D, et al. 3D and 2D marginal fit of pressed and CAD/CAM lithium disilicate crowns made from digital and conventional impressions. J Prosthodont. 2014;23;610–617.
3. Aslan YU, Coskun E, Ozkan Y, Dard M. Clinical Evaluation of Three Types of CAD/CAM Inlay/ Onlay Materials After 1-Year Clinical Follow Up. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2019 Aug 29;27(3):131–40.
4. Carvalho T. F., Lima J. F. M., De-Matos J. D. M., et al. Evaluation of the accuracy of conventional and digital methods of obtaining dental impressions. International journal of odontostomatology. 2018;12(4):368–375. doi: 10.4067/S0718-381X2018000400368.

22. Vysoká terapeutická účinnosť TRODELVY® v liečbe agresívneho metastatického choriokarcinómu

Mgr. Natália Udvorková
(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, Bratislava, [2] Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, [3]Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Bratislava, [4]II. onkologická klinika LF UK a NOÚ, Bratislava

Úvod

Choriokarcinóm je vysoko agresívna forma neseminómových testikulárnych germinatívnych nádorov (TGCT *z angl. Testicular germ cell tumor*), ktorá sa vyznačuje rýchlym rastom, skorou hematogénnou diseminániou a vysokým metastatickým potenciálom. Hoci ide o zriedkavé ochorenie, jeho biologické správanie ho radí medzi najinvazívnejšie nádory semenníkov. Typicky postihuje mladých mužov v neskorom tínedžerskom veku a v rannom dospelom období, pričom sa často diagnostikuje až v pokročilých štádiách. Metastázy najčastejšie postihujú pľúca, čo môže viesť k hemoptýze, dyspnoe a akútnemu respiračnému zlyhaniu (ARDS *z angl. Acute respiratory distress syndrome*). Okrem pľúc môžu byť postihnuté aj ďalšie orgány, ako pečeň a mozog, čím sa prognóza pacienta ešte viac zhoršuje (Raos *et al.*, 2020, Cuevas-Estrada *et al.*, 2023)

Štandardná liečba metastatického choriokarcinómu je založená na kombinovanej chemoterapii s cisplatinou, pričom najčastejšie sa používa režim BEP (bleomycín, etopozid, cisplatina) alebo intenzifikovaný režim VIP (etopozid, ifosfamid, cisplatina) u pacientov s vysokorizikovým ochorením. Hoci agresívna chemoterapia vedie k vyliečeniu väčšiny pacientov, jej účinnosť môže byť obmedzená rozvojom chemorezistencie a život ohrozujúcimi komplikáciami. Medzi najzávažnejšie patrí choriokarcinómový syndróm, ktorý vzniká v dôsledku rýchlej lýzy pľúcnych metastáz, sprevádzaný uvoľnením vysokých hladín zápalových cytokínov, čo môže vyústiť do ARDS. Ďalšími komplikáciami sú syndróm nádorového rozpadu (TLS), vedúci k závažným metabolickým a elektrolytovým poruchám, ako aj bleomycínom indukovaná pľúcna toxicita, ktorá môže viesť k ireverzibilnej pľúcnej fibróze. Tieto faktory významne ovplyvňujú prognózu pacientov a limitujú možnosti súčasnej liečby (Rejlekova *et al.*, 2019, Al-Khayal *et al.*, 2023, Herr *et al.*, 2024).

Vzhľadom na tieto výzvy je potrebné hľadať nové terapeutické prístupy, ktoré by zlepšili liečebné výsledky a zároveň minimalizovali toxicitu. Jednou z najsľubnejších stratégií sú konjugáty protilátok s cytotoxickými látkami (ADCs – *z angl. Antibody – drug conjugates*). ADC kombinujú špecificitu monoklonálnej protilátky, ktorá cieli na nádorový antigén, s účinnosťou silnej cytotoxickej zložky, čím umožňujú selektívne ničenie nádorových buniek pri súčasnej redukcii systémovej toxicity. Táto technológia sa ukázala ako účinná v liečbe viacerých typov

nádorov a predstavuje sľubnú možnosť aj pre pacientov s agresívnymi formami TGCT (Tsuchikama *et al.*, 2024, Udvorková *et al.*, 2024).

V rámci našich experimentálnych štúdií sme identifikovali Sacituzumab govitekan (ADC-SG) ako potenciálne účinný ADC pri liečbe testikulárneho choriokarcinómu. ADC-SG je konjugát monoklonálnej protilátky namierenej proti transmembránovému antigénu Trop-2 (*z angl. Trophoblast cell surface antigen 2*) s inhibítorom topoizomerázy I (SN-38), ktorý už preukázal významnú protinádorovú aktivitu v iných malignitách. Naše výsledky naznačujú, že ADC-SG by mohol predstavovať nový terapeutický prístup pre pacientov s metastatickým choriokarcinómom, najmä v prípadoch, kde konvenčná chemoterapia zlyháva alebo vedie k závažným komplikáciám.

Materiál a metódy

Bunkové línie

Táto štúdia využila široké spektrum etablovaných ľudských bunkových línií a ich izogénnych variantov rezistentných na cisplatinu (CPT), ktoré sú reprezentatívne pre všetky histologické podtypy GCT *(z angl. Germ cell tumor).* Rezistentné varianty (CisR) týchto bunkových línii boli derivované priamo v našom laboratóriu (postupným zvyšovaním selekčného tlaku cisplatiny) alebo získané darom z laboratórii uvedených v Tabuľke 1. Uvedené bunkové línie boli kultivované v príslušnom kultivačnom médiu s pridaním: 1× GlutaMAX™ (GIBCO™, Life Technologies Corp., Grand Island, NY, USA), and 1× Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich, Merck). Bunky boli udržiavané v 2D aj v 3D kultivačních podmienkach (vo forme multicelulárnych sféroidov) v inkubátore pri 37 °C s 5 % CO_2.

Bunková línia Hs1.Tes (CRL-7002™), odvodená z fibroblastov zdravého testikulárneho tkaniva, bola kultivovaná v DMEM s vysokým obsahom glukózy (4,5 g/L) (Sigma-Aldrich) doplnenom o 10 % FBS (GIBCO™, Life Technologies Corp., NY, USA) a 1× antibioticko-antimykotický roztok (Sigma-Aldrich) a slúžila ako kontrola na hodnotenie toxicity testovaných liečiv na zdravé bunky.

qRT-PCR

RNA bola zo vzoriek vyizolovaná 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 sa postupovalo podľa priloženého manuálu výrobcu. Kvalita a čistota vyizolovanej 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 expresie sledovaných génov bolo vyhodnotené s použitím $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metódy, pričom expresia génu *GADPH* (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).

Histologický typ	*Bunková línia*	*Pôvod*	*Rezistencia*	*CPT IC50*	*Médium*
Embryonálny karcinóm	**TERA – 1**	získané darom od prof. Looijenga, Princess Máxima Centrum pre Pediatrickú onkológiu; Holandsko	áno (inherently resistant)	5µM	McCoy
	TERA – 2 (CZ)	získané darom od Dr. Boublikova;Odd. hematológie a detskej onkológie; 2. LF UK, Česká republika	nie	2,2 µM	DMEM
	TERA – 2 R (CZ)	odvodené v našom laboratóriu	áno	2 µM	DMEM
	NTERA – 2	ATCC®CRL 1973™	nie	0.033µM	DMEM
	NTERA –2 CisR	odvodené v našom laboratóriu	áno	1µM	DMEM
	NT – 2 R (DE)	získané darom od prof. Looijenga, Princess Máxima Centrum pre Pediatrickú onkológiu; Holandsko	áno	3,24 µM	DMEM
	NCCIT	ATCC®CRL 2073™	nie	0,8µM	RPMI
	NCCIT CisR (SK)	odvodené v našom laboratóriu	áno	8,25µM (subklon D)	RPMI
	NCCIT (NL)	RRID:CVCL_1451;získané darom od prof. Looijenga, Princess Máxima Centrum pre Pediatrickú onkológiu; Holandsko	nie	5,24 µM	RPMI
	NCCIT CisR (NL)	získané darom od prof. Looijenga, Princess Máxima Centrum pre Pediatrickú onkológiu; Holandsko	áno	16,11 µM	RPMI
	NCCIT (CZ)	získané darom od Dr. Boublikova;Odd. hematológie a detskej onkológie; 2. LF UK, Česká republika	nie	3,2µM	RPMI
	NCCIT CisR (CZ)	získané darom od Dr. Boublikova;Odd. hematológie a detskej onkológie; 2. LF UK, Česká republika	áno	24,75µM	RPMI
	2102Ep (NL)	RRID:CVCL_C522; získané darom od prof. Looijenga, Princess Máxima Centrum pre Pediatrickú onkológiu; Holandsko	nie	2,62 µM	DMEM
	2102Ep CisR (NL)	RRID:CVCL_C522;získané darom od prof. Looijenga, Princess Máxima Centrum pre Pediatrickú onkológiu; Holandsko	áno	13,36 µM	DMEM
	NEC8	NEC8 (RCB0489); získané darom od Riken, Tsukuba, Japonsko	nie	1,5 µM	RPMI
	NEC8 CisR (SK)	odvodené v našom laboratóriu	áno	11 µM	RPMI
Choriokarcinóm	**JAR**	ATCC® HTB-144™	nie	0,1 µM	RPMI
	JAR CisR (SK)	odvodené v našom laboratóriu	áno	2,8µM (subclone C)	RPMI
	JEG – 3	ATCC® HTB36™	nie	1 µM	DMEM
	JEG – 3 CisR (SK)	derived in our laboratory	áno	4 µM (subclone A)	DMEM
Seminóm	**TCam-2**	získané darom od Dr. Kitazawa; Ehime Univerzitná nemocnica, Shitsukawa, Japonsko	nie	1,5 µM	RPMI
	TCam-2 CisR (SK)	odvodené v našom laboratóriu	áno	4,5 µM	RPMI
Nádor žĺtkového vaku	**NOY – 1**	cat. no. ENG101, FA; Kerafast	nie	1,1 µM	RPMI
	NOY – 1 CisR (SK)	odvodené v našom laboratóriu	áno	7,8 µM	RPMI
Testikulárny nádor žĺtkového vaku	**NCR – G1**	RCB0489, Riken, Tsukuba, Japonsko	nie	0,1 µM	advDMEM/F12
	NCR – G1 CisR (SK)	odvodené v našom laboratóriu	áno	v procese	advDMEM/F12
Teratóm/Teratokarcinóm	**SuSa**	SUSA ACC 747, DSMZ	nie	0,7 µM	RPMI
	577MF	ECAC (CVCL_2290)	áno	v procese	DMEM

Tabuľka 1: Panel bunkových línii GCT použitých v tejto štúdii. Ich pôvod, kultivačné médium a hodnota IC50 pre cisplatinu.

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 z každej testovanej bunkovej línie. 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 ADC-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 nasadané v množstve $1x10^5$/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 ADC-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 IC_{50} sme vyhodnotili pomocou Graphad Prism® (Boston, MA, USA).

Rovnakým spôsobom bol hodnotený možný toxický účinok Irinotekanu, Cisplatiny a ADC-SG na zdravé testikulárne fibroblasty Hs1.Tes (CRL-7002) a tiež stanovenie IC_{50} pre Irinotekan vo vybraných bunkových líniiach GCTs.

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 koncentráciami liečiva ADC-SG, (Selleckchemm). Po 4 dňoch bola relatívna viabilita 3D mnohobunkových sféroidov otestovaná pomocou testu CellTiter-Glo™ 3D Cell Viability Assay (Promega Corporation) a výsledky boli vyhodnotené pomocou Graphad Prism® (Graphpad Inc., La Jolla, CA, USA).

Kinetické meranie bunkovej proliferácie

Pred analýzou boli pripravené fluorescenčne značené bunky podľa publikácie (Kucerova *et al.*, 2025), ktoré sa nasadili na 96-jamkové platničky v 3D kultivácii (ako bolo uvedené vyššie) a po 72h boli ošetrené s ADC-SG (SeleckChem) v koncentrácii 0 – 3125nM. Snímky fázového kontrastu a fluorescencie sa získavali každé 2–3 h od ošetrenia pomocou kinetického zobrazovacieho systému IncuCyte® ZOOM a na každú jamku sa urobili dve snímky. Údaje sa analyzovali pomocou softvéru IncuCyte®ZOOM verzie 2016A. V podmienkach 3D kultivácie boli snímky zhotovené s objektívom so zväčšením 4x. Proliferácia bola vyjadrená ako priemerná hodnota bunkovej konfluencie v % ± SD celkovej intenzity integrovanej fluorescencie objektu (RCUxum2/obrazok).

In vivo experimenty

V súlade s inštitucionálnymi smernicami a schválenými protokolmi (Inštitucionálna etická komisia a Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, registračné číslo Ro-

5862-3/2023-220), v súlade so smernicou 2010/63/EÚ a nariadením 377/2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely, boli použité 6 až 8 – týždňové myši NSG® (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1wjl/SzJ/ *). Bunková línia JEG3 CisR bola vybraná na základe predošlých *in vitro* výsledkov, a podaná suspenzia obsahovala $1x10^6$ buniek v 100 µl zmesi: extracelulárnej matrix (ECM Gel - Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma liquid, BioRea, Lamballe – France) 1:1 (50 µl média DMEM bez séra, 50 µl ECM). Bunková suspenzia bola podaná bilaterálne subkutánne (*s.c*) každej zo skupiny 8 NSG myší. Na 7. deň, po dosiahnutí hmatateľných nádorov 1x1 mm u všetkých zvierat, bol 4 myšiam podaný intravenózne (*i.v*) liek Trodelvy® (ADC-SG 200mg; prášok na koncentrát na infúzny roztok; registračné číslo: EU/1/21/1592/001) v množstve 17,5mg/kg. Zvieratám bolo podaných maximálne 8 dávok s frekvenciou dvakrát týždenne (Cardillo *et al.*, 2015). Nádory boli zmerané posuvným meradlom a objem vypočítaný podľa vzorca pre objem elipsoidu: objem = 0,52 × ((šírka + dĺžka)/2)^3. Zvieratá boli humánne utratené, keď nádory presiahli objem 1 cm^3, v prípade zhoršeného zdravotného stavu skôr. Metastatický model *in vivo* bol vytvorený intravenózním podaním nádorových buniek NLR JEG3 CisR NSG myšiam (2×10^5 buniek v 200 µl PBS/myš). Experiment zahŕňal 12 myší, ktoré boli rozdelené do dvoch skupín: n=7 neliečených kontrol a n=5 zvierat liečených ADC-SG. Vzhľadom na vyššiu agresivitu tohto modelu bolo liečenie ADC-SG zahájené na 5. deň po injekcii nádorových buniek. Liečebný a dávkovací režim boli rovnaké ako je uvedené vyššie. Výsledky boli vyhodnotené v programe Graphad Prism® (Graphpad Inc., La Jolla, CA, USA).

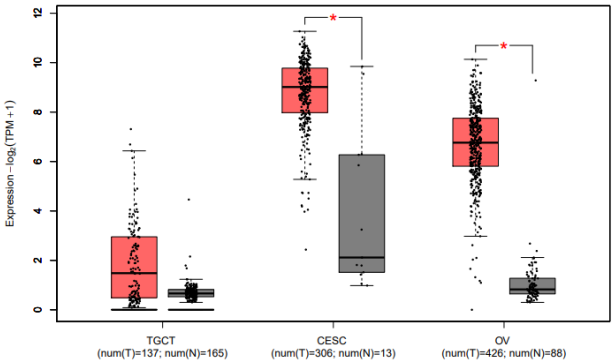
Štatistická analýza

Na štatistickú analýzu údajov z *in vitro* experimentov na testovanie rozdielov medzi dvoma skupinami v jednotlivých časových bodoch sa použil Studentov t-test. Log-rank test (Mantel-Cox) sa použil na porovnanie dvoch alebo viacerých kriviek prežitia v experimentoch *in vivo*, v závislosti od normality údajov, pomocou softvéru GraphPad Prism® (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

Výsledky

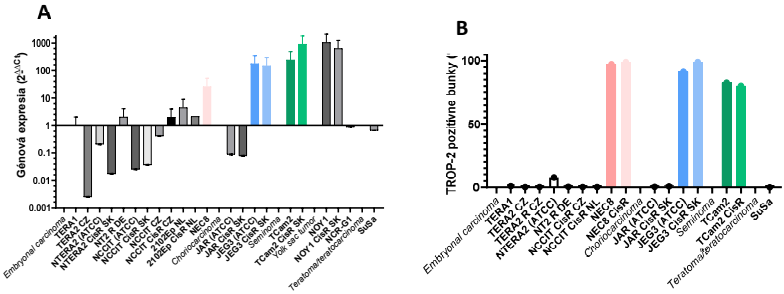
Analýza génovej expresie TACSTD2 a TROP-2 proteínu v TGCT CisR bunkových líniách

TROP-2 je transmembránový glykoproteín kódovaný génom *TACSTD2*. Na základe dostupných údajov z výskumnej databázy GEPIA2 (i1) sme zistili, že gén *TACSTD2* je výrazne vyšší v TGCT v porovnaní so zdravým tkanivom semenníkov a je vyšší aj pri nádoroch vaječníkov (OV) a cervikálnom skvamocelulárnom karcinóme a endocervikálnom adenokarcinóme (CESC) (Obrázok 2). Expresia *TACSTD2* v bunkových líniách TGCT bola detegovaná iba v SuSa (TtC), nie sú dostupné žiadne údaje o expresii *TACSTD2* v iných histologických podtypoch TGCT.



Obrázok 1: Expresia génu TACSTD2 v TGCT. Gén TACSTD2 je významne upregulovaný v TGCT (červená) v porovnaní so zdravým tkanivom semenníkov (sivá), ako aj v iných typoch nádorov, ako je cervikálny spinocelulárny karcinóm a endocervikálny (CESC) a rakovina vaječníkov (OV) (údaje dostupné v databáze GEPIA2) (Tang et al., 2017).

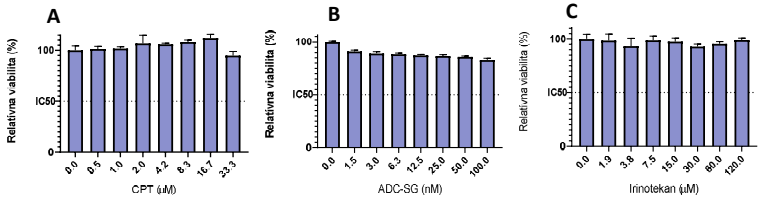
V našej práci bola analyzovaná expresia génu *TACSTD2* na úrovni mRNA (obrázok 2A) a expresia proteínu TROP-2 (obrázok 2B) v paneli všetkých uvedených histologických podtypov TGCT. Výsledky demonštrujú zvýšené hladiny génu *TACSTD2* v bunkových líniách niekoľkých histologických podtypov TGCT a ich cisplatina – rezistentných (CisR) variantoch: 2102Ep NL (EC), JEG3 (ATCC) (ChC)/JEG3 CisR SK (ChC), TCam2 (SE)/TCam2 CisR SK (SE), NOY1 (YST)/NOY1 CisR SK, NEC8/NEC8 CisR SK. Analýza prietokovou cytometriou preukázala zvýšené hladiny markera TROP-2 v NEC8 (EC), JEG3 (ChC), TCam2 (SE) a ich variantoch CisR (obrázok 2B). Medzi bunkovými líniami citlivými na CPT a rezistentnými na CPT sa nezistili žiadne významné zmeny. Nižšie hladiny expresie *TACSTD2*/TROP-2 boli pozorované najmä v EC bunkových líniách (TERA1, TERA2 CZ, NTERA2 (ATCC), NT2 R DE, NTERA2 CisR SK, NCCIT CisR CZ, NCCIT CisR NL, 2102Ep NL, 2102Ep CisR NL).



Obrázok 2: Analýza hladín expresie génu TACSTD2 a proteínu TROP-2 v bunkových líniách TGCT. Hladiny génovej expresie TACSTD2 sa hodnotili pomocou metódy 2−ΔΔCt, pričom ako referenčná bola použitá génová expresia GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). (A) Zvýšená regulácia TACSTD2 v TGCT bunkových líniách NEC8, JEG3 (ATCC)/JEG3 CisR SK (ChC), TCam2/TCam2 CisR SK (SE) korelovala so zvýšenou expresiou TROP-2. (B) Nízka alebo žiadna expresia TROP-2 bola pozorovaná v histologických podtypoch buniek TGCTs EC, ChC (JAR) a Ttc (SuSa) a ich CisR variantoch.

Overenie možného toxického účinku použitých liekov na zdravé bunky

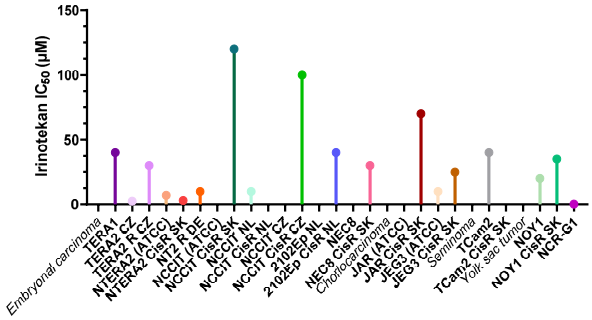
Na overenie toxicity liekov na zdravé, nenádorové bunky, sa ako kontrola použili testikulárne fibroblasty Hs1.Tes (CRL-7002) izolované zo zdravého bieleho mužského testikulárneho tkaniva. Zvyšujúce sa koncentrácie CPT, ADC-SG alebo Irinotekanu neboli cytotoxické pre zdravé fibroblasty a nenastala žiadna významná zmena v životaschopnosti Hs1.Tes.



Obrázok 3: Toxicita CPT, ADC-SG a Irinotekanu v zdravom tkanive semenníkov. (A) Relatívna životaschopnosť (%) Hs1.Tes (CRL-7002) ovplyvnená CPT (koncentrácia: 0,5-33,3 uM). (B) Relatívna životaschopnosť (%) Hs1.Tes (CRL-7002) ovplyvnená ADC-SG (koncentrácia 1,5-100 nM). (C) Relatívna životaschopnosť (%) Hs1.Tes (CRL-7002) ovplyvnená Irinotekanom (koncentrácia 1,9-120 µM). Po 72 hodinách sa určili zmeny v inhibícii rastu s použitím luminiscenčnej súpravy na stanovenie životaschopnosti buniek a nezaznamenali sa žiadne významné zmeny. Hodnoty boli stanovené ako relatívna životaschopnosť (%) (priemer z troch opakovaní) ± SD z aspoň dvoch nezávislých experimentov.

Citlivosť (T)GCT bunkových línií na irinotekan

Hodnotil sa aj cytotoxický účinok Irinotekanu. Výsledky naznačujú, že Irinotekan, ktorý vyžaduje metabolizmus v pečeni, aby sa premenil na svoj aktívny metabolit SN-38, nevykazuje významné terapeutické účinky na testované TGCTs, keď sa podáva ako samostatná látka. Na dosiahnutie cytotoxicity sú potrebné vysoké koncentrácie Irinotekanu. Na rozdiel od toho, keď sa SN-38 podáva ako súčasť ADC-SG, terapeutický účinok sa výrazne zvýši. Zatiaľ čo ADC-SG bol účinný pri nanomolárnych koncentráciách, samotný Irinotekan vyžadoval mikromolárne koncentrácie na dosiahnutie porovnateľného účinku – čo predstavuje 1000-násobné zvýšenie koncentrácie (obrázok 4).

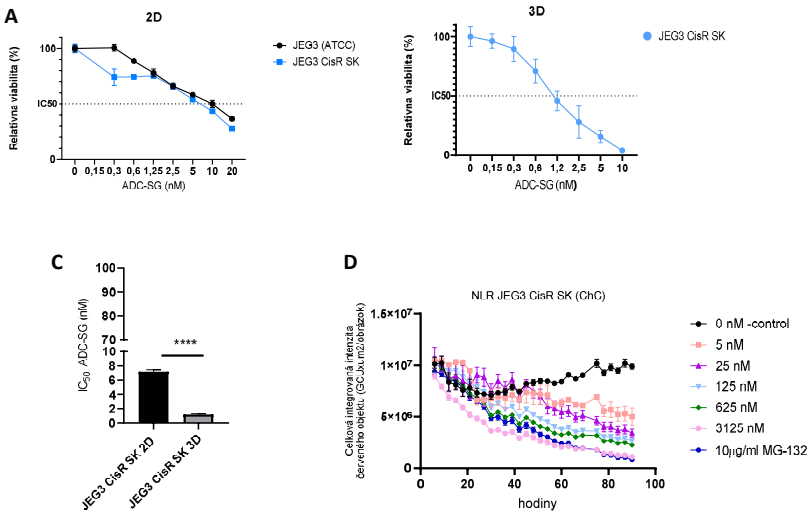


Obrázok 4: Irinotekan, cytotoxický liek ADC-SG, je menej účinný samostatne v porovnaní s celým konjugátom. Bunkové línie, ktoré vykazovali nižšiu citlivosť na ADC-SG, tiež vykazovali nižšiu citlivosť na Irinotekan (NCCIT CisR CZ (EC), NCCIT CisR SK (EC), JAR CisR SK (ChC), NOY1 CisR SK (YST)). Avšak koncentrácie Irinotekanu potrebné na dosiahnutie IC50 boli niekoľkonásobne vyššie, čo môže viesť k zvýšenej toxicite a nepriaznivým vedľajším účinkom. Po 72 hodinách sa určili zmeny v inhibícii rastu použitím luminiscenčnej súpravy na stanovenie životaschopnosti buniek. Hodnoty boli stanovené ako relatívna životaschopnosť (%) (priemer z troch opakovaní) ± SD z aspoň troch nezávislých experimentov.

Významný cytotoxický efekt ADC-SG v bunkovej línii JEG3 CisR (ChC)

Po potvrdení zvýšenej expresie *TACSTD2*/TROP-2 v JEG3 (ATCC)/ JEG3 CisR SK ChC bol ďalej overený cytotoxický účinok ADC-SG v 2D CPT- senzitívnych aj CisR variantoch JEG3 (Obrázok 5A) a tiež v 3D kultivačnom prostredí CisR variante (Obrázok 5B). Pri kultivácii buniek vo forme multicelulárnych sféroidov bol zistený výraznejší účinok ADC-SG (Obrázok 5C). Antiproliferatívny účinok ADC-SG v 3D bol tiež sledovaný pomocou fluorescenčne značených NLR JEG CisR pomocou Incucyte® Live -Cell Analysis System IncuCyte® ZOOM (Essen BioScience Ltd., Welwyn Garden City, UK) (Obrázok 5D).

B

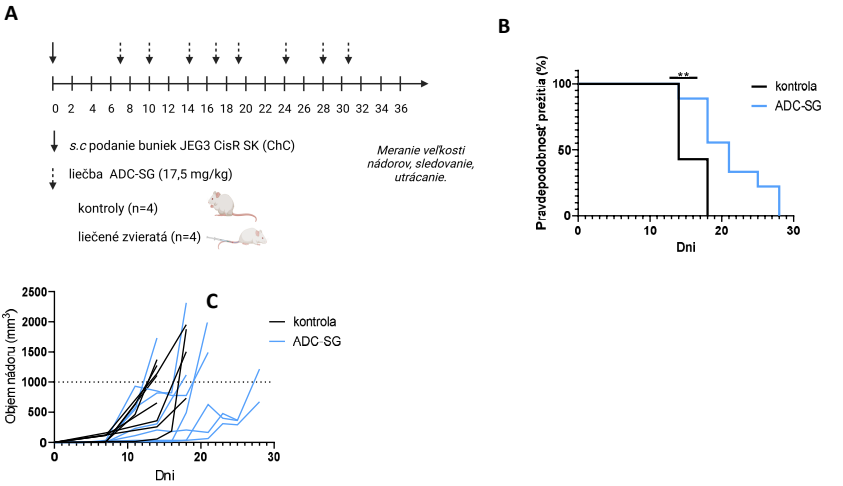


*Obrázok 5: Porovnanie citlivosti 2D kultúr oproti 3D mnohobunkovým sféroidom po ošetrení ADC-SG. (A) Cytotoxický účinok ADC-SG na bunkové línie JEG3/JEG3 CisR SK (ChC) v 2D kultivačnom prostredí. (B) Cytotoxický účinok ADC-SG na bunkovú líniu JEG3 CisR SK (ChC) v 3D kultivačnom prostredí. (C) Signifikantný vyšší cytotoxický účinok ADC-SG v 3D kultivácii buniek JEG3 CisR SK (ChC). Bunkové línie vykazovali významne zvýšenú citlivosť (****p < 0,0001) po ošetrení ADC-SG v 3D mnohobunkových sféroidných modeloch v porovnaní s 2D kultiváciou. Účinnosť ADC-SG sa hodnotila pomocou luminiscenčného testu životaschopnosti, ktorý sa uskutočnil na 3. deň pre 2D kultúry a na 4. deň pre 3D sféroidy. Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SD z aspoň troch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť bola stanovená pomocou nepárového Studentovho t-testu s prahmi významnosti nastavenými na *p < 0,05, **p < 0,01 a ***p < 0,001, ****p < 0,0001. (D) Antiproliferatívny účinok ADC-SG v 3D mnohobunkových sféroidných kultúrach NLR JEG3 CisR. TGCT boli ošetrené ADC-SG a kinetické zmeny boli monitorované pomocou Incucyte® Live-Cell Analysis System IncuCyte®ZOOM (Essen BioScience Ltd., Welwyn Garden City, UK). MG-132 sa použil ako kontrola na úplné usmrtenie buniek. Hodnoty sa určili ako celková integrovaná intenzita červeného objektu (GCUxum2/obrazok) (priemer z troch/štvornásobkov) ± SD.*

Protinádorový účinok ADC-SG in vivo

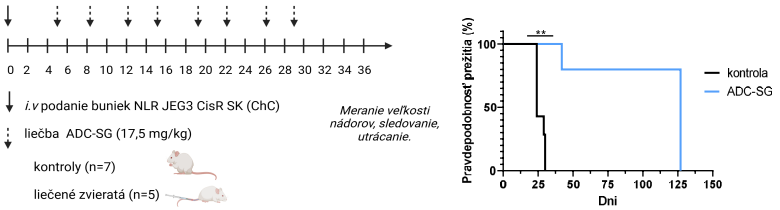
V ďalšej fáze sa skúmala tumorigenicita buniek JEG3 CisR SK (ChC). Na vyhodnotenie účinku ADC-SG boli nádorové bunky injikované *s.c.* a boli vytvorené xenoimplantáty nádorových buniek JEG3 CisR SK (ChC). Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín: neošetrené kontrolné zvieratá (n=4) a zvieratá ošetrené ADC-SG (n=4). V každej skupine sa medzi dňami 4 - 7 po injekcii buniek vyvinulo 8 hmatateľných nádorov. Liečba sa začala 7. deň po inokulácii a prebiehala 2-krát týždenne (celkovo 8 dávok) (Obrázok 6A). Zvieratá liečené ADC-SG vykazovali významne dlhšie

prežívanie v porovnaní s neliečenou skupinou ($p < 0,01$) (Obrázok 6B) a dosiahli prah veľkosti nádoru 1 cm^3 neskôr, v porovnaní s neliečenou skupinou (Obrázok 6C).



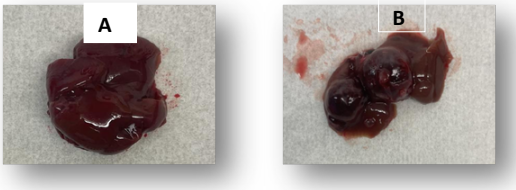
*Obrázok 6: Protinádorový účinok ADC-SG in vivo xenograftoch JEG3 CisR SK (ChC). (A) Grafická vizualizácia experimentálneho nastavenia (i4)(vytvorené pomocou https://BioRender.com). (B) Zvýšená pravdepodobnosť prežitia (%) u zvierat liečených ADC-SG v porovnaní s neliečenými kontrolami. Signifikantne dlhšie prežívanie v porovnaní s neliečenou skupinou (p=0,0097; **p<0,01). (C) ADC-SG inhiboval rast nádoru in vivo v JEG3 CisR SK (ChC) v porovnaní s neošetrenými kontrolami. Štatistická významnosť bola stanovená pomocou nepárového Studentovho t-testu a Long-rank (Mantel-Cox) testu v GraphPad Prism® (Boston, MA, USA), s prahmi významnosti nastavenými na *p < 0,05, **p < 0,01 a ***p < 0,001, **** p < 0,0001, nevýznamné > 501).*

Ďalej bol vytvorený model metastatického ochorenia intravenóznou injekciou bunkovej línie NLR JEG3 CisR SK (ChC). Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín: kontrolná skupina (n=7) a skupina liečená ADC-SG (n=5). Liečba ADC-SG sa začala 5. deň po injekcii nádorových buniek. Neliečené zvieratá uhynuli do jedného mesiaca, zatiaľ čo u 4 z 5 liečených zvierat nedošlo k zhoršeniu zdravotného stavu a boli utratené v dôsledku ukončenia experimentu po viac ako štvornásobnom čase v porovnaní s neliečenými kontrolami ($p < 0,01$) (obrázok 7B).



*Obrázok 7: Protinádorový účinok ADC-SG v metastatickom in vivo modeli. (A) Grafická vizualizácia experimentu metastatického in vivo modelu NLR JEG3 CisR SK (ChC) (i2- vytvorené pomocou https://BioRender.com). (B) Významne zvýšené prežívanie liečených zvierat (p = 0,001; p < 0,01) v modeli metastatického ochorenia po podaní buniek NLR JEG3 CisR v porovnaní s neliečenými kontrolami. Štatistická významnosť bola stanovená pomocou Long-rank (Mantel-Cox) testu v GraphPad Prism® (Boston, MA, USA), s prahmi významnosti nastavenými na * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.*

Fluorescenčne značené bunky NLR JEG3 CisR boli detegované v odobratých pľúchach aj v pečeni kontrolných zvierat (použitím Incucyte® Live-Cell Analysis System IncuCyte®ZOOM (Essen BioScience Ltd., Welwyn Garden City). Neliečené zvieratá mali viditeľne zväčšenú pečeň s prítomnými metastázami pričom pečeň liečených zvierat mala nie len nižšiu hmotnosť ale neboli viditeľné žiadne patologické zmeny (Obrázok 8).



Obrázok 8: Zmeny v pečeni zvierat odobratých z in vivo modelov po i.v inokulácii NLR JEG3 CisR SK (ChC). (A) Pečeň odobratá z neliečeného zvieraťa (kontrola) – žiadne viditeľné metastázy. Hmotnosť pečene: 2, 169 g. (B) Pečeň odobratá z liečeného zvieraťa (ADC-SG) – s viditeľnými metastázami. Hmotnosť pečene: 1,753 g.

Diskusia

TGCT sa v populácii síce nevyskytujú často, no predstavujú najrozšírenejšiu malignitu u mužov vo veku 15–44 rokov. Tento typ ochorenia vo všeobecnosti veľmi dobre reaguje na štandardnú chemoterapiu na báze platiny, pričom miera vyliečenia presahuje 95 %. Dokonca aj v pokročilých metastatických štádiách dosahuje úspešnosť liečby viac ako 80 %. Napriek tomu incidencia TGCT v populácii stále narastá a jednou z hlavných prekážok liečby je chemorezistencia. Okrem toho, pri histologicky najagresívnejšom podtype TGCT –

choriokarcinóme – je liečba komplikovaná aj vývojom choriokarcinómového syndrómu, ktorý vedie k zlyhaniu terapie a výraznému zhoršeniu prognózy pacienta (Lobo *et al.*, 2020, Rottenberg *et al.*, 2021, McHugh *et al.*, 2024).

V našom laboratóriu sme v rámci predklinických testovaní skúmali viaceré potenciálne terapeutické prístupy s cieľom zlepšiť liečebné výsledky u pacientov s TGCT, ktorí nereagujú na konvenčnú chemoterapiu (Schmidtova *et al.*, 2018, Schmidtova *et al.*, 2019, Schmidtova *et al.*, 2020, Országhová *et al.*, 2022, Schmidtova *et al.*, 2022, Kucerova *et al.*, 2025).

Najnovšie výskumy poukazujú na vysokú účinnosť ADCs v rôznych typoch nádorov, pričom viaceré ADC vykazujú lepšie výsledky než štandardne používané chemoterapeutiká (Udvorková *et al.*, 2024). Dodnes bolo schválených niekoľko ADC, ktoré by mohli byť účinné aj pri liečbe TGCT, nakoľko boli identifikované potenciálne cieľové molekuly vhodné na takýto typ terapie. Medzi nimi sa CLDN6 javí ako sľubný terapeutický cieľ, keďže bol detegovaný GCT. ADC TORL-1-23, zamerané na CLDN6, preukázalo cytotoxickú aktivitu u pacientov s refraktérnymi nádormi v klinickej štúdii fázy I (NCT05103683) (Konecny *et al.*, 2023) (i3). Okrem toho CLDN6-ADC terapia indukovala apoptózu v CisR TGCT bunkách (Skowron *et al.*, 2023). V našom laboratóriu sme potvrdili priaznivý *in vitro* terapeutický efekt ADC Mirvetuximab soravtansine (MIRV) pri chemorezistentných TGCT. Zároveň sme preukázali nadmernú expresiu folátového receptora 1 (FOLR1) nielen v CisR bunkových líniách, ale aj v tkanivových mikroblokoch (TMA *z angl. Tissue microarrays*) odvodených od xenotransplantovaných nádorov a pacientskych vzoriek. Výrazne vyššie hladiny FOLR1 boli pozorované u pacientov s TGCT, ktorí neodpovedali na chemoterapiu a mali životaschopné nádory aj po liečbe (Kucerova *et al.*, 2025).

V tejto štúdii sme sa zamerali na potenciálny účinok ADC-SG, ktorý bol schválený FDA na liečbu metastatického triple – negatívneho karcinómu prsníka (od roku 2020) a metastatického HER2-negatívneho, HR-pozitívneho karcinómu prsníka (od roku 2023) (Wahby *et al.*, 2021, Kang, 2024).

Detegovali sme expresiu TROP-2, transmembránového kalciového signálneho transduktora, v cisplatin-senzitívnych aj CPT rezistentných variantoch TGCT bunkových línií. TROP-2 je minimálne exprimovaný v zdravých tkanivách, avšak jeho nadmerná expresia bola preukázaná v rôznych solídnych nádoroch (Lenárt *et al.*, 2020, Tolaney *et al.*, 2025). Podľa dostupných databáz je expresia génu *TACSTD2*, ktorý kóduje TROP-2, zvýšená v nádorových vzorkách pacientov s TGCT v porovnaní so zdravými semenníkovými tkanivami (TCGA vs. GTEx) (Obrázok 1A). Avšak údaje o expresii *TACSTD2* v TGCT sú obmedzené iba na bunkovú líniu SUSA (TtC), pričom informácie o jeho expresii v iných podtypoch TGCT nie sú známe (i2). V tejto štúdii sme potvrdili nadmernú expresiu *TACSTD2* a proteínu TROP-2 v rôznych histologických podtypoch TGCT bunkových línií, vrátane agresívnej bunkovej línie choriokarcinómu JEG3 v CPT-senzitívnom aj CisR variante. Choriokarcinóm je najagresívnejší a najrýchlejšie metastázujúci podtyp TGCT. Ako súčasť zmiešaných nádorov postihuje najmä mladých pacientov a jeho prognóza je nepriaznivá (Al-Khayal *et al.*, 2023). Čistý choriokarcinóm často vedie k rozvoju choriokarcinómového syndrómu, ktorý je spôsobený lýzou nádorových buniek po podaní chemoterapie, najmä v pľúcnych metastázach. Tento proces vedie k masívnemu uvoľneniu zápalových cytokínov, ako sú IL-6, TNF-α a IL-1β, čo spôsobuje systémový zápal, akútne respiračné zlyhanie a multiorgánové zlyhanie. Efektívne terapeutické možnosti na zníženie mortality pacientov s choriokarcinómovým syndrómom sú dodnes veľmi obmedzené (Rejlekova *et al.*, 2019, Rejlekova *et al.*, 2022, Herr *et al.*, 2024).

Cytotoxický účinok ADC-SG v nízkych koncentráciách sme potvrdili v 2D kultúrach JEG3 CisR. Na presnejšiu simuláciu nádorového mikroprostredia sme bunkové línie TGCT kultivovali v 3D multicelulárnych sferoidoch. V 3D kultivačnom prostredí JEG3 CisR sme pozorovali zosilnený cytotoxický efekt ADC-SG a potrebu nižšách dávok na dosiahnutie IC_{50} v porovnaní s 2D kultivačnými podmienkami. ADC-SG obsahuje CL2A linker, ktorého štiepenie a následné uvoľnenie cytotoxického SN-38 je závislé od kyslého prostredia (pH < 5) prítomného v lyzozómoch a endozómoch (Staudacher a Brown, 2017). Nádorové bunky prechádzajú metabolickými zmenami, ktoré vedú k vzniku hypoxických oblastí s nízkym pH, čím vytvárajú výhodné podmienky pre svoj rast a prežívanie (Takáčová a Pastoreková, 2015, Yuan *et al.*, 2024). Namekawa a kol. preukázali vysokú expresiu HIF-1α v 3D multicelulárnych sferoidách TGCT odvodených z chirurgických vzoriek (Namekawa *et al.*, 2020). Takéto prostredie by mohlo podporovať štiepenie acidolabilného CL2A linkeru a tým zvýšiť uvoľňovanie SN-38, čím by sa mohol zosilniť cytotoxický účinok ADC-SG v 3D kultúrach. Tieto výsledky naznačovali sľubný *in vivo* efekt, ktorý sme následne potvrdili v dvoch nezávislých modeloch – subkutánnych xenograftoch a v metastatickom modeli. Zároveň sme dokázali, že ADC-SG nepôsobí toxicky na zdravé ľudské testikulárne fibroblasty, a tiež fakt, že liečivo SN-38 je niekoľko násobne účinnejšie ak je súčasťou celého ADC a nie je podávané samostatne (Irinotekan).

Výsledky nášho výskumu poukazujú na vysoký terapeutický potenciál ADC-SG v liečbe testikulárneho choriokarcinómu, najagresívnejšej formy TGCT. Potvrdili sme nielen jeho cytotoxický účinok na chemorezistentné bunkové línie, ale aj jeho zvýšenú efektivitu v podmienkach, ktoré verne mimikujú nádorové miprostredie. Vzhľadom na obmedzené možnosti súčasnej terapie a vysokú mortalitu pacientov s choriokarcinómovým syndrómom môže byť zavedenie ADC-SG do klinickej praxe významným krokom k zlepšeniu liečby a prognózy pacientov. Naše zistenia otvárajú nové možnosti pre ďalší výskum a vývoj cielených terapeutických prístupov v onkológii.

Tento výskum bol podporený Slovenskou agentúrou pre výskum a vývoj—č. APVV-20-0158 (M. Mego); Vednou grantovou agentúrou ministerstva školstva a vedy Slovenskej republiky—č. VEGA 2/0124/21 (S. Jochová/L. Kučerová), 2/0059/25 (L. Kučerová) a 1/0013/25 (Z. Čierna); a Nadáciou pre výskum rakoviny a Ligou proti rakovine, Slovensko.

Zoznam použitej literatúry

1. AL-KHAYAL, A., NOURELDIN, Y., ALGHAFEES, M., SHAFQAT, A., SABBAH, B. N., ELHOSSINY, A. H., BAKIR, M., OMAR, M. A., ARABI, T. Z., RAB, S. A. A decade in focus: mixed germ cell tumors with choriocarcinoma components. *Annals of Medicine and Surgery* 2023, 85(11), 5355-5358.
2. CARDILLO, T. M., GOVINDAN, S. V., SHARKEY, R. M., TRISAL, P., ARROJO, R., LIU, D., ROSSI, E. A., CHANG, C. H., GOLDENBERG, D. M. Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers. *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26(5), 919-931.
3. CUEVAS-ESTRADA, B., MONTALVO-CASIMIRO, M., MUNGUIA-GARZA, P., RÍOS-RODRÍGUEZ, J. A., GONZÁLEZ-BARRIOS, R., HERRERA, L. A. Breaking the Mold:

Epigenetics and Genomics Approaches Addressing Novel Treatments and Chemoresponse in TGCT Patients. *Int J Mol Sci* 2023, 24(9).
4. HERR, S., GARABET, R., TSENG, L., HARZSTARK, A. L., RUSSIN, M. P. Choriocarcinoma Syndrome: A Rare Complication's Impact on Metastatic Germ Cell Tumor Outcomes. *Cureus* 2024, 16(4).
5. KANG, C. Sacituzumab Govitecan: A Review in Unresectable or Metastatic HR+/HER2− Breast Cancer. *Targeted Oncology* 2024, 19(2), 289-296.
6. KONECNY, G. E., HENDRICKSON, A. E. W., WINTERHOFF, B., CHANDER, C., BILIC, S., DAVENPORT, S., CHUNG, A., MILLER, L.-L., PRESS, M. F., LETRENT, S. P., SLAMON, D. J. Initial results of dose finding in a first-in-human phase 1 study of a novel Claudin 6 (CLDN6) targeted antibody drug conjugate (ADC) TORL-1-23 in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2023, 41(16_suppl), 3082-3082.
7. KUCEROVA, L., FEKIACOVA, A., UDVORKOVA, N., MALCHARKOVA, P., BLAHOVA, V., JOCHOVA, S., KALAVSKA, K., CIERNA, Z., MEGO, M. Mirvetuximab Soravtansine Induces Potent Cytotoxicity and Bystander Effect in Cisplatin-Resistant Germ Cell Tumor Cells. *Cells* 2025, 14(4), 287.
8. LENÁRT, S., LENÁRT, P., ŠMARDA, J., REMŠÍK, J., SOUČEK, K., BENEŠ, P. Trop2: Jack of all trades, master of none. *Cancers* 2020, 12(11), 3328.
9. LOBO, J., JERÓNIMO, C., HENRIQUE, R. Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors: Current Challenges from Various Perspectives. *Cancers (Basel)* 2020, 12(6).
10. MCHUGH, D. J., GLEESON, J. P., FELDMAN, D. R. Testicular cancer in 2023: Current status and recent progress. *CA Cancer J Clin* 2024, 74(2), 167-186.
11. NAMEKAWA, T., KITAYAMA, S., IKEDA, K., HORIE-INOUE, K., SUZUKI, T., OKAMOTO, K., ICHIKAWA, T., YANO, A., KAWAKAMI, S., INOUE, S. HIF1α inhibitor 2-methoxyestradiol decreases NRN1 expression and represses in vivo and in vitro growth of patient-derived testicular germ cell tumor spheroids. *Cancer Letters* 2020, 489, 79-86.
12. ORSZÁGHOVÁ, Z., KALAVSKA, K., MEGO, M., CHOVANEC, M. Overcoming Chemotherapy Resistance in Germ Cell Tumors. *Biomedicines* 2022, 10(5).
13. RAOS, D., KRASIC, J., MASIC, S., ABRAMOVIC, I., CORIC, M., KRUSLIN, B., KATUSIC BOJANAC, A., BULIC-JAKUS, F., JEZEK, D., ULAMEC, M. In search of TGCT biomarkers: a comprehensive in silico and histopathological analysis. *Disease Markers* 2020, 2020(1), 8841880.
14. REJLEKOVA, K., CURSANO, M. C., DE GIORGI, U., MEGO, M. Severe complications in testicular germ cell tumors: the choriocarcinoma syndrome. *Frontiers in Endocrinology* 2019, 10, 218.
15. REJLEKOVA, K., KALAVSKA, K., MAKOVNIK, M., HAPAKOVA, N., CHOVANEC, M., DE ANGELIS, V., OBERTOVA, J., PALACKA, P., SYCOVA-MILA, Z., MARDIAK, J. Factors associated with choriocarcinoma syndrome development in poor-risk patients with germ cell tumors. *Frontiers in Oncology* 2022, 12, 911879.
16. ROTTENBERG, S., DISLER, C., PEREGO, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nature reviews cancer* 2021, 21(1), 37-50.
17. SCHMIDTOVA, S., DORSSERS, L. C. J., KALAVSKA, K., GILLIS, A. J. M., OOSTERHUIS, J. W., STOOP, H., MIKLIKOVA, S., KOZOVSKA, Z., BURIKOVA, M., GERCAKOVA, K., DURINIKOVA, E., CHOVANEC, M., MEGO, M., KUCEROVA, L., LOOIJENGA, L. H. J. Napabucasin

overcomes cisplatin resistance in ovarian germ cell tumor-derived cell line by inhibiting cancer stemness. *Cancer Cell Int* 2020, 20, 364.
18. 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., KUCEROVA, L. Disulfiram Overcomes Cisplatin Resistance in Human Embryonal Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)* 2019, 11(9).
19. SCHMIDTOVA, S., KALAVSKA, K., KUCEROVA, L. Molecular Mechanisms of Cisplatin Chemoresistance and Its Circumventing in Testicular Germ Cell Tumors. *Curr Oncol Rep* 2018, 20(11), 88.
20. SCHMIDTOVA, S., UDVORKOVA, N., CIERNA, Z., HORAK, S., KALAVSKA, K., CHOVANEC, M., ROJIKOVA, L., VULEVOVA, M., KUCEROVA, L., MEGO, M. Effect of the PARP inhibitor veliparib on germ cell tumor cell lines. *Oncol Lett* 2022, 24(5), 392.
21. SKOWRON, M. A., KOTTHOFF, M., BREMMER, F., RUHNKE, K., PARMAKSIZ, F., RICHTER, A., KÜFFER, S., REUTER-JESSEN, K., PAULS, S., STEFANSKI, A., STRÖBEL, P., STÜHLER, K., NETTERSHEIM, D. Targeting CLDN6 in germ cell tumors by an antibody-drug-conjugate and studying therapy resistance of yolk-sac tumors to identify and screen specific therapeutic options. *Molecular Medicine* 2023, 29(1), 40.
22. STAUDACHER, A. H., BROWN, M. P. Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required? *British journal of cancer* 2017, 117(12), 1736-1742.
23. TAKÁČOVÁ, M., PASTOREKOVÁ, S. [Tumour Hypoxia - Molecular Mechanisms and Clinical Relevance]. *Klin Onkol* 2015, 28(3), 183-190.
24. TANG, Z., LI, C., KANG, B., GAO, G., LI, C., ZHANG, Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research* 2017, 45(W1), W98-W102.
25. TOLANEY, S. M., CARDILLO, T. M., CHOU, C.-C., DORNAN, C., FARIS, M. The Mode of Action and Clinical Outcomes of Sacituzumab Govitecan in Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 2025.
26. TSUCHIKAMA, K., ANAMI, Y., HA, S. Y. Y., YAMAZAKI, C. M. Exploring the next generation of antibody-drug conjugates. *Nature Reviews: Clinical Oncology* 2024, 21(3), 203-223.
27. UDVORKOVÁ, N., FEKIAČOVÁ, A., MAJTÁNOVÁ, K., MEGO, M., KUČEROVÁ, L. Antibody-drug conjugates as a novel therapeutic modality to treat recurrent refractory germ cell tumors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2024, 327(2), C362-C371.
28. WAHBY, S., FASHOYIN-AJE, L., OSGOOD, C. L., CHENG, J., FIERO, M. H., ZHANG, L., TANG, S., HAMED, S. S., SONG, P., CHARLAB, R. FDA approval summary: accelerated approval of sacituzumab govitecan-hziy for third-line treatment of metastatic triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2021, 27(7), 1850-1854.
29. YUAN, X., XIE, Z., ZOU, T. Recent advances in hypoxia-activated compounds for cancer diagnosis and treatment. *Bioorganic Chemistry* 2024, 107161.
30. i1: http://gepia2.cancer-pku.cn/#index
31. i2: https://www.proteinatlas.org/
32. i3: https://clinicaltrials.gov/
33. i4: https://app.biorender.com/

23. Analýza výskytu nežiaducich účinkov antikoagulancií u hospitalizovaných pacientov - rozdiely medzi pohlaviami

PharmDr. Orsolya Hrubá
(farmakológia)

Spoluautori: Mgr. L. Žigová[1], doc. MUDr. Peter Jackuliak, PhD., MPH[2], prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP, FEFIM[2], prof. PharmDr. Ján Kyselovič, CSc.[2,3]
Školiteľ: doc. PharmDr. Andrea Gažová, PhD.[1]

[1] Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, LF UK, Bratislava, [2] V. Interná klinika LF UK a UNB, Bratislava, [3] Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie, Košice

Úvod

Antikoagulanciá sú podskupinou antitrombotík, ktoré bránia nadmernej zrážanlivosti krvi tým, že spomaľujú alebo blokujú rôzne stupne koagulačnej kaskády.[1] Využívajú sa najmä v prevencii a liečbe tromboembolických stavov vrátane venóznych tromboembolických príhod (VTE), tromboembolických komplikácií pri srdcových ochoreniach (fibrilácia predsiení), a pri prevencii a liečbe mozgových príhod a ako sekundárna prevencia infarktu myokardu.[2–8]

Farmakoterapia antikoagulanciami v ostatných rokoch prešla významnou zmenou. Používanie tradičného warfarínu (antagonista vitamínu K) ustupuje v dôsledku príchodu priamych perorálnych antikoagulancií na trh (DOAK). Hlavným benefitom DOAKov je rýchlejší nástup účinku (hodiny, kým warfarín pôsobí až po niekoľkých dňoch), stabilnejší farmakokinetický profil a spravidla fixné dávkovanie bez potreby častého laboratórneho monitorovania. Vzhľadom na preukázanú rovnakú alebo vyššiu účinnosť oproti warfarínu sa DOAK stali preferovanou voľbou u pacientov s nevalvulárnou fibriláciou predsiení či pri venóznej tromboembólii.[9–11] Naďalej však zostávajú situácie (napr. mechanické srdcové chlopne, valvulárna fibrilácia predsiení alebo z ekonomických príčin), keď je nutné radšej nasadiť warfarín.[10]

Hlavným rizikom každej antikoagulačnej terapie je krvácanie. V porovnaní s warfarínom majú DOAKy spravidla nižšie riziko intrakraniálneho krvácania, vo vybraných subpopuláciách (pacienti s obličkovým poškodením, s protidoštičkovou liečbou alebo s predchádzajúcim gastrointestinálnym ochorením) sa môže zvyšovať incidencia gastrointestinálneho krvácania. V prípade predávkovania warfarínom sa najčastejšie využíva vitamín K, prípadne koncentrát protrombínového komplexu či čerstvo zmrazená plazma; pri DOAKoch koncentrát protrombínového komplexu alebo špecifické antidotá (ak existujú, napr. idarucizumab pre dabigatran).

Pohlavné rozdiely v antitrombotickej liečbe

Na rozdiely medzi pohlaviami v oblasti antitrombotickej terapie poukazujú viaceré štúdie a systematické prehľady.[12] Podľa nich existujú rozdiely v incidencii a klinickej prezentácii kardiovaskulárnych ochorení, ako aj v bezpečnosti a účinnosti antitrombotík. U žien sa

kardiovaskulárne ochorenia často diagnostikujú vo vyššom veku než u mužov a môžu byť sprevádzané odlišným rizikom krvácania.[13] Tieto rozdiely majú komplexné príčiny (hormonálne, vekové, komorbidity, nízka telesná hmotnosť u žien, atď.) a môžu viesť k rozdielnej voľbe terapie.[12,13] V literatúre sa zdôrazňuje, že do klinických štúdií s antitrombotikami býva zaradené menšie percento žien, čo sťažuje formuláciu definitívnych záverov – je preto žiaduca vyššia reprezentácia žien v budúcich randomizovaných kontrolovaných štúdiách.[12]

Materiál a metódy

Dizajn štúdie

Retrospektívna observačná štúdia zahŕňala pacientov hospitalizovaných na V. Internej klinike LF UK a UNB v rokoch 2010 až 2022. Na extrakciu a spracovanie dát z nemocničného informačného systému (elektronických chorobopisov) sme využili softvér R (RStudio). V liekovej anamnéze sme identifikovali hospitalizácie, pri ktorých bola zaznamenaná perorálna antikoagulačná liečba (warfarín alebo DOAK). Následne sme pacientov rozdelili na dve kohorty podľa typu liečby a porovnávali ich demografické a klinické ukazovatele.

Rozdelenie pacientov

Pacientov sme rozdelili do dvoch skupín podľa typu užívaného antikoagulancia:

Pacienti užíajúci warfarín

Pacienti užívajúci Priame perorálne antikoagulanciá (DOAK) - dabigatran, rivaroxabán, apixabán a edoxabán.

Pri každom pacientovi sme skúmali demografické ukazovatele (vek, pohlavie), dĺžku hospitalizácie, hodnoty INR, prítomnosť nežiaducich účinkov (predovšetkým krvácanie), podanie antidota. Zamerali sme sa aj na rozdiely medzi mužmi a ženami.

Našimi hypotézami boli nasledovné: (1) Pacienti užívajúci warfarín majú vyšší výskyt nežiaducich účinkov (2) Existujú rozdiely medzi mužmi a ženami v priemernom veku, type antikoagulancia a výskyte komplikácií, podobne ako to uvádzajú zahraničné zdroje.[12,13]

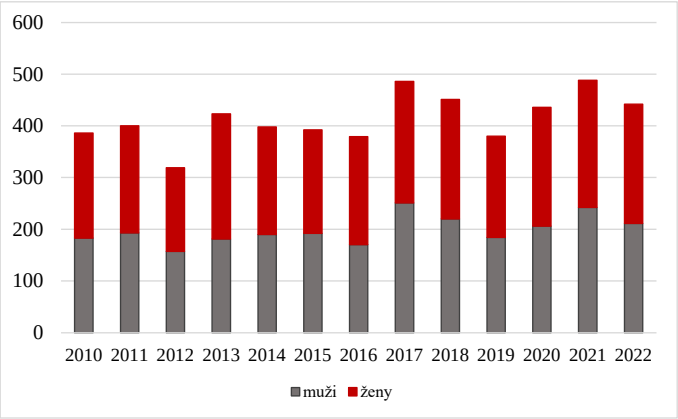
Štatistické metódy

Na porovnávanie parametrov medzi dvoma nezávislými skupinami (napr. warfarín vs. DOAK, muži vs. ženy) sme použili nepárový t-test so štatistickou hladinou významnosti $p < 0,05$. Výsledky uvádzame ako priemer ± smerodajná odchýlka (SD). Štúdia bola schválená etickou komisiou LF UK a UNB. Pred analýzou boli údaje anonymizované.

Výsledky

Základná analýza

Počas rokov 2010 – 2022 bolo zaznamenaných 46 521 hospitalizácií (muži 22 569; ženy 23 952). Priemerný vek: 69 ± 16,1 roka (muži: 66,2 ± 15,9 roka, ženy: 71,7 ± 15,9 roka. Priemerná dĺžka hospitalizácie bola 6,5 ± 6,7 dňa (v oboch skupinách podľa pohlavia). Z celkového počtu 5 380 hospitalizácií, ktoré skončili úmrtím (pomer muži : ženy ~ 48 % : 52 %; p = 0,575, Graf 1.), bol priemerný vek zomrelých 76,9 ± 11,8 roka. Ženy zomierali v priemere vo vyššom veku (79,1 ± 11,2) ako muži (74,5 ± 11,9). Nemocničná úmrtnosť celkovo dosiahla 11,6 % (11,4% u mužov a 11,7% u žien).



Graf 2 Pomer mužov a žien v súbore úmrtí

Pacienti s perorálnou antikoagulačnou terapiou

Pomocou počítačového softvéru sme analyzovali chorobopisy v skupine zomrelých pacientov. Identifikovali sme liekovú anamnézu (zhrnutie všetkých liekov, ktoré pacient užíval v období pred hospitalizáciou). Na podrobnú analýzu sme vybrali pacientov, ktorí užívali perorálne antikoagulanciá (spolu 461 osôb). Rozdelili sme ich na 2 skupiny, na základe typu perorálnej antikoagulačnej liečby:

Warfarín (n = 219) - 121 mužov a 98 žien

DOAK (n = 242) - 117 mužov a 125 žien

Priemerný vek skupiny pacientov užívajúcich warfarín: 78,5 ± 8,3 roka; skupiny pacientov užívajúcich DOAK: 81,0 ± 8,3 roka (p = 0,00182). Priemerná dĺžka hospitalizácie: warfarín 7,1 ± 7,8 vs. DOAK 8,8 ± 9,5 dňa (p = 0,03956).

Medzi pacientmi užívajúcich warfarín bolo viac mužov (55 %) ako žien (45 %). V DOAK skupine bolo viac žien (52 %) ako mužov (48 %). Ženy v oboch skupinách boli v priemere o niečo staršie než muži, čo korešponduje so všeobecnými trendmi v kardiovaskulárnych ochoreniach.[12]

Hodnoty INR a nežiaducich účinkov

Pri prvej kontrole krvi (uskutočnená pri prijatí pacienta do nemocnice) mali pacienti, u ktorých sme identifikovali užívanie warfarínu výrazne vyššie priemerné INR (3,4) ako pacienti užívajúci DOAK (1,71), s maximom až 23,37 v prípade warfarínu oproti 6,28 pri DOAK (p < 0,05). Rozptyl hodnôt INR bol u warfarínu 7,7, zatiaľ čo pri DOAK len 0,71 (p < 0,05). Nežiaduce udalosti (najmä krvácavé stavy alebo kriticky zvýšené INR) sa vyskytli u 40,2 % pacientov na warfaríne, zatiaľ čo pri DOAK len u 6,6 % (Tabuľka 1).

	pacienti užívajúci warfarín (n=219)	pacienti užívajúci DOAK (n=241)
priemerná hodnota INR (prvý odber)	3,4 ± 2,77	1,71 ± 0,83
priemerná hodnota INR (posledný odber)	2,34 ± 1,42	1,62 ± 0,68
nežiaduci účinok/ zvýšené INR	88 (40,2 %)	16 (6,6 %)
ženy/muži	41/47	10/6
priemerná hodnota INR (prvý odber)	6,0 ± 3,6	3,32 ± 1,85
priemerná hodnota INR (posledný odber)	2,9 ± 1,9	2,14 ± 1,13
zásah	59	8
fytomenadión (vitamín K)	41	6
čerstvo mrazená plazma	29	2
protrombínový komplex	1	1

Tabuľka 1. Pacienti užívajúci warfarín, ich priemerné hodnoty INR, výskyt nežiaducich udalostí alebo hlavne zvýšeného INR a spôsoby riešenia

Pri liečbe warfarínom dostalo až 59 pacientov aktívny zásah na zníženie/stabilizáciu INR (najčastejšie vitamín K, čerstvo zmrazená plazma, protrombínový komplex). Pri DOAK bola dostalo antidotum 8 pacientov.

	krvácanie z GIT K92	Hemoragická porucha zavinená cirkulujúcimi antikoag. D683	Otrava antikoagulanciami T457	Vnútromozgové krvácanie I61	spolu
warfarín	14	12	3	4	33
INR > 3,5	7	8	0	3	18
viac ako 1 antikoagulans	3	1	1	0	5
DOAK	10	1	0	0	11
INR > 3,5	1	1	0	0	2
viac ako 1 antikoagulans	2	0	0	0	2

Tabuľka 2. Prehľad vybraných nežiaducich udalostí (prevažne krvácavé stavy, kódované podľa MKCH) u pacientov užívajúcich warfarín a DOAK

V Tabuľke 2. uvádzame prehľad tých nežiaducich udalostí, ktoré sme našli v nemocničnom systéme a chorobopisoch pacientov kódované podľa MKCH u pacientov užívajúcich warfarín a u pacientov užívajúcich DOAK. Vyskytli sa nasledujúce komplikácie ako hlavná diagnóza: krvácanie z GIT (K92), Hemoragická porucha zavinená cirkulujúcimi antikoagulanciami (D683), otrava antagonistami antikoagulancií či vitamínom K (T457) a vnútromozgové krvácanie (I61); posledný stĺpec uvádza súčet všetkých udalostí v danej skupine. Riadky rozlišujú pacientov podľa toho, či užívali len jeden typ antikoagulancia (warfarín alebo DOAK) alebo mali INR > 3,5 či dokonca užívali viac ako jeden antikoagulans súčasne.

U pacientov užívajúcich warfarín sa najčastejšie vyskytlo krvácanie z GIT (14 prípadov), nasledované krvácaním zapríčineným antikoagulanciami (12), vnútromozgovým krvácaním (4) a otravou antagonistami antikoagulancií (3). Z celkových 33 prípadov bolo 18 spojených s INR > 3,5 a 5 prípadov bolo pri súčasnom užívaní viac ako jedného antikoagulancia.

U pacientov užívajúci DOAK väčšina komplikácií predstavovala krvácanie z GIT (10), zvyšok tvoril 1 prípad krvácania zapríčineného antikoagulanciami. Pri DOAK nebol zaznamenaný ani jeden prípad vnútromozgového krvácania či otravy antagonistami antikoagulancií. Dva prípady boli spojené s INR > 3,5 a týkali sa pacientov s viacerými antikoagulanciami naraz.

Diskusia

Naša retrospektívna analýza 46 521 hospitalizácií od roku 2010 do 2022 ukázala, že ženy dosahovali vyšší priemerný vek (71,7 vs. 66,2 roka) a zomierali v staršom veku (79,1 vs. 74,5 roka), avšak celková nemocničná mortalita medzi mužmi a ženami nebola štatisticky odlišná (11,4 % vs. 11,7 %, p = 0,575). U pacientov s perorálnou antikoagulačnou liečbou (n = 461) sme rozlíšili dve skupiny – warfarín (n = 219) a DOAK (n = 242). V skupine warfarínu bolo mierne viac mužov (55 %) oproti ženám (45 %), zatiaľ čo u DOAK bola zaznamenaná mierna prevaha žien (52 % vs. 48 %). Pacienti na warfaríne vykazovali výrazne vyššie hodnoty INR pri prijatí (priemerné INR 3,4 s maximom 23,37 a rozptylom 7,7) v porovnaní s pacientmi na DOAK (priemerné INR 1,71, maximum 6,28, rozptyl 0,71), čo koreluje s oveľa častejším výskytom nežiaducich udalostí – 40,2 % oproti 6,6 % u DOAK. Podrobnejšia analýza podľa kódov MKCH odhalila, že u warfarínu dominuje krvácanie z gastrointestinálneho traktu, pričom ďalšie komplikácie, ako vnútromozgové krvácanie či otrava antagonistami antikoagulancií, boli menej časté. Významná časť komplikácií u warfarínu bola tiež spojená s hodnotami INR > 3,5 a s kombinovaným užívaním viacerých antikoagulancií.

Okrem rozdielov vyplývajúcich z typu antikoagulancie je potrebné zohľadniť aj vplyv pohlavia. Vyšší vek žien a možné biologické či hormonálne odlišnosti môžu ovplyvniť farmakokinetiku a farmakodynamiku liečby, čo následne prispieva k individuálnym rizikám komplikácií. Avšak vzhľadom na retrospektívny charakter štúdie a nedostatok detailných klinických údajov (napr. renálna funkcia, HAS-BLED skóre) je potrebné tieto zistenia interpretovať s opatrnosťou.

Záver

Naše zistenia potvrdzujú, že DOAK predstavujú bezpečnejšiu a preferovanú terapeutickú alternatívu v perorálnej antikoagulačnej liečbe, čo dokazuje nižšie riziko komplikácií a stabilnejšie hodnoty INR v porovnaní s warfarínom. Napriek týmto výhodám však warfarín zostáva nevyhnutný pri špecifických indikáciách, ako sú mechanické srdcové chlopne. Rozdiely medzi pohlaviami, najmä starší vek žien, môžu ovplyvniť voľbu terapie, ale primárny rozdiel v bezpečnosti liečby je spojený so samotným typom antikoagulancie. Pre presnejšie

vyhodnotenie vplyvu pohlavia a ďalších faktorov bude potrebné zahrnúť podrobnejšie klinické údaje v budúcich analýzach.

Zoznam použitej literatúry

1. Alquwaizani, M., Buckley, L., Adams, C. & Fanikos, J. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. Curr Emerg Hosp Med Rep 1, 83–97 (2013).
2. Benjamin, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation 139, (2019).
3. Daiichi Sankyo Europe GmbH. Lixiana 15 mg filmom obalené tablety, Lixiana 30 mg filmom obalené tablety, Lixiana 60 mg filmom obalené tablety - Súhrn charakteristických vlastností. adc.sk Preprint at https://www.ema.europa.eu/sk/documents/product-information/lixiana-epar-product-information_sk.pdf (2015).
4. Bayer AG. Xarelto 10 mg filmom obalené tablety - Súhrn charakteristických vlastností lieku. adc.sk Preprint at https://www.ema.europa.eu/sk/documents/product-information/xarelto-epar-product-information_sk.pdf (2008).
5. Bristol-Myers Squibb/Pfizer EEIG. Eliquis 2.5 mg filmom obalené tablety, Eliquis 5 mg filmom obalené tablety - Súhrn charakteristických vlastností lieku. adc.sk Preprint at https://www.ema.europa.eu/sk/documents/product-information/eliquis-epar-product-information_sk.pdf (2011).
6. Boehringer Ingelheim International GmbH. Pradaxa 110 mg tvrdé kapsuly - Súhrn charakteristických vlastností lieku. adc.sk Preprint at https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/pradaxa-110-mg-tvrde-kapsuly-638673.html#kap_9_0 (2008).
7. Orion Corporation. WARFARIN ORION 3 mg - Súhrn charakteristických vlastností lieku. adc.sk Preprint at https://www.ema.europa.eu/sk/documents/product-information/warfarin-orion-epar-product-information_sk.pdf (1989).
8. PRO.MED.CS Praha. Warfarin PMCS 5 mg, Warfarín PMCS 2 mg - Súhrn charakteristických vlastností lieku. adc.sk Preprint at https://www.sukl.sk/buxus/docs/download/SPC00832346.pdf (2003).
9. Almalki, O. Betrixaban: An Oral Factor Xa Inhibitor. Clin Res Trials 3, (2017).
10. Chen, A., Stecker, E. & Warden, B. A. Direct Oral Anticoagulant Use: A Practical Guide to Common Clinical Challenges. J Am Heart Assoc 9, (2020).
11. Ruff, C. T. et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. The Lancet 383, 955–962 (2014).
12. Grifoni E, Gori AM, Giusti B, Marcucci R. Gender differences in antithrombotic therapy. Ital J Gender-Specific Med 2017; 3(1): 15-22.
13. Marcucci R, Cioni G, Giusti B, et al. Gender and antithrombotic therapy: from biology to clinical implications. J Cardiovasc Transl Res 2014; 7: 72–81.

24. Advancing Anatomical Models: A Study on the Efficiency and Quality of Modern 3D Reconstruction Technologies

Pendar Donyawie
(General Medicine, 3. Year)

Co-authors: Simon Michael Struenck, Valentin Thumfart, Benjamin Mimler
Supervisor: MUDr. Hisham Elfalougy, PhD.[1]; Mgr. Tomas Havranek, PhD.[1],
prof. MUDr. Stefan Polak, CSc.[1]
[1] Institute of Anatomy, Faculty of Medicine Comenius University, Bratislava

Introduction

Human anatomy is an integral part of medical studies and serves to impart knowledge about the composition, structure, and function of the three-dimensional body, as well as their interrelationships. It is a tactile and visual subject, which is why, in addition to teaching using 2D textbooks, practical anatomical exercises in the form of dissection and practical classes are integrated into the curriculum [1,2,3]. The scarcity of body donations represents a limitation to the provision of high-quality specimens.

Technology advancements have revolutionized the three-dimensional recording of anatomical structures, and as such, 3D scanning and modeling, and 3D printing continue to become more established for educational purposes and their use in diagnostics, surgical planning, and patient education [1,2]. Moreover, 3D scanning, when used in conjunction with 3D printing, offers cost-effective, realistic alternatives for lecturing educational specimens. During the COVID-19 pandemic digital 3D models proved essential to compensate for the limited access to physical teaching aids. Simultaneously, the implementation of 3D models across AR and VR oriented teaching methods has been further expanded [4,5]. Imaging modalities such as CT, MRI, and ultrasound provide accurate reconstructions of the internal anatomy. Moreover, 3D scanning tools such as LiDAR, photogrammetry, and structured light provide high-quality capture of external structures. Mobile applications associated with 3D scanning tools can give an efficient and low barrier to 3D models, at low cost. Models can also be created and adjusted manually using 3D software (i.e., Blender [23], ZBrush [24]) or CAD programs [1,6,22].

The use of 3D-printed models in teaching has been shown to improve tactile and spatial understanding of anatomical structures [2,6,7].

Previous studies have been limited to examining the creation of 3D models based on CT, 3D scanners, or comparing the results of smartphone 3D scanner apps [7,8,9,10,11,12]. Furthermore, there is a lack of studies comparing different methodological approaches.

This study intends to bridge this research gap through a systematic investigation of photogrammetry and LiDAR scanning using the Kiri Engine app [13] by visually evaluating the quality, practicality, and limitations. Two specifically selected test objects, the scapular and the skull, are to be compared with established methods such as CT-based segmentation, which

were performed manually and using AI segmentation based on the TotalSegmentator [14] plugin.

Material and methods

Two methods were used to create anatomical 3D models: 1) smartphone-based photogrammetry and LiDAR scans of a scapula and skull utilizing Kiri Engine and 2) CT-based reconstruction using manual and AI-assisted segmentation via 3D Slicer [15]. The scapula was segmented from the Healthy Total-Body CTs v02 dataset [16], which includes high-resolution and isotropic CTs with a voxel size of $1.0 \times 1.0 \times 1.0$ mm³. Whereas the skull was reconstructed by utilizing the AIDA CT Skull Dataset [17] which included CT data focusing on cranial structures. These anatomical structures were selected based on their different levels of complexity.

Photogrammetry and LiDAR scans with the Kiri Engine mobile application

The Kiri Engine app allows for the acquisition of 3D models through either photogrammetry or LiDAR. For photogrammetry, no more than 300 overlapping images (≥75%) were acquired off checkered surface. The scapula was stabilized while the skull was fixed on a tripod stand with the skull's foramen magnum exposed. After acquisition, the image processing was conducted using the cloud in within approximately 15 minutes, with export capabilities to standard 3D image file formats (e.g. STL, OBJ) with the optional inclusion of PBR textures. Lastly, the model was further edited in Meshmixer and Blender.

The LiDAR scans required an appropriate device. The scanning was conducted in 3 segments with the object rotating for each segment (once from 180°). The Kiri app automatically creates multiple overlapping images per segment and places a virtual 360° scan box around the model. Critical surface areas are scanned with increased density. Automatic processing takes place after uploading to the Kiri cloud. Quad mesh and rig generation were enabled before export. The final files are available via a download link and are further processed in Meshmixer and Blender in the format as they were exported.

CT-based 3D reconstruction with 3D Slicer

A second method for generating anatomical 3D models involved the use of medical datasets.

The automated segmentation is performed with TotalSegmentator, an AI-based extension for 3D Slicer, using integrated Python environment (version: >3.9), enabling complete segmentation of anatomical structures within CT datasets. The software leverages deep learning algorithms to identify and extract up to 104 anatomical structures as individual segments.

After installing the Extension module in 3D Slicer (version: >5.0), the DICOM files were imported. In the TotalSegmentator module perform a targeted segmentation of selected structures was selected. To guarantee highest accuracy, the "Fast" option was turned off. The segmentation was completed locally on a system including Intel i9 14900K CPU, 64GB RAM, and NVIDIA RTX 5070ti GPU with GPU-based rendering leading to significantly shorter processing times than CPU. The results were extracted in the Segment Editor.

For manual segmentation of the DICOM CT data in 3D Slicer, the Sandbox toolkit is installed via extensions to provide tools such as snipping and masking tool. A new segment is created in the Segment Editor, and the Hounsfield value range is defined using the Threshold tool (e.g., 130–3000 HU for bone). The preview is done via Show in 3D, and interfering artifacts are removed with Snipping tool (Erase inside). Bone structures were separated from soft tissue by adjusting the threshold range. This process required extensive post-processing because numerous artifacts and unwanted particles were present in the reconstructed 3D representation. Finally oversampling in the segment geometry was increased from factor 1.0 to 2.0-3.0 allowing for increased quality, followed by surface smoothing. The final export is done as an STL or OBJ file (coordinate system: RAS). If topology errors occur, Autodesk Meshmixer allows repair using Make Solid, Close Cracks and Holes or Inspector [18]. The repaired model is then re-exported in a desired format.

Results

The tested methods showed varying results in terms of precision, detail, and practicality and are presented in detail below in a direct comparison of the test objects.

Scapular

Reconstruction from medical CT data using 3D Slicer produced the most detailed models with manual segmentation. With approximately 760,000 polygons, the resulting 3D model represents the topography of the scapula with precision. Fine structures such as the scapular spine, acromion, and the glenoid cavity were captured anatomically correctly and with sharp delineation.

In contrast, automatic segmentation using the 3D Slicer extension TotalSegmentator showed a drastically simplified surface geometry with highly smoothed contours, reduced landmarks, and inhomogeneous structures. As a result, the mesh quality was insufficient for precise anatomical applications. The scapula appeared topologically distorted, morphologically disfigured and was often incompletely extracted by the algorithm.

Scanning bone structures using photogrammetry with the Kiri Engine app demonstrated high reproduction quality while using minimal resources. Despite the lower number of polygons (~25,000) compared to the CT model and the resulting loss of fine surface details, the reconstructed model of the scapula proved to be consistent, morphologically coherent, and accurately depicted in its basic form.

Important anatomical landmarks, particularly the general shape of the subscapular fossa, the orientation of the scapular spine, and the three-dimensional depth, were well captured, although some subtle structures were smoothed or only vaguely represented.

The additional LiDAR scans showed almost identical results in terms of surface structure and detail to the purely photogrammetrically created models.

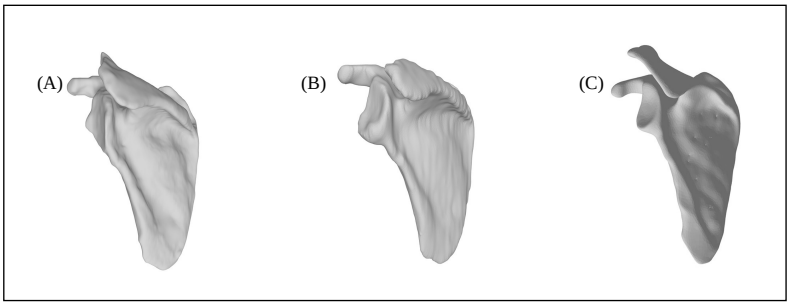


Figure 1: Scapular 3D model accuracy (A) Manual Segmentation (B) Segmentation with TotalSegmentator plugin (C) Photogrammetry 3D Model with Kiri Engine app.

Skull

The manually segmented model shows an excellent representation of the cranial anatomy. Fine details like the occipital protuberance, the cranial bone fissures, and the nasal bone are modeled precisely. This detailed reconstruction provides a realistic and comprehensive visualization of the skull structures, including the complex geometry of the nasal cavity and the delicate bony sutures.

The automatically segmented reconstruction of the skull using TotalSegmentator shows considerable deviations from cranial anatomy. Key structures like nasal bone are absent; critical portions of the skull are incomplete or blurred. Fine structures such as foramina, teeth of the upper and lower jaws, and other anatomical details were only rudimentarily represented. The model appears more like a smooth, simplified, surface which compromises judgment of the smaller anatomical features.

The scan of the skull created by the Kiri Engine reproduces the general morphology, clearly showing the orbits, nasal bone, and parts of the zygomatic bone. The cranial sutures and foramina of the skull base are captured in less detail, resulting in limited visibility. The overall external shape of the skull is recognizable, but without deeper insights into the more complex intracranial structures.

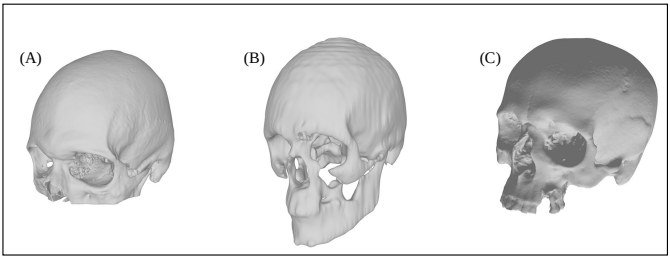


Figure 2: Skull 3D model accuracy (A) Manual Segmentation (B) Segmentation with TotalSegmentator plugin (C) Photogrammetry 3D Model with Kiri Engine app.

Criterion	CT – Manual	CT – AI (TotalSegmentator)	Kiri Photogrammetry	Kiri LIDAR
Polygon Count - Scapula	High (~730k)	Medium (~71k estimated)	Low (~25k)	Low (~24k)
Polygon Count - Skull	High (~4.300k)	Medium (~366k estimated)	Low (~253k)	Low (~242)
Anatomical Accuracy	Excellent	Poor – insufficient	Good – sufficient	Good – sufficient
Resource Expenditure	High (hardware, expertise)	Low	Very low	Very low
Post-processing Required	Yes	Yes	Yes (minimal)	Yes (minimal)
Printability	High	Low	High	High
Suitability for Education	Advanced education, surgery	Limited suitability	Basic education, pre-clinical	Basic education, pre-clinical
AR/VR Suitability	Excellent for detailed surgical simulations	Limited by model quality	Suitable for basic educational VR experiences	Suitable for basic educational VR experiences

Table 1: a classification of the results based on various qualitative and quantitative criteria.

Discussion

The results of this study align with current research and extend it through a combined analysis. It was shown that both photogrammetry and LiDAR scanning represent a valid alternative to the 3D reconstruction of anatomical structures based on CT data [11,12,21]. Despite certain smoothing effects, the topographical landmarks and basic morphological architecture are preserved. Table 1 provides a classification of the results based on various criteria.

The results show that TotalSegmentator does not yet achieve the required precision for CT segmentation, supporting Temple and Rowbottom's [19] findings, who emphasize the need for further development of deep learning-supported segmentation algorithms.

Piazza et al. [11] investigated mobile photogrammetry using the Metascan and 3D Scanner App applications to create neuroanatomical 3D models. Their results show that Metascan enabled higher polygon density and more detailed surface reconstructions, but strict standardization of image acquisition is necessary to ensure methodological reliability. Similarly, Morichon et al. [12] investigated the applicability of smartphone-based photogrammetry for creating stereoscopic 3D reconstructions for neuroanatomical training. Despite the optical limitations of mobile camera systems, high-quality models for educational use could be generated. These results confirm the present study and highlight the potential of mobile scanning technologies in medical education.

Research emphasises the importance of learner-centred digital teaching tools [2], which is supported by our results. The present study suggests that photogrammetry and LiDAR are particularly suitable for macroscopic anatomical education, while CT-based models remain essential for specialized medical and surgical training [7].

The Kiri Engine models could be integrated into AR and VR environments by providing a basis for didactic applications with lower detail requirements, while detailed manual segmentations are suitable for advanced simulations. Aimar et al. [8] showed that students using VR technologies in anatomy training exhibit significantly improved topographical understanding and improved test scores.

The scalability and adaptability of AR and VR technologies demonstrates that even lower-resolution models can be used to suit specific target groups. Nevertheless, the results of this study show that model quality remains a crucial factor [7,20].

Limitations and future research

The results obtained are promising but should be viewed with caution.

First, the study is limited to two selected bones of varying complexity, scapula and skull, and therefore results can not be generalized. Future studies should integrate bone structures and organs into the study design to ensure broader anatomical validity.

The quality of photogrammetry and LiDAR scans can vary considerably depending on user experience, lighting, and scanning parameters and should be controlled and investigated in future studies.

Furthermore, the model quality assessment was potentially based on subjective judgments, limiting the comparability of the results.

Future studies should establish objective measurement methods and standardized criteria. Furthermore, an extended cost-benefit analysis is required that systematically compares CT-based 3D printing, 3D scanner models, and real bone structures within controlled studies.

Finally, AI-assisted segmentation should be further researched to convert CT data into printable 3D models more efficiently and with greater fidelity, while using fewer resources.

Conclusion

The results demonstrated that photogrammetry and LiDAR scanning with the Kiri Engine app offer cost-effective approaches for creating anatomical 3D models, primarily being suitable for visualizing external structures and rather insufficient for the detailed representation of complex internal structures. Although manual CT segmentation produced highly precise models, it required high resource expenditure and intensive manual post-processing and training in the respective programs. Automated segmentation using the TotalSegmentator plugin resulted in excessive smoothing, which prevented an accurate representation of complex anatomical details. Future research should focus on optimizing AI-assisted CT segmentation, assess and evaluate potential applications in AR and VR, introducing objective measurement methods, developing standardized criteria, as in this study a visual assessment approach was chosen. Further research is therefore crucial to improve the accuracy and applicability of these technologies.

References

1. Haleem, A., & Javaid, M. (2019). 3D scanning applications in medical field: a literature-based review. *Clinical Epidemiology and Global Health*, *7*(2), 199-210.
2. Sun, Z., Wong, Y. H., & Yeong, C. H. (2023). Patient-specific 3D-printed low-cost models in medical education and clinical practice. *Micromachines*, *14*(2), 464.
3. McLachlan, J. C., & Patten, D. (2006). Anatomy teaching: ghosts of the past, present and future. *Medical education*, *40*(3), 243-253.
4. Choi, D. H., Choi, S. Y., Ahn, S. H., Lee, R., Cho, S. H., & Han, S. H. (2024). Development and Utilization of 3D Anatomy Education Content using Metaverse and XR for Remote Telemedicine Education. *bioRxiv*, 2024-06.
5. Byrnes, K. G., Kiely, P. A., Dunne, C. P., McDermott, K. W., & Coffey, J. C. (2021). Communication, collaboration and contagion:“Virtualisation” of anatomy during COVID-19. *Clinical anatomy*, *34*(1), 82-89.
6. Ford, S., & Minshall, T. (2019). Invited review article: Where and how 3D printing is used in teaching and education. *Additive manufacturing*, *25*, 131-150.

7. Thomas, D. B., Hiscox, J. D., Dixon, B. J., & Potgieter, J. (2016). 3D scanning and printing skeletal tissues for anatomy education. *Journal of anatomy*, *229*(3), 473-481.
8. Aimar, A., Palermo, A., & Innocenti, B. (2019). The role of 3D printing in medical applications: a state of the art. *Journal of healthcare engineering*, *2019*(1), 5340616.
9. Chen, S., Pan, Z., Wu, Y., Gu, Z., Li, M., Liang, Z., ... & Pan, H. (2017). The role of three-dimensional printed models of skull in anatomy education: a randomized controlled trail. *Scientific reports*, *7*(1), 575.
10. Iwanaga, J., Terada, S., Kim, H. J., Tabira, Y., Arakawa, T., Watanabe, K., ... & Tubbs, R. S. (2021). Easy three-dimensional scanning technology for anatomy education using a free cellphone app. *Clinical Anatomy*, *34*(6), 910-918.
11. Piazza, A., Corvino, S., Ballesteros, D., Campeggi, A., Agosti, E., Serioli, S., ... & De Notaris, M. (2024). Neuroanatomical photogrammetric models using smartphones: a comparison of apps. *Acta Neurochirurgica*, *166*(1), 378.
12. Morichon, A., Dannhoff, G., Barantin, L., Destrieux, C., & Maldonado, I. L. (2024). Doing more with less: Realistic stereoscopic three-dimensional anatomical modeling from smartphone photogrammetry. *Anatomical Sciences Education*, *17*(4), 864-877.
13. Kiri Innovations Science and Technology Inc., Kiri Engine - Photogrammetry and LiDAR scanning application, Available at: https://www.kiriengine.com/.
14. Wasserthal, J., et al., TotalSegmentator - AI-based segmentation tool for CT data, Available at: https://github.com/wasserth/TotalSegmentator.
15. Kikinis, R., Pieper, S., Vosburgh, K., 3D Slicer - open-source software for medical image computing, Available at: https://www.slicer.org/.
16. The Cancer Imaging Archive (TCIA), "Healthy Total-Body CTs v02 (2024-09-27)," 2024. [Online]. Available: https://www.cancerimagingarchive.net/tcia-downloads/healthy-total-body-cts-da-clinical/healthy-total-body-cts_v02_20240927/.
17. AIDA Data Hub, "AIDA CT Skull Dataset," 2023. [Online]. Available: https://datahub.aida.scilifelab.se/10.23698/aida/ctskull.
18. Autodesk Inc., Meshmixer - 3D design and modeling software, Available at: https://www.meshmixer.com/.
19. Temple, S. W., & Rowbottom, C. G. (2024). Gross failure rates and failure modes for a commercial AI-based auto-segmentation algorithm in head and neck cancer patients. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, *25*(6), e14273.
20. Yan, Q., Dong, H., Su, J., Han, J., Song, B., Wei, Q., & Shi, Y. (2018). A review of 3D printing technology for medical applications. *Engineering*, *4*(5), 729-742.
21. Donato, L., Cecchi, R., Goldoni, M., & Ubelaker, D. H. (2020). Photogrammetry vs CT scan: Evaluation of accuracy of a low-cost three-dimensional acquisition method for forensic facial approximation. *Journal of Forensic Sciences*, *65*(4), 1260-1265.
22. Waltenberger, L., Rebay-Salisbury, K., & Mitteroecker, P. (2021). Three-dimensional surface scanning methods in osteology: A topographical and geometric morphometric comparison. *American Journal of Physical Anthropology*, *174*(4), 846-858.
23. Blender Foundation, Blender - a 3D modelling and rendering software, Available at: https://www.blender.org/.
24. Pixologic, Inc., ZBrush - digital sculpting software, Available at: https://pixologic.com/.

25. Multilayered Dissection of the Facial Nerve and Temporal Region: An Enhanced Anatomical Approach for Educational and Clinical Insight

Simon Michael Strünck
(general medicine, 3rd year)

Coauthors: Valentin Thumfart, Pendar Donyawie, Benjamin Mimler
Supervisor: MUDr. Hisham Elfalougy, PhD.[1]; Mgr. Tomas Havranek, PhD.[1],
prof. MUDr. Stefan Polak, CSc.[1]
[1] Institute of Anatomy, Faculty of Medicine Comenius University, Bratislava

Introduction

The human head and neck are one of the most intricate regions of the body, containing a dense network of neural, vascular, muscular, and skeletal structures within a confined framework. Mastering this region's anatomy is especially important for foundational knowledge and clinical applications such as in surgery, neurology, and otolaryngology. Cadaveric dissection, which offers practical insight into spatial relationships, tissue qualities, and a tactical understanding of the anatomy, is still essential despite the advancements in digital visualization and virtual modeling [1].

Effective head dissection poses a unique challenge. Preserving delicate structures and improving identifiability for teaching purposes is of the utmost importance. Traditional fixation methods often fail to deliver expected results and maintain tissue integrity. One of the main disadvantages of many traditional preparation methods is the inability to ensure stable and repeated educational use.

This study introduces two complementary techniques to enhance the educational value of head dissections. A traditional fixation enhanced by fixative injected via the cerebral sinuses and a lateral dissection window exposing the facial nerve and associated vasculature.

The sinus-based fixation method preserves brain tissue, vessels, and cranial nerves by distributing fixative through natural anatomical canals. Conversely, the lateral window dissection provides partial cranial access through the temporal bone. It targets the extracranial facial nerve, its branches, and the vascular system, such as the external carotid artery and retromandibular vein.

These approaches aim to improve specimen utility in anatomical education and detail the methodology and educational significance to optimize teaching capabilities.

Materials and Methods

The donor’s cadaver was obtained from our donation program, following all ethical and legal guidelines. After a first inspection, the body was prepared and fixed in a general formol-alcohol based fixing solution. The fixation solution was chosen to ensure epithelial stability

and integrity. After a minimum required time period, the specimen underwent an alcohol-based second step preparation to expel as much formalin as possible.

Dissection was performed using detailed preparational techniques, using general tools, such as scalpels, forceps, scissors – and their micro modifications; an oscillating saw and micro rotary tools for creating the deep window access in the temporal was also employed.

All the procedures have been conducted while following ethical guidelines for cadaveric research.

Cerebral venous sinus fixation

The cerebral venous sinus fixation method was employed to preserve all cranial specimens, in high detail, suitable for an anatomical dissection, targeting intracranial structures directly via the venous sinus system. The cerebral venous sinus fixation is based on secured intracranial access via posterior second third of the parietal bone. The procedure begins after primary fixation administration via femoral or common carotid artery has been completed, with a midline incision over the scalp to expose the skull; gate (diameter 4.0 mm) is made through the sagittal suture line to ensure access to parietal part of sigmoid sinus. Enhanced formol-alcohol fixative (at minimum of 200 ml) was administrated under controlled pressure to perfuse the venous sinus network, including the transverse and sigmoid sinuses, preserving brain tissue, cranial nerves, and intracranial vasculature.

This technique improves the preservation of deep structures better than immersion fixation or arterial perfusion on their own, supporting detailed anatomical studies.

Lateral window preparation

The lateral window dissection technique was employed to expose the facial nerve and associated neurovascular structures in the targeted region. We employed advanced preparation techniques to ensure proper results, utilizing a multilayered macro dissection approach adapted from Grant's Dissector [2].

Deep window preparation

The deep window preparation exposes the extracranial facial nerve and underlying cerebral structures via a precise lateral craniotomy. It begins with a superficial incision from the zygomatic arch to the mastoid process. Skin and superficial fascia are reflected to expose the parotid gland, which is partially resected to reveal the facial nerve's branches. The nerve's main trunk is identified at the stylomastoid foramen, and its branches are traced anteriorly within the parotid region, preserving it where possible.

Next, an oscillating saw and micro rotary tools are used for ensuring a lateral access window in the temporal bone. This step of preparation is asymmetrical; on the posterior area, bone is removed from the temporal bone; while superficial tissues are retained in the anterior portion. This reveals critical neurovascular components, including the middle meningeal artery. By balancing between superficial and deep exposure, used method enhances clinical

and educational understanding of the relationship between the facial nerve, cranial vasculature, and brain.

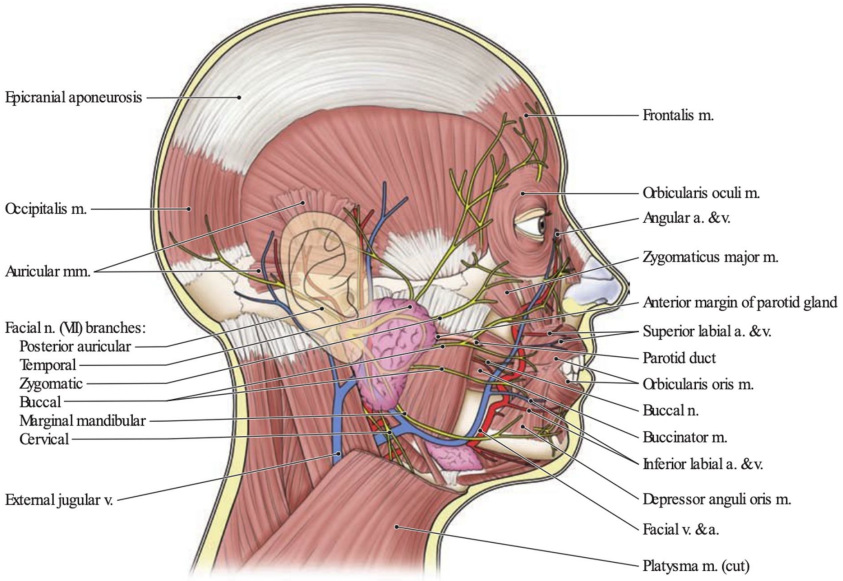


Figure 2: Schematic illustration of the anatomical structures of the lateral portion of the head [2].

Superficial window preparation

The superficial window preparation emphasizes the extracranial facial nerve and its parotid/ preauricular relationships. The first step is identifying the great auricular nerve that crosses the sternocleidomastoid muscle. The nerve is detached and reflected inferiorly, preserving its cervical plexus connection and orientation.

Second, the temporal, zygomatic, buccal, mandibular, and cervical branches of the facial nerve are separated and prepared trough the superficial tissues of the parotid. Dissection extends posteriorly to the earlobe area to identify the nerve's main trunk before branching. The parotid plexus is reflected anteriorly to improve the visualization of its course and interconnections, and the trunk is transected close to the stylomastoid foramen.

After being located at the anterior border of the gland, the parotid duct is transected and reflected forward, maintaining its passage along the masseter muscle. Finally, the

auriculotemporal nerve is identified between the mandibular head and external acoustic meatus. It ascends over the zygomatic process [3].

This approach clarifies the facial nerve's branching, its relationship with sensory nerves and salivary structures, and its relevance to parotid surgery, nerve exploration, and pathology.

Results

The lateral window dissection technique effectively displayed the extracranial facial nerve and associated neurovascular structures in the temporal region across prepared cadaveric specimens. The superficial window revealed the facial nerve's main trunk at the stylomastoid foramen and its temporal, zygomatic, buccal, mandibular, and cervical branches within the parotid gland, alongside the parotid duct and auriculotemporal nerve. Through temporal bone osteotomy, the deep window allowed for the preservation of surrounding anatomy while allowing visibility of intracranial structures such as the dura mater, middle meningeal artery, and surrounding brain tissue. Tissue integrity was preserved by the cerebral venous sinus injection fixation technique, which was used before dissection.



Figure 1: Superficial window preparation showing branches of the facial nerve (C-VII) in situ.

Discussion

Through organized access to the facial nerve and related neurovascular anatomy in the head and neck, the lateral window dissection technique provides a strong foundation for anatomical education. Due to its dual approach, it provides detailed knowledge of the complicated interplay between superficial and deep tissues. This hands-on method significantly enhances anatomical retention, sharpens spatial awareness, and deepens insight into structures critical for surgical intervention, as supported by prior studies on effective anatomical teaching [4].

By imitating operative techniques used in neurosurgery (e.g., lateral skull base approaches), otolaryngology, and maxillofacial surgery (e.g., parotidectomy), it serves as a practical tool for analyzing nerve injuries such as those resulting from temporal bone fractures or parotid

surgery. Furthermore, it helps in understanding the impact of pathologies associated with this area on surrounding neurovascular anatomy.

The technique's design, with a superficial window exposing the facial nerve branches, parotid gland, and auriculotemporal nerve, directly supports training for parotid surgery and related nerve procedures. The deep window is helpful in better grasping the basic approaches in neurosurgery and skull base applications by enabling spatial understanding of intracranial tissues, such as the brain and dura. Together, these components create a comprehensive anatomical map that bridges educational objectives with a foundation for clinical practice related to the head and neck. This adaptability underlines its value as a versatile training methodology in conjunction with established dissection procedures [2] and surgical approaches.

Beyond its practical use, this method is well-suited for the integration of modern technologies like augmented reality (AR) and 3D mapping. Models that preserve spatial links are created by digitizing their complicated anatomy using 3D scanning or photogrammetry, enabling users to interactively modify and explore complex regions such as the lateral skull base [5].

Together, the lateral window dissection and cerebral venous sinus fixation techniques provide a strong foundation for creating an extensive anatomical model that is suited to the requirements of both educators and students. This technique produces a robust, high-fidelity specimen that enables repeated hands-on investigation by maximising the preservation of sensitive brain structures and exposing the facial nerve and temporal area in a multilayered manner. While the dual-window dissection offers clear, accessible views of both superficial and deep anatomy, which is considered as ideal for teaching complex spatial relationships and clinical relevance; the sinus-based perfusion ensures long-lasting stability in contrast to traditional fixation methods, which frequently erode tissue integrity over time and/or fail to provide a complete overview of all the crucial structures.

Based on well-established procedures such as Grant's Dissector [2], this preparation method gives teachers a useful tool to connect basic information with surgical application, improving student comprehension and retention through hands-on experience with the specimen. The main benefit of this model is its immediate usefulness as a tangible, accurate resource for anatomical teaching, which will increase students' comprehension of anatomical clinical practice. Future developments, such as digital mapping, may enhance this model [6].

References

1. Standring, S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice (42nd ed.). Elsevier. (2020).
2. Detton, A. J.: Grant's Dissector (17th ed.). Wolters Kluwer. (2021).
3. Kumar, N., & Rahman, E.: Effectiveness of teaching facial anatomy through cadaver dissection on aesthetic physicians' knowledge. Advances in Medical Education and Practice, 8, 441–446. (2017).
4. Evans, D. J., & Watt, D. J.: Provision of anatomical teaching in a new British medical school: getting the right mix. Anatomical Record Part B: The New Anatomist, 284(1), 22–27. (2005).

5. Yammine, K., & Violato, C.: A meta-analysis of the educational effectiveness of three-dimensional visualization technologies in teaching anatomy. Anatomical Sciences Education, 8(6), 525–538. (2015).
6. AbouHashem, Y., Dayal, M., Savanah, S., & Štrkalj, G.: The application of 3D printing in anatomy education. Medical Education Online, 20(1), 29847. (2015).

26. Anatomical preparation of a female pelvis for demonstration and educational purposes

Benjamin Mimler
(General Medicine, 2. Year)

Co-authors: Simon Strünck, Pendar Donyawie, Valentin Thumfart
Supervisors: MUDr. Olia El Hassoun Secanska PhD.[1]., Mgr. Tomas Havranek, PhD.[1],
prof. MUDr. Stefan Polak, CSc.[1]
[1]Institute of Anatomy, LFUK Bratislava

Introduction

This paper describes the fixation and preparation of a female pelvis for anatomical demonstration and educational purposes. Methods, working steps and further possible techniques will be explained and finally discussed. Preservation methods include formalin and alcohol fixation. Physical dissection relating, the layer-by-layer technique was used, which led to an increased workload but also resulted in a more precise and clear anatomical display of muscles, organs, vessels, membranes and ligaments. Maintaining structural integrity was a key point in the whole process. A distinct demonstrational model of the uterine and perineal area, pelvic organs, pelvic diaphragm, perineum as well as associated important vessels and nerves, is going to be achieved. Students shall be provided with a lifelike, relational display of a female pelvis for better visualisation and understanding in the teaching context. The goal of this project is to improve the general understanding of students in topics of the female pelvis externally and internally, organs associated with urinary functions, anatomical positions and better spatial perception for surgical procedures or pathological processes. For detail enhancement, special dyes are going to be used in the procedure.

Cadaver dissection provides the possibility to understand the human body in situ. Regional and topographical knowledge rather than separate organ systems is key for future medical and surgical practice (1).

Methods

The female cadaver was obtained from the anatomical donation programme, following all ethical and legal guidelines. After a first visualisation, the body was generally anatomically prepared, embalmed and later fixed using a classical anatomical fixation solution consisting of 38% formalin, 96% alcohol, glycerine oil, sodiumchloride and water. The fixation solution was chosen to ensure epithelial elasticity and integrity for further working steps. After a minimum required time period, the specimen was treated by an alcohol-based solution to expel as much formalin as possible. Depending on working conditions and workability of the cadaver, alcohol was chosen, as it leaves the tissue softer to work with and provides a healthier and more comfortable working environment, as alcohol is not as gas-emitting as formalin (2).

After the expelling process and further fixation by alcohol, the cadaver was prepared for the cutting process. Considering the goal of this project, cranially a transversal-plane cut at the level of the fifth lumbar vertebra, without damaging the crista iliaca, was indicated. Caudally, both extremities were detached at the level of the articulation coxae, without disturbing the integrity of the acetabular fossa. Girdle muscles were separated with the limb. Only intrapelvic and pelvic diaphragm muscles remained in situ (3).

The now-separated female pelvis needed to be cleaned and dissected until the target structures were reached. We decided to preserve all pelvic organs and associated structures to be able to show real relations and spatial orientation. Further, the inferior and anterior views are intended to be demonstratively split into two halves, one superficial and one at the level of the pelvic diaphragm with preserved sphincters and pelvic floor musculature. A sagittal midline incision was performed at the perineal region, beginning at the superior border of the pubic symphysis until the apex of the coccyx. To preserve all rectal and vulval structures, the incision led around the left side of the labia majora and the external rectal sphincter. The superficial and deep fascia were separated to reveal the superficial perineal pouch. The next step included the detachment of all adipose tissue to reach vessels, nerves and muscles in the urogenital and rectal triangles as well as the ischiorectal fossa. Especially in the ischiadic region, this took a lot of effort, as it is crucial for humans to have abundant adipose tissue in the perineal region. It supports the pelvic floor, provides cushion while sitting and protects reproductive organs from damage. This makes dissection in the mentioned region particularly challenging. Human morphology is widely variable, bearing that in mind as the dissection proceeds, it is important to differentiate fine layers and structural variations. Fragile structures like the musculus bulbospongiosus or ischiocavernosus around the vaginal opening as well as the nervus perinealis or pudendus, which shall be preserved, represent a difficulty in the deeper dissections. It was crucial to proceed layer by layer to not damage any important structure. The peritoneum as well as the uterus were released by blunt dissection to facilitate an internal ventral view (4,5,6).

After finishing all dissectional steps, the pelvis was prepared for the dying process. We used Davidson® tissue marking dye, which is mainly utilised as a tissue dye in pathologic dissections for positional analysis in surgical specimen. The main focus of this task was to separate target structures and prevent unwanted colouration of other structures. Working with paper towels has proven itself useful, as it absorbs liquid and is easily deformable, hence exclusive colouration of wanted vessels or nerves. Acetic acid solution was used as mordant over all painted surfaces, ensures a faster drying and enhanced dye adherence for the final visualisation. Great importance was marked out concerning the course of the iliac artery and vein, including their bifurcations as well as the femoral nerve, including its branch, the iliacus nerve on the internal surface. Externally, on the posterior side, the sciatic nerve can be observed in the infrapiriform foramen, in addition to the pudendal nerve seen inside the ischiorectal fossa. Antero-lateral we can study a big part of the structures coursing through the femoral triangle, like the femoral artery or vein, exactly bifurcating at the point of dissection. For simplicity we decided to pick commonly used colours for visualisation. Red-painted structures display arteries; blue was used for veins and yellow for nerves.

Results

Generally, the project led to a full success. Tested techniques were proven to be useful, which resulted in a presentable model for educational purposes. During the process of preparation, a few difficulties were encountered. First and foremost, areas of excess adipose tissue inherited the problem of unwanted damage that is going to be seen in the final product. Especially the superficial layers of the ischiouterine fossa, which are rich in adipose tissue. Very slow and careful dissection was necessary to also not damage the musculus levator ani, which is a fairly thin muscle layer in the perineal region, easily cut if not carefully dissected.

Depicted in figure 1, we can clearly observe the bifurcation of the iliac artery and vein (Fig.1 A) into the external and internal iliac arteries. Especially the position and fact that these two vessels are surrounded and connected by a layer of adventitia serve as an excellent demonstration. Additionally, we were able to expose the femoral (Fig.1 B) and iliac (Fig.1 C) nerves coursing behind the left iliopsoas muscle. Further, the posterior deep rectouterine (Fig.1 D) and anterior shallow vesicouterine (Fig.1 E) pouches can be readily appreciated.

In the posterior view, figure 2, we generally recognise the levator ani muscle (Fig.2 A). Laterally, the sciatic nerve (Fig.2 B) can be seen coming out of the infrapiriform foramen. Medially, the pudendal nerve (Fig.2 C) running through the ischiorectal fossa is clearly visible.

Figure 3 shows, antero-laterally, the cranial portion of the femoral triangle, including branches of the femoral nerve (Fig.3 A), the common femoral artery bifurcating into the superficial (Fig.3 B) and profund femoral (Fig.3 C) arteries, as well as the common femoral vein bifurcating into the superficial femoral (Fig.3 D) and profund femoral (Fig.3 E) veins running next to the great saphenous vein (Fig.3 F), which can be excellently observed.



Figure 1: A superior view on the prepared topographical region of the female pelvis: A) Iliac Artery & Vein; B) Femoral Nerve; C) Iliac Nerve; D) Rectouterine Pouch; E) Vesicouterine Pouch.

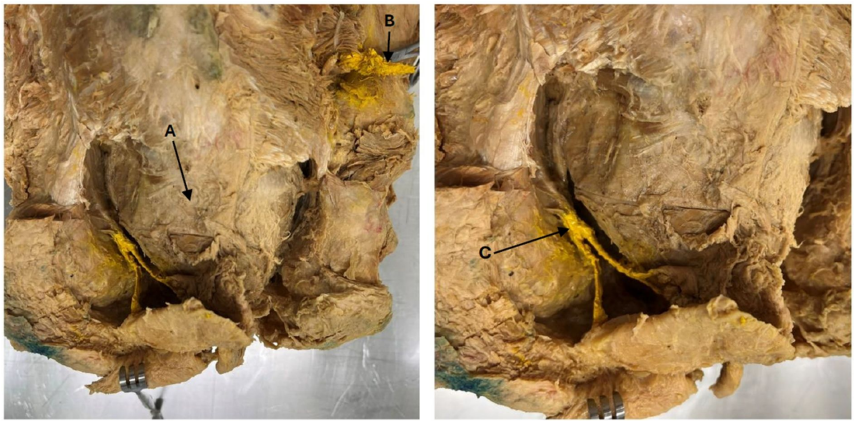


Figure 2: A superior view on the internal structures of the prepared topographical region of the female pelvis: A) Levator Ani Muscle; B) Sciatic Nerve; C) Pudendal Nerve.



Figure 3: A lateral view on the internal structures of the prepared topographical region of the female pelvis: A) Branches of the Femoral nerve; B) Superficial Femoral Artery; C) Profund Femoral Artery; D) Superficial Femoral Vein; E) Profund Femoral Vein; F) Great Saphenous Vein.

Discussion

The chosen dying method with tissue marking dyes has proven itself to be very useful. Colours attached onto the vessels or nerves adhered well on their surface. A clean preparation with towels and retainers before the dying process is crucial. Correct handling of the dyes is

indicated. The usage of too much dye on the brush can lead to crumbling or falling off of the colour after the drying process, which reduces the colouration of wanted vessel.

In the project, we were aiming for an excellent representation of a female pelvis to provide future doctors a significant advantage for their education in gynaecology and anatomy. Complicated procedures such as a pelvic exenteration, diverse pelvic prolapses, a hysterectomy or even a more routine intervention like punctures are better understood and even better spatially visualised. A model like this could be the only chance for medical students to visualise the pelvic content openly. Anterior traction and retrotracion of the uterus allow to explore and fully understand the system of pouches formed by the peritoneum, like the recto-uterine pouch (space of Duglas or cul-de-sac) and the vesico-uterine pouch. Furthermore, the dying of vessels and nerves enables us to properly display possible issues which could be encountered during these procedures. A proper understanding of the course of these structures is crucial to ensure the future patient's safety and increase the success of undergone measures. The further understanding and ability to visualise diagnostic procedures like a culdocentesisor a digital-rectal-examination as well as pathologic conditions like a rectocele, eneterocele or cystourethrocele along with treatment procedures like a hysterectomy or episiotomy is beneficial for the overall studying success and future execution of mentioned procedures (7).

The model proves to be an immensely useful tool for educational explanations and self-studies. As diverse studies verify the meaningfulness of human cadaveric models for visualisation and the overall importance of dissection done by medical students, we are sure that this preparation will help educational staff to better visualise internal and external pelvic structures as well as spatial orientations relating the pelvic floor, perineal area and internal pelvic structures (8,9).

The preparation of a model pelvis for educational purposes was successful. The colouring technique, which was tested, proved to be very useful. All important structures we aimed for to point out are reasonably presented and usable to show as model in further educational settings.

Future directions for improving anatomical preparations include an additional staining of vessels with silicone-based dye injected directly into the lumen of needed vessels, which will further improve the visibility and relational view concerning a whole picture of the chosen area.

References

7. Selcuk, İ., Tatar, I., & Huri, E. (2019). Cadaveric anatomy and dissection in surgical training. *Turkish journal of obstetrics and gynecology*, *16*(1), 72–75.
8. Rahman, M. A., Sultana, N., Ayman, U., Bhakta, S., Afrose, M., Afrin, M., & Haque, Z. (2022). Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphologic and molecular analysis of tissues. Saudi journal of biological sciences, 29(1), 175–182. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.075
9. Callas, G. (1994). Manual for Human Dissection: Photographs with Clinical Applications. McGraw-Hill/Appleton & Lange.
10. Paulsen, F., Waschke, J., Klonisch, T., & Hombach-Klonisch, S. (2011). Sobotta - Atlas of Human Anatomy, General anatomy and musculoskeletal system.

11. Platzer, W. (2011). Color Atlas of Human Anatomy, Vol. 1: Locomotor System. Thieme.
12. Fritsch, H., & Kuehnel, W. (2011). Color Atlas of Human Anatomy, Vol. 2: Internal Organs. Thieme.
13. Barton, Desmond & Heath, Owen & Shahnawaz, Rasheed & Sheng, Qiu & Alan, Thompson & Pardeep, Kumar. (2025). Pelvic Exenteration for Central Pelvic Cancer. 10.1007/978-3-031-66772-5_38.
14. Chaudhari, G., Sonawane, M., & Singel, T. C. (2020). Importance of the human cadaveric dissection for learning anatomy by the first year MBBS students – An observational study. Indian Journal of Clinical Anatomy and Physiology, 7(2), 177–181. https://doi.org/10.18231/j.ijcap.2020.036
15. Kalthur, S. G., Pandey, A. K., & Prabhath, S. (2021). Benefits and pitfalls of learning anatomy using the dissection module in an indian medical school: A millennial Learner's perspective. Translational Research in Anatomy, 26, 100159. https://doi.org/10.1016/j.tria.2021.100159

27. Development and validation of a 3D printed simulation model for minimally invasive oesophageal atresia repair

Yelyzaveta Yatsyk
(general medicine, 6. year)

Supervisor: MUDr. Petra Zahradníková PhD., MPH [1]
Department of Pediatric Surgery, Faculty of Medicine, Comenius University and National Institute of Children's Diseases, Bratislava, Slovakia

Introduction

The pathology of oesophageal atresia is an infrequent, life-threatening disorder that requires quick and professional actions from pediatric surgeons. [1] For a long period of time as a standard technique of defect removal was used the posterolateral open approach, but currently, surgical teams are increasingly giving preference to newer advantageous minimally invasive methods. [2] Decreased size of surgical cuts, lower incidence of contamination and infection occurrence, higher rate of accuracy, and shortened period of hospital stay are just some of the benefits of thoracoscopy. [3] Despite the presence of various advantages listed by many authors, the thoracoscopic approach is still avoided in some centers due to the general complexity of the procedure, high requirements from the training skills of the operator, and the newborn's body space peculiarities. [4, 2] Conventionally, surgical techniques education was carried out according to the principle of observation and further repetition of actions under the guidance of a leading surgeon in operative theatre. Nevertheless, numerous risk factors encountered in pediatric surgery, concretely concerning the most susceptible to complications patients, neonates, are prompting the search for new ways of acquiring valuable expertise. One of the most productive and secure ways of increasing experience level and expanding the set of skills in minimally invasive surgery is to perform training on simulation models of various types. [5] 3D printed simulators, virtual reality devices, trainers for specific tasks, and animal models have already been created and used worldwide for oesophageal atresia repair procedure mastering. [6, 7, 8] 3D printed inanimate models play a crucial role in different fields of surgical teaching, as the devices convey realistic feedback using safe materials without ethical restrictions and allow to spend sufficient training time in a decreased-stress environment. [9] Therefore, the development and validation of a modern and low-cost synthetic model for thoracoscopic oesophageal atresia repair may prove extremely useful for creating an effective educational platform for pediatric surgery specialists with different levels of knowledge. In addition, the obtained online survey answers will expand the current views on the degree of minimally invasive surgery simulation devices participation in the education of pediatric surgeons and indicate central simulation demands, which are missing in the pediatric surgery departments of Slovakia and the Czech Republic. The importance of this work is stressed by the fact that there

is almost no information in scientific resources about the overall status of simulation technologies development and the needs of Slovak and Czech surgical professionals.

Methods

Beforehand, the following study was analyzed and ethically approved by the National Institute of Children's Diseases Institutional Review Board. The research was conducted from 2022 to 2024 and consisted of several main stages:

1) development of the simulation Model 1 using 3D printing technologies;

2) creation of a questionnaire aimed at identifying:

- pediatric minimally invasive surgeries commonness and surgeons' self-declared level of experience in the departments of Slovakia and Czech Republic,
- how relevant is the use of simulation models in skills development of pediatric surgeons in the departments of Slovakia and the Czech Republic,
- suitability of simulators for surgical training;

3) conducting a simulation and assessment of the newly developed model and commercial model with subsequent carrying out the online anonymous survey (available on Google Forms) during the 68th Czech and Slovak Pediatric Surgery Congress;

4) processing of the obtained data using special statistical tools.

To obtain a realistic simulation, a model based on an already existing tomographic image of 1-month-old neonate with a body weight of 3200 grams was used. Informed consent from parents was previously received. The next step was the transformation of cross-sectional images by specialized software 3DSlicer into a configuration suitable for 3D printer use. As a result, the trachea and oesophagus were converted into 3D models. Tracheal structures were printed on a special device (Phrozen Mighty 8K resin-based 3D printer) from Flex Resin material that hardened with ultraviolet light exposure. Eventually, rigid tracheal parts were put in 98% alcohol to get rid of residual polymers. Selected material provided sufficient detailing, human-like trachea surface finish, and balanced flexibility of inanimate trachea. Distal and proximal parts of the oesophagus were created by filling the 3D-printed forms with a pigmented silicone Ecoflex 00-30. Both silicone parts of the oesophagus were modified with a fine mesh. The Model 1 was assembled and sealed with silicone adhesives in its entirety to ensure that fabricated components fit together densely.

The sample for this study was presented by qualified pediatric surgeons with various sets of skills corresponding to their accumulated knowledge. Thus, to get more accurate results, all participants were divided into two groups based on the length of their working experience: "inexperienced" – novice surgeons in the first ten years of their occupational activity and "experienced" – advanced professionals with a longer seniority in the pediatric surgery department. For the study, two models of oesophageal atresia and tracheoesophageal fistula were selected: newly constructed Model 1 and commercial Model 2 (LAPARO ® Medical Simulators). To ensure a consistent understanding of the main tasks during the simulation and to compensate for the possible lack of beginner's knowledge, video tutorials were prepared for each trainee. Additionally, were provided the Laparo Advance and Laparo Analytic simulation tools. Training took place on one of the presented models. The practical session

was time-limited, up to thirty minutes were allotted for each. After completing the practical activity, every participant was asked to evaluate models by supplying information about the face and content validation of both models according to the Likert scale (from one to five points).

Statistical analysis

Statistical processing of the obtained data was carried out using SPSS version 24 (IBM, USA). The result was considered statistically reliable if the p-value did not exceed 0.05. Content and face validity results were presented as mean with standard deviation. Since the Likert scale led to few responses in certain categories, Fisher's exact test was used to identify the significance between categorical variables in that case. Via t-test was analyzed parametric data and chi-square test was utilized for other non-parametric values.

Results

A total of 33 pediatric surgeons from Slovakia and the Czech Republic took part in the research. The majority – 15 respondents (46%) belonged to the youngest age group of 25-35 years. According to the length of professional experience in pediatric surgery, the prevalent category was advanced participants, which comprised approximately 55% of the selection. The annual frequency of minimally invasive surgical interventions in the departments of 12 participants (37%) was more than 151 operations during the year.

The results of self-evaluated competence turned out to be significant (p-value was 0.022): the majority (47%) of inexperienced surgeons defined their knowledge as "insufficient" when half of the experienced group self-assessed themselves as professionals with higher-level expertise (50% chose the option "good"). It should be noted that despite the positive correlation between being experienced and reporting better minimally invasive surgical competence, 17% of advanced trainees were still not satisfied with their skills rate, and only one experienced individual ranked his expertise as "very good" (as demonstrated in Figure 1).

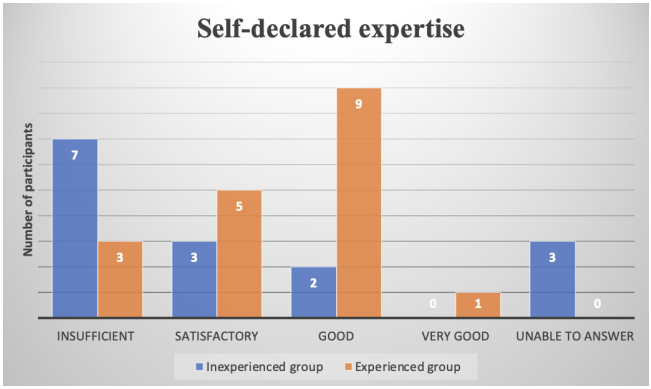


Figure 1 Self-declared expertise of inexperienced and experienced groups

Also was investigated the situation with the implementation of simulation sessions on different devices in the daily work schedule and it was revealed an inversely proportional relationship between trainees' experience level and the presence of minimally invasive skills training possibility at the workplace (p-value was 0.022): 73% of inexperienced professionals were able to improve their knowledge using laparoscopic simulators in opposition to only 33% in the advanced group. There were no significant differences between other answers. The overall analysis of training frequencies showed that just 18% could use simulators multiple times per week and 24% had the opportunity to perform sessions less often than monthly. A large proportion of surgeons, regardless of their qualifications, agreed that systematically practicing could improve professional abilities.

Simulator validation

In the validation process took part 30 participants (18 experienced individuals and 12 – inexperienced, respectively). Statistical processing with Fisher's exact test did not show significant differences in either the comparison between experienced and inexperienced groups or the comparison between Model 1 and Model 2 in content validity assessment. Mean score of Model's 1 content validity was 3.9, so it was generally evaluated as satisfactory and useful tool. During face validity evaluation was found a considerable alteration of scores that were given during working space parameter rating (p-value was 0.030), results are provided in Table 1. Other assessed parameters of face validity were found to be statistically insignificant. Mean score of Model's 1 face validity was 3.6, so it was generally evaluated as satisfactory quality tool.

Characteristics	Inexperienced group (n=12)	Experienced group (n=18)	p value
Face validity (mean score [SD])	3.9 [0.1]	3.5 [1.3]	0.083∗
Realism of experience (mean score [SD])	4 [0.7]	3.8 [0.7]	0.223∗
Positioning of TEF and esophageal pauches (mean score [SD])	3.9 [0.6]	4 [0.6]	0.411∗
Haptic feedback on materials (mean score [SD])	4.1 [0.3]	3.7 [0.5]	0.542∗
Working space (mean score [SD])	4.1 [0.7]	3.4 [0.9]	0.030∗
Difficulty (mean score [SD])	3.9 [0.4]	3.9 [0.6]	0.210∗
Overall impression (mean score [SD])	4.6 [0.4]	4.6 [0.5]	0.202∗

Table 1 Face validity evaluation: results from the Likert Scale Survey (∗ Fisher's exact test, SD – standard deviation)

Discussion

Our conducted research revealed that most experienced and inexperienced respondents completed around the same number of operations in the role of assistant and leading surgeon. At the same time, a positive correlation (p-value = 0.022) between the level of proficiency and self-identified competence was shown. Nevertheless, almost 17% of experienced survey participants considered their knowledge insufficient, and just 6% were completely satisfied. Such results highlighted the need for inexperienced and even advanced professionals to continue actively enhancing minimally invasive skills. Markel et al. reported in their study that only a third part of young specialists from different European countries could, without difficulties, gain minimally invasive surgical experience. The majority nowadays can face multiple barriers: budgetary limitations, laparoscopic procedures being predominantly managed by experienced surgeons, a deficit of specialized instruments, the absence of competent guides. [10] Therefore, it is essential to use alternative routes of teaching, such as simulator training.

Additionally, participants of the Pediatric Surgery Congress declared that approximately 49% could not practice on laparoscopic models in their institutions. Evaluation of access to simulation devices in the surgical departments of the United States demonstrated that only 2% of participants had no opportunity to visit simulation facilities, while 76% of junior doctors attended educational activities at least monthly. [11] Simultaneously, the majority of the Congress participants stated that they were able to train just less than monthly. Thus, limited minimally invasive training abilities in Slovakia and the Czech Republic can be explained by shortcomings in funding and indicate an urgent need to pay sufficient attention to introducing technological innovations into the educative training programs and enhancing the competency of experienced surgeons.

Data about variable 3D models for oesophageal atresia repair already existed in the literature. Wells et al., Zahradnikova et al., and Youn et al. have previously reported on the creation of high-fidelity synthetic models (using a similar principle of 3D printing and silicone as material for the oesophageal pouches construction) and their subsequent analysis. [12, 13,14]

Conducted analysis of the content and face validity has shown that the weakest point of the Model's 1 face validity was working space (3.8 ± 0.24). Furthermore, the difference between experienced and inexperienced groups evaluating this parameter was statistically significant (p value = 0.030). The following outcome can be interpreted differently: novice surgeons probably were comforted with the training field provided by Model 1 and found it broad enough to practice specific skills. In opposition, experts with a certain amount of experience have more realistic space limitations acquired for improvement. It is worth noting that in some previously introduced simulators, the most vulnerable aspect was either the upper oesophageal segment characteristics [14] or the required force for putting trocars (as a part of the realism assessment). [13]

References

1. Baldwin DL, Yadav D. Esophageal Atresia. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024 [cit. 18.10.2024]. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560848/

2. Drevin G, Andersson B, Svensson JF. Thoracoscopy or thoracotomy for esophageal atresia. Annals of Surgery. 2020;274(6):945-953. doi:10.1097/sla.0000000000004239
3. Blinman T, Ponsky T. Pediatric minimally invasive surgery: laparoscopy and thoracoscopy in infants and children. PEDIATRICS. 2012;130(3):539-549. doi:10.1542/peds.2011-2812
4. Bawazir O. Thoracoscopy in pediatrics: Surgical perspectives. Annals of Thoracic Medicine. 2019;14(4):239. doi:10.4103/atm.atm_114_19
5. Patel EA, Aydın A, Desai A, Dasgupta P, Ahmed K. Current status of simulation-based training in pediatric surgery: A systematic review. Journal of Pediatric Surgery. 2018;54(9):1884-1893. doi:10.1016/j.jpedsurg.2018.11.019
6. Glenn IC, Bruns NE, Schomisch SJ, Ponsky TA. Creation of an esophageal atresia animal model using a bifurcated esophagus to maintain digestive tract continuity. Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. 2017;27(10):1079-1084. doi:10.1089/lap.2017.0180
7. Neville JJ, Chacon CS, Haghighi-Osgouei R, Houghton N, Bello F, Clarke SA. Development and validation of a novel 3D-printed simulation model for open oesophageal atresia and tracheo-oesophageal fistula repair. Pediatric Surgery International. 2021;38(1):133-141. doi:10.1007/s00383-021-05007-9
8. Palmisani F, Sezen P, Haag E, Metzelder ML, Krois W. The “chicken-leg anastomosis”: Low-cost tissue-realistic simulation model for esophageal atresia training in pediatric surgery. Frontiers in Pediatrics. 2022;10. doi:10.3389/fped.2022.893639
9. Ghazi AE, Teplitz BA. Role of 3D printing in surgical education for robotic urology procedures. Translational Andrology and Urology. 2020;9(2):931-941. doi:10.21037/tau.2020.01.03
10. Markel M, Lacher M, Hall NJ, et al. Training in minimally invasive surgery: experience of paediatric surgery trainees in Europe. British Journal of Surgery. 2023;110(10):1397-1399. doi:10.1093/bjs/znad245
11. Schlottmann F, Tolleson-Rinehart S, Kibbe MR, Patti MG. Status of Simulation-Based training in departments of Surgery in the United States. Journal of Surgical Research. 2020;255:158-163. doi:10.1016/j.jss.2020.05.041
12. Wells JM, Nair D, Cook N, et al. End-User Input into the Design and Validation of a Synthetic Thoracoscopic Esophageal Atresia/Tracheo-Esophageal Fistula Simulator. Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. 2020;30(6):685-691. doi:10.1089/lap.2019.0600
13. Youn JK, Ko D, Yang HB, Kim HY. A 3D printed esophageal atresia–tracheoesophageal fistula thorascopy simulator for young surgeons. Scientific Reports. 2024;14(1). doi:10.1038/s41598-024-62154-4
14. Zahradniková P, Babala J, Pechanová R, et al. Inanimate 3D printed model for thoracoscopic repair of esophageal atresia with tracheoesophageal fistula. Frontiers in Pediatrics. 2023;11. doi:10.3389/fped.2023.1286946

28. Úloha črevnej mikrobioty a fekálnej mikrobiálnej transplantácie v patogenéze reumatoidnej artritídy

Mgr. Paulína Belvončíková

(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Kristína Macáková [1], Nikola Tóthová [1], Pavel Babál [2], Lenka Tarabčáková [3], Roman Gardlík [1]

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

[1]Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, [2]Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, [3]Klinika reumatológie, Nemocnica svätého Michala, Bratislava

Úvod

Reumatoidná artritída (RA) je chronické systémové autoimunitné ochorenie, charakterizované progresívnym zápalom kĺbov, prítomnosťou protilátok proti citrulinovaným proteínom, reumatoidného faktora (RF) a zvýšenou hladinou prozápalových cytokínov [1,2]. Kľúčovými rizikovými faktormi RA sú genetická predispozícia, pohlavie a environmentálne vplyvy, no presná etiopatogéneza zostáva nejasná [3].

Množstvo štúdií poukazuje na úlohu orálnej mikrobioty v patogenéze RA [4–6]. Stimulácia imunitného systému však môže pochádzať aj z mikrobioty osídľujúcej iné časti tela, konkrétne črevnej mikrobioty. Črevo predstavuje najhustejšie osídlený a najkomplexnejší ekosystém v ľudskom tele [7]. Črevné baktérie produkujú metabolity, napríklad mastné kyseliny s krátkym reťazcom, ktoré môžu modulovať imunitnú odpoveď, viesť k zvýšenej produkcii prozápalových cytokínov a narušeniu rovnováhy imunitného systému. Zároveň, metabolity invazívnych patogénnych baktérií v čreve môžu prenikať do krvného obehu, opäť tak stimulovať imunitu a podporovať systémový zápal [8–10].

Narušenie imunitnej rovnováhy spôsobené dysbiózou črevnej mikrobioty sa preukázateľne spája so vznikom, prípadne zhoršením prognózy, mnohých autoimunitných ochorení, vrátane RA [11,12]. Viaceré štúdie poukazujú na zmeny v zložení črevnej mikrobioty u RA pacientov [13,14]. Napríklad baktéria *Prevotella* je spájaná so zvýšeným rizikom vzniku a závažnosťou príznakov RA prostredníctvom modulácie imunitnej odpovede v prospech prozápalových dráh [15]. Naopak, prítomnosť baktérií *Akkermansia a Bifidobacterium* indukuje protizápalové dráhy imunitného systému a obnovuje črevnú homeostázu [16].

Tieto poznatky vyvolali záujem o terapeutické stratégie zamerané na črevnú mikrobiotu, vrátane fekálnej transplantácie (FMT). FMT spočíva v prenose črevných baktérií od zdravého darcu do čreva príjemcu [17]. Táto metóda bola pôvodne aplikovaná na liečbu opakujúcich sa infekcií *Clostridioides difficile*, avšak klinické štúdie preukázali pozitívne účinky aj v prípade iných autoimunitných ochorení, ako psoriatická artritída alebo celiakia [18]. Prvé klinické štúdie naznačujú, že FMT by mohla pomôcť taktiež zmierniť príznaky RA [19].

Zvieracie modely sú nevyhnutným nástrojom pre pochopenie patogenézy ochorenia a testovanie nových terapeutík. Jedným z najčastejšie používaných modelov RA je model kolagénom indukovanej artritídy (CIA) [20]. Najčastejšie využívaným kmeňom myší v CIA modeli sú myši DBA/1J [21]. Použitie rôznych iných myších kmeňov s odlišnou dysreguláciou imunitného systému, napríklad kmeň myší Aire^{-}/$^{-}$, by však mohlo pomôcť objasniť úlohu črevnej mikrobioty v špecifických autoimunitných dráhach [22].

Primárnym cieľom tejto štúdie bolo preskúmať úlohu črevnej mikrobioty v patogenéze RA pomocou dvoch kmeňov myší, DBA/1J a Aire^{-}/$^{-}$, s využitím CIA modelu a metódy FMT. Poznatky vychádzajúce z tejto štúdie môžu v budúcnosti ponúknuť nové stratégie liečby u pacientov s autoimunitnými ochoreniami.

Materiál a metódy

1. Darcovia FMT - pacienti

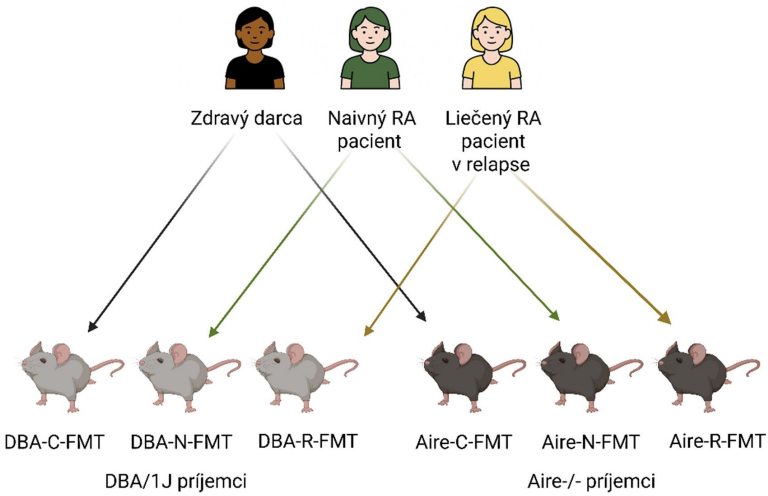
Vzorky stolice boli odobrané od RA pacientov a zdravých kontrol rovnakého veku a pohlavia. Diagnóza RA bola stanovená podľa kritérií Európskej ligy proti reumatizmu a pacienti boli oslovení v spolupráci s reumatologickou ambulanciou Nemocnice svätého Michala v Bratislave. Vzorky boli po odbere spracované do 2 hodín, pričom 30 g čerstvo odobratej stolice darcu bolo homogenizovaných v sterilnom fyziologickom roztoku. Veľké častice boli odstránené centrifugáciou a supernatant bol zmrazený pri −80 °C.

2. Príjemci FMT – zvierací model CIA

Pre účely štúdie bolo použitých 11 samíc myší DBA/1J (Kmeň #000670, Jackson Laboratory) a 9 samíc myší Aire^{-}/$^{-}$ (Kmeň #004743, Jackson Laboratory). Na začiatku experimentu oba kmene myší absolvovali antibiotickú liečbu po dobu 14 dní roztokom antibiotík rozpustených vo vode. Následne boli myši oboch kmeňov rozdelené do troch skupín podľa typu podávaneho FMT: od zdravých darcov, naivných RA pacientov bez liečby a liečených RA pacientov v relapse (Obr. 1). Všetkým skupinám bola indukovaná CIA, a to pomocou hovädzieho kolagénu typu II u DBA/1J myší a kuracieho kolagénu u Aire^{-}/$^{-}$ myší. Model CIA trval celkovo 10 týždňov. Počas doby trvania experimentu bolo FMT podávané opakovane orálnou sondou v objeme 250 µL v intervale 7 dní.

3. Analýza črevnej mikrobioty

Vzorky stolice od myších príjemcov boli zbierané pred indukciou CIA a počas 5. a 10. týždňa trvania experimentu. Genomická DNA zo vzoriek fekálnych transplantátov darcov a stolíc myších príjemcov bola izolovaná pomocou komerčného QIAamp Fast DNA Stool Mini kitu. Variabilná oblasť V4 génu 16S rRNA bola amplifikovaná a vzorky boli sekvenované pomocou MiSeq platformy Illumina v spoločnosti BioVendor MDx, Brno, Česká republika. Kvalita sekvenačných dát vo formáte fastq bola posúdená pomocou nástroja FastQC (verzia 0.11.9). Na odstránenie nekvalitných čítaní bol použitý nástroj Fastp (verzia 0.23.2). Sekvencie primerov boli odstránené pomocou Cutadapt (verzia 3.5). Dáta boli ďalej spracované balíkom DADA2 (verzia 1.22.0) na generovanie ASV (ang. amplicon sequence variant). Taxonómia bola priradená pomocou IDTAXA klasifikátora balíka DECIPHER (verzia 2.22.0) s referenčnou databázou SILVA SSU r138.



Obr. 1. Experimentálne skupiny

4. Analýza závažnosti artritídy

Závažnosť artritídy bola vizuálne hodnotená pomocou skórovacieho systému 0-4 bodov pre každú labku v pravidelných intervaloch raz za týždeň. Súčasne bol meraný opuch labiek digitálnym pletysmometrom a teplota labiek infračervenou termografiou. Na konci experimentu boli zvieratá uspané inhalačnou anestézou 3 % izofluranu. Následne im bola odobraná krv z retroorbitálneho plexu. Krvný obraz bol analyzovaný pomocou hematologického analyzátora Abacus VET 5. Plazma bola centrifugovaná pri 1600 g počas 10 minút pri teplote 4 °C. Koncentrácie zápalových cytokínov v plazme boli stanovené pomocou analýzy LEGENDplex a prietokovej cytometrie prístrojom DxFLEX. Predné a zadné labky boli odobraté na histologickú analýzu. Tkanivá boli farbené hematoxylínom-eozínom a chloracetát-esterázou pre analýzu hrúbky synoviálnej membrány a infiltrácie neutrofilov.

5. Štatistická analýza

Štatistické vyhodnotenie a vizualizácia údajov boli vykonané pomocou softvéru GraphPad Prism (verzia 8.0.10). Na analýzu mikrobiomových dát bol primárnym nástrojom použitý softvér RStudio (verzia 4.2.1). Rozdiely medzi skupinami boli analyzované pomocou ANOVA testu a Bonferroniho post-hoc testov. Rozdiely boli považované za štatisticky signifikantné, ak p-hodnoty boli menšie ako 0,05. Prezentované výsledky boli vizualizované ako priemer ± štandardná chyba priemeru. Schémy boli vytvorené pomocou Biorender.com.

Výsledky

1. Analýza črevnej mikrobioty

Výsledky PCA analýzy osekvenovaných vzoriek stolice myší poukázali na špecifické zoskupovanie zodpovedajúce časovým bodom pred (0. týždeň) a po aplikácii FMT (5. a 10. týždeň), pričom vzorky po FMT vykazovali prekryv zoskupenia, a teda podobné zloženie mikrobioty. Navyše, PCA analýza vzoriek po FMT odhalila špecifické zoskupovanie vzoriek podľa kmeňa myších príjemcov.

RDA analýza črevnej mikrobioty na úrovni rodu v Aire^{-}/$^{-}$ myšiach odhalila významné rozdiely v zložení mikrobioty medzi skupinami, ktoré prijali rôzne FMT (R^2=0,501; p<0,001). Tieto rozdiely boli pozorované v rodoch *Butyricimonas, Marvinbryantia, Ureaplasma, Prevotellaceae UCG-001, Paraprevotella, Candidatus Saccharimonas, Lachnospiraceae UCG-008, Hungatella, Catenibacterium, Parabacteroides* a *Dielma* (p<0,01). Menšie, ale relevantné zmeny boli zaznamenané v rodoch *Bifidobacterium, Parasutterella, Lachnospiraceae FCS020 group, Enterorhabdus, Allobaculum, Monoglobus, Anaeroplasma, Tuzzerella, Coprobacter, Romboutsia, Turicibacter, Barnesiella, Enterobacter,* a *[Ruminococcus] gauvreauii group* (p<0,05).

Podobne, RDA analýza črevnej mikrobioty na úrovni rodu bola vykonaná aj v DBA/1J myšiach (R^2=0,500; p<0,001). Najvýznamnejšie rozdiely boli pozorované v rodoch *[Eubacterium] nodatum group, Pseudogracilibacillus, Phascolarctobacterium, Bifidobacterium, Eggerthella, Paraprevotella, Akkermansia, Fusobacterium, Anaerostipes* a *Sutterella* (p<0,001). Okrem toho boli významné rozdiely zaznamenané aj v rodoch *Alistipes, Parabacteroides, Staphylococcus, Gordonibacter, Atopostipes, Faecalibaculum* a *Holdemania* (p<0,01). Menšie zmeny sa prejavili v rodoch *Corynebacterium, Facklamia, Marvinbryantia, [Eubacterium] ventriosum group, Odoribacter, Candidatus Stoquefichus, Parasutterella, Barnesiella, Allobaculum, [Clostridium] innocuum group* a *Hungatella* (p<0,05).

2. Analýza závažnosti artritídy

V Aire^{-}/$^{-}$ kmeni myší neboli pozorované významné rozdiely v RA skóre medzi FMT skupinami v priebehu sledovaného obdobia (časový bod: p=ns; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Relatívna telesná hmotnosť myší sa síce v priebehu času zvyšovala, avšak bez významných rozdielov medzi skupinami (časový bod: p<0,01; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Rovnako nebol zaznamenaný žiadny účinok transplantácie FMT na objem predných ani zadných labiek (časový bod: p=ns; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Teplota labiek sa v priebehu času zvyšovala, avšak bez významných rozdielov medzi FMT skupinami (časový bod: p<0,001; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Histologická analýza nepreukázala významné rozdiely v hrúbke synoviálnej membrány (p=ns), ani v počte neutrofilov infiltrujúcich synovium (p=ns). Pri analýze celkového krvného obrazu sa nezistili žiadne významné rozdiely v počtoch bielych krviniek, lymfocytov, monocytov, neutrofilov a koncentráciách prozápalových cytokínov v plazme (p=ns).

V DBA/1J myšiach RA skóre stúpalo v priebehu času, avšak FMT nemalo na tento trend žiadny vplyv (časový bod: p<0,001; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Relatívna telesná hmotnosť sa v DBA/1J myšiach počas experimentu nemenila (časový bod: p=ns; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Objem labiek sa zvyšoval v priebehu času bez významného vplyvu FMT (časový bod: p<0,01; skupina: p=ns; interakcia: p=ns). Teplota labiek v DBA/1J myšiach sa menila v priebehu času, opäť nezávisle od transplantácie FMT (časový bod: p<0,001; skupina: p=ns; interakcia:

p<0,01). U myší, ktoré dostávali FMT od RA pacientov, bola pozorovaná zvýšená hrúbka synoviálnej membrány v predných labkách (p<0,05). Žiadne významné rozdiely neboli zaznamenané v zadných labkách (p=ns), ani v počte neutrofilov infiltrujúcich synovium (p=ns). Post hoc Dunnov test s Bonferroniho korekciou odhalil zníženú koncentráciu MCP-1 v skupine DBA-N-FMT v porovnaní s kontrolnou skupinou (p<0,05), avšak žiadne ďalšie rozdiely v prozápalových cytokínoch neboli pozorované (p=ns). V DBA/1J myšiach bola pozorovaná významná pozitívna korelácia medzi skóre RA a rodom *Bifidobacterium* a *Paraprevotella* (p<0,05), čo naznačuje ich možnú súvislosť s progresiou RA. Naopak, rody *Corynebacterium, Aerococcus, Enterorhabdus, Butyricicoccus* a *Odoribacter* vykazovali významnú negatívnu koreláciu so skóre RA (p<0,05).

Diskusia

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo preskúmať úlohu črevnej mikrobioty v patogenéze RA pomocou modelu CIA v kombinácii s metódou FMT. V tejto práci boli použité dva rôzne kmene myší. Zatiaľ čo myši kmeňa DBA/1J sú široko používané v modeloch CIA [21], aplikácia kmeňa Aire^{-}/$^{-}$ predstavuje novú stratégiu štúdia patogenézy RA. Doposiaľ boli Aire^{-}/$^{-}$ myši využité v experimentálnych modeloch autoimunitných ochorení, ako je Sjögrenov syndróm [23] či autoimunitná hepatitída [24], avšak experimentálne štúdie zamerané na RA doposiaľ chýbajú.

Najnovší výskum naznačuje, že črevná mikrobiota môže zohrávať dôležitú úlohu pri vzniku a progresii mnohých autoimunitných ochorení. Klinické štúdie poukazujú na zmeny v zložení črevnej mikrobioty u pacientov s RA. Napríklad, zvýšená relatívna abundancia *Escherichia-Shigella* a znížená relatívna abundancia rodov *Alloprevotella, Lactobacillus, Enterobacter* a *Odoribacter* bola pozorovaná u pacientov s RA v porovnaní so zdravými jedincami [25]. Tieto zistenia naznačujú, že stratégie zamerané na moduláciu črevnej mikrobioty by mohli byť novým potenciálnym terapeutickým nástrojom.

Metóda FMT bola preukázaná ako účinná pri liečbe infekcií *Clostridioides* [18]. V tejto štúdii bolo podávané FMT z troch skupín darcov: zdravých jedincov, naivných RA pacientov a liečených RA pacientov v relapse, ktoré boli myšiam kontinuálne transplantované raz týždenne počas indukcie CIA modelu. Počiatočná PCA analýza ukázala výrazné zoskupenie vzoriek pred a po FMT, čo naznačuje zmenu v zložení črevnej mikrobioty po transplantácii a úspešnosť procedúry FMT. Tieto zistenia podporila následne aj RDA analýza, kde sa príslušné vzorky príjemcov myší zoskupovali na základe prijatého FMT. Výsledky taktiež naznačujú špecifickú kolonizáciu podľa kmeňa myší z rovnakých FMT darcov, čo indikuje, že výber kmeňa myší môže ovplyvniť výsledky experimentálnych FMT štúdií.

Následné analýzy identifikovali niekoľko špecifických baktérií u myší transplantovaných FMT od zdravých darcov ako aj od pacientov. Bez ohľadu na kmeň myší sa vo všetkých analýzach zistila zvýšená relatívna abundancia rodu *Bifidobacterium* v CTRL-transplantovaných myšiach. Tento rod predstavuje bežné probiotikum, často prítomné v probiotických potravinách a doplnkoch výživy, ako aj v zdravom gastrointestinálnom trakte. 41 Prekvapivo bola skupina Aire-C-FMT obohatená aj o rody *Paraprevotella, Prevotellaceae UCG-001* a *Parabacteroides*. Súčasné klinické štúdie naznačujú príčinnú úlohu týchto baktérií vo vzniku RA [26]. Obohatenie rodiny *Prevotellaceae* a rodu *Prevotella* bolo zistené aj v preklinických štádiách RA [15]. Výsledky tak naznačujú, že črevná mikrobiota zdravých jedincov môže obsahovať druhy úzko spojené s nástupom RA.

Okrem zhrubnutia synoviálnej membrány predných labiek sa nezistili žiadne významné rozdiely v RA skóre, relatívnej telesnej hmotnosti, objeme labiek, teplote labiek či v neutrofilovej infiltrácii synovia medzi skupinami s rôznymi FMT. Rovnako neboli pozorované žiadne rozdiely v systémovej zápalovej odpovedi s výnimkou chemokínu MCP-1, ktorý hrá úlohu v nábore monocytov a podpore zápalu [27].

Napriek prevažne negatívnym výsledkom sme zistili niekoľko korelácií, ktoré môžu naznačovať potenciálnu úlohu určitých bakteriálnych taxónov v patogenéze RA. Prekvapivo bola v DBA/1J myšiach zaznamenaná pozitívna korelácia medzi skóre RA a rodom *Bifidobacterium*, čo je v rozpore s už publikovanými údajmi. V intervenčných štúdiách podávanie rôznych kmeňov *Bifidobacterium* zmiernilo symptómy CIA a obnovilo rovnováhu medzi pro- a protizápalovými odpoveďami v modeloch CIA [28,29]. Pozitívna korelácia medzi skóre RA a rodom *Paraprevotella* bola v súlade s predchádzajúcimi štúdiami [30]. Rody ako *Odoribacter, Enterorhabdus* a *Butyricicoccus*, vykazovali negatívnu koreláciu so skóre RA, čo naznačuje ich potenciálnu ochrannú úlohu v patogenéze RA.

Štúdia prináša nové poznatky vzťahu črevnej mikrobioty a patogenézy RA. Hoci sa nepreukázal priamy vplyv FMT na RA, pozorované zmeny v črevnej mikrobiote zdôrazňujú komplexnosť interakcií medzi hostiteľom a mikroorganizmami pri autoimunitných ochoreniach. Budúci výskum so širšími súbormi vzoriek a pokročilými metódami analýzy mikrobiomu bude kľúčový pre objasnenie týchto interakcií.

Podporené čiastočne grantom UK-UK/1296/2025, APVV-21-0370 a VEGA 1/0706/25.

Zoznam použitej literatúry

1. Smolen, J.S.; Aletaha, D.; McInnes, I.B. Rheumatoid Arthritis. *Lancet* 2016, *388*, 2023–2038, doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
2. McInnes, I.B.; Schett, G. Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007, *7*, 429–442, doi:10.1038/nri2094.
3. Romão, V.C.; Fonseca, J.E. Etiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: A State-of-the-Art Review. *Front Med (Lausanne)* 2021, *8*, 689698, doi:10.3389/fmed.2021.689698.
4. Esberg, A.; Johansson, L.; Johansson, I.; Dahlqvist, S.R. Oral Microbiota Identifies Patients in Early Onset Rheumatoid Arthritis. *Microorganisms* 2021, *9*, 1657, doi:10.3390/microorganisms9081657.
5. Lee, J.-Y.; Mannaa, M.; Kim, Y.; Kim, J.; Kim, G.-T.; Seo, Y.-S. Comparative Analysis of Fecal Microbiota Composition Between Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Patients. *Genes* 2019, *10*, 748, doi:10.3390/genes10100748.
6. Zhang, X.; Zhang, D.; Jia, H.; Feng, Q.; Wang, D.; Liang, D.; Wu, X.; Li, J.; Tang, L.; Li, Y.; et al. The Oral and Gut Microbiomes Are Perturbed in Rheumatoid Arthritis and Partly Normalized after Treatment. *Nat Med* 2015, *21*, 895–905, doi:10.1038/nm.3914.
7. Hou, K.; Wu, Z.-X.; Chen, X.-Y.; Wang, J.-Q.; Zhang, D.; Xiao, C.; Zhu, D.; Koya, J.B.; Wei, L.; Li, J.; et al. Microbiota in Health and Diseases. *Sig Transduct Target Ther* 2022, *7*, 1–28, doi:10.1038/s41392-022-00974-4.

8. Silva, Y.P.; Bernardi, A.; Frozza, R.L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020, *11*, 25, doi:10.3389/fendo.2020.00025.
9. Hooper, L.V.; Macpherson, A.J. Immune Adaptations That Maintain Homeostasis with the Intestinal Microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010, *10*, 159–169, doi:10.1038/nri2710.
10. van der Hee, B.; Wells, J.M. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-Chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology* 2021, *29*, 700–712, doi:10.1016/j.tim.2021.02.001.
11. Bodkhe, R.; Shetty, S.A.; Dhotre, D.P.; Verma, A.K.; Bhatia, K.; Mishra, A.; Kaur, G.; Pande, P.; Bangarusamy, D.K.; Santosh, B.P.; et al. Comparison of Small Gut and Whole Gut Microbiota of First-Degree Relatives With Adult Celiac Disease Patients and Controls. *Frontiers in microbiology* 2019, *10*, 137–140, doi:10.3389/FMICB.2019.00164.
12. Zhao, T.; Wei, Y.; Zhu, Y.; Xie, Z.; Hai, Q.; Li, Z.; Qin, D. Gut Microbiota and Rheumatoid Arthritis: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Opportunities. *Front Immunol* 2022, *13*, 1007165, doi:10.3389/fimmu.2022.1007165.
13. Chen, J.; Wright, K.; Davis, J.M.; Jeraldo, P.; Marietta, E.V.; Murray, J.; Nelson, H.; Matteson, E.L.; Taneja, V. An Expansion of Rare Lineage Intestinal Microbes Characterizes Rheumatoid Arthritis. *Genome Med* 2016, *8*, 43, doi:10.1186/s13073-016-0299-7.
14. Chiang, H.-I.; Li, J.-R.; Liu, C.-C.; Liu, P.-Y.; Chen, H.-H.; Chen, Y.-M.; Lan, J.-L.; Chen, D.-Y. An Association of Gut Microbiota with Different Phenotypes in Chinese Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med* 2019, *8*, E1770, doi:10.3390/jcm8111770.
15. Drago, L. Prevotella Copri and Microbiota in Rheumatoid Arthritis: Fully Convincing Evidence? *J Clin Med* 2019, *8*, 1837, doi:10.3390/jcm8111837.
16. Campbell, C.; Kandalgaonkar, M.R.; Golonka, R.M.; Yeoh, B.S.; Vijay-Kumar, M.; Saha, P. Crosstalk between Gut Microbiota and Host Immunity: Impact on Inflammation and Immunotherapy. *Biomedicines* 2023, *11*, 294, doi:10.3390/biomedicines11020294.
17. Luo, Y.; Tong, Y.; Wu, L.; Niu, H.; Li, Y.; Su, L.C.; Wu, Y.; Bozec, A.; Zaiss, M.M.; Qing, P.; et al. Alteration of Gut Microbiota in High-Risk Individuals for Rheumatoid Arthritis Is Associated with Disturbed Metabolome and Initiates Arthritis by Triggering Mucosal Immunity Imbalance. *Arthritis Rheumatol* 2023, doi:10.1002/art.42616.
18. Belvoncikova, P.; Maronek, M.; Gardlik, R. Gut Dysbiosis and Fecal Microbiota Transplantation in Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci* 2022, *23*, 10729, doi:10.3390/ijms231810729.
19. Zeng, J.; Peng, L.; Zheng, W.; Huang, F.; Zhang, N.; Wu, D.; Yang, Y. Fecal Microbiota Transplantation for Rheumatoid Arthritis: A Case Report. *Clinical Case Reports* 2021, *9*, 909, doi:10.1002/ccr3.3677.
20. Brand, D.D.; Latham, K.A.; Rosloniec, E.F. Collagen-Induced Arthritis. *Nat Protoc* 2007, *2*, 1269–1275, doi:10.1038/nprot.2007.173.
21. Schuh, B.M.; Macáková, K.; Feješ, A.; Groß, T.; Belvončíková, P.; Janko, J.; Juskanič, D.; Hollý, S.; Borbélyová, V.; Šteňová, E.; et al. Sex Differences in Long-Term Effects of Collagen-Induced Arthritis in Middle-Aged Mice. *Front Physiol* 2023, *14*, 1195604, doi:10.3389/fphys.2023.1195604.
22. Anderson, M.S.; Venanzi, E.S.; Klein, L.; Chen, Z.; Berzins, S.P.; Turley, S.J.; von Boehmer, H.; Bronson, R.; Dierich, A.; Benoist, C.; et al. Projection of an Immunological Self

Shadow within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 2002, *298*, 1395–1401, doi:10.1126/science.1075958.
23. Chen, F.Y.; Lee, A.; Ge, S.; Nathan, S.; Knox, S.M.; McNamara, N.A. Aire-Deficient Mice Provide a Model of Corneal and Lacrimal Gland Neuropathy in Sjögren's Syndrome. *PLOS ONE* 2017, *12*, e0184916, doi:10.1371/journal.pone.0184916.
24. Hardtke-Wolenski, M.; Taubert, R.; Noyan, F.; Sievers, M.; Dywicki, J.; Schlue, J.; Falk, C.S.; Ardesjö Lundgren, B.; Scott, H.S.; Pich, A.; et al. Autoimmune Hepatitis in a Murine Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1 Model Is Directed against Multiple Autoantigens. *Hepatology* 2015, *61*, 1295–1305, doi:10.1002/hep.27639.
25. Sun, Y.; Chen, Q.; Lin, P.; Xu, R.; He, D.; Ji, W.; Bian, Y.; Shen, Y.; Li, Q.; Liu, C.; et al. Characteristics of Gut Microbiota in Patients With Rheumatoid Arthritis in Shanghai, China. *Front Cell Infect Microbiol* 2019, *9*, 369, doi:10.3389/fcimb.2019.00369.
26. Sibanda, T.; Marole, T.A.; Thomashoff, U.L.; Thantsha, M.S.; Buys, E.M. Bifidobacterium Species Viability in Dairy-Based Probiotic Foods: Challenges and Innovative Approaches for Accurate Viability Determination and Monitoring of Probiotic Functionality. *Front Microbiol* 2024, *15*, 1327010, doi:10.3389/fmicb.2024.1327010.
27. Koch, A.E.; Kunkel, S.L.; Harlow, L.A.; Johnson, B.; Evanoff, H.L.; Haines, G.K.; Burdick, M.D.; Pope, R.M.; Strieter, R.M. Enhanced Production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Invest* 1992, *90*, 772–779, doi:10.1172/JCI115950.
28. Z, F.; B, Y.; Rp, R.; C, S.; G, S.; J, Z.; H, Z.; W, C. Protective Effects of Bifidobacterium Adolescentis on Collagen-Induced Arthritis in Rats Depend on Timing of Administration. *Food & function* 2020, *11*, doi:10.1039/d0fo00077a.
29. Jeong, Y.; Jhun, J.; Lee, S.-Y.; Na, H.S.; Choi, J.; Cho, K.-H.; Lee, S.Y.; Lee, A.R.; Park, S.-J.; You, H.J.; et al. Therapeutic Potential of a Novel Bifidobacterium Identified Through Microbiome Profiling of RA Patients With Different RF Levels. *Front Immunol* 2021, *12*, 736196, doi:10.3389/fimmu.2021.736196.
30. Yang, Y.; Hong, Q.; Zhang, X.; Liu, Z. Rheumatoid Arthritis and the Intestinal Microbiome: Probiotics as a Potential Therapy. *Front. Immunol.* 2024, *15*, doi:10.3389/fimmu.2024.1331486.

29. Porovnanie kvantitatívnej a digitálnej polymerázovej reťazovej reakcie pri analýze génovej expresie v placente

Mgr. Natália Andová

Spoluautori: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH[1], RNDr. Petra Priščáková, PhD.[1]
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH[1]
[1]Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Bratislava

Úvod

Stanovenie úrovne génovej expresie je kľúčovým procesom vo výskume biologických mechanizmov, či už fyziologických alebo patologických. Existuje niekoľko metód na meranie a analyzovanie variácie génovej expresie, akými sú napríklad mikročipová analýza, RNA sekvenovanie a kvantitatívna PCR (qPCR), ktorá je zlatým štandardom. Každá z metód má svoje výhody a nevýhody a voľba tej vhodnej závisí od konkrétnych cieľov práce a experimentov, či od dostupných materiálnych zdrojov (1). Tradičnejšia qPCR slúži na relatívnu kvantifikáciu a sleduje fluorescenčný signál v priebehu exponenciálnej fázy amplifikácie. O niečo novšia metóda digitálna dropletova PCR (ddPCR) slúži na absolútnu kvantifikáciu a zhromažďuje fluorescenčné signály prostredníctvom koncového merania a používa počet pozitívnych častí reakcie na výpočet koncentrácie analyzovanej vzorky. Hlavné rozdiely medzi týmito dvoma metódami sú už v spomínanom spôsobe merania množstva cieľovej sekvencie, ďalej v presnosti, citlivosti a odolnosti voči inhibítorom PCR reakcie (2). Zavádzanie ddPCR do laboratórií predstavuje významný posun vo vykonávaní molekulárnych analýz a v diagnostike.

Placenta je výnimočný špecializovaný dočasný orgán, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v tehotenstve. Jednou z tehotenských komplikácii je preeklampsia, ktorá predstavuje riziko pre matku aj plod. Je charakterizovaná ako gestačná multisystémová hypertenzná porucha. Napriek tomu, že výskum genetických aspektov tohto ochorenia stále prebieha existuje ešte veľa neznámych ohľadom presných mechanizmov vzniku a vývoja tejto gestačnej komplikácie. Patofyziológia preeklampsie je úzko spojená s poruchami vývoja placenty. Proteín syncytín-1, kódovaný génom *ERVW-1,* má kľúčovú úlohu pri diferenciácii syncytiotrofoblastu a optimálnej placentácii. Tento proteín má dôležitú úlohu pri diferenciácii placenty a vzhľadom na to by deregulácia génovej expresie jeho kódujúceho génu mohla hrať úlohu v rozvoji preeklampsie, respektíve v prechode do závažnej formy preeklampsie (3, 4, 5). Naša práca sa zamerala práve na placentu, ktorá je veľmi komplexný a heterogénny orgán a obsahuje početné bunkové komponenty fetálneho aj materského pôvodu. Kvôli heterogenite tkaniva vykazuje vysokú variabilitu génovej expresie. Gény sú odlišne exprimované v anatomicky odlišných častiach placenty, ktoré prispievajú k fyziológii tohto orgánu a zároveň sú pozorované zmeny v úrovni expresie niektorých génov aj medzi jednotlivcami (6).

Uvádzaná práca je založená na porovnaní výsledkov získaných metódou qPCR a ddPCR. Génom záujmu je vyššie spomínaný *ERVW-1*. Hlavným cieľom práce je stanovenie možností

a navrhnutie vhodného metodického prístupu pri potrebe korelácie dát získaných pomocou metódy ddPCR s už publikovanými dátami získanými metódou qPCR.

Materiál a metódy

Vzorky RNA boli izolované pomocou komerčnej súpravy *GeneJET RNA Purification* (Thermo Scientific) z čerstvého tkaniva (klkov a placenty) podľa pokynov výrobcu. Pred qPCR metódou bola RNA podľa pokynov výrobcov ošetrená a prepísaná do cDNA pomocou *DNázy I* (Thermo Scientific) a *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific). Pre samotnú qPCR bola použitá komerčnú súpravu *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Scientific) podľa pokynu výrobcov a vyhodnocovanie prebehlo v počítačovom programe (*QuantStudio 3 and 5 Real-Time PCR System Software – Design and Analysis Software v1.5.2*). Pre ddPCR boli použité komerčné súpravy od Bio-Rad *2x QX200 ddPCR Supermix for Probes (no dUTPs)* a *One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes* podľa pokynov výrobcu. Pri jednokrokovej RT-ddPCR sa všetky komponenty pre reverznú transkripciu aj pre ddPCR pipetovali naraz do reakcie na rozdiel od dvojkrokovej, pri ktorej bolo potrebné najprv ošetriť RNA *DNázou I* (Thermo Scientific) a následne ju prepísať do cDNA pomocou *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific). Použité boli TaqMan próby pre *ERVW-1* (cieľový gén; FAM – Hs00205893_m1) a *YWHAZ* (referenčný gén; VIC – Hs03044281_g1). Na vyhodnotenie výsledkov bol využitý počítačový softvér *QX Manager Software v2.1* (Bio-Rad).

Relatívnu úroveň génovej expresie pri qPCR sme vyjadrili ako ΔCq, teda rozdiel v hodnotách kvantifikačných cyklov (Cq) pre cieľový gén a referenčný gén pre danú vzorku (ΔCq = Cq (cieľový gén) – Cq (referenčný gén)). Pri ddPCR sa pri vyhodnocovaní génovej expresie pozerá na samotné hodnoty koncentrácie, avšak v našom prípade sa vypočítal pomer koncentrácie referenčného génu a koncentrácie cieľového génu pre porovnanie s výsledkami z qPCR.

Na štatistickú analýzu a hodnotenie štatistickej významnosti bol využitý dvojvýberový t-test a korelačná analýza (Pearsonov korelačný koeficient - r). Hladiny významnosti, *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Sila korelácie sa hodnotila podľa hodnôt r. Veľmi vysoká korelácia 0,90 – 1,00, vysoká 0,70 – 0,90, stredná 0,50 – 0,70, nízka 0,30 – 0,50 a veľmi nízka respektíve žiadna korelácia 0,00 – 0,30.

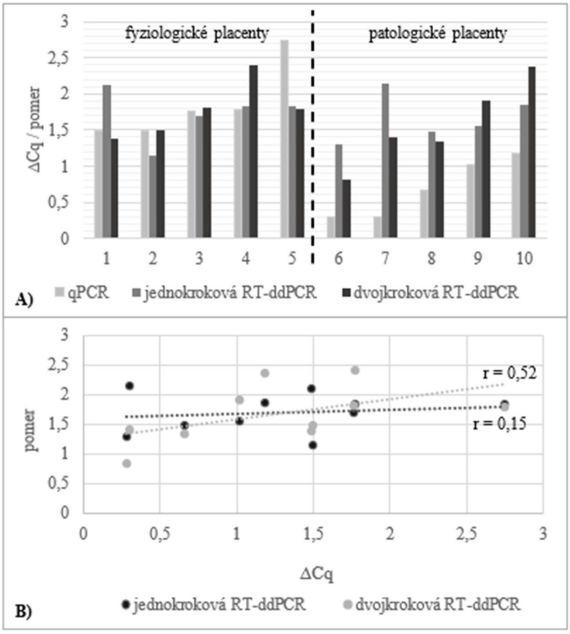
Výsledky

Korelácia výsledkov génovej expresie *ERVW-1* génu medzi metódami polymerázovej reťazovej reakcie

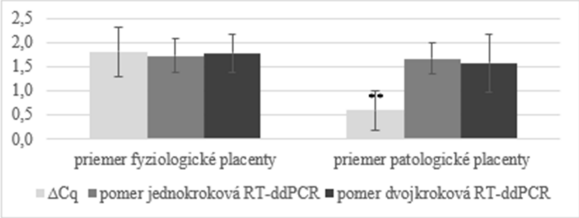
Do experimentov boli vybrané RNA vzorky izolované z tkaniva placenty, päť fyziologických (1, 2, 3, 4, 5) a päť patologických vzoriek (6, 7, 8, 9, 10). Porovnávané boli výsledky z rôznych metodických prístupov (RT-qPCR, jednokroková a dvojkroková RT-ddPCR) pre stanovenie úrovne expresie *ERVW-1* (Obr. 1A). Medzi metodickými prístupmi qPCR a dvojkrokovou RT-ddPCR bolo pri niektorých vzorkách možno vidieť trend v úrovni expresie génu *ERVW-1*. Pri výsledkoch medzi RT-qPCR a jednokrokovou RT-ddPCR trend pozorovaný nebol. Tieto zistenia boli kvantifikované aj korelačnou analýzou (Obr. 1B), ktorá hovorí o tom, že medzi hodnotami relatívnej (RT-qPCR) a absolútnej (dvojkroková RT-ddPCR) kvantifikácie je stredná miera

korelácie (r = 0,52), avšak medzi hodnotami z RT-qPCR a jednokrokovej RT-ddPCR je veľmi nízka respektíve žiadna korelácia (r = 0,15).

Pri porovnaní priemerných hodnôt úrovne expresie *ERVW-1* vo fyziologickej a patologickej skupine placent a medzi metódami qPCR a ddPCR je možné vidieť, že priemerná hodnota pri všetkých metodických prístupoch pri fyziologických vzorkách je takmer rovnaká, avšak pri preeklamptických vzorkách sa medzi qPCR a prístupmi ddPCR značne odlišuje (Obr. 2). Rozdiel v priemerných hodnotách medzi fyziologickými a patologickými placentami pri qPCR bol štatisticky významný ($p < 0,01$). Medzi vzorkami pri použitých prístupoch ddPCR bol štatisticky nesignifikantný rozdiel v priemerných hodnotách.



Obr. 1: Korelačná analýza rôznych metodických prístupov PCR
A) Hodnoty ΔCq (rozdiel hodnôt Ct pre sledovaný a referenčný gén) - metóda RT-qPCR. Pomery koncentrácií (počet kópií/µl) referenčného génu YWHAZ a sledovaného génu ERVW-1 - metódy jednokroková a dvojkroková RT-ddPCR.
B) Korelačná analýza výsledkov získaných RT-qPCR a RT-ddPCR. Referenčný gén YWHAZ.
r – Pearsonov korelačný koeficient



Obr. 2: Porovnanie priemerných hodnôt (± SD) úrovne expresie ERVW-1 vo fyziologickej a patologickej skupine qPCR a ddPCR
*SD - smerodajná odchýlka, ** - p < 0,01, referenčný gén YWHAZ*
ΔCq = Cq (cieľový gén) – Cq (referenčný gén)
pomer = koncentrácia pre referenčný gén/koncentrácia pre cieľový gén

Diskusia

RT-qPCR je v súčasnosti zlatým štandardom na detekciu a kvantifikáciu RNA, avšak jej použitie je spojené aj s viacerými nevýhodami. Presnosť merania môže byť ovplyvnená skresleniami v dôsledku menších rozdielov vo východiskovom množstve RNA, kvalite RNA

alebo rozdieloch v účinnosti reverznej transkripcie a PCR amplifikácie. Na to aby sa minimalizovali chyby sa používa normalizácia pomocou referenčných génov, ktoré ale nemusia byť stabilné v rôznych experimentálnych podmienkach. Referenčné gény by mali vykazovať minimálnu variabilitu vo svojej expresii medzi tkanivami a fyziologickými stavmi organizmu. Je žiaduce vybrať takú referenciu, ktorá by vykazovala podobné hodnoty Cq s cieľovým génom. Odporúča sa vždy pri analýze použiť minimálne dva referenčné gény, kvôli tomu aby sa zohľadnil akýkoľvek dopad, ktorý môžu mať experimentálne podmienky na expresiu individuálnych referenčných génov (7). Okrem toho nepresnosti v meraní Cq hodnôt, vznik artefaktov a suboptimálne reakčné podmienky môžu viesť k nesprávnej interpretácii údajov. Chyby sa navyše môžu znásobovať pri použití relatívnej kvantifikácie, najmä ak sa používajú neadekvátne normalizačné stratégie (8). Pre optimálny dizajn experimentu boli publikované smernice, ktoré je dôležité dodržiavať. Minimálne informácie pre publikovanie experimentov qPCR ale aj ddPCR (MIQE) sa zameriavajú na spoľahlivosť výsledkov s cieľom pomôcť zabezpečiť integritu vedeckej literatúry, podporiť konzistentnosť medzi laboratóriami a zvýšiť transparentnosť experimentov. MIQE obsahuje zoznam pre autorov, recenzentov a editorov, podľa ktorého by sa mali riadiť pre zabezpečenie relevantnosti, presnosti, správnej interpretácie a reprodukovateľnosti výsledkov (9, 10).

Ako možné riešenie limitácií qPCR sa javí metóda ddPCR, ktorá poskytuje absolútnu kvantifikáciu nukleových kyselín bez potreby referenčných génov alebo štandardných kriviek. Dôležitou výhodou ddPCR je aj nižšia citlivosť na inhibíciu PCR reakcie, pretože cieľové sekvencie sú účinne koncentrované v menších objemoch a taktiež aj vyššia presnosť, čo z nej robí atraktívnu alternatívu k RT-qPCR (2). Otázkou však zostáva, ako korelovať výsledky ddPCR s doteraz publikovanými údajmi z RT-qPCR pre potreby nadväzných štúdií.

V našej štúdii boli porovnávané metódy RT-qPCR a ddPCR pri stanovení úrovne expresie génu *ERVW-1* v placente. Ako experimentálny model sme vybrali placentu, pre ktorú je typická vysoká variabilita génovej expresie. Za gén záujmu sme zvolili *ERVW-1.* Vysoká úroveň

expresie génu pre proteín syncytín-1 je typicky exkluzívna pre placentárne tkanivo za normálnych fyziologických podmienok. Viaceré štúdie (11, 12, 13) ukázali, že deregulácia expresie génu *ERVW-1* v trofoblaste koreluje so vznikom a závažnosťou preeklampsie.

Na korelačnú analýzu bolo vybraných 10 placentárnych biopsií, kde boli RT-qPCR výsledky porovnané s dvoma prístupmi RT-ddPCR (jednokrokovou a dvojkrokovou). Pre porovnanie výsledkov bol použitý prístup normalizácie, kde boli pri RT-qPCR vypočítané hodnoty ΔCq, zatiaľ čo pri ddPCR boli použité pomery koncentrácií referenčného a cieľového génu. Tento prístup sa ukázal ako efektívny pre porovnávanie metód.

Naše výsledky ukázali, že medzi RT-qPCR a dvojkrokovou RT-ddPCR existuje čiastočný trend (Obr. 1A), ktorý potvrdila aj korelačná analýza ($r = 0,52$) (Obr. 1B). Zatiaľ čo jednokroková RT-ddPCR nevykazovala výraznú koreláciu (Obr. 1). Pri porovnaní expresie medzi fyziologickými a patologickými placentami boli zmeny v expresii *ERVW-1* signifikantné len pri RT-qPCR (** - $p < 0,01$), zatiaľ čo pri ddPCR boli štatisticky nevýznamné (Obr. 2).

Aj keď ddPCR ponúka významné výhody v oblasti presnosti, citlivosti a reprodukovateľnosti, jej použitie je zatiaľ limitované počtom dostupných štúdií a nutnosťou stanoviť presné kalibračné štandardy pre zabezpečenie konzistentnosti medzi laboratóriami, čo by sa mohlo dosiahnuť dodržiavaním MIQE smerníc (8, 14). Naše zistenia naznačujú, že dvojkroková RT-ddPCR je vhodnejším prístupom pre koreláciu s dvojkrokovou RT-qPCR. Napriek čiastočnému trendu a strednej miere korelácie medzi hodnotami získanými týmito dvoma metódami sa pri spriemerovaní hodnôt vo fyziologickej a patologickej skupine vzoriek dosiahli výrazne odlišné výsledky (Obr. 2). Na definitívne potvrdenie vhodnosti ddPCR je potrebná rozsiahlejšia validácia, širšie spektrum experimentálnych podmienok a štandardizácia analytických postupov. Do budúcnosti by bolo perspektívne analyzovať väčší štatistický súbor, pričom ddPCR by sa mohla stať ideálnou metódou na kvantifikáciu génovej expresie v prípadoch so špeciálnymi požiadavkami na analýzu malých zmien (8, 14).

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00253 a grantom VEGA 1/0198/24.

Zoznam použitej literatúry

1. Singh KP, Miaskowski C, Dhruva AA, Flowers E, Kober KM: Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biol Res Nurs*. 2018; 20(4): 369-382.
2. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E: dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018; 18(4): 1271. Published 2018 Apr 20.
3. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG: Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 2004; 114(5-6): 397-407.
4. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA: Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*. 2019; 124(7): 1094-1112.
5. Lee X, Keith JC Jr, Stumm N, a spol.: Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta*. 2001; 22(10): 808-812.
6. Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO: Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(14): 5478-5483.
7. Kozera B, Rapacz M: Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013; 54(4): 391-406.

8. Baettig CG, Zirngibl M, Smith KF, Lear G, Tremblay LA: Comparison between droplet digital PCR and reverse transcription-quantitative PCR methods to measure ecotoxicology biomarkers. *Mar Pollut Bull*. 2023; 190: 114829.
9. Bustin SA, Benes V, Garson JA, a spol.: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611-622.
10. Huggett JF, Foy CA, Benes V, a spol.: The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*. 2013; 59(6): 892-902.
11. Vargas A, Toufaily C, LeBellego F, Rassart É, Lafond J, Barbeau B: Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reprod Sci*. 2011; 18(11): 1085-1091.
12. Knerr I, Beinder E, Rascher W: Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186(2): 210-213.
13. Langbein M, Strick R, Strissel PL, Vogt N, Parsch H, Beckmann MW, Schild RL: Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev*. 2008; 75(1): 175-183.
14. Liu X, Feng J, Zhang Q, a spol.: Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets. *Emerg Microbes Infect*. 2020; 9(1): 1175-1179.

30. CD44 ako potenciálny marker pľúcnej fibrózy

Mgr. Michaela Kardohelyová
(lekárska mikrobiológia a imunológia)

Spoluautori: M. Suchánková[1,7], E. Zsemlye[1,7], J. Urban[2], P. Baráth[3], L. Kohútová[3], B. Siváková[3,4], M. Gánovská[2], E. Tibenská[5], K. Szaboová[5], E. Tedlová[6], T. Moskalets[7], D. Juskanič[8,9], K. Klučková[10,11], A. Ohradanova-Repic[12], P. Babulic[7], M. Bucová[1], V. Leksa[7].

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

[1]Imunologický ústav LF UK, Bratislava; [2]Národný ústav tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie Vyšné Hágy; [3]Oddelenie glykobiológie, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava; [4]Katedra lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice; [5]Medirex a. s., Bratislava; [6]Klinika pneumológie a ftizeológie LF UK a UN, Bratislava; [7]Laboratórium molekulárnej imunológie, Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava; [8]Diagnostické centrum Jessenius, Nitra; [9]Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava; [10]Klinika pre deti a dorast, Fakultná nemocnica Nitra, Nitra; [11]Hematologicko-transfuziologické oddelenie, Národný ústav detských chorôb a Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [12]Úsek molekulárnej imunológie, Ústav hygieny a aplikovanej imunológie, Centrum pre patofyziológiu, infektológiu a imunológiu, Lekárska univerzita Viedeň, Viedeň.

Úvod

Skupina difúznych parenchýmových pľúcnych chorôb (DPPCH) sa vyznačuje najmä nedostatočne prebádanou etiológiou a patogenézou a molekulárne mechanizmy ostávajú z veľkej časti neobjasnené. Patrí sem 150-200 chorôb a predpoklad je, že ich počet sa bude zvyšovať[1]. u niektorých DPPCH má dôležitú úlohu fibróza. Fibrotický proces je progresívny, zápalový a ireverzibilný proces, pri ktorom je postihnutý najmä pľúcny parenchým. Dochádza k nekontrolovanej aktivácii a diferenciácii fibroblastov na myofibroblasty a následnému ukladaniu extracelulárnej matrix v interstíciu. Príznaky u pacientov sú dušnosť a zadýchavanie sa. V experimentálnom animálmom modeli pri myšiach sa ukázalo, že po indukcii fibrózy bleomycínom výrazne stúpla expresia molekuly CD44[2]. Preto sme predpokladali, že namerané hladiny CD44 by mohli byť výrazne vyššie aj v prípade DPPCH sprevádzaných fibrózou. Cieľom práce bolo stanovenie možného zdroja sCD44 pomocou stimulácie bunkových línií (pľúcne epitelové bunky a pľúcne fibroblasty) a stanovenie koncentrácie sCD44 naprieč rôznymi diagnózami. Stanovenie možného zdroja sCD44 sme sledovali prostredníctvom molekulárno-biologických metód ELISA a Western blot a na potvrdenie zdroja sme použili metódu kolónovej chromatografie, kedy sa nám prítomné proteíny v tekutine z z bronchoalveolárnej laváže (BALT) rozdelili na základe veľkosti.

Materiál a metódy

Vyšetrovaný súbor tvorilo 257 pacientov s DPPCH. Vzorky pacientov 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. Pacientov sme rozdelili do piatich skupín: 1. Pacienti s idiopatickou pľúcnou fibrózou (IPF; n=46 pacientov); 2. Pacienti s hypersenzitívnou pneumonitídou (HP; n=58); 3. Pacienti so sarkoidózou (S; n=123); 4. Pacienti s organizujúcou sa pneumóniou (OP; n=14); 5. Pacienti s intersticiálnymi pľúcnymi chorobami spojenými so systémovými chorobami spojiva (CTD-ILD; n=16).

Diagnózy boli stanovené v súlade s aktuálnymi usmerneniami publikovanými ako oficiálne usmernenia Americkej hrudníkovej spoločnosti (ATS)/Európskej respiračnej spoločnosti (ERS)/Japonskej respiračnej spoločnosti (JRS)/Latinskoamerickej hrudníkovej asociácie (ALAT) pre klinickú prax IPF a HP[3,4,5,6] alebo usmerneniami ATS/ERS/World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) pre SRC[7], resp. podľa aktuálne používaných praktických diagnostických prístupov pre CTD-ILD[8,9] a OP[10]. Diagnózy boli stanovené ako výsledok konsenzu multidisciplinárneho tímu, ktorí tvorili pneumológovia, rádiológovia a patológovia.

Koncentráciu solubilnej CD44 (sCD44) 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).

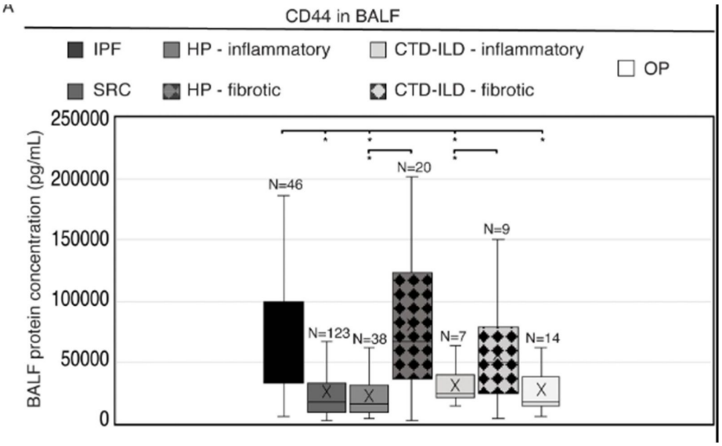
Koncentráciu sCD44 sme merali prostredníctvom metódy Western blot, kedy sme použili MRC-5 bunky stimulované BALT od pacientov s IPF. Následne sme na potvrdenie koncentrácie sCD44 merali v BALT od pacientov s IPF a zisťovali sme to pomocou metódy ELISA (CD44 ELISA Kit: FineTest, Catalogue No. #EH0654). V poslednom kroku sme použili metódu kolónovej chromatografie a to z dôvodu zistenia možného zdroja uvoľňovania CD44, ktorá nám rozdelila proteíny v BALT na základe ich veľkosti a to na exozomálnu a proteínovú časť.

Na štatistické vyhodnotenie sme použili softvér SAS. Na určenie toho, či skúmaná populácia má normálne rozdelenie, sa použil Kolmogorov-Smirnovov test s jedným výberom. Na určenie rozdielov a štatistickej významnosti sa použila neparametrická analýza rozptylu Kruskal-Wallis test s Dunnovým posttestom. Výsledky boli vyjadrené ako medián a medzikvartilové rozpätie (IQR). Korelačná analýza sa vykonala pomocou Spearmanovho testu. Za štatistickú významnosť sa považovala hodnota $P < 0,05$. Na posúdenie schopnosti CD44 rozlišovať medzi fibrotickým a nefibrotickým fenotypom DPPCH sa vypočítala pomocou metódy ROC (Receiver Operating Characteristic) plocha pod krivkou AUC (Area Under the Curve.

Výsledky

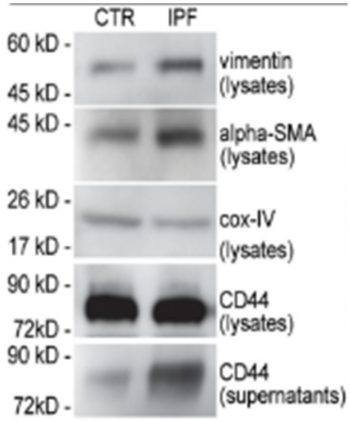
1. Porovnanie koncentrácií sCD44 v BALT u pacientov s rôznymi diagnózami DPPCH

Porovnaním koncentrácie sCD44 v BALT sme zistili štatisticky významne vyššie koncentrácie u pacientov s IPF, HP – fibrotická forma a CTD-ILD – fibrotická forma (obrázok 1).



*Obrázok 1: Porovnanie koncentrácie sCD44 v BALT pri diagnózach DPPCH pomocou metódy ELISA. 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).*

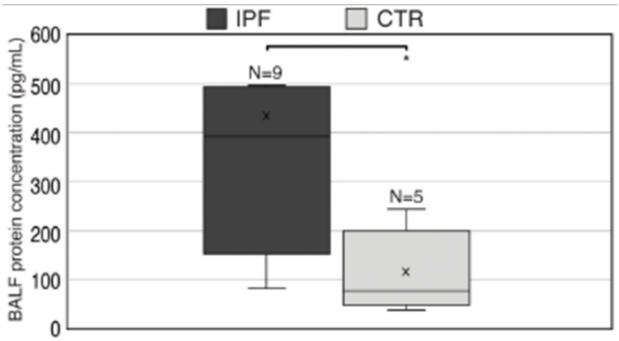
2. Dôkaz prítomnosti sCD44 vo vzorkách pľúcnych fibroblastov MRC-5 stimulovaných BALT pomocou metódy Western blot



Obrázok 2: Dôkaz prítomnosti sCD44 vo vzorkách MRC-5 pomocou metódy Western blot

Dôkaz prítomnosti sCD44 vo vzorkách MRC-5 bunkových lyzátov pomocou metódy Western blot s použitím špecifickej protilátky proti vimentínu, α-SMA, COX IV a CD44 sa expresia týchto markerov zvýšila. Vimentín a α-SMA sú markery aktivácie fibroblastov. COX IV bol použitý ako kontrolný proteín.

3. Dôkaz prítomnosti sCD44 vo vzorkách pľúcnych fibroblastov MRC-5 stimulovaných BALT pomocou metódy ELISA

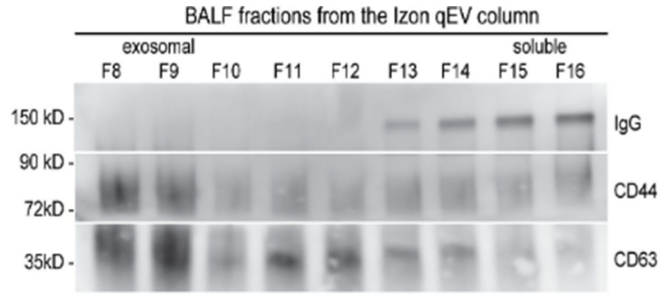


Obrázok 3: Dôkaz prítomnosti sCD44 vo vzorkách MRC-5 pomocou metódy ELISA

Dôkaz prítomnosti sCD44 vo vzorkách MRC-5 pomocou metódy ELISA. Použili sme vzorky supernatantov MRC-5 buniek, ktoré boli stimulované BALT od pacientov z IPF a ako kontrolnú vzorku sme použili MRC-5 bunky stimulované PBS.

4. Dôkaz prítomnosti sCD44 vo frakciách (exozomálnych alebo proteínových) odobratých z tekutiny bronchoalveolárnej laváže (BALT)

Dokázali sme prítomnosť sCD44 v exozomálnych frakciách najviac pozitívne boli v exozomálnych frakciách F8 a F9. CD63 sa použil ako exozomálny marker.



Obrázok 4: Dôkaz prítomnosti sCD44 vo frakciách získaných z BALT

Vybrané frakcie sme rozdelili pomocou chromatografických kolón Izon qEV (Izon Science, UK) na základe ich veľkosti. Po separácii sme vybrané IPF-BALT, ktoré nám umožnili izoláciu exozómov a následne sme zistili, že CD44 je vo frakciách, ktoré sú pozitívne na CD63, ktoré zodpovedali exozomálnej frakcii. Naopak, imunoglobulín bol prítomný vo frakciách, ktoré zodpovedajú rozpustným proteínom.

Diskusia

V tejto štúdii sme hľadali špecifický biomarker pre pľúcnu fibrózu v BALT pri rôznych diagnózach DPPCH. BALT je zmes tvorená imunitnými bunkami a rôznymi solubilnými molekulami, ktoré sú vylučované v alveoloch. Pri DPPCH sa počet týchto imunitných buniek a rozpustných molekúl v alveoloch dramaticky zvyšuje[11], čo značne sťažuje identifikáciu biomarkerov z BALT pre jednotlivé typy chorôb[12]. Existuje však jeden charakteristický znak pľúcnej fibrózy, ktorý odlišuje fibrotické formy DPPCH od ostatných typov. Konkrétne ide o aktiváciu fibroblastov na myofibroblasty sprevádzanú nadmerným ukladaním matrix, čo vedie k strate funkčnej pľúcnej architektúry[13].

Najprv sme identifikovali potenciálnych kandidátov v sekrétoch myofibroblastov, ktoré sa diferencovali z fibroblastov MRC-5 aktiváciou pomocou BALT od pacientov s IPF a ďalej sme vyhodnotili BALT z rôznych podskupín DPPCH na prítomnosť vybraného kandidáta (obrázok 1). V ďalšom kroku sme zistili zvýšené hladiny sCD44 v BALT zo súboru IPF a zo skupín fibrotických fenotypov HP a CTD-ILD. Zvýšené hladiny sCD44 v BALT sa nám ukázali pri použití citlivých molekulárno-biologických metód Western blot (obrázok 2) a ELISA (obrázok 3). Metódu ELISA sme použili na potvrdenie prítomnosti sCD44 vo vzorkách MRC-5 stimulovaných BALT od pacientov s IPF.

CD44 je receptor pre kyselinu hyalurónovú[14,15] a okrem fibroblastov je exprimovaný na povrchu epitelových buniek, endotelových buniek, makrofágov, T-buniek a tiež iných typov buniek[16]. CD44 sa podieľa na bunkovej adhézii, migrácii buniek alebo ich aktivácii, pri ktorej sa CD44 reguluje[17]. Celkovo sa jeho funkcie odrážajú nielen v množstve fyziologických procesov vrátane hojenia rán, angiogenézy alebo zápalu[18,19], ale aj v patologických podmienkach, napr. pri rakovine alebo poškodení pľúc[20,21]. Naša štúdia poukazuje na to, že CD44 sa uvoľňuje z aktivovaných fibroblastov ako exozomálna zložka a súčasne je prítomná v BALT (obrázok 4). Celkovo sa v pľúcnom mikroprostredí môže extracelulárny CD44 produkovať v rôznych formách a z rôznych buniek.

Záver

Na základe svojej rozšírenej expresie a mnohostranných úloh sa CD44 môže podieľať na progresii choroby nielen prostredníctvom ciest súvisiacich s fibrózou, ale aj so zápalom. Na základe našich výsledkov však môžeme konštatovať, že hodnotenie CD44 v BALT by sa mohlo stať užitočným nástrojom na spresnenie a zvýšenie spoľahlivosti klinickej diagnostiky progresívno-fibróznych fenotypov DPPCH, čo môže byť obzvlášť užitočné pri predpovedaní pľúcnej fibrinogenézy napríklad aj u pacientov s dlhodobým COVID. sCD44 v BALT sa tak ukazuje ako spoľahlivý marker pľúcnej fibrózy.

Štúdia bola financovaná z grantu VEGA 1/0426/24, APVV-20-0513, VEGA 2/0152/21.

Zoznam použitej literatúry

1. Krištúfek P., 2021. *Pneumológia a ftizeológia*. 1.vydanie. Slovenská republika: Raabe, 2021. 120 strán. ISBN: 9788081404870
2. Li Y, Jiang D, Liang J, Meltzer EB, Gray A, Miura R, Wogensen L, Yamaguchi Y, Noble PW. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan

and CD44. J Exp Med. 2011 Jul 4;208(7):1459-71. doi: 10.1084/jem.20102510. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21708929; PMCID: PMC3135364.
3. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, Behr J, Cottin V, Danoff SK, Morell F, Flaherty KR, Wells A, Martinez FJ, Azuma A, Bice TJ, Bouros D, Brown KK, Collard HR, Duggal A, Galvin L, Inoue Y, Jenkins RG, Johkoh T, Kazerooni EA, Kitaichi M, Knight SL, Mansour G, Nicholson AG, Pipavath SNJ, Buendía-Roldán I, Selman M, Travis WD, Walsh S, Wilson KC; American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2018 Sep 1;198(5):e44-e68. doi: 10.1164/rccm.201807-1255ST. PMID: 30168753.
4. Raghu G, Remy-Jardin M, Ryerson CJ, Myers JL, Kreuter M, Vasakova M, Bargagli E, Chung JH, Collins BF, Bendstrup E, Chami HA, Chua AT, Corte TJ, Dalphin JC, Danoff SK, Diaz-Mendoza J, Duggal A, Egashira R, Ewing T, Gulati M, Inoue Y, Jenkins AR, Johannson KA, Johkoh T, Tamae-Kakazu M, Kitaichi M, Knight SL, Koschel D, Lederer DJ, Mageto Y, Maier LA, Matiz C, Morell F, Nicholson AG, Patolia S, Pereira CA, Renzoni EA, Salisbury ML, Selman M, Walsh SLF, Wuyts WA, Wilson KC. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2020 Aug 1;202(3):e36-e69. doi: 10.1164/rccm.202005-2032ST. Erratum in: Am J Respir Crit Care Med. 2021 Jan 1;203(1):150-151. doi: 10.1164/rccm.v203erratum1. Erratum in: Am J Respir Crit Care Med. 2022 Aug 15;206(4):518. doi: 10.1164/rccm.v206erratum4. PMID: 32706311; PMCID: PMC7397797.
5. Rajan SK, Cottin V, Dhar R, Danoff S, Flaherty KR, Brown KK, Mohan A, Renzoni E, Mohan M, Udwadia Z, Shenoy P, Currow D, Devraj A, Jankharia B, Kulshrestha R, Jones S, Ravaglia C, Quadrelli S, Iyer R, Dhooria S, Kolb M, Wells AU. Progressive pulmonary fibrosis: an expert group consensus statement. Eur Respir J. 2023 Mar 30;61(3):2103187. doi: 10.1183/13993003.03187-2021. PMID: 36517177; PMCID: PMC10060665.
6. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, Kreuter M, Lynch DA, Maher TM, Martinez FJ, Molina-Molina M, Myers JL, Nicholson AG, Ryerson CJ, Strek ME, Troy LK, Wijsenbeek M, Mammen MJ, Hossain T, Bissell BD, Herman DD, Hon SM, Kheir F, Khor YH, Macrea M, Antoniou KM, Bouros D, Buendia-Roldan I, Caro F, Crestani B, Ho L, Morisset J, Olson AL, Podolanczuk A, Poletti V, Selman M, Ewing T, Jones S, Knight SL, Ghazipura M, Wilson KC. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2022 May 1;205(9):e18-e47. doi: 10.1164/rccm.202202-0399ST. PMID: 35486072; PMCID: PMC9851481.
7. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Aug;160(2):736-55. doi: 10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99. PMID: 10430755.
8. Mira-Avendano I, Abril A, Burger CD, Dellaripa PF, Fischer A, Gotway MB, Lee AS, Lee JS, Matteson EL, Yi ES, Ryu JH. Interstitial Lung Disease and Other Pulmonary

Manifestations in Connective Tissue Diseases. Mayo Clin Proc. 2019 Feb;94(2):309-325. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.09.002. Epub 2018 Dec 14. PMID: 30558827.
9. Geerts S, Wuyts W, Langhe E, Lenaerts J, Yserbyt J. Connective tissue disease associated interstitial pneumonia: a challenge for both rheumatologists and pulmonologists. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2017;34(4):326-335. doi: 10.36141/svdld.v34i4.5894. Epub 2017 Apr 28. PMID: 32476865; PMCID: PMC7170069.
10. Cherian SV, Patel D, Machnicki S, Naidich D, Stover D, Travis WD, Brown KK, Naidich JJ, Mahajan A, Esposito M, Mina B, Lakticova V, Cohen SL, Muller NL, Schulner J, Shah R, Raoof S. Algorithmic Approach to the Diagnosis of Organizing Pneumonia: A Correlation of Clinical, Radiologic, and Pathologic Features. Chest. 2022 Jul;162(1):156-178. doi: 10.1016/j.chest.2021.12.659. Epub 2022 Jan 14. PMID: 35038455; PMCID: PMC9899643.
11. Liu Z, Yan J, Tong L, Liu S, Zhang Y. The role of exosomes from BALF in lung disease. J Cell Physiol. 2022 Jan;237(1):161-168. doi: 10.1002/jcp.30553. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34388259; PMCID: PMC9292261.
12. Wang Q, Xie Z, Wan N, Yang L, Jin Z, Jin F, Huang Z, Chen M, Wang H, Feng J. Potential biomarkers for diagnosis and disease evaluation of idiopathic pulmonary fibrosis. Chin Med J (Engl). 2023 Jun 5;136(11):1278-1290. doi: 10.1097/CM9.0000000000002171. PMID: 37130223; PMCID: PMC10309524.
13. Ramos C, Montaño M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001 May;24(5):591-8. doi: 10.1165/ajrcmb.24.5.4333. PMID: 11350829.
14. van der Voort R, Manten-Horst E, Smit L, Ostermann E, van den Berg F, Pals ST. Binding of cell-surface expressed CD44 to hyaluronate is dependent on splicing and cell type. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Sep 5;214(1):137-44. doi: 10.1006/bbrc.1995.2267. PMID: 7545390.
15. Bennett KL, Modrell B, Greenfield B, Bartolazzi A, Stamenkovic I, Peach R, Jackson DG, Spring F, Aruffo A. Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variably spliced exons. J Cell Biol. 1995 Dec;131(6 Pt 1):1623-33. doi: 10.1083/jcb.131.6.1623. PMID: 8522617; PMCID: PMC2120678.
16. Weng X, Maxwell-Warburton S, Hasib A, Ma L, Kang L. The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2022 May;33(5):318-332. doi: 10.1016/j.tem.2022.02.002. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35249813.
17. Govindaraju P, Todd L, Shetye S, Monslow J, Puré E. CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. Matrix Biol. 2019 Jan;75-76:314-330. doi: 10.1016/j.matbio.2018.06.004. Epub 2018 Jun 9. PMID: 29894820; PMCID: PMC6286871.
18. Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009 Jul;8(3):208-20. doi: 10.2174/187152809788680994. PMID: 19601881.

19. Chen L, Fu C, Zhang Q, He C, Zhang F, Wei Q. The role of CD44 in pathological angiogenesis. FASEB J. 2020 Oct;34(10):13125-13139. doi: 10.1096/fj.202000380RR. Epub 2020 Aug 23. PMID: 32830349.
20. Jordan AR, Racine RR, Hennig MJ, Lokeshwar VB. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. Front Immunol. 2015 Apr 21;6:182. doi: 10.3389/fimmu.2015.00182. PMID: 25954275; PMCID: PMC4404944.
21. Hassn Mesrati M, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. Biomolecules. 2021 Dec 9;11(12):1850. doi: 10.3390/biom11121850. PMID: 34944493; PMCID: PMC8699317.

31. Masívne paralelné sekvenovanie ako nástroj diagnostiky mitochondriálnych ochorení

RNDr. Gabriela Bľandová
(Lekárska biológia a klinická genetika)

Spoluautori: Mgr. Marian Baldovič, PhD.[2], prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH[1]
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH[1]
[1]Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, [2]Katedra molekulárnej biológie PriF UK

Úvod

Mitochondriálne ochorenia radíme do skupiny genetických porúch, pre ktoré sú charakteristické dysfunkčné mitochondrie. Molekulárna etiológia týchto ochorení je komplexná, pričom zahŕňa varianty v jadrovej a mitochondriálnej DNA (mtDNA). Môžu mať akýkoľvek typ dedičnosti, vrátane autozomálnej a X-viazanej dedičnosti pre varianty v jadrových génoch a maternálnej dedičnosti pre varianty v mtDNA. Sporadicky sa vyskytujú aj prípady zapríčinené *de novo* variantmi (1).

Pre určenie potrebného genetického vyšetrenia je kľúčová správna a detailná klinická diagnostika. Tá je však náročná z viacerých dôvodov. Klinické prejavy pacientov väčšinou nezapadajú do jediného syndrómu. Diagnostika mitochondriálnych ochorení je skomplikovaná často slabou koreláciou medzi genotypom a pozorovaným klinickým fenotypom, čo znamená, že niektoré varianty v mtDNA môžu viesť k niekoľkým odlišným klinickým syndrómom. U mitochondriálnych ochorení často pozorujeme pleiotropný účinok, teda ak jeden variant spôsobuje viacero, zdanlivo nesúvisiacich symptómov alebo ochorení. Ďalšou komplikáciou je neúplná penetrancia, teda aj keď jedinec nesie patogénny variant, nemusí u neho nevyhnutne dôjsť k rozvoju ochorenia. Variabilný klinický prejav variantu v mtDNA je často dôsledkom úrovne heteroplazmie. Prahová úroveň, teda minimálny kritický podiel mutovaných mtDNA potrebných na fenotypový prejav ochorenia, je rozdielna pre jednotlivé varianty a taktiež sa môže líšiť medzi tkanivami (2).

Revolúciu v diagnostike najmä zriedkavejších genetických porúch spôsobil príchod masívneho paralelného sekvenovania (MPS), ktoré sa stalo silným nástrojom na skúmanie genetického pozadia aj mitochondriálnych porúch. Významným problémom však v laboratórnej diagnostike u pacientov so suspektným mitochondriálnym ochorením ostává, že hoci mnohé metódy na diagnostiku mitochondriálnych ochorení sú dobre zavedené, metodika testovania sa medzi jednotlivými laboratóriami líši a doposiaľ nie je žiaden jediný laboratórny či diagnostický test zlatým štandardom na potvrdenie diagnózy tohto ochorenia a ani ustálený diagnostický algoritmus (3).

Materiál a metódy

Biologický materiál

Pre účely štúdie sme zozbierali súbor 137 pacientov so suspektným mitochondriálnym ochorením. Len 32 pacientov (23,4 %) bolo indikovaných výlučne na vyšetrenie génov asociovaných s mitopatiami so silnou klinickou suspekciou, kým zvyšných 105 pacientov (76,6 %) bolo na základe ich klinických príznakov indikovaných aj na vyšetrenie iného panelu génov. Ako vstupný materiál na analýzu DNA sme mali k dispozícií od pacientov zväčša vzorky periférnej krvi a bukálneho steru, pričom v niektorých prípadoch sme mali k dispozícií aj vzorky moču, aspirátu kostnej drene, či plodovej vody. Náš súbor pacientov tvorilo 78 žien a 59 mužov slovenského pôvodu.

DNA extrakcia

DNA pacientov bola izolovaná zo vzoriek periférnej krvi a aspirátu kostnej drene použitím komerčne dostupnej analytickej súpravy innuPREP Blood DNA Mini (IST Innuscreen GmbH). Na vzorky bukálneho steru, plodovej vody a moču bola použitá súprava InnuPREP Forensic kit (IST, Innuscreen GmbH).

Masívne paralelné sekvenovanie

Vzorky pacientov boli analyzované MPS, a to vyšetrením klinického exómu (CES) alebo celého exómu (WES) pomocou kitov od spoločnosti SOPHiA GENETICS. Pri výbere platformy sa zohľadňovala prítomnosť génov zahrnutých v jednotlivých kitoch, ktoré by mohli asociovať s klinickými príznakmi pacienta. Ďalším kritériom bol vek pacientov, pričom pediatrickí pacienti boli preferovaní na analýzu platformou WES. 97 vzoriek pacientov bolo analyzovaných prostredníctvom CES platformy a 34 vzoriek bolo analyzovaných pomocou WES platformy. Samotné sekvenovanie prebehlo pomocou sekvenačného systému NextSeq1000/2000. Získané dáta boli analyzované softvérom SOPHiA DDM.

MLPA analýza

Všetky vzorky pacientov boli analyzované MLPA analýzou pre mtDNA pomocou komerčne dostupného kitu SALSA MLPA Probemix P125 Mitochondrial DNA (MRC Holland) pre presnejšiu detekciu možných CNV variantov. Vzorky boli analyzované na prístroji SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), kde prebieha fragmentačná analýza.

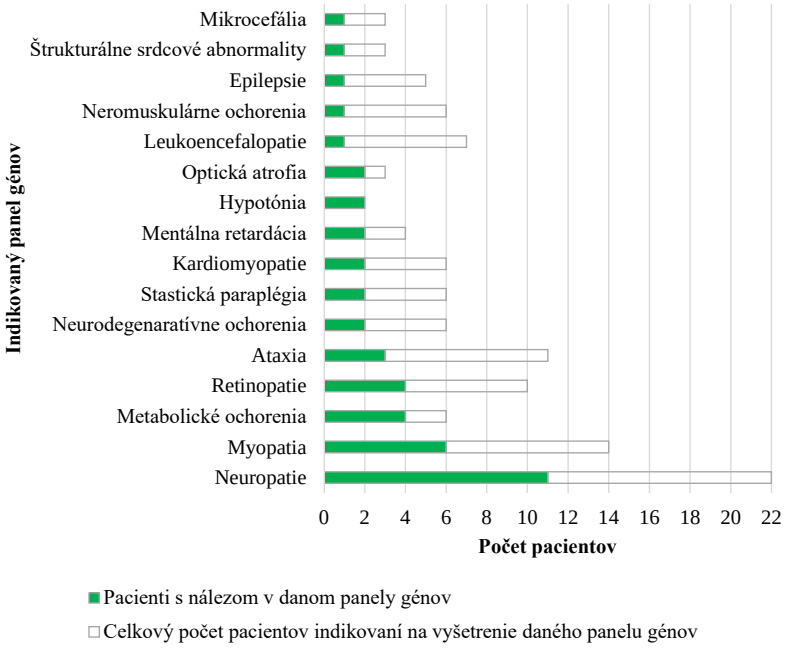
Výsledky

Z celkového počtu 137 pacientov so suspekciou na mitochondriálne ochorenie sme detegovali kauzálny variant u 50 pacientov (36 %) v paneli génov mitopatie. U 45 pacientov (33 %) sme detegovali kauzálny variant v inom indikovanom paneli génov (Graf 1), a teda v skutočnosti u týchto pacientov išlo o diagnózu mimo skupiny mitochondriálnych ochorení. U 42 pacientov (31 %) sme nedetegovali žiaden kauzálny variant a teda nezistili sme genetickú príčinu ich zdravotného stavu.

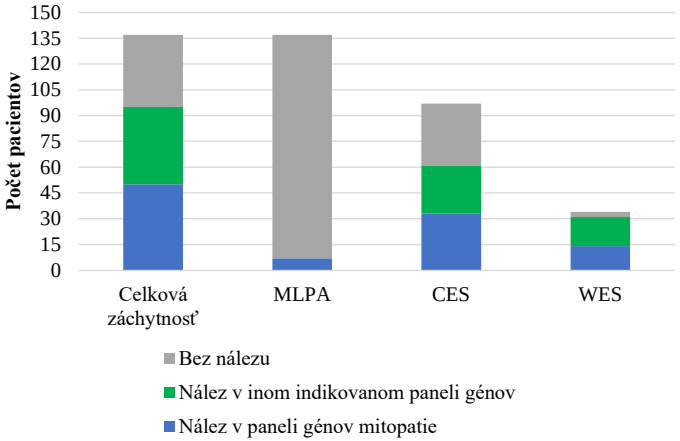
Z celkového počtu 50 pacientov s detegovaným patogénnym resp. potenciálne patogénnym variantom v paneli génov mitopatie sme u 10 pacientov (20 %) detegovali kauzálny variant

v mtDNA, pričom len 1 variant bol detegovaný v homoplazmickom stave, kým zvyšných 9 variantov bolo detegovaných v heteroplazmickom stave. U zvyšných 40 pacientov (80 %) bol kauzálny variant detegovaný v jadrovom genóme.

V génoch asociovaných s mitochondriálnymi ochoreniami sme MLPA analýzou zachytili kauzálny variant u 7 pacientov (5 %). Z celkového počtu pacientov analyzovaných CES prístupom sme detegovali kauzálny variant v paneli génov mitopatie u 33 pacientov (34 %), u 28 pacientov (29 %) sme detegovali kauzálny variant v inom indikovanom paneli génov, pričom u 36 pacientov (37 %) sme nezachytili žiaden variant triedy patogenity 5 alebo 4, ktorý by asocioval s fenotypom týchto pacientov. Z celkového počtu pacientov analyzovaných WES prístupom sme detegovali kauzálny variant v paneli génov mitopatie u 14 pacientov (41 %), u 17 pacientov (50 %) sme identifikovali kauzálny variant v inom indikovanom paneli génov a 3 pacienti (9 %) ostali bez stanovej príčiny ich ochorenia (Graf 2).



Graf 1: Panely génov mimo skupiny mitopatií s detegovaným patogénnym prípadne potenciálne patogénnym variantom



Graf 2: Celková úspešnosť genetického testovania

Diskusia

Naša práca identifikovala spomedzi 137 pacientov so suspektným mitochondriálnym ochorením (potenciálne) patogénne varianty v mtDNA a v génoch jadrovej DNA asociovaných s mitochondriálnymi ochoreniami u 50 pacientov, čo predstavuje 36 % z celkového počtu pacientov. Toto percento pacientov s potvrdeným mitochondriálnym ochorením je s súlade so štúdiou Grigalionienė et al. (4), ktorá potvrdila mitochondriálne ochorenie u 36,7 % pacientov s klinickou suspekciou. V štúdii Wortmann et al. (5) identifikovali veľmi podobné percento pacientov s potvrdeným mitochondriálnym ochorením za použitia WES platformy, kde u 109 pacientov s podozrením na mitochondriálne ochorenie potvrdili túto diagnózu u 42 pacientov (39 %). Percento pacientov s potvrdenou mitochondriálnou diagnózou v našej štúdii, ale aj dvoch vyššie spomenutých štúdiách je vyššie ako v štúdiách za použitia len panelového sekvenovania (6). Ukazuje sa, že pri diagnostike mitochondriálnych ochorení je panelové sekvenovanie nepostačujúce, vzhľadom na obmedzenú analýzu preddefinovaného súboru génov, čím sa zvyšuje riziko úniku kauzálnych variantov nachádzajúcich sa mimo preddefinovaného panelu génov a taktiež v prípade, že ide v konečnom dôsledku o iné genetické ochorenie nie je možné hľadať genetickú príčinu ochorenia v inom paneli génov.

Zo všetkých pacientov indikovaných na CES analýzu sme detegovali (potenciálne) patogénne varianty, či už vo virtuálnom paneli mitopatie alebo v inom indikovanom paneli génov u 63 % pacientov, zatiaľ čo pri pacientoch indikovaných na WES analýzu to bolo až 91 %, čo poukazuje na výrazne vyššiu diagnostickú výťažnosť WES v porovnaní s CES platformou. Keďže skupina mitochondriálnych ochorení je geneticky extrémne heterogénna, pričom do etiológie týchto ochorení je zapojených okolo 1500 génov (7), WES prístup je efektívnejší, keďže poskytuje pokrytie takmer všetkých kódujúcich oblastí genómu, a teda zahŕňa aj gény, ktoré nie sú súčasťou CES, čím sa zvyšuje šanca na identifikáciu aj zriedkavejších DNA variantov spojených s fenotypmi pacientov (5).

Z celkového súboru 137 pacientov so suspekciou na mitochondriálne ochorenie nebola genetická príčina ochorenia identifikovaná u 42 pacientov (31 %), u ktorých sme nedetegovali žiaden kauzálny variant triedy patogenity 4 alebo 5, či už asociovaný s mitopatiami alebo inými ochoreniami. Táto skupina pacientov predstavuje veľkú výzvu, nielen v našej, ale aj v iných štúdiách (8-10).

7,1 % z týchto negatívnych vzoriek bolo analyzovaných výlučne MLPA metódou pre mtDNA. Vzhľadom na charakter tejto metódy je pravdepodobnosť zachytenia kauzálneho nálezu pomerne nízka, keďže príslušný kit zahŕňa 6 najčastejších patogénnych mtDNA variantov a deteguje CNV varianty, ktoré sú ale vo všeobecnosti genetickou príčinou niektorého zo širokej a početnej skupiny mitochondriálnych ochorení len zriedka.

Aj naša štúdia ukázala, že relatívne malé percento pacientov s klinickou suspekciou na mitochondriálne ochorenia má v skutočnosti geneticky potvrdené mitochondriálne ochorenie, čo je dôsledkom rozsiahlej fenotypovej variability týchto ochorení. Mitochondriálne ochorenia môžu ovplyvňovať takmer všetky tkanivá a orgánové systémy, čo vedie k širokému spektru klinických prejavov, od neurologických a svalových symptómov až po ochorenia srdca, pečene či metabolické dysfunkcie, čo sme pozorovali aj v našom súbore pacientov. Táto variabilita často napodobňuje mnohé iné genetické alebo získané ochorenia, čím sa sťažuje klinická diagnostika (11). Na druhej strane je však potrebné zdôrazniť, že pacienti, u ktorých sa klinicky nepredpokladá mitochondriálne ochorenie, môžu napriek tomu trpieť týmto typom ochorenia, čo ukázala aj štúdia Grier et al. (12), ktorá uvádza, že z 210 pacientov bolo nesprávne diagnostikových 50 % pacientov na ochorenie mimo skupiny mitopatii, pričom podrobnejšie analýzy v konečnom dôsledku potvrdili mitochondriálne ochorenie.

Hoci je v súčasnosti WES rutinne využívaný v diagnostickej praxi, celková diagnostická výťažnosť stále nie je 100 %, čo sa ukázalo aj v našej štúdii. Pri nevyriešených prípadoch prostredníctvom WES prístupu, kde bola ako vstupný materiál použitá vzorka periférnej krvi, je možnou príčinou variant prítomný v mtDNA s heteroplazmiou pod detekčný limit danej metódy. V takýchto situáciách je vhodné zvážiť analýzu mtDNA zo vzoriek alternatívnych tkanív, ako je moč, sval alebo iné relevantné tkanivo, kde môže byť úroveň heteroplazmie podstatne vyššia, čo hovoria aj iné štúdie (13). Nediagnostikované prípady by mohli byť spôsobené aj kauzálnym variantom v génoch ešte neasociovanými s mitopatiami, prípadne variantmi, ktoré nie je možné detegovať pomocou WES, ako sú napríklad hlboké intrónové varianty, či expanzie. Možným riešením je využitie celogenomového sekvenovania (WGS), ktoré má potenciál zachytiť varianty, ktoré nie sme schopní detegovať prostredníctvom WES (14). V súčasnosti sa rozvíjajú aj nové technológie založené na dlhých čítaniach, ktoré by mohli objasniť prípady bez stanovej genetickej príčiny ochorenia. Toto sekvenovanie s dlhými čítaniami umožňuje detekciu zložitých štrukturálnych variantov, ktoré sú prostredníctvom krátkych čítaní len ťažko detekovateľné. Patria sem napríklad rozsiahle inverzie, delécie alebo translokácie. (15).

Na základe získaných výsledkov je nevyhnutné zamerať sa na integráciu pokročilých technológií do klinickej praxe a prehĺbenie výskumu v oblasti mitochondriálnych dysfunkcií, aby sa zvýšila diagnostická výťažnosť a zaviedli sa personalizované terapeutické stratégie, ktoré by mohli významne zlepšiť kvalitu života pacientov s mitochondriálnymi ochoreniami.

Zoznam použitej literatúry

1. Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., ... & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. Nature reviews Disease primers, 2(1), 1-22.
2. Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2020). Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. EMBO reports, 21(3), e49612.
3. Mavraki, E., Labrum, R., Sergeant, K., Alston, C. L., Woodward, C., Smith, C., ... & Fratter, C. (2023). Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines. European Journal of Human Genetics, 31(2), 148-163.
4. 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.
5. Wortmann, S. B., Koolen, D. A., Smeitink, J. A., van den Heuvel, L., & Rodenburg, R. J. (2015). Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. Journal of inherited metabolic disease, 38(3), 437-443.
6. Lieber, D. S., Calvo, S. E., Shanahan, K., Slate, N. G., Liu, S., Hershman, S. G., ... & Mootha, V. K. (2013). Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. Neurology, 80(19), 1762-1770.
7. Schlieben, L. D., & Prokisch, H. (2020). The dimensions of primary mitochondrial disorders. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 600079.
8. Sun, G., Huang, W., Wang, L., Wu, J., Zhao, G., Ren, H., ... & Kong, X. (2024). Molecular findings in patients for whole exome sequencing and mitochondrial genome assessment. Clinica Chimica Acta, 119774.
9. Retterer, K., Juusola, J., Cho, M. T., Vitazka, P., Millan, F., Gibellini, F., ... & Bale, S. (2016). Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. Genetics in Medicine, 18(7), 696-704.
10. Yang, Y., Muzny, D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Ding, Y., ... & Eng, C. M. (2014). Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. Jama, 312(18), 1870-1879.
11. McFarland, R., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. The Lancet Neurology, 9(8), 829-840.
12. Grier, J., Hirano, M., Karaa, A., Shepard, E., & Thompson, J. L. (2018). Diagnostic odyssey of patients with mitochondrial disease: results of a survey. Neurology: Genetics, 4(2), e230.
13. Paredes-Fuentes, A. J., Oliva, C., Urreizti, R., Yubero, D., & Artuch, R. (2023). Laboratory testing for mitochondrial diseases: biomarkers for diagnosis and follow-up. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 60(4), 270-289.
14. Davis, R. L., Kumar, K. R., Puttick, C., Liang, C., Ahmad, K. E., Edema-Hildebrand, F., ... & Sue, C. M. (2022). Use of whole-genome sequencing for mitochondrial disease diagnosis. Neurology, 99(7), e730-e742.
15. Sund, K. L., Liu, J., Lee, J., Garbe, J., Abdelhamed, Z., Maag, C., ... & Hestand, M. S. (2024). Long-read sequencing and optical genome mapping identify causative gene disruptions in noncoding sequence in two patients with neurologic disease and known chromosome abnormalities. American Journal of Medical Genetics Part A, e63818

32. Spánkové správanie a neuromorfológia mozgových štruktúr v animálnom modeli porúch autistického spektra

Mgr. Petronela Sušienková
(Lekárske neurovedy)

Spoluautori: Jakub Szabó[2], Iveta Pajanová[3,4], Izabela Mária Hašková[1], Andrej Feješ[1], Ladislav Bačiak[5], Peter Celec[1,6]

Školiteľ: Mgr. Veronika Borbélyová, PhD.

[1] Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, [2] Ústav medicínskej fyziky a biofyziky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, [3] Ústav elektrotechniky, Fakulta elektrotechniky a informačných technológií, Slovenská technická univerzita, [4] Ústav meraní, Slovenská akadémia vied, [5] Centrálne laboratória, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, [6] Ústav patofyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Pacienti s poruchami autistického spektra (PAS) často udávajú okrem charakteristických symptómov, ktorými sú ťažkosti v sociálnych interakciách spolu s repetitívnym a stereotypným správaním, aj poruchy spánku (1). Bolo popísané, že až 95% pacientov s PAS má ťažkosti so spánkom (2), pričom zväčša ide o problémy pri zaspávaní, ktoré môžu zhoršiť symptómy PAS (1). Zároveň boli popísané morfologické rozdiely a rozdiely konektivity mozgových oblastí súvisiacich so spánkom, akými sú amygdala, hypotalamus, talamus, hipokampus, či prefrontálny kortex u pacientov s PAS (3,4). Napriek stúpajúcej prevalencii PAS je etiopatogenéza týchto porúch stále nejasná. Genetické faktory zohrávajú významnú úlohu pri vzniku PAS, pričom jedným z často mutovaných génov identifikovaných u 1-2% pacientov s PAS je *SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3* (SHANK3) gén zodpovedajúci za synaptogenézu (5). *Shank3*-deficientné myši sú zároveň často používaným animálnym modelom PAS, pretože vykazujú správanie podobné symptómom PAS (5). Podobne ako u pacientov, aj v tomto animálnom modeli boli identifikované ťažkosti so spánkom (3,6). Okrem toho boli poruchy synaptogenézy, ktoré súvisia aj s deficienciou *Shank3* génu, identifikované ako potenciálny faktor ťažkostí so spánkom v animálnych modeloch PAS (7). Avšak, prepojenie medzi neuroanatómiou mozgových štruktúr, ťažkosťami so spánkom a ich dopadu na správanie podobné PAS v genetickom animálnom modeli Shank3-deficientných myší v literatúre chýba. Preto bolo našim cieľom skúmať súvislosti medzi správaním podobným PAS, spánkovým správaním a volumetriou mozgových štruktúr (hypotalamus, hipokampus, corpus callosum, mozoček, striatum) *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Taktiež sme zisťovali, či volumetria mozgových štruktúr vedie k prehĺbeniu správania podobného PAS prostredníctvom ťažkostí v spánkovom správaní u Shank3-/- myší.

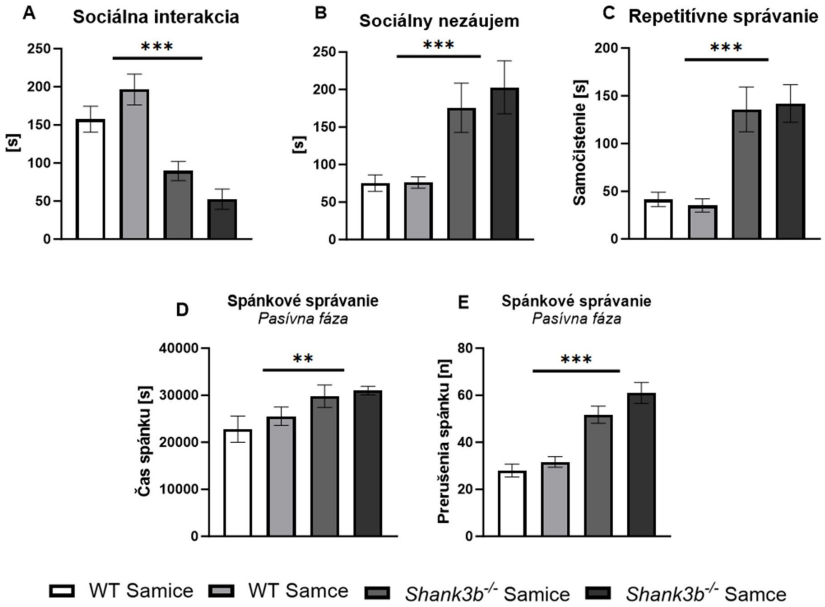
Materiál a metódy

Samice a samce *Shank3b*$^{-/-}$ myší a wild-type (WT) myší bez genetickej mutácie (n=8/skupina) boli behaviorálne testované na správanie podobné PAS: Test recipročnej sociálnej interakcie (sociálna interakcia, sociálny nezáujem), Test otvoreného poľa (repetitívne samočistenie). Spánkové správanie bolo hodnotené počas 24 hodinového monitoringu správania v domácej klietke, z toho 12 hodín zachytávalo aktívnu fázu (noc) a 12 hodín zachytávalo pasívnu fázu (deň), pričom sa hodnotila dĺžka spánku a spánkové fragmentácie. Správanie bolo automaticky analyzované prostredníctvom EthoVision XT 16 software (Noldus, Wageningen, Holandsko). Repetitívne samočistenie a sociálne správanie bolo manuálne hodnotené dvomi nezávislými pozorovateľmi. Pre štatistické spracovanie bol použitý priemer hodnôt posúdený pozorovateľmi. Myši boli skenované in vivo magnetickej rezonancii (*T2 -w*) a bola pripravená volumetrická analýza vybraných neuroanatomických štruktúr. Objemy jednotlivých oblastí boli normalizované vzhľadom na objem celého mozgu.

Dáta boli analyzované prostredníctvom JASP 0.18.2.0 software. Pre zistenie rozdielov podľa genotypu, pohlavia a ich interakcie bola použitá ANOVA (two-way) s následnou post hoc Bonferroniho korekciou. Pearsonov korelačný koeficient bol použitý na analýzu vzťahov medzi behaviorálnymi parametrami a relatívnym objemom mozgových štruktúr u *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Zistené vzťahy medzi objemom mozgových štruktúr, správaním podobným PAS a spánkovými prerušeniami boli následne analyzované mediačnou analýzou, pričom prerušenia spánku predstavovali skúmaný mediátor medzi prediktorom (relatívnym objemom mozgovej štruktúry) a závislou premennou (behaviorálny parameter) u *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Dáta sú vizualizované ako priemer ± SEM.

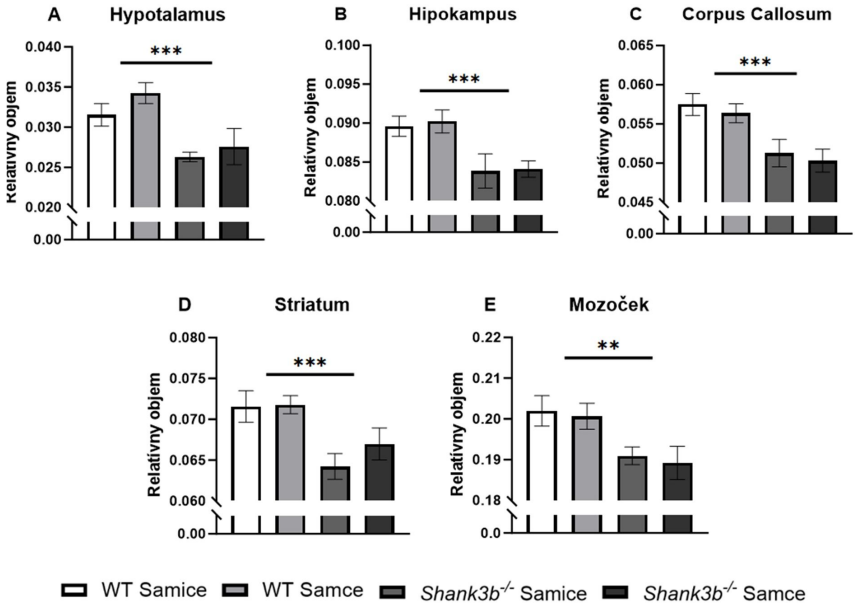
Výsledky

Zistili sme významné rozdiely medzi *Shank3b*$^{-/-}$ myšami a WT myšami v správaní podobnom PAS (sociálna interakcia: $F_{(1,28)}$=43,054; p<0,001; η^2=0,562; sociálny nezáujem: $F_{(1,28)}$=20,682; p<0,001; η^2=0,42; repetícia: $F_{(1,28)}$=38,557; p<0,001; η^2=0,578). Samce a samice sa medzi sebou nelíšili. *Shank3b*$^{-/-}$ myši prejavovali nižší sociálny záujem (t=-6,562; p<0,001; d=-2,32; Obr. 1A) a zároveň vyšší sociálny nezáujem o kontakt s druhou myšou (t=4,548; p<0,001; d=1,608; Obr.1B) ako WT myši. Taktiež sme u nich pozorovali takmer trikrát vyššiu mierou repetitívneho samočistenia ako u WT myší (t=6,209; p<0,001; d=2,195; Obr.1C). Dĺžka spánku ako aj spánková fragmentácia u *Shank3b*$^{-/-}$ myši počas ich aktívnej fázy dňa boli porovnateľné s WT myšami. V pasívnej fáze dňa sme pozorovali rozdiely medzi *Shank3b*$^{-/-}$ myšami a WT myšami v dĺžke spánku ($F_{(1,28)}$=8,511; p<0,01; η^2=0,227), ako aj v spánkovej fragmentácii ($F_{(1,28)}$=62,141; p<0,001; η^2=0,658), avšak samce a samice sa nelíšili. Kým *Shank3b*$^{-/-}$ myši spali dlhšie ako myši WT (t=2,917; p<0,01; d=1,031; Obr. 1D), ich spánok bol takmer dvakrát tak často prerušovaný ako u WT myší (t=7,883; p<0,001; d=2,787; Obr. 1E). Zatiaľ čo vyšší čas strávený spánkom v pasívnej fáze nesúvisel so sociálnym správaním, trendom súvisel s nižšou repetíciou (p=0,056). Vyšší počet prerušení spánku v pasívnej fáze u *Shank3b*$^{-/-}$ myší súvisel s vyššou repetíciou a trendom (p=0,06) s nižším časom stráveným v sociálnej interakcii (Tabuľka 1).



*Obr. 1 Porovnanie správania podobného PAS a spánkového správania WT a Shank3b-/- myší. *** - p<0,001*

Pozorovali sme rozdiely medzi *Shank3b*$^{-/-}$ myšami a WT myšami v relatívnom objeme mozgových štruktúr ($F_{(1,28)}$= min. 11,066 – max. 17,351; p<0,01 všetky; η^2= min. 0,282 – max. 0,378). *Shank3b*$^{-/-}$ myši mali menší hypotalamus (t=-3,93; p<0,001; d=-1,39; Obr. 2A), hipokampus (t=-3,798; p<0,001; d=-1,343; Obr. 2B), corpus callosum (t=-4,165; p<0,001; d=-1,473; Obr. 2C), striatum (t=-3,623; p<0,001; d=-1,281; Obr. 2D) a mozoček (t=-3,327; p<0,01; d=-1,176; Obr. 2E) ako WT myší. Nepozorovali sme rozdiely v relatívnom objeme mozgových štruktúr medzi samcami a samicami.



Obr. 2 Porovnanie relatívneho objemu mozgových štruktúr WT a Shank3-/- myší.

Častejšie prerušenia spánku u *Shank3b*$^{-/-}$ myší súviseli s nižším relatívnym objemom mozočka a hypotalamu. Nižší čas strávený v sociálnych interakciách bol spojený s nižším relatívnym objemom striata, amygdaly a mozočka. Vyšší sociálny nezáujem súvisel s menším relatívnym objemom hypotalamu a striata. Repetitívne správanie bolo spojené s nižším relatívnym objemom mozočka a striata (Tabuľka 1).

Tabuľka 1. Korelácie behaviorálnych parametrov a relatívnych objemov mozgových štruktúr.

	Dĺžka spánku [s]	Prerušenia spánku [n]	Soc. interakcia [s]	Soc. nezáujem [s]	Repetícia [s]	Rel. Mozoček	Rel. Hypotalamus
Prerušenia spánku [n]	-0.555*	—					
Soc. interakcia [s]	-0.120	-0.475	—				
Soc. nezáujem [s]	0.280	0.388	-0.572*	—			
Repetícia [s]	-0.486	0.531*	-0.556*	0.356	—		
Rel. Mozoček	0.159	-0.571*	0.704**	-0.462	-0.522*	—	
Rel. Hypotalamus	0.331	-0.666***	0.399	-0.517*	-0.442	0.595*	—
Rel. Striatum	-0.032	-0.098	0.504*	-0.538*	-0.668**	0.551*	0.374

Pozn: soc.-sociálny, rel.-relatívny objem (vzhľadom na objem mozgu); *-p<0.05; **-p<0.01; ***-p<0.001

Na základe interkorelačného vzťahu medzi relatívnym objemom mozočka, spánkom a správaním sme vykonali mediačnú analýzu, ktorá nepreukázala, že spánkové fragmentácie sprostredkúvajú vzťah menšieho relatívneho objemu mozočka a vyšším repetitívnym samočistením (nepriamy efekt: β=-21,877; p=0,209, 95% CI [-101,172 – 8,71]) či sociálnym záujmom (nepriamy efekt: β=6,913; p=0,617, 95% CI [-12,742 – 66,828]) u *Shank3b*$^{-/-}$ myší.

Diskusia

V našej práci sme zaznamenali správanie podobné PAS spolu s ťažkosťami so spánkom u *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Tieto myší síce v pasívnej fáze dňa síce spali dlhšie, ale viac sa budili v porovnaní s WT myšami. Zároveň sme pozorovali atrofiu ich mozgových štruktúr, ktorá selektívne súvisela so správaním. Bolo popísané, že ťažkosti so spánkom u pacientov s PAS môžu viesť ku zhoršeniu charakteristických symptómov PAS (1). Podobne aj naše výsledky nazančili súvislosť medzi správaním podobným PAS a spánkovými fragmentáciami. Okrem toho správanie podobné PAS súviselo aj s atrofiou mozgových štruktúr. Ťažkosti v sociabilite súviseli najmä s menšou relatívnym objemom mozočka, striata a hypotalamu, kým repetícia súvisela s atrofiou mozočka a striata. Relatívny objem hypotalamu, mozgovej štruktúry podieľajúcej sa na regulácii spánku a bdenia (4), ako aj relatívna veľkosť mozočka, ktorý taktiež prispieva k regulácii spánku pravdepodobne prostredníctvom cerebro-cerebelárnych dráh (8), v našom výskume súviseli so spánkovými prerušeniami *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Avšak, iba pri atrofii mozočka sme pozorovali súvislosť aj so spánkovými fragmentáciami ako aj s správaním podobnom PAS. Mozoček zohráva významnú rolu pri výskyte repetitívneho správania, pri metalizácii, ktorá je u pacientov s PAS zhoršená (7), no je tiež podstatný pri spánkovom správaní (8). Avšak, naše výsledky nepreukázali, že by menší relatívny objem mozočka zhoršovala správanie podobné PAS prostredníctvom zvýšenej spánkovej fragmentácie u *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Zdá sa, že menší relatívny objem mozočka môže byť zapojený do modulácie správania podobného PAS skôr prostredníctvom priameho vplyvu na toto správanie, ako sa to

predpokladá v literatúre (9), než prostredníctvom vplyvu na spánok. Okrem toho je potrebné zohľadniť aj iné faktory, ktoré môžu hrať rolu pri vzťahu spánkového správania a zhoršenia sociability a repetície, ako napríklad miera nabudenia, ktorá je spájaná s ťažkosťami so zaspávaním u pacientov s PAS (2,4). Zároveň môže byť tento vzťah u pacientov s PAS sprostredkovaný iným typom ťažkostí so spánkom (napr. problémy pri zaspávaní) (2), než je spánková fragmentácia, ktorú sme identifikovali u *Shank3b*$^{-/-}$ myší. Limitáciou tejto práce je tiež absencia zaznamenávania elektorencefalografických záznamov priamo pri spánku myší, ktorá by mohla hlbšie objasniť kvalitu spánku a prítomnosť spánkových rytmov, ktorých zmeny boli popísané u *Shank3* deficientných myší najme v NREM fáze (2). Do budúceho výskumu by bolo preto dôležité použiť väčší výskumný súbor na overenie identifikovaných vzťahov. Následne by bolo potrebné zamerať sa na zohľadnenie ďalších faktorov súvisiacich so zhoršením spánku, ako napríklad koncentrácie kortikosterónu či melatonínu v cirkulácii, keďže ide o hormóny, ktoré súvisia s hypernabudením identifikovaným u pacientov s PAS. Naša práca využila na analýzu spánku metódu monitorovania správania myší v domácej klietke, ktorá sleduje prirodzené správanie zvieraťa a znižuje vplyv stresu na výkon zvieraťa v teste (10). Avšak, pre overenie kauzálneho vzťahu medzi vplyvom spánkových ťažkostí na správanie podobné PAS by bolo do budúceho výskumu vhodné zaradiť experimentálny dizajn využívajúci napríklad spánkovú depriváciu.

Podporené grantom APVV-20-0185.

Zoznam použitej literatúry

1. Kim H, Kim JH, Yi JH, Kim JY, Solmi M, Cortese S, et al. Correlations between sleep problems, core symptoms, and behavioral problems in children and adolescents with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. Eur Child Adolesc Psychiatry. 01. máj 2024;33(5):1539–49.
2. Mohammed MA, Abdalkhalig EM, Ali IA, Hassan SS, Osman H. Pattern of sleep disorders among children with autism spectrum disorder. BMC Psychiatry. 30. júl 2024;24(1):539.
3. Maurer JJ, Choi A, An I, Sathi N, Chung S. Sleep disturbances in autism spectrum disorder: Animal models, neural mechanisms, and therapeutics. Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms. 01. máj 2023;14:100095.
4. He T, Xu C, Hu W, Zhang Z, Zhou Z, Cui X, et al. Research progress on the main brain network mechanisms of sleep disorders in autism spectrum disorder. Curr Psychol. 01. október 2024;43(40):31674–85.
5. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. Cell. február 2020;180(3):568-584.e23.
6. Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. Nature. apríl 2011;472(7344):437–42.
7. Doldur-Balli F, Imamura T, Veatch OJ, Gong NN, Lim DC, Hart MP, et al. Synaptic dysfunction connects autism spectrum disorder and sleep disturbances: A perspective from studies in model organisms. Sleep Medicine Reviews. 01. apríl 2022;62:101595.

8. Canto CB, Onuki Y, Bruinsma B, Werf YD van der, Zeeuw CID. The Sleeping Cerebellum. Trends in Neurosciences. 01. máj 2017;40(5):309–23.
9. Biswas MS, Roy SK, Hasan R, PK MMU. The crucial role of the cerebellum in autism spectrum disorder: Neuroimaging, neurobiological, and anatomical insights. Health Sci Rep. 03. júl 2024;7(7):e2233.
10. Kahnau P, Mieske P, Wilzopolski J, Kalliokoski O, Mandillo S, Hölter SM, et al. A systematic review of the development and application of home cage monitoring in laboratory mice and rats. BMC Biology. 13. november 2023;21(1):256.

33. Selektívna úloha Toll-like Receptora 9 v kognitívnych funkciách

Mgr. Emma Skybová
(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Jakub Szabó[2], Filip Baran[1], Peter Celec[1,3]
Školiteľ: Mgr. Ľubica Janovičová, PhD.
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
[2]Ústav lekárskej fyziky a biofyziky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
[3]Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,

Úvod

Pamäť je dôležitý kognitívny proces, ktorý umožňuje ľuďom ukladať a vybavovať informácie nevyhnutné pre adaptáciu a prežitie. Hipokampus, štruktúra v temporálnom laloku mozgu, zohráva kľúčovú úlohu pri formovaní a konsolidácii nových spomienok. Poškodenie hipokampu môže viesť k vážnym kognitívnym deficitom, vrátane neschopnosti zapamätať si a vybavovať si informácie. Napriek tradičnému vnímaniu hipokampu ako hlavného centra pamäti, súčasný výskum odhaľuje komplexnejšiu povahu pamäťových procesov, ktoré zahŕňajú široké spektrum molekulárnych mechanizmov a interakcií medzi neurónmi, synaptickú plasticitu, ako aj vplyvy rôznych neurotransmiterov a receptorov.

V posledných rokoch sa osobitná pozornosť venuje úlohe imunitného systému v regulácii mozgových funkcií, pričom sa poukazuje, že imunitné receptory môžu ovplyvňovať synaptickú plasticitu a procesy spojené s pamäťou. Toll-like receptory (TLR) sú známe svojou úlohou v imunitnom systéme, kde rozpoznávajú patogénom asociované molekulové vzory a poškodením asociované molekulové vzory a spúšťajú imunitnú odpoveď. Jeden z TLR bol identifikovaný ako negatívny regulátor neurogenézy v hipokampe, pričom jeho absencia viedla k zlepšeniu pamäťových funkcií u myší[1].

Špecificky, Toll-like receptor 9 (TLR9) je známy svojou schopnosťou rozpoznávať ne-metylovanú CpG DNA, typickú pre bakteriálnu a vírusovú DNA, a spúšťať imunitnú odpoveď. Nedávne štúdie naznačujú, že TLR9 zohráva úlohu aj v centrálnom nervovom systéme (CNS), konkrétne v pamäťových procesoch. Výskum ukázal, že mikroglie v hipokampe využívajú TLR9 na reguláciu neurogenézy po záchvatoch, čím chránia pred abnormálnym rastom neurónov a potenciálnym kognitívnym deficitom[2].

Okrem toho, štúdia zistila, že TLR9 v neurónoch CA1 oblasti hipokampu je nevyhnutný pre kontextovú pamäť. Selektívna delécia TLR9 v týchto neurónoch viedla k zhoršenej schopnosti myší zapamätať si kontextové informácie, čo naznačuje, že TLR9 priamo prispieva k formovaniu pamäťových engramov[3].

Pamäť zahŕňa rôzne funkčne špecifické typy, ako sú krátkodobá, dlhodobá, priestorová a pracovná pamäť. Zostáva nejasné, či mechanizmy regulované TLR9 ovplyvňujú všetky tieto formy pamäti, alebo či ich účinok je špecifický len pre niektoré aspekty kognície. Preto je cieľom tejto štúdie preskúmať vplyv deficiencie TLR9 na rôzne formy pamäti a kognitívnu flexibilitu u myší.

Materiál a metódy

V tejto štúdii sme použili dospelé Tlr9-deficientné (TLR9-/-, n=25) a geneticky intaktné (WT, n=19) myši oboch pohlaví. Myši boli testované v dvoch behaviorálnych testoch: Morrisovom vodnom bludisku (MWM) a teste rozpoznávania nového objektu (NOR).

Morrisovo vodné bludisko (MWM) je klasický test priestorovej pamäti a učenia. Myši boli trénované na nájdenie skrytej platformy v kruhovom bazéne s vodou. Počas tréningovej fázy sme merali vzdialenosť a čas, ktorú myši prešli, kým našli platformu. V testovacej fáze sme odstránili platformu a merali vzdialenosť a čas strávený v cieľovom kvadrante, kde sa platforma predtým nachádzala.

Test rozpoznávania nového objektu (NOR) sa používa na hodnotenie krátkodobej a dlhodobej pamäti rozpoznávania. Myši boli najprv vystavené dvom identickým objektom. Po hodinovej prestávke (krátkodobá pamäť) a následne po 24-hodinovej prestávke (dlhodobá pamäť) boli myši opäť vystavené dvom objektom, pričom jeden z nich bol nový. Merali sme čas, ktorý myši strávili skúmaním nového objektu.

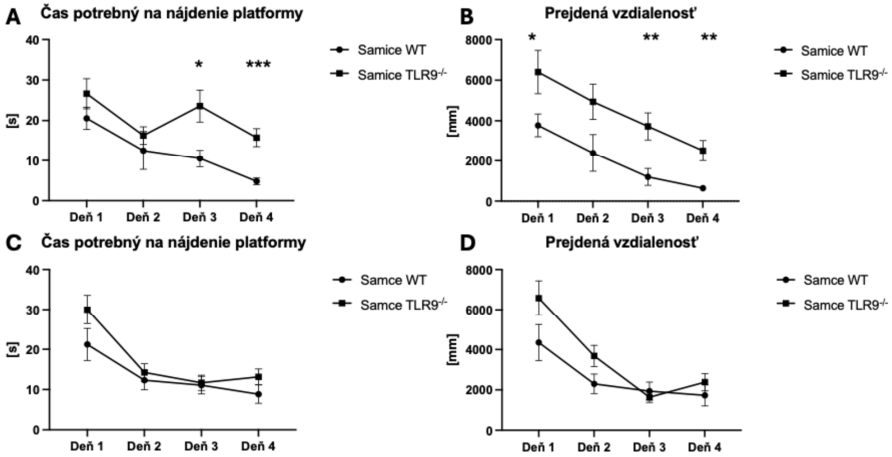
Dáta boli analyzované pomocou štatistického softvéru GraphPad Prism version 6.04 for MAC. Pre zistenie rozdielov medzi skupinami sme použili ANOVA (two-way) s následným post hoc testom s Bonferroniho korekciou a Studentov T-test.

Výsledky

Proces učenia a priestorová pamäť v Morrisovom vodnom bludisku (MWM)

Tréningová fáza MWM bola navrhnutá na hodnotenie priestorového učenia u myší. Výsledky ukázali, že samice Tlr9-/- prešli v priemere dvojnásobnú vzdialenosť v porovnaní s kontrolnými WT myšami, kým našli skrytú platformu ($p < 0,01$). Podobný, aj keď menej výrazný efekt bol pozorovaný u samcov Tlr9-/-, kde bola vzdialenosť približne 1,5-násobne väčšia ako u WT myší ($p < 0,05$). Tieto výsledky naznačujú, že deficiencia TLR9 spomaľuje proces učenia priestorových vzorcov u oboch pohlaví.

Počas testovacej fázy, v ktorej bola platforma odstránená, sa skúmalo, či si myši dokázali zapamätať jej pôvodnú polohu. Samice aj samce Tlr9-/- strávili v cieľovej oblasti porovnateľné množstvo času ako WT myši, pričom rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky významné (samice: $p = 0,09$; samce: $p = 0,28$). To naznačuje, že aj napriek pomalšiemu priebehu učenia si myši Tlr9-/- dokázali nakoniec osvojiť priestorové informácie na úroveň kontrolných zvierat.



*Obr. 1 Porovnanie času a vzdialenosti potrebných na nájdenie skrytej platformy počas učiacej fázy u samíc a samcov WT a TLR9-/- myší: A) Potrebný čas a (B) prejdená vzdialenosť počas 4 cvičných dní u samíc WT a TLR9-/-; (C) Potrebný čas a (D) prejdená vzdialenosť počas 4 cvičných dní u samcov WT a TLR9-/-. * - p<0,05 ** - p<0,01 *** - p<0,001*

Kognitívna flexibilita v reverznom MWM teste

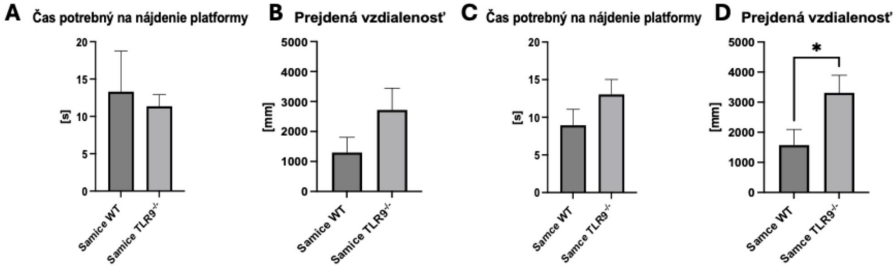
Kognitívna flexibilita bola hodnotená reverzným testom v MWM, kde bola platforma presunutá na novú pozíciu. Medzi samicami Tlr9-/- a WT myšami neboli pozorované žiadne významné rozdiely (p = 0,16), čo naznačuje, že deficiencia TLR9 u samíc nemala vplyv na ich schopnosť adaptovať sa na novú situáciu.

Naopak, samce Tlr9-/- prešli dvojnásobnú vzdialenosť oproti kontrolným WT samcom, kým našli novú polohu platformy (p < 0,05). Tento výsledok naznačuje, že deficiencia TLR9 môže u samcov negatívne ovplyvniť schopnosť flexibilne využívať stratégie pri hľadaní cieľa, čo by mohlo odrážať deficit v schopnosti preučiť sa na nové podmienky.

Krátkodobá a dlhodobá pamäť v teste rozpoznávania nového objektu (NOR)

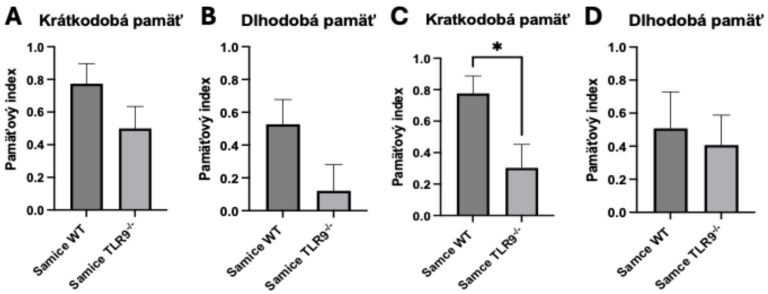
V NOR teste bola krátkodobá a dlhodobá pamäť hodnotená podľa času stráveného skúmaním nového objektu v porovnaní s už známym objektom.

Samice Tlr9-/- nevykazovali žiadne významné rozdiely oproti WT myšiam ani v krátkodobej (p = 0,20), ani v dlhodobej pamäti (p = 0,12). To naznačuje, že u samíc deficiencia TLR9 významne neovplyvňuje pamäť rozpoznávania.



*Obr. 2 Porovnanie času a prejdenej vzdialenosti potrebných na nájdenie novej pozície skrytej platformy počas reverznej fázy u samíc a samcov WT a TLR9-/- myší: (A) Potrebný čas a (B) prejdená vzdialenosť u samíc WT a TLR9-/-; (C) Potrebný čas a (D) prejdená vzdialenosť u samcov WT a TLR9-/-. * - p<0,05*

Na druhej strane, samce Tlr9-/- mali výrazne zhoršenú krátkodobú pamäť, pričom strávili približne dvakrát menej času skúmaním nového objektu v porovnaní s WT myšami ($p < 0,05$). Tento výsledok naznačuje, že deficiencia TLR9 môže u samcov ovplyvniť procesy krátkodobého uchovávania informácií. Avšak v dlhodobej pamäti sa medzi skupinami nezistili žiadne rozdiely ($p = 0,72$), čo znamená, že TLR9 nie je zásadný pre dlhodobé uchovanie vizuálnych informácií.



*Obr. 3 Porovnanie pamäťového indexu v teste krátkodobej a dlhodobej pamäte u samíc a samcov WT a TLR9-/- myší : (A) Krátkodobá a (B) dlhodobá pamäť u samíc WT a TLR9-/-; (C) Krátkodobá a (D) dlhodobá pamäť u samcov WT a TLR9-/- . * - p<0,05*

Diskusia

Naše výsledky naznačujú, že deficiencia TLR9 ovplyvňuje proces učenia a niektoré formy pamäti u myší. Hoci Tlr9-/- myši vykazujú pomalší priebeh učenia v Morrisovom vodnom bludisku (MWM), po opakovanom tréningu dosahujú porovnateľnú úroveň vizuospaciálnej pamäti ako kontrolné myši. Okrem toho deficiencia TLR9 negatívne ovplyvňuje krátkodobú pamäť a kognitívnu flexibilitu u samcov. Tieto výsledky naznačujú, že TLR9 zohráva selektívnu úlohu v kognitívnych procesoch a jeho vplyv na pamäťové funkcie je špecifický pre pohlavie.

Nedávne štúdie odhalili, že TLR9, známy svojou úlohou v imunitnom systéme, je exprimovaný aj v neurónoch hipokampu, kde prispieva k formovaniu pamäťových engramov prostredníctvom mechanizmov opravy DNA. Jovasevic et al. (2024) zistili, že aktivácia TLR9 v CA1 neurónoch hipokampu je nevyhnutná pre kontextuálne učenie a pamäť, pričom jeho absencia vedie k narušeniu týchto procesov . Naše zistenia, ktoré poukazujú na zhoršené učenie v MWM u Tlr9-/- myší, sú v súlade s týmito výsledkami a naznačujú, že TLR9 je kľúčový pre efektívne priestorové učenie.

Okrem toho, naše pozorovania naznačujú pohlavne špecifické rozdiely vplyvu deficiencie TLR9 na pamäťové funkcie. Zatiaľ čo samce Tlr9-/- myší vykazovali významné deficity v krátkodobej pamäti a kognitívnej flexibilite, samice tieto deficity nevykazovali. Tieto rozdiely môžu byť dôsledkom hormonálnych vplyvov na expresiu TLR9 alebo rozdielov v neuronálnych dráhach medzi pohlaviami. Podobné pohlavne špecifické účinky boli zaznamenané aj v iných štúdiách skúmajúcich vplyv imunitných receptorov na neurogenézu a kognitívne funkcie[2].

Je dôležité poznamenať, že naša štúdia má niekoľko obmedzení. Po prvé, zamerali sme sa len na dve formy pamäti a kognitívnu flexibilitu. Budúce štúdie by mali preskúmať aj iné aspekty kognície, vrátane pracovnej a epizodickej pamäti, ktoré by mohli byť regulované odlišnými mechanizmami. Po druhé, použili sme globálne TLR9-deficientné myši, teda myši s úplnou stratou TLR9 vo všetkých bunkách a tkanivách. Do budúcnosti by bolo vhodné zvážiť využitie selektívnych knock-out modelov, napríklad s deficitom TLR9 špecificky v neurónoch, mikroglie či astrocytoch, čím by sa presnejšie určilo, ktoré bunkové populácie sú kľúčové pre pozorované zmeny v správaní. Alternatívne by sa dalo uvažovať aj o skúmaní deficiencie iných TLR receptorov, čím by sa rozšíril pohľad na úlohu innate imunity v regulácii pamäťových funkcií.

Zaujímavým smerom by mohlo byť aj preskúmanie funkcie TLR9 v kontexte neurozápalu, napríklad po prekonaní systémových zápalových stavov, ako je sepsa, alebo po traumatickom poškodení mozgu. Hoci ide o invazívne modely, predstavujú relevantný kontext, v ktorom by mohol mať TLR9 odlišnú úlohu, v závislosti od typu poškodenia a časového priebehu odpovede.

Táto štúdia ukazuje, že TLR9 zohráva selektívnu úlohu v kognitívnych procesoch a jeho deficiencia má minimálny vplyv na všeobecné pamäťové schopnosti u myší. Budúci výskum by sa mal zamerať na preskúmanie mechanizmov, ktorými TLR9 ovplyvňuje pamäť a kognitívne funkcie, a zvážiť klinický význam týchto zistení pre ľudské zdravie.

Výskum bol podporený z výskumného grantu APVV-22-0554.

Zoznam použitej literatúry

1. E. Okun, K. Griffioen, B. Barak, N.J. Roberts, K. Castro, M.A. Pita, A. Cheng, M.R. Mughal, R. Wan, U. Ashery, & M.P. Mattson, Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107 (35) 15625-15630, https://doi.org/10.1073/pnas.1005807107 (2010).
2. Cho KO, Hsieh J. Microglial TLR9: Guardians of Homeostatic Hippocampal Neurogenesis. Epilepsy Curr. 2016 Jan-Feb;16(1):39-40. doi: 10.5698/1535-7597-16.1.39. PMID: 26900378; PMCID: PMC4749116.

3. Jovasevic V, Wood EM, Cicvaric A, Zhang H, Petrovic Z, Carboncino A, Parker KK, Bassett TE, Moltesen M, Yamawaki N, Login H, Kalucka J, Sananbenesi F, Zhang X, Fischer A, Radulovic J. Formation of memory assemblies through the DNA-sensing TLR9 pathway. Nature. 2024 Apr;628(8006):145-153. doi: 10.1038/s41586-024-07220-7. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38538785; PMCID: PMC10990941.

34. Efekt sacubitril/valsartanu na hladinu úzkosti podobného správania u spontánne hypertenzných potkanov

MUDr. Mária Szighardtová
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Aziriová, S[1], Stanko, P[1], Baka, T[1], Repová, K[2], Krajčovičová, K[1], Adamcová, M[3]
Školiteľ: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.[1]
[1]Ústav patologickej fyziológie, LF UK, Bratislava, [2]Detská klinika NÚDCH, Bratislava, [3]Ústav fyziológie LF Univerzity Karlova, Praha

Úvod

Závažné organické patológie vrátane kardiovaskulárnych (KVS) ochorení môžu pri chronickom trvaní viesť k zmenám správania v zmysle anxiety a depresie. Na druhej strane pretrvávanie anxióznych a depresívnych ladení má tendenciu sa odraziť do zvýšenia incidencie takých kardiovaskulárnych stavov ako je hypertenzia, obezita, alebo ischemická choroba srdca. Okrem samotných patologických stavov sa na vzniku alterácie správania môže podieľať aj farmakologická intervencia kardiovaskulárnych patológií. Je preto mimoriadne dôležité pri posudzovaní profilu jednotlivých liekov detegovať ich možné pozitívne alebo negatívne efekty na behaviorálne prejavy, čo by umožnilo kvalifikovanejší prístup pri selektívnom nasadení kardiovaskulárnej intervencie (1,2)

Celý rad KVS situácií sa spája s aktiváciou neurohumorálnych systémov. Súčasti renín-angiotenzínového systému (RAAS) a adrenergného systému môžu participovať na vzniku psychickej alterácie v zmysle vzniku a progresie anxiety. Na druhej strane blokátory RAAS ako aj sympatikového systému vykazujú anxiolytický efekt (1). Relatívne nedávno sa v oblasti zlyhania srdca začal využívať duálny inhibítor sacubitril/valsartan (ARNI). Sacubitril blokádou endopeptidázy neprilyzínu, ktorý štiepi viaceré peptidy vrátane atriálneho- a mozgového natriuretického peptidu (ANP/BNP), zvyšuje hladinu ANP/BNP, ktorých vazodilatačný a antiproliferatívny účinok sa považuje za benefičný pre srdce a cievy. Blokátor AT1 receptora pre angiotenzín II (ABR), valsartan, zase zabraňuje profibrotickému a vazokonstrikčnému efektu angiotenzín II (Ang II) a u pacientov so stredne ťažkým zlyhaním srdca výrazne zlepšoval prognózu (3,4)

Pretože v literatúre existujú len ojedinelé údaje o vplyve ARNI na správanie, cieľom práce bolo zistiť, či ARNI môže modifikovať behaviorálne prejavy u SHR potkanov s geneticky indukovanou hypertenziou.

Materiál a metódy

V experimente sa použili 12. týždňové samce potkanov kmeňa Wistar a SHR. Zvieratá boli chované individuálne v štandardných podmienkach (22 ± 2 °C, 55 ± 10 % vlhkosť, 12 h cyklus svetla/tmy) s voľným prístupom k potrave a vode. Rozdelené boli do 4 skupín: 1. CTRL (Wistar),

2. ARNI (Wistar + ARNI 68 mg/kg/deň), 3. SHR, 4. SHR+ARNI (SHR + ARNI 68 mg/kg/deň). ARNI sa podávalo 6 týždňov v pitnej vode, s koncentráciou upravenou podľa dennej spotreby.

Počas experimentu sa potkanom v týždenných intervaloch meral systolický tlak krvi (STK) a pulzová frekvencia (P) pomocou neinvazívnej pletyzmogarfie s použitím manžety na chvost. Behaviorálne testy sa realizovali na konci pokusu, a to otvorené pole (OF), vyvýšené bludisko v tvare plus (EPM) a box svetlo-tma (LDB). Po ukončení experimentu boli zvieratá usmrtené, odobrali sa krv a srdcia na ďalšie spracovanie. Relatívna hmotnosť ľavej komory (ĽK) sa stanovila ako pomer hmotnosti ĽK k telesnej hmotnosti potkana. Fibrotické zmeny myokardu sa kvantifikovali stanovením koncentrácie hydroxyprolínu v myokarde, vyjadrenej v mg/g ĽK.

Štatistické spracovanie údajov bolo realizované v softvéri IBM SPSS Statistics 29.0. Na porovnanie skupín sa použila jednofaktorová analýza, dvojfaktorová analýza a analýza rozptylu pre opakované merania s Bonferroni post-hoc analýzou. Výsledky sú prezentované ako priemer ± štandardná chyba priemeru (SEM), pri hladine významnosti α=0,05. Na analýzu vzťahov medzi kardiovaskulárnymi parametrami a anxiete podobnom správaním sa použila lineárna- (β, R^2) a logistická regresia (B, R^2), pri hladine významnosti α=0,05.

Výsledky

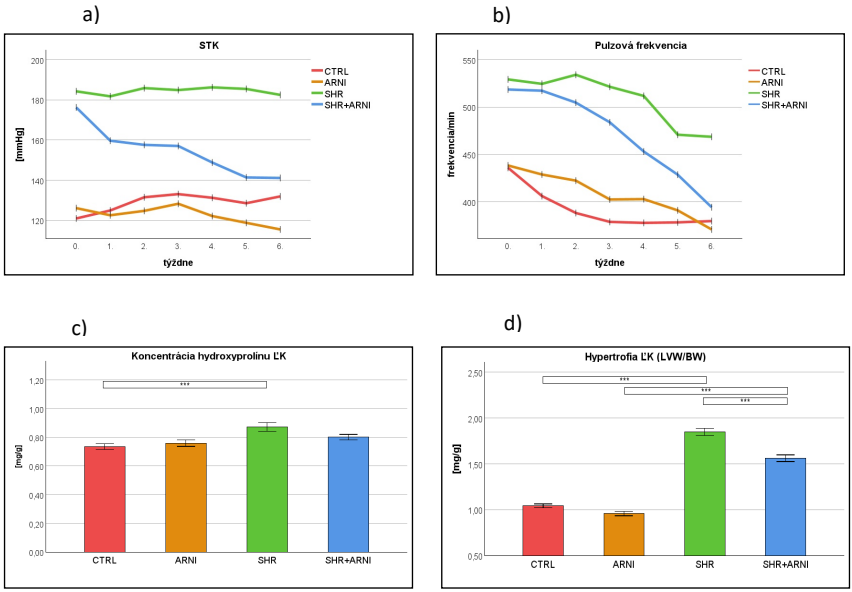
Hemodynamické parametre

U SHR potkanov pretrvával počas experimentu signifikantne vyšší systolický tlak krvi (STK, t_{48}=18,04, p<0,001; 1a) a pulzová frekvencia (P, t_{48}=11,47, p<0,001; 1b) v porovnaní s kontrolnými Wistar potkanmi. Liečba ARNI viedla k signifikantnému zníženiu STK (ARNI vs. SHR+ARNI, t_{48}=10,38, p<0,001) a P (ARNI vs. SHR+ARNI: t_{48}=6,24, p<0,001) u SHR potkanov.

Patologická remodelácia myokardu bola u SHR potkanov výraznejšia v porovnaní s Wistar potkanmi, čo sa prejavilo signifikantne vyšším obsahom hydroxyprolínu v ĽK (t_3=4,11; p<0,001; 1c) a výraznou hypertrofiou ĽK (t_3=18,00; p<0,001; 1d). Liečba ARNI významne znížila hypertrofiu ĽK (t_3=13,38; p<0,001; 1d). V prípade fibrotických zmien bol pozorovaný hranične signifikantný interakčný efekt medzi typom potkana a liečbou ($F_{1\text{-}48}$=4,04, p=0,05; 1c).

Behaviorálne parametre

SHR potkany vykazovali signifikantne vyššiu frekvenciu vstupov do otvoreného ramena EPM (CTRL vs. SHR: t_{48}=3,06, p=0,02; 2a), do centrálnej časti EPM (CTRL vs. SHR, t_{48}=3,14, p=0,02; 2b), do centrálnej zóny OF (CTRL vs. SHR, t_{48}=3,76, p=0,003; 2c) a do svetlej komory LDB (CTRL vs. SHR, t_{48}=3,81, p=0,002; ARNI vs. SHR+ARNI, t_{48}=4,61, p<0,001; 2d) v porovnaní s Wistar potkanmi. Taktiež SHR potkani trávili viac času v centrálnej zóne OF (CTRL vs. SHR: t_{48}=4,27, p<0,001; 2e) a vo svetlej komore LDB (ARNI vs. SHR+ARNI, t_{48}=2,78, p=0,05; 2f) v porovnaní s kontrolnými Wistar potkanmi.



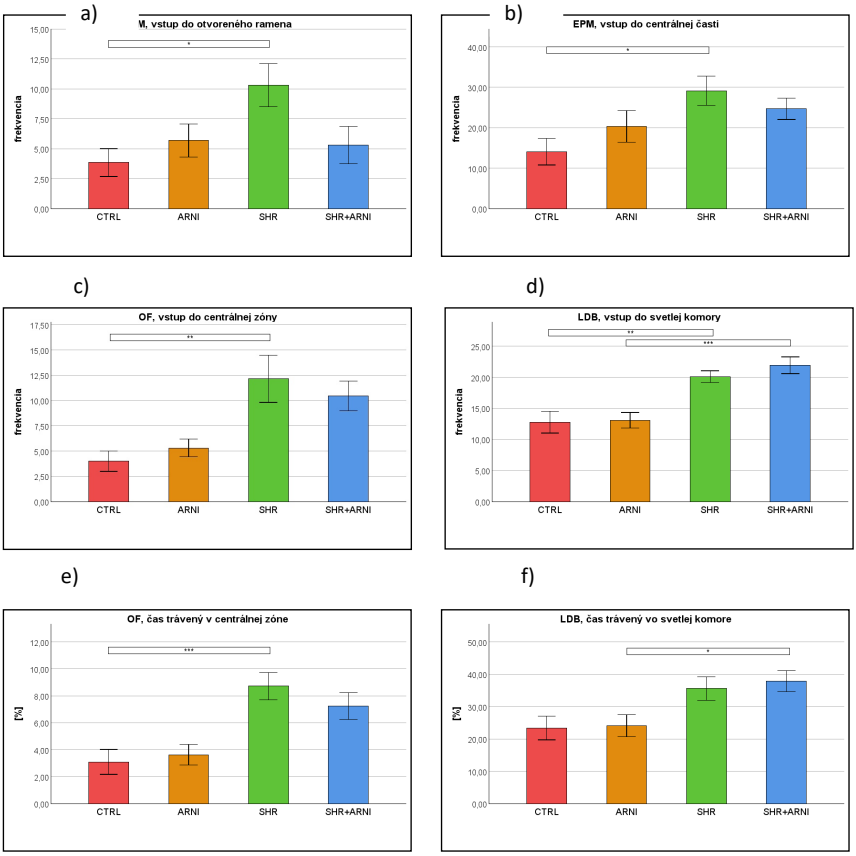
*Obr. 1: Hemodynamické parametre: a) Systolický tlak krvi (STK), b) Pulzová frekvencia (P), c) Koncentrácia hydroxyprolínu ľavej komory (ĽK), d) Hypertrofia ĽK; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*

Štatistická analýza preukázala hlavný efekt typu potkana v anxiete podobnom správaní (Wistar vs. SHR; EPM, vstup do centrálnej časti: $F_{1\text{-}48}$=8,20, p=0,006; OF, centrálna zóna: $F_{1\text{-}48}$=18,82, p<0,001, LDB, svetlá komora: $F_{1\text{-}48}$=35,30, p<0,001). Liečba ARNI nepreukázal štatisticky významný vplyv na anxiete podobné správanie.

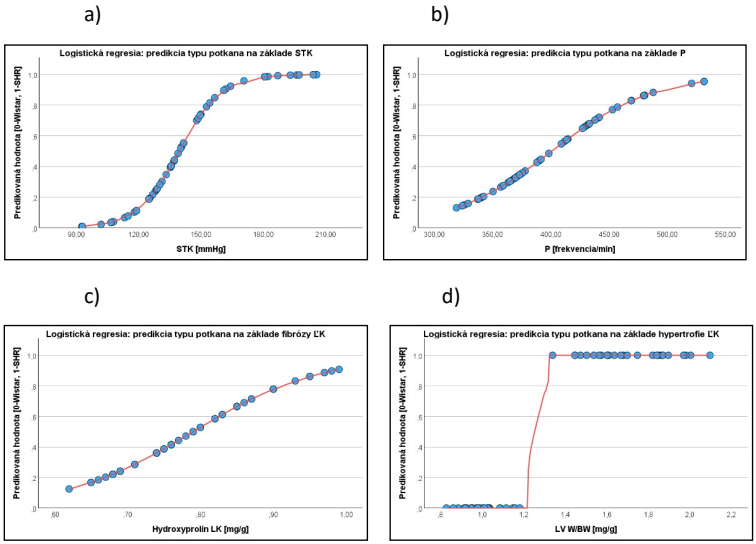
Regresná analýza vplyvu kardiovaskulárnych (KVS) parametrov na anxiete podobné správanie u SHR potkanov

Lineárna regresná analýza preukázala, že anxiete podobné správanie (EPM, vstup do otvoreného ramena: $F_{4\text{-}8}$=2,08, p>0,05; vstup do centrálnej časti: $F_{4\text{-}8}$=2,08, p>0,05; OF, vstup do centrálnej zóny: $F_{4\text{-}8}$=2,08, p>0,05; LDB, vstup do svetlej komory: $F_{4\text{-}8}$=2,08, p>0,05) nebolo štatisticky významne asociované s KVS parametrami (STK, P, fibróza ĽK, hypertrofia ĽK) u SHR potkanov. Regresné modely vykazovali nízku mieru vysvetlenej variability (R^2=0,24–0,51) žiadna z analýz nepreukázal štatistickú významnosť (p>0,05).

Naopak, výsledky binárnej logistickej regresie potvrdili, že KVS parametre sú štatisticky významne asociované s typom potkana (Wistar vs. SHR). STK (B=0,101, p<0,001; 3a), P (B=0,023, p=0,001; 3b) a koncentrácia hydroxyprolínu ĽK (B=11,45, p=0,002; 3c) sú významnými prediktormi typu potkana. Hypertrofia ĽK (B=197,11, p>0,05; 3d) nebola identifikovaná ako štatisticky významný prediktor typu potkana.



*Obr. 2: a) EPM, vstup do otvoreného ramena, b) EPM, vstup do centrálnej časti, c) OF – vstup do centrálnej zóny, d) LDB, vstup do svetlej komory e) OF – čas trávený v centrálnej zóne, f) LDB – čas trávený vo svetlej komore;*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*



Obr. 4: Výsledky logistickej regresie: a) predikcia typu potkana na základe STK ; b) predikcia typu potkana na základe P; c) predikcia typu potkana na základe fibrózy ĽK; d) predikcia typu potkana na základe hypertrofie ĽK.

Diskusia

Súčasný výskyt anxiety a hypertenzie je v klinickej praxi často pozorovaný fenomén, ktorý sa spája so zhoršenou prognózou (5). Hľadanie indikátorov a mechanizmov prípadného kauzálneho vzťahu medzi hypertenziou a anxietou je preto pertraktovaným problémom kardiológie aj psychológie. SHR potkany sa využívajú na štúdium týchto súvislosti niekoľko desaťročí. Poznanie neurohumorálnych aktivácii, ktoré sú spojené so vznikom hypertenzie, by mohlo prispieť k detekcii spoločného základu hemodynamických a behaviorálnych alterácií. U SHR súvislosť medzi hypertenziou a neurohumorálnymi zmenami nie je celkom objasnená. Skutočnosť, že v našom pokuse bola srdcová frekvencia, ktorá je odrazom aktivity adrenergného systému, u SHR významne zvýšená (6) a v predchádzajúcich pokusoch renálna denervácia sympatikového systému zabránila vývoju hypertenzie a remodelácie ĽK u SHR (7) nasvedčuje tomu, že hemodynamické a štrukturálne zmeny sú u SHR skôr determinované s aktiváciou sympatikového nervového systému.

Aktivácia adrenergného systému ako ústredného stresového systému u SHR potkanov je do určitej miery v súlade s našimi nálezmi anxiolytického (antiaxiogénneho) správania, keď potkany s excesívnou odvahou vstupovali do osvetlených alebo nechránených oblastí, kde sa kontrolné Wistar potkany zdržiavali podstatne menej. Staršie literárne nálezy u SHR opakovane dokladovali hypertaktivitu a hyperaktivitu k novým stimulom (8,9). Vhodným inbreedingom mnohých generácii vychádzajúc z SHR a normotenzných Wistar potkanov sa vytvorili dva modely, kde je hyperaktivita oddelená od hypertenzie. WKHA potkany

vykazujú hyperaktivitu ale bez sprievodnej hypertenzie a WKHT kmeň je hypertenzný kmeň, ale bez súčasnej hyperaktivity (7).Takéto oddelenie patologického správania od vplyvu hypertenzie umožňuje cielenejšie štúdium hemodynamických a psychogénnych alterácií (8). Často v kardiovaskulárnom výskume využívaný model SHR, ktorý vykazuje spontánnu hyperaktivitu a hyperaktivitu indukovanú stresovým impulzom, sa používal aj ako model pre štúdium poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD; 9). Zdá sa pravdepodobné, že tieto charakteristiky SHR, ktoré potenciálne súvisia so zvýšenou aktiváciou adrenergného systému, by mohli participovať na detegovaných anxiolytických prejavoch SHR v našom experimente.

Regresná analýza umožňuje do určitej miery detegovať kauzálnu súvislosť medzi koincidujúcimi a potenciálne vzájomne sa ovplyvňujúcimi premennými. Analýza jednotlivých anxiolytických prejavov SHR s krvným tlakom, srdcovou frekvenciou, hypertrofiou a fibrózou ľavej komory nepreukázali priamu súvislosť správania s uvedenými KVS premennými. To umožňuje vysloviť predpoklad, že zvýšená miera anxiolytického správania u SHR je nezávislá od sprievodnej hypertenzie, zvýšenej frekvencie a ich následkov v podobe remodelácie ľavej komory, a teda zrejme ani od neurohumorálnej sympatodrenergnej aktivácie, ktorá tieto alterácie hemodynamicky sprevádza. Skôr sa zdá prevdepodobné, že zmena správania v zmysle anxiolýzy-teda „odvážnejšieho“ chovania je inherentná, geneticky determinovaná vlastnosť SHR.

Chronické podávanie ARNI nemalo významný vplyv na antiaxiogénne prejavy SHR. Tento nález je v zdanlivom rozpore s ojedinelým nálezom anxiolytického účinku ARNI v klinických podmienkach, kde prechod z enalaprilu na ARNI u symptomatických pacientov so zlyhaním srdca nielen zlepšil kardiovaskulárnu prognózu, ale bol spojený s redukciou depresívnych a anxiogénnych prejavov (10), pričom v inej štúdii sa anxiolytický efekt ARNI dostavil dokonca akútne už v priebehu jedného týždňa terapie (11). Treba si však uvedomiť, že u SHR v našom experimente nebola u potkanov prítomná anxiozita, ale práve opačný prejav charakterizovaný odvážnym správaním. Je preto pochopiteľné, že anxiolytický potenciál ARNI dokázaný u pacientov s depresiou sa v našom experimente nemal príležitosť prejaviť. Na druhej strane skutočnosť, že ARNI u SHR redukoval hypertenziu, remodeláciu srdca u SHR a kompletne vertoval systolickú aj diastolickú dysfunkciu ľavej komory (6) bez podstatného vplyvu na alterácie správania potvrdzuje na základe regresnej analýzy vytvorený predpoklad, že modifikácia správania u SHR v našom pokuse je nezávislá od hypertenzie a sprievodných kardiovaskulárnych porúch , ale je pravdepodobnejšie deterrminovaná inherentou alteráciou správania SHR.

Záver

SHR potkany vykazovali vo viacerých testovaných parametroch zníženú mieru anxiete podobného správania - anxiolytické/odvážne prejavy. Regresná analýza ukázala, že anxiolytické prejavy správania u SHR nesúvisia s hemodynamickými zmenami ani so štrukturálnou prestavbou ĽK. Chronická aplikácia ARNI výrazne znížila krvný tlak aj remodeláciu srdca SHR, nemala však vplyv na zvýšenú mieru anxiolytických prejavov. Anxiolytické správanie sa preto dá považovať za súčasť inherentnej konštitúcie SHR nezávislej na hemodynamických zmenách ani na štrukturálnej prestavbe ĽK srdca.

Podporené: VEGA 1/0048/23

Zoznam použitej literatúry

1. Repova K, Aziriova S, Krajcirovicova K, Simko F: Cardiovascular therapeutics: A new potential for anxiety treatment? Med Res Rev. 2022; 42(3): 1202-1245.
2. Repova K, Aziriova S, Kovacova D et al.: Lisinopril reverses behavioural alterations in spontaneously hypertensive rats. Gen Physiol Biophys. 2019; 38(3): 265-270.
3. Simko F, Stanko P, Repova K et al.: Effect of sacubitril/valsartan on the hypertensive heart in continuous light-induced and lactacystin-induced pre-hypertension: Interactions with the renin-angiotensin-aldosterone system. Biomed Pharmacother. 2024; 173: 116391.
4. McMurray JJ, Packer M, Desai AS et al.: Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF). Eur J Heart Fail. 2013; 15(9): 1062-1073.
5. Player MS, Peterson LE: Anxiety disorders, hypertension, and cardiovascular risk: a review. Int J Psychiatry Med. 2011; 41(4): 365-377.
6. Simko F, Baka T, Stanko P et al.: Sacubitril/Valsartan and Ivabradine Attenuate Left Ventricular Remodelling and Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats: Different Interactions with the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Biomedicines. 2022; 10(8): 1844.
7. Wang M, Han W, Zhang M, Fang W, Zhai X, Guan S, Qu X: Long-term renal sympathetic denervation ameliorates renal fibrosis and delays the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Am J Transl Res. 2018; 10(12): 4042-4053.
8. Hendley ED: WKHA rats with genetic hyperactivity and hyperreactivity to stress: a review. Neurosci Biobehav Rev. 2000; 24(1): 41-44.
9. Hill JC, Herbst K, Sanabria F: Characterizing operant hyperactivity in the Spontaneously Hypertensive Rat. Behav Brain Funct. 2012; 8:5.
10. Dereli S, Kılınçel O, Çerik İB, Kaya A: Impact of sacubitril/valsartan treatment on depression and anxiety in heart failure with reduced ejection fraction. Acta Cardiol. 2020; 75(8): 774-782.
11. Kellner M, Yassouridis A, Górski D, Waheed S, Kähler J, Wiedemann K: Acute Anxiolytic Effects of Sacubitril/Valsartan in Patients with Heart Failure. J Dep Anxiety. 2023; 12:499.

35. Imunomodulačné účinky fyzickej aktivity v myšacom modeli bakteriálnej pneumónie

Mgr. Nikola Tóthová
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Kristína Macáková[1]
Školiteľ: doc. RNDr. Barbora Vlková, PhD.[1]
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Úvod

Počas intenzívnej fyzickej aktivity môže dôjsť k poškodeniu svalových vlákien a tzv. mikrotraume tkaniva, najmä v dôsledku mechanického preťaženia, energetického stresu a nedostatočného zásobenia tkaniva kyslíkom (1). Rozpadom poškodených buniek sa do cirkulácie uvoľňujú proteíny a DNA, kde sa z nej stáva extracelulárna DNA (ecDNA) (2). EcDNA predstavuje molekulárny signál nebezpečenstva (DAMP) schopný alarmovať stav ohrozenia organizmu (3). Rozlišujeme nukleárnu a mitochondriálnu ecDNA, pričom mitochondriálne DAMPs (DNA a proteíny) majú väčší imunogénny potenciál, pretože vďaka evolučnej príbuznosti s baktériami si zachovali ich štruktúrne prvky, akými sú cirkulárna DNA, hypometylované úseky, či formylované peptidy (4). Imunitná odpoveď na intenzívnu fyzickú aktivitu zdieľa charakteristické črty so systémovou zápalovou odpoveďou (5). Prítomnosť ecDNA v cirkulácii spúšťa prozápalovú signalizačnú kaskádu, čo vedie k mobilizácii imunitných buniek, predovšetkým neutrofilov, do miesta poškodenia (6). Sterilný zápal po fyzickej aktivite je nevyhnutný pre regeneráciu tkaniva, avšak nadmerné uvoľňovanie alebo nedostatočné odbúravanie ecDNA deoxyribonukleázami (DNázami) defokusuje imunitný systém, čím sa znižuje obranyschopnosť voči patogénom (7, 8). Táto súvislosť bola preukázaná u pacientov s traumatickými poraneniami alebo po chirurgických zákrokoch, kde nadmerné uvoľňovanie ecDNA prispievalo k rozvoju infekcie až sepsy (9).

U fyzicky aktívnych jedincov je častou zdravotnou komplikáciou zvýšená náchylnosť na infekcie horných dýchacích ciest. Po intenzívnej fyzickej záťaži nastáva tzv. *„open window“* obdobie, trvajúce 3–72 hodín, počas ktorého dochádza k dočasnému oslabeniu imunitného systému a zvýšenému riziku rozvoja bakteriálnej pneumónie (10). Molekulárne mechanizmy zodpovedné za reguláciu imunitných procesov vyvolaných fyzickou aktivitou doposiaľ nie sú dostatočne známe. Cieľom tohto experimentu bolo skúmať imunomodulačné účinky fyzickej aktivity a analyzovať ako sterilný zápal po fyzickej aktivite ovplyvňuje priebeh bakteriálnej pneumónie v myšacom modeli.

Materiál a metódy

Animálny model

V tomto projekte boli použité dospelé samce laboratórnych myší kmeňa C57BL/6J (n=24) s priemernou hmotnosťou 30 gramov. Myši boli rozdelené do kontrolnej skupiny (CTRL; n=12), ktorá nebola vystavená fyzickej aktivite a do experimentálnej skupiny (BEH; n=12), ktorá bola po habituácii na bežiaci pás vystavená akútnemu intenzívnemu behu po dobu 60 minút. Habituácia na bežiaci pás pre hlodavce (Ugo Basile, Varese, Taliansko) prebiehala dvojfázovo po dobu 3 dní, aby sa predišlo stresovej reakcii z nového prostredia. Pred samotnou fyzickou aktivitou boli všetky myši podrobené 1-hodinovému fastingu, s cieľom zabezpečiť rovnaký metabolický stav medzi jednotlivými skupinami. Zároveň sa týmto opatrením predchádza možnému gastrointestinálnemu diskomfortu pri fyzickej aktivite u myší z BEH skupiny. Protokol intenzívneho behu myší na bežiacom páse vychádzal z publikácie Shi a kol., 2019 (11), v ktorom beh myší začína rýchlosťou 10 m/min po dobu 15 minút na rozcvičenie, potom postupuje na 15 m/min počas 15 minút a následne sa každých 15 minút zvyšuje rýchlosť o 3 m/min. Bezprostredne po fyzickej aktivite bolo kontrolným aj experimentálnym myšiam odobraných 300 µl krvi z retro-orbitálneho plexu pre hemoanalýzu, analýzu koncentrácie ecDNA, laktátu, neutrofilových enzýmov a DNázovej aktivity.

Po 3 hodinách od indukcie sterilného zápalu fyzickou aktivitou boli myši rozdelené do 4 podskupín: CTRL (n=4), BEH (n=4), CTRL+pneu (n=8; nebežiace s indukovanou pneumóniou) a BEH+pneu (n=8; bežiace s indukovanou pneumóniou). Myšiam bola vyvolaná bakteriálna pneumónia intratracheálnym podaním baktérií kmeňa *Staphylococcus aureus* (OD=0,2). Po 16 hodinách bol experiment ukončený terminálnym odberom krvi z retro-orbitálneho plexu. Pre analýzu prekonania bakteriálnej pneumónie boli získané aj vzorky tekutiny bronchoalveolárnej laváže (BALF).

Bunková imunitná odpoveď

Počet neutrofilov a makrofágov atrahovaných do miesta infekcie (pľúc) bol stanovený spracovaním 50 µl BALFu pomocou cytospinu (Centric 250 Domel, Železniki, Slovinsko) pri 1800 x g, 7 minút na vytvorenie bunkových preparátov na mikroskopickom sklíčku. Následne boli preparáty fixované a farbené hematoxylín-eozínom pre vizualizáciu buniek a ich kvantifikáciu pod svetelným mikroskopom. Zmeny v počte neutrofilov, resp. zmeny v bunkovom zastúpení v periférnej krvi boli kvantifikované hemoanalyzátorom (Abacus Vet5, Diatron MI Zrt, Budapest, Maďarsko) bezprostredne po fyzickej aktivite, ako aj po prekonaní bakteriálnej pneumónie. Funkčná aktivita neutrofilov, prezentovaná koncentráciou enzýmov myeloperoxidázy a neutrofilovej elastázy, bola analyzovaná v plazme a tekutinách bronchoalveolárnej laváže metódou sendvičovej ELISY. Na detekciu týchto biomarkerov vo vzorkách bol použitý komerčný kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) s postupom podľa pokynov výrobcu.

Kvantifikácia extracelulárnej DNA a DNázová aktivita

Vzorky krvi boli spracované centrifugáciou pri 1600 x g, 4°C, 10 minút pre získanie plazmy. 100 µl plazmy bolo následne centrifugovaných pri 16 000 x g, 4°C, 10 minút na analýzu extracelulárnej DNA. EcDNA bola izolovaná automaticky pomocou prístroja QIAcube (Qiagen, Hilden, Nemecko) na základe kolónkovej elúcie. Koncentrácia ecDNA v plazme 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 qTOWER^3 G (Analytik Jena, Thuringia, Nemecko). Aktivita DNázy I vo vzorkách bola stanovená v agarózovom géli so substrátom kuracej DNA radiálnou difúziou enzýmu. Na výpočet DNázovej aktivity podľa kalibračnej krivky bol použitý softvér ImageJ (NIH, Maryland, Bethesda, USA).

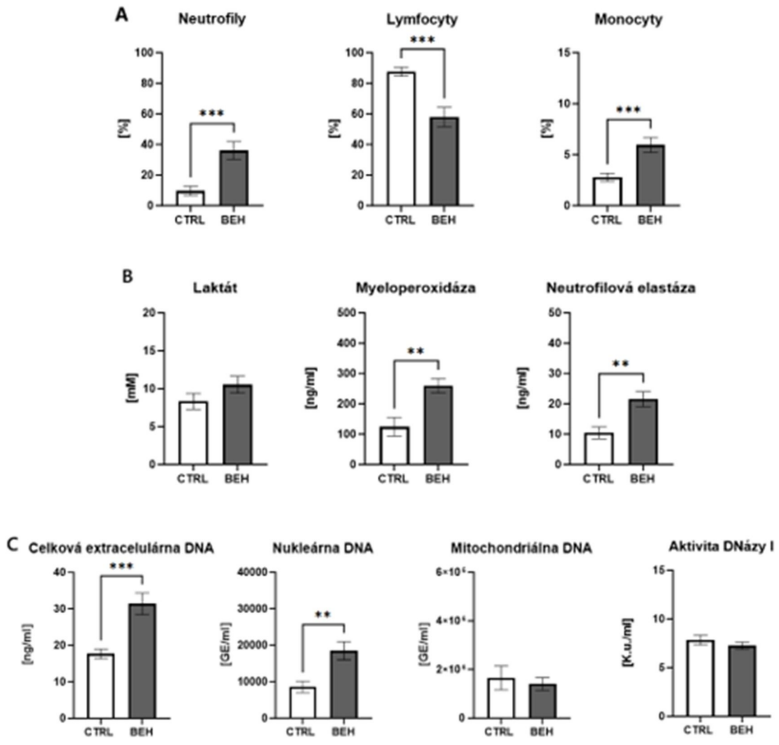
Štatistická analýza

Štatistická analýza bola spracovaná a graficky znázornená použitím softvéru GraphPad Prism 10 (La Jolla, San Diego, CA, USA). Rozdiely medzi kontrolnými a bežiacimi myšami boli vyhodnotené nepárovým t-testom. Na vyhodnotenie výsledkov v myšacom modeli pneumónie bol použitý one-way ANOVA test s Bonferroni korekciou. Za štatisticky významné rozdiely sú považované hodnoty p menšie ako 0,05. Získané údaje sú uvedené ako priemer ± SEM.

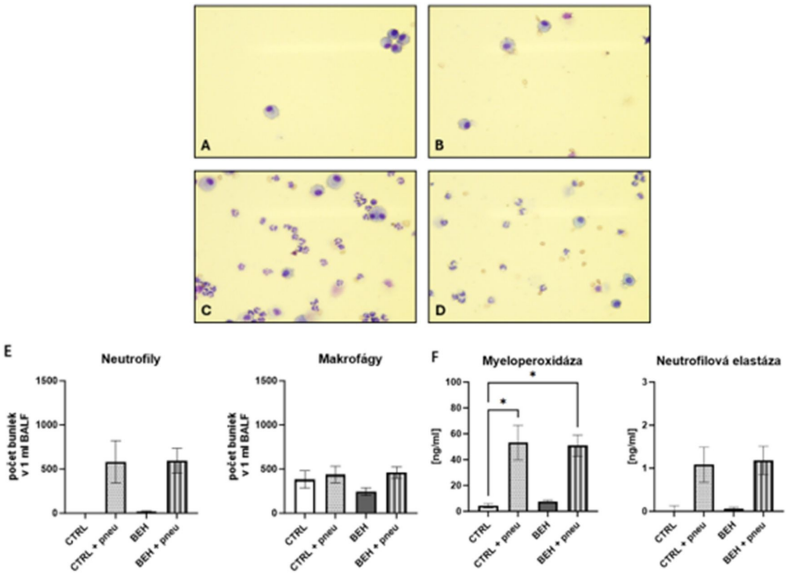
Výsledky

Fyzická aktivita u myší, reprezentovaná behom na bežiacom páse pre hlodavce po dobu 60 minút, viedla k zmenám v zastúpení imunitných buniek v krvi. Krvný obraz experimentálnej skupiny BEH preukázal po fyzickej aktivite neutrofíliu (p=0.0005, t=4.15), lymfocytopéniu (p=0.0002, t=4.41) a monocytózu (p=0.0007, t=3.95) v porovnaní s kontrolnou skupinou myší (Obr. 1A). Okrem toho boli v plazme myší po fyzickej aktivite detegované vyššie koncentrácie enzýmov myeloperoxidázy (p=0.002, t=3.56) a neutrofilovej elastázy (p=0.002, t=3.52) (Obr. 1B). Koncentrácia celkovej ecDNA v plazme bola vyššia u bežiacich myší o 78%, pričom jej pôvod bol odzrkadlený vzostupom koncentrácie nukleárnej DNA (p=0.003, t=3.38), ale nie mitochondriálnej DNA (p=0.66, t=0.45) (Obr. 1C). Aktivita DNázy I nebola ovplyvnená fyzickou aktivitou (Obr. 1C). Nebola detegovaná ani zvýšená koncentrácia laktátu v plazme bežiacich myší v porovnaní s kontrolnou skupinou bezprostredne po fyzickej aktivite (Obr. 1B).

Indukcia bakteriálnej pneumónie kmeňom *Staphylococcus aureus* viedla u myší k infiltrácii pľúc kľúčovými bunkami vrodenej imunity – neutrofilmi (p=0.048, F=3.18) (Obr. 2A-E). Naopak, v zastúpení makrofágov v pľúcach boli pozorované len minimálne rozdiely medzi jednotlivými skupinami (p=0.354, F=1.15) (Obr. 2A-E). Vyššie koncentrácie enzýmov myeloperoxidázy (p=0.004, F=6.20) a neutrofilovej elastázy (p=0.055, F=3.03) v BALFe myší s indukovanou pneumóniou poukazujú na aktiváciu a degranuláciu neutrofilov v akútnej fáze bakteriálnej infekcie (Obr. 2F).

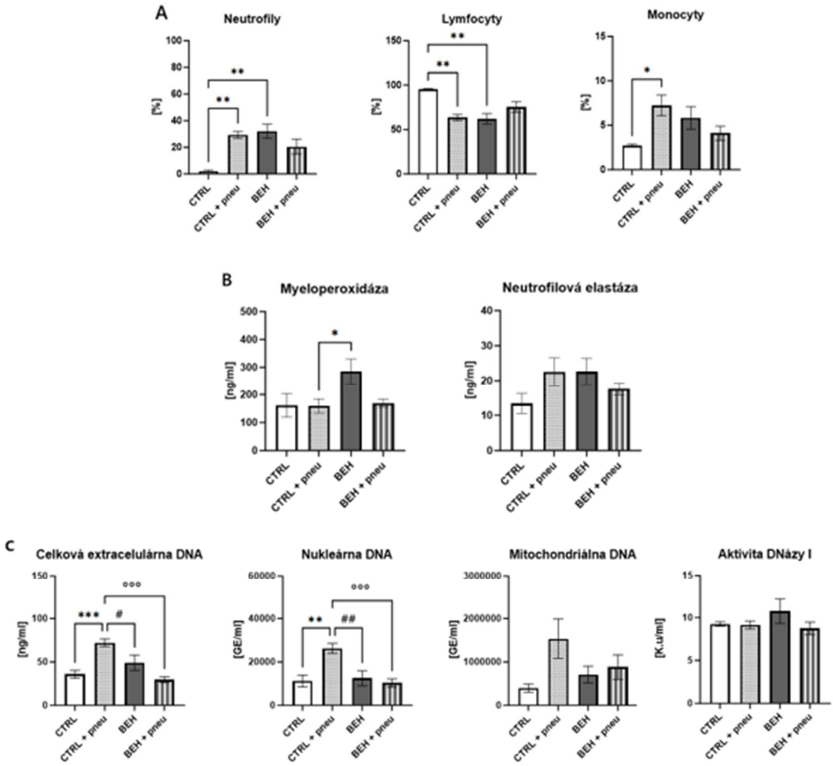


Obr. 1: A – Krvný obraz imunitných buniek po fyzickej aktivite; B – Koncentrácia laktátu, myeloperoxidázy a neutrofilovej elastázy v plazme po fyzickej aktivite; C – Koncentrácia celkovej ecDNA, jej subcelulárneho pôvodu (nukleárnej a mitochondriálnej DNA) v plazme a aktivita DNázy I po fyzickej aktivite.



Obr. 2: A – Populácia buniek makrofágov v tekutine bronchoalveolárnej laváže CTRL skupiny; B – Populácia buniek makrofágov v tekutine bronchoalveolárnej laváže BEH skupiny; C – Populácia buniek neutrofilov a makrofágov v tekutine bronchoalveolárnej laváže CTRL+pneu skupiny; D – Populácia buniek neutrofilov a makrofágov v tekutine bronchoalveolárnej laváže BEH+pneu skupiny; E – Počet neutrofilov a makrofágov v 1 ml tekutiny bronchoalveolárnej laváže; F – Koncentrácia myeloperoxidázy a neutrofilovej elastázy v tekutine bronchoalveolárnej laváže.

Hematologická analýza po bakteriálnej pneumónii ukázala vyššie zastúpenie neutrofilov (p=0.006) a monocytov (p=0.046) v CTRL+pneu skupine s indukovanou pneumóniou, ako aj vyšší počet neutrofilov v skupine BEH bez pneumónie (p=0.008) v porovnaní s kontrolnou skupinou myší (Obr. 3A). Navyše, tieto dve experimentálne skupiny vykazovali aj lymfocytopéniu (CTRL+pneu: p=0.006; BEH: p=0.008). V skupine BEH+pneu s indukovanou pneumóniou neboli pozorované žiadne výrazné zmeny v populácii imunitných buniek v krvi (Obr. 3A). Plazmatická koncentrácia myeloperoxidázy bola vyššia iba v skupine BEH v porovnaní so skupinou CTRL+pneu (p=0,047), avšak koncentrácia neutrofilovej elastázy nebola vyššia (Obr. 3B). Čo sa týka ecDNA v plazme, najvyššia koncentrácia bola detegovaná v skupine CTRL+pneu (p=0,0006) (Obr. 3C). Naopak, v skupine BEH+pneu bola koncentrácia ecDNA o 59 % nižšia v porovnaní s kontrolnou skupinou s pneumóniou (p=0,0003). Celková plazmatická ecDNA korešpondovala s nukleárnou DNA (p=0,0002, F=10,87), ale nie s mitochondriálnou DNA (p=0,183, F=1,79) (Obr. 3C). Po bakteriálnej pneumónii neboli zaznamenané zmeny v aktivite DNázy I (p=0,377, F=1,09) (Obr. 3C).



Obr. 3: A – Krvný obraz imunitných buniek po bakteriálnej pneumónii; B – Koncentrácia myeloperoxidázy a neutrofilovej elastázy v plazme po bakteriálnej pneumónii; C – Koncentrácia celkovej ecDNA, jej subcelulárneho pôvodu (nukleárnej a mitochondriálnej DNA) v plazme a aktivita DNázy I po bakteriálnej pneumónii.

Diskusia

V tejto práci sme sledovali imunomodulačné účinky fyzickej aktivity pri prekonaní bakteriálnej pneumónie v myšacom modeli, so zameraním na ecDNA a aktivitu neutrofilov. Krvný obraz u myší po fyzickej aktivite preukázal neutrofíliu, lymfocytopéniu a monocytózu, charakteristické pre intenzívnu, resp. dlhotrvajúcu fyzickú záťaž (12). Mobilizácia kľúčových buniek vrodenej imunity z kostnej drene do obehu podporuje iniciáciu sterilného zápalu esenciálneho pre regeneráciu namáhaných tkanív. Lymfocytopénia naznačuje presun lymfocytov do sekundárnych lymfatických orgánov na udržanie imunitnej homeostázy. Koncentrácia laktátu v plazme myší ihneď po behu nebola výrazne vyššia v porovnaní

s kontrolnou skupinou. Možným vysvetlením je, že maximálna koncentrácia laktátu nemusela byť zachytená v zvolenom časovom bode, alebo bol laktát efektívne využitý ako energetický substrát, preto myši nedosiahli anaeróbny metabolický stav (13). Fyzická aktivita viedla k uvoľneniu DNA z buniek do extracelulárneho priestoru, čo sa prejavilo vyššou koncentráciou ecDNA v plazme bežiacich myší. Jej nukleárny pôvod a vyššie koncentrácie myeloperoxidázy a neutrofilovej elastázy u bežiacich myší poukazujú na aktiváciu a degranuláciu neutrofilov, čo naznačuje tvorbu neutrofilových extracelulárnych pascí (NETs) ako potenciálneho zdroja nami detegovanej ecDNA (14).

3 hodiny po fyzickej aktivite bola myšiam indukovaná bakteriálna pneumónia, ktorá sa prejavila infiltráciou pľúc neutrofilmi a zvýšenou koncentráciou neutrofilových enzýmov v bronchoalveolárnej laváži. Tieto výsledky zdôrazňujú úlohu neutrofilov v akútnej imunitnej odpovedi na bakteriálnu infekciu (15). Krvný obraz po bakteriálnej pneumónii ukázal zvýšené zastúpenie neutrofilov a monocytov u kontrolných myší s pneumóniou, čo potvrdzuje typickú systémovú zápalovú odpoveď počas infekcie. U bežiacich myší s pneumóniou však nebol pozorovaný tento výsledok. Navyše, v kontrolnej skupine bola po indukcii pneumónie detegovaná aj najvyššia koncentrácia ecDNA v plazme, prevažne jadrového pôvodu, zatiaľ čo u bežiacich myší s pneumóniou bola zaznamenaná nízka koncentrácia ecDNA, a to napriek podobnej aktivite DNázy I v oboch skupinách. Jednou z potenciálnych príčin tohto rozdielu môže byť zapojenie alternatívnych mechanizmov degradácie DNA po fyzickej aktivite, ako je napríklad aktivita enzýmu DNázy1L3. DNáza1L3 zohráva kľúčovú úlohu v prevencii nekontrolovaného zápalu a autoimunitných reakcií tým, že degraduje jadrové DNA fragmenty (16), avšak jej funkcia pri modulácii zápalu po fyzickej aktivite zatiaľ nie je preskúmaná. Získané výsledky naznačujú, že priebeh bakteriálnej infekcie bol podobný u kontrolných aj bežiacich myší s indukovanou pneumóniou, avšak boli pozorované určité rozdiely v regulácii ecDNA, čo môže byť dôsledkom imunitných procesov po fyzickej aktivite. Na objasnenie pôvodu ecDNA a jeho potenciálnej úlohy v náchylnosti na infekcie sú potrebné ďalšie štúdie.

Zoznam použitej literatúry

1. Zwetsloot KA, John CS, Lawrence MM, Battista RA, Shanely RA. High-intensity interval training induces a modest systemic inflammatory response in active, young men. J Inflamm Res. 2014;7:9-17.
2. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. Sports Med. 2012;42(7):565-586.
3. Magna M, Pisetsky DS. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins. Clin Ther. 2016;38(5):1029-1041.
4. West AP, Shadel GS. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. Nat Rev Immunol. 2017;17(6):363-375.
5. Fehrenbach E, Schneider ME. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. Sports Med. 2006;36(5):373-384.
6. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 2010;464(7285):104-107.
7. Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. J Appl Physiol (1985). 2017;122(3):559-570.

8. Timmermans K, Kox M, Vaneker M, et al. Plasma levels of danger-associated molecular patterns are associated with immune suppression in trauma patients. Intensive Care Med. 2016;42(4):551-561.
9. Kim HI, Park J, Gallo D, Shankar S, Konecna B, Han Y, Banner-Goodspeed V, Capers KR, Ko SG, Otterbein LE, Itagaki K, Hauser CJ. DANGER Signals Activate G -Protein Receptor Kinases Suppressing Neutrophil Function and Predisposing to Infection After Tissue Trauma. Annals of surgery. 2023;278(6), e1277–e1288.
10. Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, et al. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. Exerc Immunol Rev. 2010;16:119-137.
11. Shi Y, Shi H, Nieman DC, et al. Lactic Acid Accumulation During Exhaustive Exercise Impairs Release of Neutrophil Extracellular Traps in Mice. Front Physiol. 2019;10:709.
12. Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:355-380.
13. Abreu P, Mendes SVD, Leal-Cardoso JH, Ceccatto VM. Anaerobic threshold employed on exercise training prescription and performance assessment for laboratory rodents: A short review. *Life Sci*. 2016;151:1-6.
14. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. J Appl Physiol (1985). 2014;117(3):325-333.
15. Sikora JP, Karawani J, Sobczak J. Neutrophils and the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13469.
16. Lauková L, Konečná B, Janovičová Ľ, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. Biomolecules. 2020;10(7):1036.

36. Signalisation differences between sterile and infection inflammation

Emil Bečka
(normal and pathological physiology)

Co-authors: Letícia Hudecová[1], Patrik Bertovič[1]
Supervisor: assoc. prof. Mgr. Michal Pastorek, PhD.[1]
[1]Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

Introduction

Mitochondria and bacteria exhibit several structural and molecular similarities due to their common evolutionary origin. However, over time, mitochondria have been integrated into eukaryotic cells and are typically intracellular. When tissue damage occurs, such as in the case of traumatic injury, cell rupture can result in the release of mitochondria into the extracellular environment, triggering sterile inflammation (1). Innate immune cells, particularly neutrophils, recognise these extracellular mitochondria as bacterial-like particles and respond by phagocytosis, degranulation, and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs consist of neutrophil nuclear and mitochondrial DNA, enriched with granular and cytosolic proteins that form a web-like structure in order to trap and prevent the dissemination of pathogens (2). However, the presence of NETs is not always advantageous; excessive NET formation, especially during sterile inflammation, can damage host tissues and hinder the resolution of inflammation (3).

Neutrophils detect pathogens via pattern recognition receptors (PRRs), including formyl peptide receptors (FPRs) and Toll-like receptors (TLRs). Activation of these receptors leads to intracellular Ca^{2+} fluctuation, serving as a second messenger. Increased intracellular calcium concentration is required for the activation of several key enzymes, such as NADPH oxidase 2 (NOX2) and peptidylarginine deiminase 4 (PAD4). These enzymes are essential for the production of reactive oxygen species (ROS) and the citrullination of histones, both of which are critical steps in the process of NET formation (4). In parallel, signalling pathways involving phosphorylation of kinases such as AKT, p38α or mTOR regulate neutrophil metabolism and functions including polarisation, migration, and defence responses (5). Notably, there is currently a lack of evidence on the how the differences in these pathways in translate to neutrophil responses when activated by bacteria versus mitochondria.

Our research aims to describe signalling pathways leading to NETs formation and their differentiation dependent on the activation by bacteria and mitochondrial particles that mediate infectious vs. sterile inflammation. Understanding these differences could open possibilities for the modulation of neutrophil reactivity in sterile inflammation needed for managing polytraumatic patients while preserving the antimicrobial properties of neutrophils.

Materials and methods

Isolation of Polymorphonuclear (PMNs) cells

Heparinised blood was collected by venipuncture from healthy volunteers under ethical approval granted by the Ethics Committee of the University Hospital Bratislava (workplace Ruzinov under number EK 218/2020). Erythrocytes were lysed using ice-cold isotonic ammonium chloride buffer (150 mM NH4Cl, 10 mM KHCO3, 0,1 mM EDTA) and leukocytes were centrifuged at 400xg for 10 minutes at 4°C. The cell pellet was resuspended in MojoSort™ Buffer and followed by kit insolation of PMNs according to manufacturer protocol (480152, Biolegend, San Diego, CA, USA).

Isolation of mitochondria

For human mitochondria isolation, placental tissue was used (EK 218/2020). Mitochondria were isolated using a modified isolation protocol (6). Briefly, 200mg of placental tissue was chopped and homogenized with a Dounce homogenizer in 1ml of ice-cold STE buffer (250 mM saccharose, 2 mM EGTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4). The whole homogenate was centrifuged at 500xg for 3 minutes at 4°C. Mitochondria-rich supernatant was centrifuged at 8000xg for 10 minutes at 4°C and the mitochondria pellet was resuspended in 1ml of ice-cold STE buffer This process was repeated two more times before the mitochondria were collected.

Cultivation of bacteria

Gram-positive bacteria *S. aureus* subspecies aureus Rosenbach (NCTC 8530) was inoculated from frozen stocks into liquid LB broth (L3022, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) and incubated overnight in aerobic conditions at 250RPM, 37°C. After incubation, bacterial suspension was centrifuged at 5000xg for 5 minutes and the bacterial pellet was resuspended in sterile PBS (BR0095, Canvax Reagents SL, Valladolid, Spain). The bacterial amount was determined by optical density (O.D.) at 600nm using a spectrophotometer (Eppendorf, Germany), where O.D. 1 equalled 7.8 x 10^8/ml for *S. aureus*.

Protein array analysis of phospho-kinase activity in PMNs

Isolated PMNs were transferred to RPMI 1640 medium (11835030, Gibco, Paisley, UK) in a total concentration of 3x10^6 cells/200µl supplemented with or without FPR1 agonist - 50nM FPR-A14 (HY-103472, MedChemExpress LLC, Monmouth Junction, NJ, USA) 30 minutes before mitochondria inoculation. As stimuli, both bacteria and mitochondria, 20µl of suspension were added to PMNs suspension from O.D. 1 stock solution and incubated for 30 minutes at 37°C. After incubation, Cells were harvested by centrifugation at 500xg, for 5 minutes at 4°C. For cell lysis, commercial Lysis buffer 6 supplemented with 100nM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1x concentrated Protease Inhibitor Cocktail I (539131, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. For the array, 3 biological samples were pooled and the whole procedure was done according to manufacturer protocol (ARY003C, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The array was developed by exposing the membranes to X-ray film for 15 minutes to detect chemiluminescent signals. X-ray films were scanned and analysed using Fiji, an open-source ImageJ according to the modified protocol (7).

NETs formation assay

To evaluate the signalling cascade of PMNs, cells were transferred into RPMI supplemented with 10% FBS (P30-3306, PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) pre-stained with 100ng/ml Hoechst 33342 (5117, Bio-Techne, Abingdon, United Kingdom) and 100nM SYTOX™ Green (S7020, Invitrogen, Eugene, OR, USA) for 30 minutes at 37°C, supplemented with 1 mM EGTA, FPR1 agonist 50nM FPRA14, 5µM FPR1 inhibitor (Cylcosporin H, HY-P1122, MedChemExpress LLC, Monmouth Junction, NJ, USA), 1.25µM NOX 2 inhibitor (GLX481304, SML3192, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) TLR9 inhibitory oligonucleotide (tlrl-4084, Invitrogen, Eugene, OR, USA) and 5.9µM PAD4 inhibitor (Cl-amidine, 506282, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) After incubation, cell suspension was transferred into 96-well cell culture plate in concentration 2x10^4 cells/100µl and mixed with 100µl of 5x diluted O.D. 1 suspension of bacterial and mitochondrial suspension. NETs formation was analysed using BioTek Cytation 7 Cell Imaging Multimode Reader (Santa Clara, CA, United States). NETs formation was analysed as integral of Sytox green signal over time and normalized to the number of cells in the view field. A 3-hour scanning cycle with a 15-minute imaging interval was used.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v8.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). NETs formation assay was evaluated using two-factor ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Data are presented as a mean and standard deviation (SD). P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

First, we have described differences in the phosphorylation of kinases involved in immune response upon neutrophil activation with mitochondrial or bacterial stimuli. We have observed increased phosphorylation of STAT6 in PMNs upon stimulation with both, mitochondria and *S. aureus* while agonist FPRA14 decreased the phosphorylation to the level of control. Contrary, phosphorylation of p70 S6 kinase was mildly increased in mitochondria-treated PMNs, but FPRA14 increased phosphorylation levels as in *S. aureus-treated* cells. Increased phosphorylation of kinases associated with immune response was observed in *S. aureus*-treated PMNs, like JNK 1/2/3 and RSK 1/2/3, while stimulation of PMNs with mitochondria decreased phosphorylation level without effect of FPA14. Meanwhile, the phosphorylation level of AKT 1/2/3 decreased after mitochondria induction, but changes in PMNs induced by *S. aureus* were not observed. Similarly, the kinase p38α phosphorylation level was not changed in either mitochondria or bacteria-induced PMNs, but after FPRA14, the phosphorylation level decreased (Fig.1 A). To summarise, mitochondria decrease the phosphorylation of JNK, AKT and RSK1/2/3, three major kinases associated with immune response, while *S. aureus* either upregulates them, or their phosphorylation status does not change.

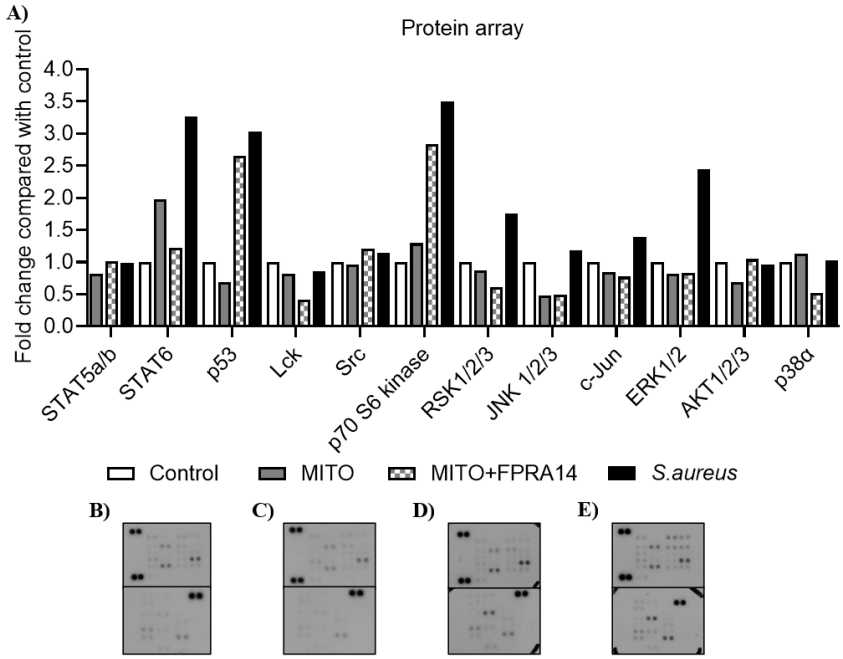


Fig.1 Protein profiler array analysis. A) The graph shows the relative fold change phosphorylation of proteins with differences upon mitochondria, FPRA14 or S. aureus treatment. Results are shown as pooled biological triplicates. B-E) Developed chemiluminescent signal of protein array on X-ray films of the control group (B), mitochondria-treated PMNs (MITO; C), mitochondria and FPRA14-treated PMNs (D) and S. aureus-treated PMNs (E).

Activation of kinase pathways commonly leads to activation of enzymes required for chromatin decondensation and NETs formation (8, 9). Here we tested the implementation of several receptors described as key players to trigger NETs formation. Inhibition of FPR1 prevents induction of NETs formation induced by mitochondria, while FPRA14, the agonist of FPR1 decreases NETs formation induced by mitochondria but also induces NETs formation itself. Next, depletion of extracellular Ca^{2+} did not prevent mitochondria-NETs formation but inhibited induction of NETs caused by FPRA14, single receptor FPR1-triggered NETs formation, in addition, the combination of extracellular Ca^{2+} depletion and use of FPRA14 decreased NETs formation induced by mitochondria. Decrease, but not complete inhibitions in NETs formation was also observed when we targeted NOX2, TLR9 and PAD4 (Fig.2). To summarize these results, we speculate that most key enzymes involved in NETosis are, while important in the process, partially replaceable by alternative pathways.

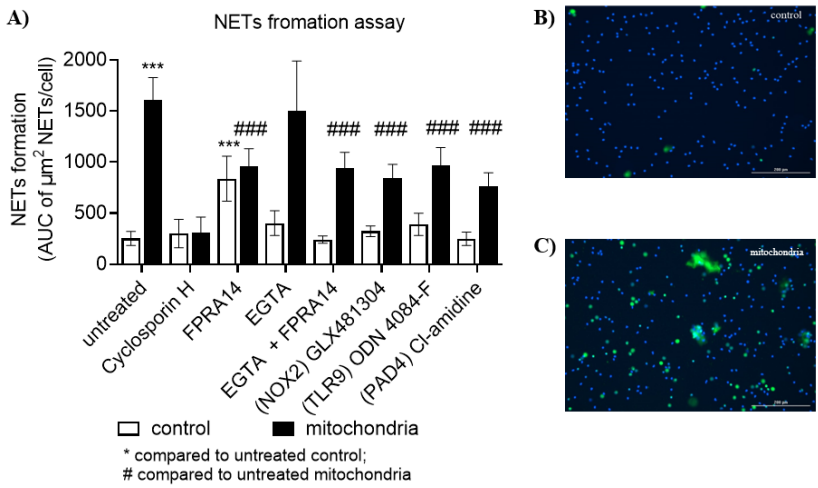


*Fig.2 NETs formation assay. A) The graph shows observation of NETs formation by PMNs ex vivo induced by mitochondria and modulated using several inhibitors. B-C) Representative pictures of intact PMNs (B) and PMNs with mitochondria (C) after 3 hours of incubation. The data presented are means ±SD of 3 independent experiments performed in duplicates. ***; ### p < 0.001; two-factor ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test.*

Discussion

Even two decades after the discovery of NETs, there are still gaps in understanding the differences in molecular pathways, leading to NETs formation induced by infectious and sterile stimuli. Neutrophils triggered with mitochondria and bacteria showed differential phosphorylation of RSK1/2/3. This result corresponds with the already described pathway, indicating the involvement of FPR1 (10). We found that triggering of neutrophils with *S. aureus* leads to phosphorylation of JNK which phosphorylation is regulated by ROS formation, which is also linked to the killing of bacteria and NETs formation (11). On the other hand, damage-associated molecular patterns including mitochondria were reported to induce JNK, p38α and AKT kinases, which we did not observe using isolated mitochondria (12). However, our analysis did not include a variety of isoforms and phosphorylation sites of all kinases. Our findings about p70 S6 kinase are partially in accordance with the described pathways induced by formylated peptides (8). Surprisingly, we observed phosphorylation of STAT6, which is associated with antiviral immunity and anti-inflammatory properties upon its activation, but the role in neutrophils, especially in NETosis is unknown (13). Our findings show that *S. aureus*-induced neutrophils have increased phosphorylation levels of kinases associated with immune response, while mitochondria often decrease this phosphorylation. FPRA14 partially preserve phosphorylation patterns, but together with mitochondria did not correspond with what is known regarding immune response of neutrophils.

Besides kinases, NETosis also consist of several other crucial checkpoints, whose activation is important to produce NETs (9). Here, we tested several checkpoint molecules, receptors and enzymes, which are considered as necessary for NETs formation. Blocking of FPR1 with either an agonist or an inhibitor attenuates NETs formation induced by mitochondria (14), but pre-activation of FPR1 with FPR1 agonist alone also induced NETs formation (8). While both NOX2 and PAD4 were shown to be indispensable for NETosis in some inducers and redundant in others, we have observed that their inhibition only partially attenuates NETs formation, highlighting the complexity of NETosis initiated by mitochondria (15, 16). Ca^{2+} is an important signalling molecule in the context of NETosis, whose release is regulated upon FPR1 activation. We showed that for NETs release induced by mitochondria, intracellular Ca^{2+} is sufficient (9).

Taken together, mitochondria induced NETs formation even when known kinases implicated in NETosis were more dephosphorylated, conversely hinting at possible immune suppression. While these results are surprising and must be further expanded upon, the distinct phosphorylation patterns in mitochondria- and pathogen-induced NETs formation open avenues for possible therapeutic exploitation. We show that activation of FPR1 is a key molecular regulator in response to mitochondria also in the case of NETs formation. Hence specific targeting and modulation of FPR1 may be crucial in both, immunosuppression and overreaction of neutrophils.

This work was supported by APVV-21-0378 and UK/27/2023

References

1. Calfee CS, Matthay MA. Clinical immunology: Culprits with evolutionary ties. Nature. 2010;464(7285):41-2.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004;303(5663):1532-5.
3. Nappi F, Bellomo F, Avtaar Singh SS. Worsening Thrombotic Complication of Atherosclerotic Plaques Due to Neutrophils Extracellular Traps: A Systematic Review. Biomedicines. 2023;11(1).
4. Chen T, Li Y, Sun R, Hu H, Liu Y, Herrmann M, et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. Front Immunol. 2021;12:775267.
5. Martin-Vega A, Cobb MH. Navigating the ERK1/2 MAPK Cascade. Biomolecules. 2023;13(10).
6. Fisher J, McKeating D, Pennell E, Cuffe J, Holland O, Perkins A. Mitochondrial isolation, cryopreservation and preliminary biochemical characterisation from placental cytotrophoblast and syncytiotrophoblast. Placenta. 2019;82:1-4.
7. Klemm AH. Semi-automated analysis of dot blots using ImageJ/Fiji. F1000Research. 2020;9.
8. de Carvalho Oliveira V, Tatsiy O, McDonald PP. Phosphoinositol 3-kinase-driven NET formation involves different isoforms and signaling partners depending on the stimulus. Front Immunol. 2023;14:1042686.
9. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ. 2011;18(4):581-8.

10. Spirrison AN, Lannigan DA. RSK1 and RSK2 as therapeutic targets: an up-to-date snapshot of emerging data. Expert Opin Ther Targets. 2024;28(12):1047-59.
11. Yeh MC, Mukaro V, Hii CS, Ferrante A. Regulation of neutrophil-mediated killing of Staphylococcus aureus and chemotaxis by c-jun NH2 terminal kinase. J Leukoc Biol. 2010;87(5):925-32.
12. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. Shock. 2010;34(1):55-9.
13. Tolomeo M, Cascio A. STAT4 and STAT6, their role in cellular and humoral immunity and in diverse human diseases. Int Rev Immunol. 2024;43(6):394-418.
14. Itagaki K, Kaczmarek E, Kwon WY, Chen L, Vlkova B, Zhang Q, et al. Formyl Peptide Receptor-1 Blockade Prevents Receptor Regulation by Mitochondrial Danger-Associated Molecular Patterns and Preserves Neutrophil Function After Trauma. Crit Care Med. 2020;48(2):e123-e32.
15. Garishah FM, Rother N, Riswari SF, Alisjahbana B, Overheul GJ, van Rij RP, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Dengue Are Mainly Generated NOX-Independently. Front Immunol. 2021;12:629167.
16. Englert H, Rangaswamy C, Kullik GA, Divivier M, Gobel J, Hermans-Borgmeyer I, et al. Sepsis-induced NET formation requires MYD88 but is independent of GSDMD and PAD4. FASEB J. 2025;39(1):e70301.

37. Vplyv deficiencie Toll-like receptoru 9 a pohlavia na prežívanie dospelých C57BL/6 myší s abdominálne vyvolanou polymikrobiálnou sepsou.

Mgr. Filip Baran

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Emma Skybová[1], Jakub Szabó[2], Michal Pastorek[1], Peter Celec[1,3]

Školiteľ: Mgr. Ľubica Janovičová, PhD.[1]

[1]Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
[2] Ústav medicínskej fyziky a biofyziky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
[3] Ústav patofyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Podľa poslednej definície predstavuje sepsa život ohrozujúci stav s orgánovou disfunkciou ako následok prehnanej a neregulovanej imunitnej odpovede organizmu na infekciu. (1) Najčastejšími pôvodcami sepsy sú baktérie, avšak infekciu vyvolávajú aj vírusy a patogénne mikromycéty. (2) Komplexná patogenéza sepsy sa začína v momente, keď sú invadujúce patogény a s nimi asociované molekulárne vzorce rozpoznané receptormi imunitného systému, ktoré následne aktivujú bunkové signálne dráhy vedúce k expresii mediátorov zápalu. Okrem s patogénmi asociovaných molekulárnych vzorcov dochádza v priebehu infekcie k nekróze a apoptóze hostiteľských buniek, ktoré do okolia uvoľňujú s poškodením asociované molekulárne vzorce, akými môžu byť históny alebo extracelulárna DNA (ecDNA) (3). ecDNA má vo zvýšených koncentráciách imunogénne vlastnosti, a dokáže byť rozpoznaná Toll-*like* receptorom 9 (TLR9). Táto interakcia vedie prostredníctvom signálnej dráhy jadrového faktora kappa-B a interferónového regulačného faktora 7 k zvýšenej expresii prozápalových cytokínov (4). Ak prozápalový stav pretrváva, infekcia vedie k vzniku cytokínovej búrky a systémovému zápalu, ktorý môže vyústiť až do septického šoku a zlyhania viacerých orgánových sústav (5). Patogenéza sepsy môže byť ovplyvnená aj radou hostiteľských faktorov, akými sú napríklad vek, pohlavie alebo prítomnosť rozličných komorbidít (6,7) . Primárnym cieľom tohto projektu bolo preto sledovať rozdiely v mortalite u myší divého typu a myší deficitných pre Toll-*like* receptor 9 (TLR9-/-) v prípade oboch pohlaví, u ktorých bola vyvolaná abdominálna sepsa. Z doposiaľ známych publikácií sme očakávali vyššiu mortalitu u samcov, a vyššiu mieru prežívania v prípade TLR9-/- myší v porovnaní s divým typom.

Materiál a metódy

Na vyvolanie sepsy sme využili model podania fekálnej suspenzie (FSI) na základe protokolu prebraného od Tsuchida a kolektívu (8). Do experimentu boli zapojené samice a samce myší divého typu (C57BL/6; ♀n=5, ♂n= 8) a myši deficitné pre receptor TLR9 (♀n=11, ♂n= 14). FSI bola pripravená s výkalov zdravých myší, ktoré boli rozsuspendované vo fyziologickom

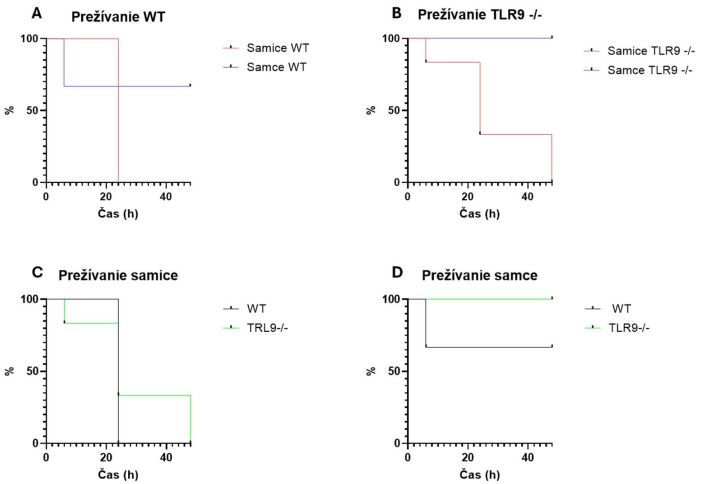
roztoku. Táto zmes bola následne prefiltrovaná cez sitko s pórmi o veľkosti 70µm a 40µm, aby sme sa zbavili tuhých nestrávených častí stolice. Jednotlivým myšiam bolo následne intraperitoneálne podané konštantné množstvo tejto suspenzie s koncentráciou 50mg, čo predstavovalo 200ul suspenzie, jedincom v kontrolnej skupine bol intraperitoneálne podaný fyziologický roztok. Šesť hodín po začiatku experimentu bolo myšiam podané antibiotikum Imipenem (25mg/kg). V časových bodoch 6, 24 a 48 hodín bolo myšiam pridelené adekvátne septické skóre a jedincom bola prostredníctvom termokamery zmeraná telesná teplota. Septické skóre odzrkadľuje zdravotný stav jedincov a taktiež závažnosť infekcie, hypotermia ako následok sepsy je zase spájaná s vyššou mortalitou. Pozorované parametre spolu so skórovacím systémom sú znázornené v tabuľke 1. Voda a potrava bola podávaná *ad libidum*. Na konci experimentu boli jedince uvedené do celkovej narkózy prostredníctvom intraperitoneálneho podania roztoku ketamínu (100mg/kg) a xylazínu (10mg/kg). Jedince boli následne usmrtené exsangvináciou a následnou cervikálnou dislokáciou. Získaná krv bola analyzovaná prostredníctvom hemoanalyzátora. Dáta boli analyzované prostredníctvom softvéru GraphPad Prism (verzia 10.4.1). Normálne rozloženie dát bolo potvrdené testom normality (Shapiro-Wilk test), na základe čoho sme použili parametrické štatistické testy (dvojfázová ANOVA, zmiešaný model). Rozdiely v prežívaní boli vyjadrené krivkou prežívania (Log-Rank test). Jednotlivé dáta sú zobrazené ako aritmetické priemery so štandardnou odchýlkou priemeru.

Tabuľka 1. Parametre skórovania septických myší.

Piloerekcia	0 – hladká srsť, 1 - piloerekcia
Oči	0 – otvorené, 1 - privreté až zatvorené
Aktivita	0 – aktívna, 1 – letargická, 2 – neaktívna
Vedomie	0 – pri vedomí, 1 - ospalá
Dýchanie	0 – rýchle dýchanie, normálne, 1 – pomalé, namáhané a trhané dýchanie

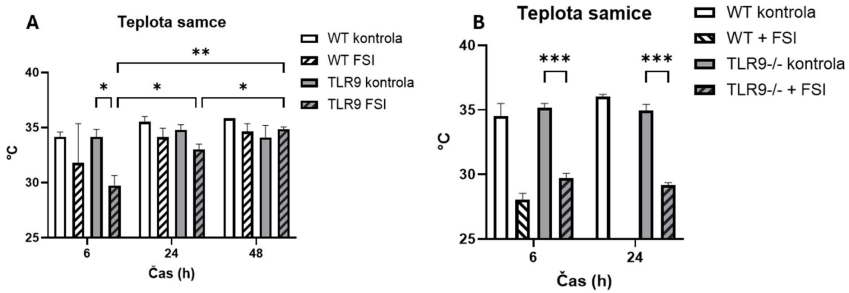
Výsledky

Napriek tomu, že mortalita samíc v porovnaní so samcami myší divého typu dosiahla v priebehu prvých 24 hodín 100%, signifikantný rozdiel v prežívaní nebol pozorovaný (Obr. 1A - Log-rank test – p=0.37). Opak nastal v prípade myší deficitných pre receptor TLR9, kde bola mortalita samíc vyššia v porovnaní so samcami, z ktorých neuhynul žiadny jedinec (Obr. 1B - Log-rank test – p=0.0003). Pri porovnávaní mortality medzi myšami divého typu a TLR9-/- myšami sme rozdiely nepozorovali (Obr. 1C a 1D - Log-rank test – ♀ = 0.60; ♂ = 0.12).



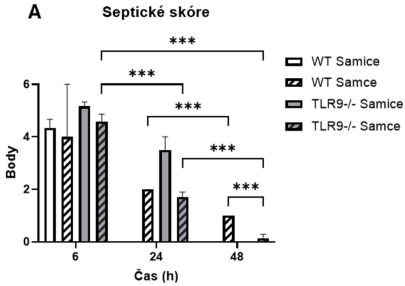
Obrázok 1. Krivky prežívania myší divého typu – A, a TLR9-/- myší – B. Krivky C a D znázorňujú rozdiely v rámci genotypov.

Signifikantné rozdiely v teplote medzi myšami divého typu a myšami deficitnými pre receptor TLR9 sme nezaznamenali. U TLR9-/- samcov a samcov divého typu bol však v priebehu 48 hodín pozorovaný postupný vzrast teploty až na hodnoty kontrolných zdravých jedincov (Obr. 2A). V prípade septických samíc sme takýto nárast nezaznamenali, a ich teplota sa v priebehu prvých 24 hodín experimentu nezmenila (Obr. 2B).



*Obrázok 2. Rozdiely v teplote myší divého typu a TLR9-/- myší. WT – divý typ (*p= 0.05; **p=0.01; ***p=0.001)*

Hodnota septického skóre bola najvyššia 6 hodín po infekcii v prípade všetkých pozorovaných skupín, a v priebehu experimentu sa postupne znižovala. Pri porovnávaní hodnôt septického skóre medzi samcami divého typu a TLR9-/- sme rozdiel pozorovali 48 hodín po infekcii, pričom práve samce divého typu mali toto skóre vyššie v porovnaní s TLR9-/- samcami (Obr. 3A - $p<0.001$).



*Obrázok 3. Hodnoty septického skóre v priebehu experimentu. (*p= 0.05; **p=0.01; ***p=0.001)*

Diskusia

V predloženom projekte sme úspešne testovaným jedincom navodili sepsu prostredníctvom FSI metódy. Experimentom sme zistili, že samice TLR9-/- myší sú náchylnejšie na úmrtie v prípade polymikrobiálnej abdominálnej sepsy. Tieto zistenia sú v rozpore s počiatočnou hypotézou o tom, že práve samce by mali vykazovať vyššiu mortalitu. Túto skutočnosť si vysvetľujeme tým, že pri navodzovaní sepsy sme použili konštantnú koncentráciu FSI suspenzie pri samcoch ako aj pri samiciach. V práci od Bojaliliho a kolektívu navodzovali laboratórnym myšiam sepsu prostredníctvom bakteriálneho endotoxínu (LPS) a metódou prepichnutia a podviazania slepého čreva (CLP). V prípade LPS modelu bola dávka normalizovaná na váhu zvlášť pre samice a zvlášť pre samce. Výsledkom bola 100% mortalita samcov, pričom približne 5% samíc experiment prežilo. V prípade CLP modelu bola zaznamenaná mortalita v prípade oboch pohlaví približne 50% a signifikantné rozdiely neboli pozorované (9). V budúcich experimentoch plánujeme model štandardizovať a normalizovať dávku FSI suspenzie a to buď v závislosti od váhy testovaných zvierat, alebo konštantným množstvom FSI suspenzie, ktoré však bude rozdielne pre samce a pre samice. Niekoľko publikovaných prác dokázalo, že deficiencia TLR9 receptoru má v prípade CLP navodenej sepsy protektívny účinok vo forme zníženej expresie prozápalových cytokínov, pričom táto deficiencia viedla k signifikantnému zníženiu v mortalite TLR9-/- myší v porovnaní s myšami divého typu (10, 11). Mortalita samíc oboch genotypov v našom prípade dosiahla v priebehu experimentu 100%. V prípade samcov došlo u TLR9-/- k prežitiu všetkých jedincov v porovnaní so samcami divého typu, avšak tento rozdiel nebol signifikantný. Máme za to, že aj v tomto prípade zohrávala úlohu konštantná dávka FSI suspenzie, a nízky počet jedincov v jednotlivých skupinách. Okrem normalizácie dávky by sme v budúcom experimente preto určite navýšili počet testovaných jedincov. Po normalizácii dávky a navýšení počtu jedincov by sme sa taktiež pozreli na to, aký význam zohráva signalizácia TLR9 receptorom a uvoľnená ecDNA s potenciálnou aplikáciou DNázy I ako liečby. V mnohých prípadoch sa v štúdiách používajú iba mladé samce, preto v nasledujúcich experimentoch plánujeme zahrnúť obe pohlavia a mladšie ale aj staršie myši.

Napriek niekoľkým nedostatočnostiam táto pilotná práca predstavuje dobrý základ pre budúce experimenty zaoberajúce sa mortalitou a rozdielnou patogenézou sepsy v prípade

samíc a samcov, pričom získané dáta by v budúcnosti mohli byť translatované do klinického výskumu pre lepší a personalizovanejši manažment sepsy u žien a mužov.

Tento projekt bol podporený grantom APVV-22-0554.

Zoznam použitej literatúry:

1. Mervyn S, Manu SH, Michael B, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016, roč. 315, č. 8, s. 801–810.
2. Kristina ER, Sarah Charlotte J, Kareha MA, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 2020, roč. 395, č. 10219, s. 200–211.
3. Heike B, Klaus SO. Cell death in sepsis: a matter of how, when, and where. *Critical Care* 2009, roč. 13, č. 4, s. 173.
4. Svetlana K, Polina L, Oksana CH, et al. Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF-kB-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (haMSCs). *Expert Opinion on Biological Therapy* 2012, roč. 12, č. sup1, s. S99–S111.
5. Benjamin G. CH, Filip K. S, George F. W. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*. 2017, roč. 39, č. 5, s. 517–528.
6. Christine K, Seongmi CH, Eun Jin J, et al. Prevalence and outcomes of chronic comorbid conditions in patients with sepsis in Korea: a nationwide cohort study from 2011 to 2016. *BMC Infectious Diseases.* 2024, roč. 24, č. 1, s. 184.
7. Ines L, Sharon E, Nathalie L, Ignacio ML, Bruno P, Marc L. Interactions between Gender and Sepsis—Implications for the Future. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 3, s. 746.
8. Takumi T, Takeshi W, Asumi M, et al. Protocol for a Sepsis Model Utilizing Fecal Suspension in Mice: Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model. *Frontiers in Medicine*. 2022, roč. 9.
9. Rafael B, Armando RH, Arturo VA, et al. Two murine models of sepsis: immunopathological differences between the sexes—possible role of TGFβ1 in female resistance to endotoxemia. *Biological Research*. 2023, roč. 56, č. 1, s. 54.
10. Dan H, Xiaohua Y, Yianxiao X, et al. Inhibition of Toll-like receptor 9 attenuates sepsis-induced mortality through suppressing excessive inflammatory response. *Cellular immunology*. 2015, roč. 295, č. 2, s. 92–98.
11. George P, Bryan M. B, Hoang M. N, Zubin M. B, Ronald P. D. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008, roč. 205, č. 6, s. 1277–1283.

38. Chirurgická liečba gestačnej trofoblastovej neoplázie

MUDr. Liam McCullough
(gynekológia a pôrodníctvo)

Školiteľ: Doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

Gestačná trofoblastová choroba (GTCH) je skupina ochorení spojených s graviditou, pri ktorých dochádza k abnormálnej proliferácii trofoblastu. Malígne formy GTCH sa označujú ako gestačná trofoblastová neoplázia (GTN) a zahŕňajú nasledujúce tumory: invazívna a mestastatická hydatidózna mola, gestačný choriokarcinóm, trofoblastový tumor placentárneho lôžka (PSTT), epiteloidný trofoblastový tumor (ETT) a zmiešaný trofoblastový tumor (1). Perzistujúca GTN je forma trofoblastovej neoplázie, ktorá je diagnostikovaná klinicky pri stúpajúcich hladinách alebo plató hladín ľudského choriového gonádotropínu (hCG) po evakuácii molárnej gravidity alebo pôrode, potrate či ektopickej gravidite (2). Okrem PSTT a ETT sa biopsia trofoblastových tumorov neodporúča pre ich bohatú vaskularizáciu a vysoké riziko krvácania (3).

Incidencia GTCH sa v Európe a v Severnej Amerike pohybuje medzi 0,57-2 prípadmi na 1000 tehotenstiev (4). Kurabilita pacientiek s GTN je až do 100 % pri nízkorizikovom a až do 95 % pri vysokorizikovom ochorení (2).

Napriek výbornej chemosenzitivite má chirurgická liečba významnú úlohu v liečbe GTN. Najčastejšími indikáciami na chirurgickú liečbu sú ložiská rezistentné na chemoterapiu a krvácanie z tumoru. Výkony využívané v manažmente lokálneho ochorenia zahŕňajú dilatáciu a kyretáž dutiny maternice a hysterektómiu, pri extrauterinných metastázach je to torakotómia so segmentálnou resekciou pľúc a kraniotómia. U pacientiek so splnenými reprodukčnými požiadavkami je možná primárna chirurgická liečba, ktorá redukuje alebo i eliminuje chemoterapiu (3,5). PSTT a ETT sú rezistentné na chemoterapiu a hysterektómia s resekciou metastatických ložísk je liečba prvej voľby (6).

Metódy

Práca retrospektívne analyzuje chirurgickú liečbu pacientiek s GTN v Centre pre gestačnú trofoblastovú chorobu Slovenskej republiky od 1.1.1993 do 31.12.2023. Vyšetrovacie metódy využité na určenie štádia ochorenia a na zhodnotenie rizikových faktorov boli ultrazvukové vyšetrenie malej panvy, počítačová tomografia (CT) hrudníka, brucha a malej panvy, röntgenový snímok hrudníka a magnetická rezonancia hlavy. Štádium ochorenia bolo určené podľa FIGO (Medzinárodná spoločnosť pre gynekológiu a pôrodníctvo) stagingového systému a WHO (Svetová zdravotnícka organizácia) prognostického skórovacieho systému.

Pacientky boli stratifikované do nízkorizikovej (WHO skóre ≤ 6) a vysokorizikovej (WHO skóre ≥ 7) skupiny a liečené monochemoterapiou alebo polychemoterapiou.

Analyzované boli nasledovné parametre: vek pacientky, interval a typ predchádzajúcej gravidity, typ chirurgického výkonu, FIGO štádia ochorenia, WHO prognostické skóre, interval do dosiahnutia remisie. Do súboru boli zahrnuté pacientky, ktoré boli liečené len chirurgicky alebo kombináciou s chemoterapiou alebo rádioterapiou. Remisia bola definovaná ako dosiahnutie hladiny hCG < 5 IU/l, rezistencia ako plató alebo vzostup hladín hCG počas liečby a recidíva ako vzostup hladín hCG po dosiahnutí remisie.

Na spracovanie a analýzu údajov bol použitý program MS Office Excel 2023.

Výsledky

Do štúdie bolo zahrnutých celkovo 69 pacientiek s GTN. Priemerný vek pacientiek bol 34,1 rokov (rozsah 17-56; SD ± 10,4). Najviac pacientiek bolo vo vekovej kategórii 20-29 rokov (21/69; 30,4 %) a 30-39 rokov (19/69; 27,5 %) a najmenej ich bolo v kategórii > 50 rokov (6/69; 8,7 %). Najčastejší typ predchádzajúcej gravidity bol pôrod (26/69; 37,7 %) a po ňom kompletná mola (25/69; 36,2 %). Nízkorizikové pacientky podľa WHO prognostického skóre tvorili viac ako polovicu prípadov (35/69; 57,4 %). Až na jednu pacientku, u ktorej bola potvrdená invazívna/metastatická mola, bol u všetkých vysokorizikových pacientiek potvrdený gestačný choriokarcinóm (25/26; 96,2 %).

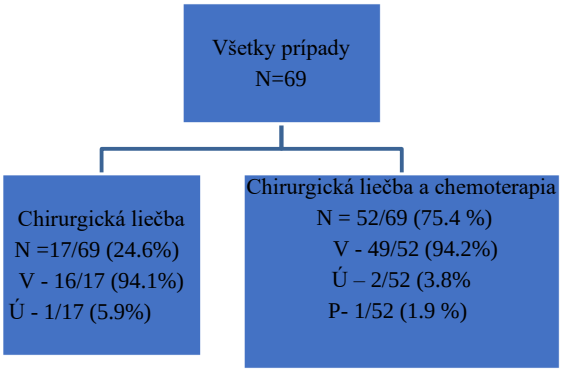
Gestačné choriokarcinómy boli histologicky potvrdené v 39 prípadoch (55,6 %), invazívne a metastatické moly v 21 prípadoch (30,4 %), PSTT v 6 prípadoch (8,7 %), ETT v 2 prípadoch (3 %) a zmiešaný trofoblastový tumor v jednom prípade (1,4 %). V prípade zmiešaného tumoru išlo o kombináciu gestačného choriokarcinómu a PSTT. 35 pacientiek malo nemetastatické ochorenie (50,7 %) a 34 pacientiek malo metastázy (49,3 %).

Metastázy sa najčastejšie vyskytovali v pľúcach (n=28; 82,4 %). Menej často sa metastázy nachádzali v mozgu (n=6; 17,6 %), v pošve (n=5; 14,7 %), v obličke (n=3; 8,8 %), v slezine (n=3; 8,8 %), v pečeni (n=2; 5,9 %), v nadobličkách (n=1; 2,9 %), v parametriu (n=1; 2,9%) a v rekte (n=1; 2,9 %).

Celkovo bolo 17 pacientiek (24,6 %) liečených iba chirurgicky. 52 pacientiek (75,4 %) bolo liečených chirurgicky a chemoterapiou, z ktorých 2 boli liečené aj rádioterapiou (2,9 %). V súbore bolo vykonaných 77 chirurgických výkonov. Najčastejšie výkony boli hysterektómia (32/77; 46,4 %) a dilatácia a kyretáž (25/77; 36,2 %). Menej časté boli resekcie pľúc (4/77; 5,8 %), salpingektómia (3/77; 4,3 %); extirpácia pošvovej metastázy (3/77; 4,3 %), hemostatická sutura (3/77; 4,3 %), kraniotómia (3/77; 4,3 %), splenektómia (2/77; 2,9 %), resekcia pečene (1/77; 1,4 %) a resekcia rekta (1/77; 1,4 %). Výsledky liečby podľa štádia ochorenia sú uvedené v grafe 1.

Chirurgická liečba bola použitá v prvej línii v 60 prípadoch prípadoch (87 %) a v druhej línii v 9 prípadoch (13 %). Celkový počet a typ výkonov v prvej a druhej línii sú uvedené v tab. 1.

Graf 1. Výsledky liečby prípadov podľa liečebnej modality



N - počet prípadov, V- vyliečené, Ú - úmrtie, P - prerušenie liečby

Tab. 1 Chirurgické výkony v prvej a druhej línii liečby

Chirurgický výkon	Prvá línia N=67 (%)	Druhá línia N=10 (%)	Spolu N=77 (%)
Hysterektómia	26 (38.8)	6 (60)	32 (41.6)
Dilatácia a kyretáž	25 (37.3)	0	25 (32.5)
Salpingektómia	3 (4.5)	0	3 (3.9)
Extirpácia pošvovej metastázy	3 (4.5)	0	3 (3.9)
Hemostatická sutura	3 (4.5)	0	3 (3.9)
Krániotómia	2 (3.0)	1 (10)	3 (3.9)
Splenektómia	2 (3.0)	0	2 (2.6)
Resekcia pľúc	1 (1.5)	3 (30)	4 (5.2)
Resekcia pečene	1 (1.5)	0	1 (1.3)
Resekcia rekta	1 (1.5)	0	1 (1.3)

Zo 17 prípadov (17/60; 28,3 %) liečených iba chirurgicky, bolo 8 prípadov invazívnej/metastatickej moly (8/21; 38,1 %), 5 prípadov PSTT (5/6; 83,3 %), 2 prípady ETT (2/2; 100 %) a 2 prípady gestačného choriokarcinómu (2/39; 5,1 %). U väčšiny pacientiek bola vykonaná hysterektómia (13/17; 76,5 %). V dvoch prípadoch PSTT boli pacientky vyliečený iba dilatáciou a kyretážou (2/6; 33,3 %), v ostatných prípadoch bola vykonaná hysterektómia. Jedna pacientka s gestačným choriokarcinómom (1/39; 2,6 %) vo vajíčkovode bola vyliečená salpingektómiou.

Takmer všetky druholíniové chirurgické výkony boli indikované pre rezistentné ložiská tumoru. Iba v jednom prípade bola vykonaná krániotómia pre krvácanie.

Priemerný počet aplikovaných cyklov chemoterapie v celom súbore bol 7 (rozsah 1-17; SD ± 3,1). Nízkorizikové pacientky boli liečené sekvenčnou liečbou metotrexátom a aktinomycínom D a v dvoch prípadoch kombinovaným režimom MAC (metotrexát, aktinomycín D, cyklofosfamid). Vysokorizikové pacientky boli prevažne liečené polychemoterapeutickým režimom EMA/CO.

Relaps ochorenia sa vyskytol v 5 prípadoch (5/69; 7,2 %), z ktorých dve (2/5; 40 %) bolo vyliečených resekciou chemorezistentného ložiska v pľúcach. Tri pacientky zomreli (3/69; 4,3 %), pričom vo všetkých prípadoch išlo o pacientky veľmi vysokého rizika s metastázami v mozgu. Celková kurabilita bola 95,7 % (66/69), pričom sa vyliečili všetky nízkorizikové pacientky (35/35) a 88,5 % (23/26) vysokorizikových pacientiek. Priemerný interval od začiatku liečby do dosiahnutia remisie bol 11,3 týždňa (rozsah: 0-86; SD ± 11.4).

Diskusia

GTN je vďaka chemoterapii výborne liečiteľná malignita (2). Postupné zavádzanie imunoterapie do liečebných protokolov zlepšuje prognózu u vysokorizikových pacientiek a u pacientiek s ochorením rezistentným na chemoterapiu (4). Napriek výbornej chemosenzitivite väčšiny trofoblastových tumorov má chirurgická liečba stále významnú úlohu. Hlavné indikácie na liečbu sú krvácanie z nádoru, rezistencia na chemoterapiu a ako primárna liečba PSTT a ETT (2).

Dilatácia a kyretáž sa v liečbe využíva najmä na primárnu diagnostiku a liečbu moly hydatidózy. Opakovaná kyretáž možno využiť na odstránenie tumorov v dutine maternice. V štúdií Osborne et al. dosiahlo remisiu po kyretáži 40 % pacientiek s nízkorizikovou nemetastatickou formou GTN (7). Riziko komplikácii pri druhej kyretáži je dosahuje až 8 % (8). Všetky pacientky v našom súbore s histologickou diagnózou gestačného choriokarcinómu a invazívnej a metastatickej moly, ktoré postúpili opakovanú kyretáž, vyžadovali ďalšiu chemoterapiu alebo iný chirurgický výkon. Dve pacientky s PSTT (2/6; 40 %) boli vyliečené iba kyretážou.

Hysterektómia sa využíva najmä na odstránenie chemorezistentných ložísk a pri profúznom krvácaní z nádoru u pacientiek so splnenými reprodukčnými požiadavkami (2). V publikáciach sa popisuje miera remisie 47,8-82,4 % po hysterektómii bez chemoterapie u 47,8-82,4 % pacientiek s nemetastatickým ochorením (9,10). Hysterektómia v prvej línii môže byť kuratívna aj pri metastatickom ochorení. V štúdii od Dabi et al. dosiahlo remisiu po hysterektómii bez chemoterapie až 77,3 % z 30 pacientok, ktoré mali maximálne 2 zobrazené metastázy v pľúcach (11). V našom súbore dosiahlo remisiu po hysterektómii bez chemoterapie 42,1 % pacientiek s invazívnou/metastatickou molou, 3 zo 4 pacientiek s PSTT a oba prípady ETT. Všetky pacientky s gestačným choriokarcinómom, u ktorých bola vykonaná hysterektómia, vyžadovali chemoterapiu.

Najčastejšie lokalita metastáz sú pľúca (80 %), pošva (30 %), pečeň (10 %) a mozog (10 %). Chirurgická liečba sa najčastejšie využíva na odstránenie rezistentných ložísk a menej často pri krvácaní z metastáz (8). Resekciou rezistentných pľúcnych metastáz je možné dosiahnúť remisiu až v 90,5-90,9 % prípadov (12). V našom súbore vyžadovalo resekciu pľúcnych mestastáz 5,8 % prípadov (4/69), pričom v dvoch prípadoch bola indikácia recidíva ochorenia, v jednom prípade chemorezistencia a v jednom prípade bola vykonaná resekcia ako primárny výkon.

Záver

GTN patrí medzi zriedkavé malignity s vynikajúcou prognózou. Napriek chemosenzitivite väčšiny trofoblastových tumorov má chirurgická liečba dôležitú úlohu na dosiahnutie takmer 100 % kurability. Výsledky nášho súboru potvrdzujú význam chirurgie v manažmente pacientiek s GTN.

Zoznam použitej literatúry

1. Hui P, Shih I: Gestational trophoblastic disease. In WHO Classification of Tumours Editorial board: Female genital tumours. (WHO Classification of Tumours, 5. vydanie, 4. zväzok). Lyon, IARC. 2020, 309-334.
2. Ngan HYS, Bender H, Benedet JL, Jones H, Montruccoli GC, Pecorelli S; FIGO Committee on Gynecologic Oncology: Gestational trophoblastic neoplasia, FIGO 2000 staging and classification. Int J Gynecol Obstet 2003; 83: 175-177.
3. Soper JT: Gestational Trophoblastic Disease: Current Evaluation and Management. Obstet Gynecol 2021; 137(2): 355- 370.
4. Horowitz NS, Eskander RN, Adelman MR et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of gestational trophoblastic disease: ASociety of Gynecologic Oncology evidenced-based review and recommendation. Gynecol Oncol 2021; 163 (3): 605–613.
5. Lok C, Van Trommel N, Massuger L, et al. Practical clinical guidelines of the EOTTD for treatment and referral of gestational trophoblastic disease. Eur J Cancer 2020; 130: 228–240.
6. Frijstein MM, Lok CAR, Van Trommel NE, et al. Management and prognostic factors of epithelioid trophoblastic tumors: Results from the International Society for the Study of Trophoblastic Diseases database. Gynecol Oncol 2019; 152 (2): 361-367
7. Osborne RJ, Filiaci VL, Schink JC, et al. Second Curettage for Low-Risk Nonmetastatic Gestational Trophoblastic Neoplasia. Obstet Gynecol 2016; 128(3): 535-542.
8. Coopmans L, Larsson A, Joneborg U, et al. N. Surgical Management of Gestational Trophoblastic disease. Gynecol Obstet Invest 2023; 3: 1-16.
9. Bolze PA, Mathe M, Hajri T a spol: First-line hysterectomy for women with low-risk non-metastatic gestational trophoblastic neoplasia no longer wishing to conceive. Gynecol Oncol 2018; 150(2): 282-287.
10. Eysbouts YK, Massuger LFAG, IntHout J, et al. The added value of hysterectomy in the management of gestational trophoblastic neoplasia. Gynecol Oncol 2017; 145(3): 536-542.
11. Dabi Y, Hajri T, Massardier J, et al. Outcome of First-Line Hysterectomy for Gestational Trophoblastic Neoplasia in Patients No Longer Wishing to Conceive and Considered With Isolated Lung Metastases: A Series of 30 Patients. Int J Gynecol Cancer 2018; 28(9): 1766-1771.
12. Zhao L, Qun Y, Ma D, et al. Surgical treatment of lung metastasis in patients with refractory gestational trophoblastic neoplasia: A retrospective study. Gynecol Oncol 2022; 167(1): 37-41.

39. Tehotenstvo v čase COVID-19: Čo nám ukázala slovenská národná štúdia?

MUDr. Adriána Goldbergerová
(gynekológia a pôrodníctvo)

Spoluautori: Cecília Marčišová[2], Ladislav Kováč[3], Ľubomíra Izáková[4], Ján Mikas[5], Jana Námešná[6], Zuzana Krištúfková[7], Alexandra Krištúfková[1]
Školiteľ: prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.[1]
[1] I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB, [2] Gynekologicko-pôrodnícke oddelenie, NAW, Piešťany, [3] GLOSS research group HRP SRH WHO International, Switzerland, [4] Psychiatrická klinika LF UK a UNB, [5] Úrad verejného zdravotníctva SR, [6] RÚVZ Banská Bystrica, [7] Katedra epidemiológie SZU

Úvod

Pandémia COVID-19 vyvolala viaceré otázky o vplyve infekcie SARS-CoV-2 na priebeh tehotenstva a zdravie novorodencov. Kým prvotné správy naznačovali minimálny dopad infekcie SARS-CoV-2 na tehotné ženy, ďalšie štúdie poukázali na významné riziká vrátane zvýšenej materskej morbidity a mortality, závažných perinatálnych komplikácií, častejších príjmov na jednotky intenzívnej starostlivosti (JIS) a vyššieho výskytu predčasných pôrodov (1). Ako rizikové faktory závažného priebehu COVID-19 u tehotných boli identifikované pokročilý vek matky (nad 35 rokov), zvýšený index telesnej hmotnosti (BMI), iná ako kaukazská rasa, diabetes mellitus, chronická hypertenzia a preeklampsia (2,3).

Väčšina existujúcich štúdií čerpala z nemocničných údajov a nezachytávala mierne ani asymptomatické prípady, čo zdôraznilo potrebu populačne orientovaného výskumu pokrývajúceho celé spektrum gravidity (2). V reakcii na túto potrebu vznikla slovenská štúdia COVID-19 PreMatOut, zameraná na analýzu priebehu a dôsledkov infekcie SARS-CoV-2 počas tehotenstva a pôrodu vrátane pôrodníckych aj nepôrodníckych komplikácií a zdravotného stavu novorodencov počas hospitalizácie.

Materiál a metódy

Táto národná retrospektívna observačná kohortová štúdia zahŕňa všetky tehotné ženy s potvrdenou infekciou SARS-CoV-2 v ktoromkoľvek štádiu tehotenstva, od začiatku pandémie v marci 2020 až do oficiálneho ukončenia pandémie podľa WHO dňa 5. mája 2023. Štúdia bola koncipovaná s dvoma hlavnými cieľmi:

- Primárny cieľ: Preskúmať vplyv COVID-19 na priebeh tehotenstva s dôrazom na subjektívne výpovede pacientiek – ich príznaky a skúsenosti.
- Sekundárny cieľ: Získať doplňujúce objektívne dáta od poskytovateľov prenatálnej a pôrodnej starostlivosti.

Pre tieto účely bola vytvorená multiodborová spolupráca viacerých pracovísk Lekárskej fakulty Univerzity Komenského (LF UK) a Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (ÚVZ SR). ÚVZ SR viedol celoštátny register pozitívne testovaných vrátane tehotných žien. Po jeho sprístupnení sa údaje zbierali z dvoch hlavných zdrojov:

Pacientsky dotazník: Respondentky boli telefonicky kontaktované, oboznámené s cieľom štúdie a po vyjadrení súhlasu im bol odoslaný dotazník e-mailom alebo poštou.

Klinické údaje: Po získaní informovaného súhlasu boli kontaktovaní obvodní gynekológovia a príslušné nemocnice. Boli požiadaní o vyplnenie online dotazníka zameraného na diagnostiku, hospitalizácie a výsledky pôrodu.

Všetky údaje boli spracované anonymne v súlade s nariadením GDPR platným v EÚ. Analýza bola vykonaná pomocou kvantitatívnych štatistických metód.

Výsledky

3.1 Subjektívne údaje získané od respondentiek

Z celoštátneho registra bolo identifikovaných 1148 tehotných žien s potvrdenou infekciou SARS-CoV-2 metódou PCR alebo antigénovým testom. Po získaní informovaného súhlasu dotazník úplne vyplnilo 240 respondentiek, ktoré boli následne zahrnuté do analýzy. Priemerný vek respondentiek v čase infekcie bol 32 rokov a priemerný gestačný vek pri diagnostikovaní bol 23 týždňov. Všetky ženy boli kaukazského pôvodu.

Symptómy infekcie

U väčšiny žien mal priebeh infekcie symptomatický charakter; bezpríznakový priebeh uviedlo len 1 % respondentiek. Najčastejšie sa vyskytli príznaky horných dýchacích ciest (42 %), nasledované neurologickými symptómami u 38 % pacientiek. Menej často boli prítomné príznaky dolných dýchacích ciest (16 %) a gastrointestinálne ťažkosti (3 %). Jednotlivá prevalencia symptómov je uvedená v tabuľke č. 1.

	Počet prípadov (n = 240)	(%)
Zvracanie	12	5,00
Hnačka	16	6,67
Dýchavičnosť	52	21,67
Bolesť hrdla	106	44,17
Nádcha	109	45,42
Strata chuti	109	45,42
Svalová a kĺbová bolesť	114	47,50
Kašeľ	129	53,75
Strata čuchu	132	55,00
Zvýšená teplota (>37 °C)	137	57,08
Bolesť hlavy	140	58,33
Únava / malátnosť	168	70,00

Tabuľka 1. Symptomatický priebeh ochorenia: Prevalencia a percentuálne zastúpenie hlásených príznakov v sledovanom súbore.

Pôrodnícke komplikácie a spôsob pôrodu

Analyzovali sme aj pôrodnícke komplikácie v súbore 240 žien, pričom sme rozlišovali komplikácie pred a po prekonaní infekcie SARS-CoV-2 (tabuľka 2). Celkovo 52 žien (22 %) uviedlo, že pred infekciou počas tehotenstva zažili určitý typ komplikácie. Najčastejšie išlo o krvácanie (21 %), hroziaci predčasný pôrod (19 %) a placentárne patológie (8 %). Po prekonaní infekcie hlásilo 55 žien (23 %) nové alebo zhoršené komplikácie. Najčastejšie sa vyskytli hypertenzné poruchy (25 %), hroziaci predčasný pôrod (25 %) a opuchy (16 %), nasledované poruchou rastu plodu (15 %) a abnormálnym nálezom na placente (11 %).

Komplikácia	Pred SARS-CoV-2 (n = 52)	%	Po SARS-CoV-2 (n = 55)	%
Hroziaci predčasný pôrod	10	19,23	14	25,45
Hypertenzné ochorenie	3	5,77	14	25,45
Opuchy	1	1,92	9	16,36
Porucha rastu plodu	1	1,92	8	14,55
Placentárne patológie	4	7,69	6	10,91
Oligohydramnion	0	0,00	4	7,27
Krvácanie	11	21,15	1	1,82
Gestačný diabetes	3	5,77	1	1,82
Hematóm	3	5,77	0	0,00
Anémia	2	3,85	1	1,82
Hepatopatia	2	3,85	2	3,64

Tabuľka 2. Pôrodnícke a nepôrodnícke komplikácie pred a po prekonaní infekcie SARS-CoV-2

Spôsob pôrodu: 67 % vaginálny, 33 % cisársky rez. Predčasne (32.–37. týždeň) porodilo 21 žien. Ďalších 21 malo aktívnu infekciu počas pôrodu.

Očkovanie a hospitalizácie

V rámci súboru sme analyzovali aj očkovací status. Celkovo 47 žien uviedlo, že boli očkované proti ochoreniu COVID-19, z toho 30 pred tehotenstvom a 17 počas tehotenstva. Hlásené boli len mierne nežiaduce účinky, ako zvýšená teplota, bolesť v mieste vpichu, začervenanie a únava. Pri porovnaní výskytu hospitalizácií, febrilít, dýchavičnosti a bezpríznakového priebehu medzi ženami očkovanými pred tehotenstvom, počas tehotenstva a neočkovanými ženami štatistická analýza nepreukázala štatisticky významné rozdiely v žiadnom z ukazovateľov. Trend však naznačoval miernejší priebeh ochorenia u žien očkovaných počas gravidity (tabuľka 3).

Ukazovateľ	Pred tehotenstvom (n = 30)	Počas tehotenstva (n = 17)	OR [95 % CI] Pred vs. Počas	p-hodnota (Pred vs. Počas)	Chi-kvadrát (vs. neočkované)	p-hodnota (vs. neočkované)
Hospitalizácie	1 (3,3 %)	0 (0,0 %)	∞	1,000	2,29	0,319
Horúčka (>37 °C)	20 (66,7 %)	8 (47,1 %)	2,25 [0,69–7,38]	0,227	1,96	0,376
Dýchavičnosť	9 (30,0 %)	3 (17,6 %)	2,00 [0,50–8,07]	0,492	0,28	0,870
Asymptomatický priebeh	0 (0,0 %)	2 (11,8 %)	0,00	0,126	4,50	0,106

Tabuľka 3. Porovnanie výstupov podľa načasovania očkovania (pred tehotenstvom vs. počas tehotenstva)

Hospitalizáciu si vyžadovalo 13 žien (5,42 %) zo súboru 240. Všetky hospitalizácie si vyžadovali špecializovanú zdravotnú starostlivosť: štyri ženy boli hospitalizované na COVID špecializovanom oddelení, štyri na gynekologickom oddelení, tri na jednotke intenzívnej starostlivosti a dve na oddelení infektológie.

Jednofaktorová analýza bola použitá na identifikáciu rizikových faktorov hospitalizácie. Hoci 7 hospitalizovaných žien bolo starších ako 35 rokov v porovnaní s nehospitalizovanými, rozdiel nebol štatisticky významný. Naopak, ženy v treťom trimestri mali štatisticky významne vyššiu pravdepodobnosť hospitalizácie. Dýchavičnosť bola taktiež významne asociovaná s hospitalizáciou. Najsilnejším prediktorom bola horúčka – prítomná u všetkých hospitalizovaných žien (tabuľka 4).

Rizikový faktor	Hospitalizované (n = 13)	Nehospitalizované (n = 227)	OR (95 % CI)	p-hodnota
Vek> 35 rokov	7 (53,8 %)	92 (40,3 %)	1,71 (0,55–5,32)	0,393
Tretí trimester	9 (69,2 %)	92 (40,5 %)	3,30 (1,02–10,65)	0,048
Dýchavičnosť	7 (53,8 %)	47 (20,7 %)	4,47 (1,43–14,01)	0,011
Horúčka	13 (100,0 %)	124 (54,6 %)	∞	0,0007

Tabuľka 4. Jednofaktorová analýza rizikových faktorov pre hospitalizáciu z dôvodu COVID-19

3.2 Objektívne klinické údaje

Nálezy z prenatálnej starostlivosti

Z údajov od poskytovateľov prenatálnej starostlivosti (n = 24) sme analyzovali laboratórne a ultrazvukové výsledky. V našej štúdii sa významné odchýlky nepotvrdili. Zaznamenali sme však zvýšené CRP, čo je v súlade s literatúrou ako typická zápalová odpoveď počas infekcie SARS-CoV-2 v tehotenstve (4).

Ultrazvukové vyšetrenia nepreukázali významné rozdiely v dopplerovských alebo morfologických parametroch v porovnaní s bežnou populáciou. Neboli zaznamenané žiadne známky fetálnej infekcie ani štrukturálne abnormality plodu.

Údaje z pôrodnice

Táto časť prezentuje objektívne klinické údaje získané z pôrodníc (n = 53). Väčšina žien mala na začiatku tehotenstva normálny BMI (60 %), 40 % nadváhu/obezitu. Komorbidity boli prítomné u 40 % prípadov, najčastejšie hypotyreóza a trombofília. Peripartálne komplikácie sa vyskytli v 34 %, najmä krvácanie, hypotónia maternice, OASIS, predčasný odtok plodovej vody a fetálna hypoxia. Priemerná dĺžka hospitalizácie bola 3,8 dňa.

Neonatálne výsledky

Súbor zahŕňal 53 novorodencov. Priemerná pôrodná hmotnosť bola 3420 g, pH pupočníkovej krvi pri narodení bolo 7,35, čo zodpovedá normálnemu rozpätiu acidobázickej rovnováhy. Všetci novorodenci boli po pôrode hodnotení ako zdraví a ani dotazníky realizované rok po pôrode neodhalili žiadne zdravotné komplikácie.

Diskusia

Tehotenstvo predstavuje všeobecne uznávaný rizikový faktor pre ťažší priebeh ochorenia COVID-19 (5). Už jedna z prvých štúdii UKOSS (národná prospektívna kohortová štúdia) v Spojenom kráľovstve analyzovala 1148 hospitalizovaných tehotných žien s potvrdenou infekciou SARS-CoV-2 v období marec až august 2020. Zistilo sa, že 63 % týchto žien malo symptomatický priebeh a odhadovaná incidencia hospitalizácie so symptomatickým COVID-19 bola 2 na 1000 tehotenstiev (3). V našej štúdii si hospitalizáciu vyžadovalo 13 zo 240 tehotných žien (5,42 %). Tento podiel sa môže zdať vyšší než v britských dátach, avšak porovnanie limitujú rozdiely v národných stratégiách, nemocničnej kapacite či prístupe k prijímaniu pacientiek. Navyše, symptomatický priebeh prevažoval aj v našom súbore – len 1 % respondentiek ostalo bezpríznakových.

Pri porovnaní symptómov sa ukázali isté odlišnosti oproti iným štúdiám. Kým niektoré systematické prehľady uvádzajú ako najčastejšie horúčku, kašeľ a myalgiu (6), v našej kohorte dominovala únava (70 %), bolesti hlavy (58 %), horúčka (57 %), strata čuchu (55 %) a kašeľ (53 %). Tieto rozdiely môžu byť spôsobené odlišným gestačným vekom pacientok, cirkulujúcim variantom vírusu alebo metódou zberu údajov.

Výskyt cisárskych rezov (33 %) zodpovedá globálnym trendom vyššej pravdepodobnosti operatívneho pôrodu u symptomatických tehotných (3,7). Neonatálne výstupy boli priaznivé – nezaznamenali sme žiadne úmrtia ani závažné komplikácie novorodencov.

Podľa predbežných údajov jedného zo spoluautorov došlo počas pandémie na Slovensku k nárastu materskej mortality. V rokoch 2021–2022 bolo 7 úmrtí priamo alebo nepriamo spojených s COVID-19, čo tvorilo približne 37 % všetkých materských úmrtí.

Zaujímavé je, že sme nezaznamenali významné rozdiely v priebehu infekcie medzi dominantnými vlnami pandémie (varianty Alpha, Delta, Omicron). Kriticky choré pacientky boli hospitalizované počas všetkých fáz pandémie bez jednoznačnej prevahy konkrétneho variantu. Očkovanie bolo v súbore málo zastúpené, a aj podávanie efektívnych liečebných možností – ako kortikosteroidy či tromboprofylaxia – bolo len výnimočné, čo poukazuje na isté rezervy pri prenose medzinárodných odporúčaní do klinickej praxe (8).

Pandémia COVID-19 zároveň poukázala na potrebu existencie flexibilných výskumných rámcov. Tehotné ženy bývajú často vylučované z veľkých klinických štúdií, čím vzniká informačná medzera. Pre budúce krízové situácie je dôležité mať pripravené tzv. „hibernované protokoly“ so schválením financovaním, aby sa výskum mohol okamžite spustiť bez zdržania (2).

Záver

Táto národná štúdia potvrdila, že symptomatický priebeh COVID-19 bol u tehotných žien na Slovensku veľmi častý. Pokročilý materský vek a infekcia v treťom trimestri boli spojené so zvýšeným rizikom hospitalizácie. Mierne zvýšený výskyt cisárskych rezov a predčasných pôrodov naznačuje možný nepriamy vplyv pandémie na pôrodnícku starostlivosť. Vo všeobecnosti boli materské a neonatálne výsledky priaznivé. Napriek tomu by širšie využitie overených liečebných prístupov – vrátane očkovania počas tehotenstva – mohlo viesť k ešte lepším výsledkom. Táto štúdia spojila subjektívne výpovede žien s doplňujúcimi klinickými údajmi z prenatálnej a pôrodnej starostlivosti, čím ponúkla komplexný pohľad na priebeh tehotenstva počas pandémie.

Štúdia bola podporená grantom Nadácie ESET (č. zmluvy: 5795440) a čiastočne financovaná grantom Lekárskej fakulty UK č. UK/3035/2024 a UK/45/2022

Zoznam použitej literatúry

1. Allotey J, Fernandez S, Bonet, M et al: Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: Living systematic review and meta-analysis. BMJ 2020: 370, m3320.
2. de Bruin O, Engjom H, Vousden N et al: Variations across Europe in hospitalization and management of pregnant women with SARS-CoV-2 during the initial phase of the pandemic: Multi-national population- based cohort study using the International Network of Obstetric Survey Systems (INOSS). Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2023: 102: 1521–1530.
3. Vousden N, Bunch K, Morris E et al: The incidence, characteristics and outcomes of pregnant women hospitalized with symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection in the UK from March to September 2020: A national cohort study using the UK Obstetric Surveillance System (UKOSS). PLoS ONE 2021: 16: 5.
4. Melbye H, Hvidsten D, Holm A et al: The course of C-reactive protein response in untreated upper respiratory tract infection. Br. J. Gen. Pract. 2004: 54: 653–658.
5. Vousden N, Ramakrishnan R, Bunch K et al: Management and implications of severe COVID-19 in pregnancy in the UK: Data from the UK Obstetric Surveillance System national cohort. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2022: 101: 461–470.
6. Hassanipour S, Faradonbeh SB, Momeni K et al: A systematic review and meta-analysis of pregnancy and COVID-19: Signs and symptoms, laboratory tests, and perinatal outcomes. Int. J. Reprod. Biomed. 2020: 18: 1005–1018.
7. da Silva CEB, Guida JPS, Costa ML: Increased Cesarean Section Rates during the COVID-19 Pandemic: Looking for Reasons through the Robson Ten Group Classification System. Rev. Bras. Ginecol. Obs. 2023: 45: e371–e376.
8. Use of Heparins in Adult Patients with COVID-19. Available online: https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1267737/ Eparine_update_02_13.05.2021_eng.pdf (accessed on 12 September 2024).

40. Materská mortalita na Slovensku v rokoch 2007 – 2024

MUDr. Dominika Kotríková
(gynekológia a pôrodníctvo)

Spoluautori: Diana Štrbová[1]
Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
[1] I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB

Úvod

Materská mortalita (MM) je jedným z hlavných indikátorov úrovne a kvality zdravotnej starostlivosti poskytovanej v danej krajine. Definuje sa ako úmrtie ženy počas tehotenstva, pri pôrode alebo do 42 dní po pôrode, a to v dôsledku komplikácií súvisiacich s tehotenstvom alebo pôrodom (priama materská úmrtnosť), alebo v dôsledku ochorenia, ktoré bolo tehotnosťou alebo pôrodom negatívne ovplyvnené (nepriama materská úmrtnosť). Svetová Zdravotnícka Organizácia (World Health Organisation – WHO) v tejto definícií nezohľadňuje úmrtia nesúvisiace s tehotnosťou – náhodné materské úmrtia (1).

MM je vyjadrovaná ako index materskej úmrtnosti (maternal mortality ratio – MMR), ktorý určuje počet úmrtí na 100 000 živonarodených detí. MM patrí medzi hlavné výzvy verejného zdravotníctva, najmä v rozvojových krajinách, kde je prístup k adekvátnej zdravotnej starostlivosti často obmedzený.(2) Vysoká materská mortalita naznačuje medzery v prístupe ku kvalitnej zdravotnej starostlivosti počas tehotenstva, pôrodu alebo po pôrode (1). Celkové MMR vo svete bolo 233/100 000 živonarodených detí (údaj z roku 2020). V Európe bolo MMR 13/100 000 živonarodených detí. Cieľom WHO je znížiť materskú mortalitu vo svete do roku 2030 na 70/100 000 živonarodených detí (2).

Cieľom analýzy materských úmrtí je zistenie incidencie materských úmrtí na Slovensku a určiť najčastejšie príčiny úmrtí.

Metódy

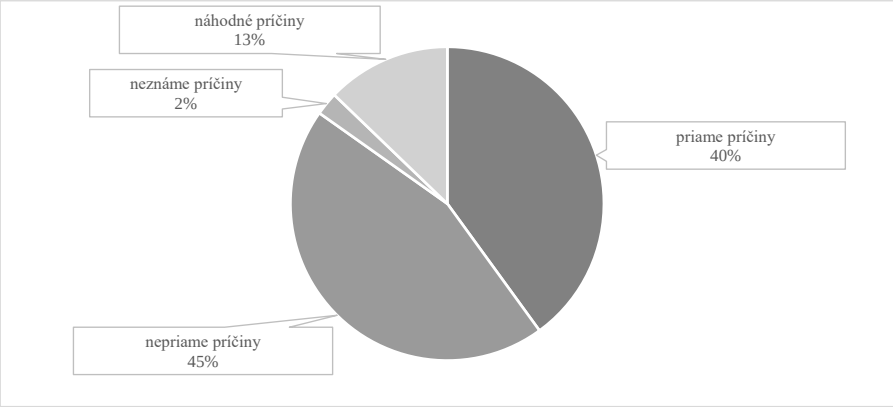
Jednotlivé prípady materských úmrtí na Slovensku boli získané z databázy Slovenskej gynekologicko-pôrodníckej spoločnosti (SGPS), ktorá tieto údaje zbiera od roku 2007. Prípady sú spoločnosti hlásené z jednotlivých gynekologicko-pôrodníckych pracovísk na Slovensku, z iných pracovísk, na ktorých dôjde k úmrtiu matky (najčastejšie oddelenia anesteziológie a intenzívnej medicíny), a niektoré boli získané aktívnym pátraním v masmédiách.

Analýza jednotlivých prípadov bola vykonaná podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb pre materskú mortalitu (MKCH-10-MM) (3). Výsledky boli spracované podľa jednotlivých rokov úmrtí a následne v celom 18-ročnom období.

Na základe počtu úmrtí a počtu živonarodených detí bol počítaný index materskej úmrtnosti a percentuálny podiel pre jednotlivé príčiny MM.

Výsledky

V rokoch 2007 – 2024 bolo na Slovensku živonarodených 987 181 detí. V tomto období umrelo na Slovensku celkovo 125 matiek. MMR v sledovanom období bolo 12,66/100 000 živonarodených detí. 50 žien (40,00%) umrelo z priamych príčin, 56 žien (44,8%) z nepriamych príčin, 3 ženy (2,40%) umreli z neznámej príčiny a 16 žien (12,80%) umrelo z náhodných príčin.



Graf 1 Percentuálne zastúpenie príčin úmrtí na Slovensku v rokoch 2007 - 2024

Najčastejšou priamou príčinou úmrtia matiek bola embólia plodovou vodou (EPV). Na EPV umrelo v sledovanom období 13 žien (10,40%) – MMR1,32/100 000 živonarodených detí. Nasledovali úmrtia z hemoragických príčin (abrupcia placenty, atónia uteru, placenta acreta spectrum), na ktoré umrelo celkovo 11 žien (8,8%). Treťou najčastejšou príčinou úmrtia boli úmrtia na hypertenzné ochorenia (preeclampsia, HELLP syndróm) – umrelo 9 žien (7,20%).

Z nepriamych materských úmrtí boli na prvom mieste v počte úmrtí kardiovaskulárne ochorenia - zlyhanie srdca, kardiomyopatie, zápalové ochorenia srdca, krvácanie z aorty, sleziny a krvácanie do mozgu. Na tieto príčiny umrelo celkovo 27 žien (21,60%), čo predstavuje MMR 2,74/100 000 živonarodených detí.

Druhou najčastejšou nepriamou príčinou úmrtia boli úmrtia na vírusové ochorenia (ochorenia H1N1 a COVID-19) – celkovo 11 materských úmrtí (8,80%). Tretie miesto tvorili úmrtia na onkologické ochorenia, ako sú leukémie, nádor mozgu, nádor pľúc. Na tieto ochorenia umrelo 7 pacientok (5,60%).

Zo 16 pacientok, ktoré umreli z náhodných príčin, až 81,3% pacientok umrelo v dôsledku polytraumy. 68,75% náhodných úmrtí tvorili autonehody, na druhom mieste (18,75% úmrtí) boli vraždy.

Priemerný vek matiek, ktoré umreli, bol 31,6 roka. Najmladšia pacientka mala 15 rokov, najstaršia 47 rokov. Najviac pacientok umrelo vo veku nad 35 rokov, najnižšiu mortalitu mali pacientky od 20 do 24 rokov. Celkovo 87 (69,60%) žien umrelo po pôrode – z nich 60 (68,96%) pacientok rodilo cisárskym rezom a 27 (31,03%) pacientok rodilo vaginálne. Štyri pacientky (3,20%) umreli po potrate, 28 pacientok (22,40%) umrelo počas tehotnosti a tri pacientky

(2,40%) umreli počas pôrodu. U troch pacientok bol čas úmrtia pre nekompletnú dokumentáciu neznámy.

Diskusia

Vo viacerých štúdiách o materskej mortalite prevládajú nepriame príčiny úmrtia nad priamymi, podobne ako na Slovensku. Vysvetliť to môžeme zlepšením starostlivosti o ženy počas tehotnosti a pôrodu a zlepšením manažmentu pôrodníckych komplikácií (4-5).

Najčastejšou priamou príčinou úmrtia matiek vo svete sú hemorágie (27,1%), hypertenzné ochorenia (14%) a sepsa (10,7%) (6). Hemorágie a hypertenzné ochorenia boli na Slovensku v počte úmrtí na druhom a treťom mieste, vedúcou príčinou úmrtí boli embólie plodovou vodou. Vysoký podiel hypertenzných ochorení môže byť dôsledkom zvyšovania sa priemerného veku rodičiek a stúpajúcu incidenciu civilizačných ochorení ako sú cukrovka a obezita (7). Kým v roku 2007 bol priemerný vek rodičiek 28,1 roka, v roku 2023 to bolo 29,8 roka (8).

Do štatistiky boli zaradené aj úmrtia z náhodných príčin. WHO tieto úmrtia zo svojich štatistík vynecháva, pretože nemôžu byť ovplyvnené zdravotnou starostlivosťou. Niektorým náhodným materským úmrtiam by sa však dalo predísť rôznymi preventívnymi opatreniami napr. správnym používaním bezpečnostných pásov v aute. Prevencia domáceho násilia a vrážd tehotných žien si vyžaduje komplexný prístup, ktorý zahŕňa zdravotný skríning, právne opatrenia a systémy sociálnej podpory (9-10).

Incidencia traumy v tehotnosti sa odhaduje približne na 6-8% celosvetovo. Je to jedna z najčastejších nepôrodníckych príčin úmrtí matiek. Najviac úmrtí z náhodných príčin je v dôsledku autonehody (55 – 85%) (11-12). Na Slovensku tvorili autonehody 66,7% náhodných materských úmrtí.

Z hľadiska veku pacientok, najvyššiu materskú mortalitu v Európe majú ženy nad 35 rokov. Percento pôrodov žien nad 35 rokov sa zvyšuje takmer v každej krajine Európy (13). Vyšší vek rodičiek je spojený s vyššou prevalenciou komplikácií počas tehotnosti aj počas pôrodu. Najčastejšími komplikáciami tehotnosti žien nad 35 rokov sú vyšší výskyt hypertenzných ochorení, vyššie riziko vzniku gestačného diabetu mellitu (DM), ale aj vyšší výskyt neonatálnych komplikácií ako rastová reštrikcia plodu, syndróm dychovej tiesne a potreba resuscitácie novorodenca po pôrode. U starších žien je aj vyšší výskyt pôrodov ukončených cisárskym rezom (13-14).

Viaceré štúdie označili cisársky rez ako jeden z rizikových faktorov materskej mortality a morbidity (15). Materská mortalita u žien po cisárskom reze bola na Slovensku 2x vyššia, ako u žien po vaginálnom pôrode. Z 59 pacientok, ktoré rodili cisárskym rezom, iba 2 úmrtia priamo súvisiaseli s cisárskym rezom – jeden prípad purulentnej peritoninitídy po dehiscencii uterotómie a jeden prípad aspiračnej pneumónie po celkovej anestézii. Ostatné úmrtia nemali priamu súvislosť s cisárskym rezom. Vyššia mortalita žien po cisárskom reze môže byť vysvetlená prítomnosťou závažnej komplikácie počas tehotnosti, ako HELLP syndróm, preeklampsia, intrakraniálna hemorágia, infekcia alebo dekompenzovaný diabetes mellitus.

Záver

Materská mortalita nie je len zdravotným problémom, ale aj sociálnym a ekonomickým faktorom, ktorý ovplyvňuje celé rodiny a komunity. Znižovanie materskej úmrtnosti je preto jedným z hlavných cieľov udržateľného rozvoja, pričom krajiny po celom svete prijímajú rôzne opatrenia na jej elimináciu. Stratégie by sa mali zamerať na skupiny žien s vyšším rizikom úmrtia ako sú ženy nad 35 rokov a aplikovanie preventívnych opatrení na znižovanie nie len priamych a nepriamych príčin materských úmrtí, ale aj náhodnej materskej úmrtnosti.

Použitá literatúra

1. WHO. Maternal mortality. 2024; https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/maternal-mortality
2. WHO. Trends in maternal mortality 2000 to 2020: estimates by WHO, UNICEF, UNFPA, World Bank Group and UNDESA/Population Division. 2023; ISBN 978-92-4-006875-9
3. WHO. The WHO application of ICD-10 to deaths during pregnancy, childbirth and puerperium: ICD MM. 2012; https://www.who.int/publications/i/item/9789241548458
4. Nair M, Nelson-Piercy C, Knight M. Indirect maternal deaths: UK and global perspectives. Obstet Med. 2017;10:10-15. doi:10.1177/1753495X16689444
5. Engin-Üstün Y, Sanisoğlu S, Keskin HL, et al. Changing trends in the Turkish maternal deaths, with a focus on direct and indirect causes. Eur J ObstetGynecolReprod Biol. 2019;234:21-25. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.12.031
6. Say L, Chou D, Gemmill A, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. Lancet Glob Health. 2014;2(6):e323-e333. doi:10.1016/S2214-109X(14)70227-X
7. Ford ND, Cox S, Ko JY. Hypertensive Disorders in Pregnancy and Mortality at Delivery Hospitalization - United States, 2017–2019. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2022;71:585-591. http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7117a1
8. Podmanická Z, Foltánová N, Galvánková A, a spol. My v číslach. Pohyb obyvateľstva 2023. Demografia a sociálna štatistika, Štatistický úrad SR 2024. 86s. In: www.statistics.sk
9. Huecker MR, Chapman J. Seat Belt Injury. Updated 2023. In: StatPearls [online]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470262/.
10. Jahanfar S, Howard LM, Medley N. Interventions for preventing or reducing domestic violence against pregnant women. 2014 Nov 12; 2014 (11):CD009414. doi:10.1002/14651858.CD009414.pub3
11. Irving T, Menon R, Ciantar E. Trauma during pregnancy. BJA Educ. 2021;21:10-19, doi: 10.1016/j.bjae.2020.08.005.
12. Owattanapanich N, Lewis MR, Benjamin ER, et al. Motor vehicle crashes in pregnancy: Maternal and fetal outcomes. J Trauma Acute Care Surg. 2021.90(5):861-865. doi: 10.1097/TA.0000000000003093
13. EURO-PERISTAT PROJECT. European Perinatal Health Report: Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015. 2018. https://www.europeristat.com/publications/european-perinatal-health-report-2015/

14. Londero AP, Rossetti E, Pittini C. *et al.* Maternal age and the risk of adverse pregnancy outcomes: a retrospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* . 2019; 19, 261. doi: https://doi.org/10.1186/s12884-019-2400-x
15. Ye J, Zhang J, Mikolajczyk R, et al. Association between rates of caesarean section and maternal and neonatal mortality in the 21st century: a worldwide population-based ecological study with longitudinal data. BJOG. 2016;123(5):745-753. doi:10.1111/1471-0528.13592

41. Závažná materská morbidita po technikách asistovanej reprodukcie v Slovenskej republike v rokoch 2012- 2021

MUDr. Diana Štrbová
(gynekológia a pôrodníctvo)

Spoluautori: Kotríková Dominika
Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.

Úvod

Podľa WHO (World Health Organisation) neplodnosťou trpí približne 15% párov v reprodukčnom veku[(1)]. Prognosticky nepriaznivým faktom je, že celosvetovo stále narastá výskyt neplodnosti[(2)]. Jedným z najvýznamnejších rizikových faktorov vzostupu neplodnosti je zvyšujúci sa vek rodičiek v prvej gravidite[(2)]. Vyšší vek rodičiek so sebou nesie i vyššie riziko výskytu závažných komplikácií, ktoré majú negatívny vplyv na materskú morbiditu i mortalitu. Vek nie je jediným faktorom vplývajúcim na neplodnosť. Ide však o jeden z mála faktorov, ktoré je možné v rámci rozvíjajúcej sa neplodnosti ovplyvniť, v zmysle dostatočnej informovanosti pacientok v mladších vekových kategóriách plánujúcich v budúcnosti koncepciu, poukázaním na zvýšené riziko komplikácií a materskej morbidity a mortality[(3)].

Materiál a metodika

V retrospektívnej deskriptívnej populačnej štúdii boli analyzované a porovnávané prípady vybraných závažných morbidít v skupinách žien v graviditách po ART (Assisted reproductive technologies) a po spontánnej koncepcii v SR (Slovenská republika) od 1. januára 2012 do 31. decembra 2021. Do štúdie boli zahrnuté prípady peripartálnej hysterektómie, PAS (placenta accreta spektrum), transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti (JIS), HELLP syndrómu (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) a sepsy. V graviditách po ART boli zahrnuté gravidity po IVF-ET (In Vitro Fertilization- Embryotranfer) a KET (Kryoembryotransfer), intrauterinnej inseminácii. Peripartálna hysterektómia bola definovaná ako chirurgické odstránenie maternice počas pôrodu alebo do 42 dní po ňom[(4)]. Medzi transporty rodičiek na JIS patrili pacientky, ktoré počas gravidity alebo 42 dní po pôrode vyžadovali preklad na oddelenie/kliniku anesteziológie a intenzívnej medicíny alebo na akúkoľvek jednotku intenzívnej starostlivosti vzhľadom na závažnosť ich zdravotného stavu[(5)]. Materská sepsa bola definovaná ako diagnóza závažnej sepsy u tehotnej alebo šestonedieľky, bez ohľadu na primárne ložisko infekcie – zahŕňajúc prípady sepsy pôrodníckej aj nepôrodníckej genézy. Kritériá boli: telesná teplota < 36° C alebo > 38° C minimálne 2 merania s odstupom 4 hodín; pulz >100/minútu minimálne 2 merania s odstupom 4 hodín, tachypnoe >20/minútu minimálne 2 merania s odstupom 4 hodín a počet leukocytov >17x10 9 alebo < 4x10 9 alebo > 10 % nezrelých foriem leukocytov pri 2 meraniach[(6)]. V skupine pacientok s HELLP syndrómom boli zaradené tie, ktoré spĺňali kritériá HELLP syndrómu podľa Mississippi klasifikácie. AIP – placenta accreta, increta, percreta boli diagnostikované histologicky po hysterektómii alebo post mortem s dôkazom trofoblastových klkov v myometriu alebo

zobrazovacími metódami s ponechaním placenty alebo časti placenty in situ[7]. Údaje boli získané zo štandardizovaných anonymných dotazníkov pracovnej skupiny SOSS, vyplnených k jednotlivým prípadom závažných morbidít a porovnané s údajmi SPM SGPS.

Výsledky

V rokoch 2012 – 2021 bolo v SR spolu zaevidovaných 559 856 pôrodov. Z nich 549 479 (98,15 %) bolo po spontánnej koncepcii a 10 377 (1,85 %) z gravidít po ART.

V analyzovanom období bolo v SR zdokumentovaných a zaevidovaných spolu 444 prípadov peripartálnej hysterektómie. Z nich 16 (3,60 %) bolo po ART. Incidencia peripartálnych hysterektómií na 1 000 pôrodov bola signifikantne vyššia 1,54 (95% CI 0,88-2,50) ($p < 0,01$) v skupine pacientok po ART než po spontánnej koncepcii 0,80 (95% CI 0,71-0,86). V porovnaní so ženami po spontánnej koncepcii boli rodičky s peripartálnou hysterektómiou po ART signifikantne staršie. BMI, priemerná krvná strata a modalita pôrodu boli bez signifikantného rozdielu. Najčastejšími indikáciami k vykonaniu peripartálnej hysterektómie patrili atónia maternice, PAS, či placenta praevia. K materskému úmrtiu v súvislosti s peripartálnou hysterektómiou v skupine pacientok po ART nedošlo.

Transport na JIS si v sledovanom období vyžiadalo 746 pacientok, z toho 28 bolo pacientok s graviditou po ART (3,75 %). Incidencia transportu rodičiek na JIS na 1 000 pôrodov bola signifikantne vyššia 2,70 (95% CI 1,79-3,9) ($p < 0,01$) v skupine pacientok po ART než po spontánnej koncepcii 1,31 (95% CI 1,21-1,41. Medzi najčastejšie indikácie prekladu na JIS patrili masívne krvácanie, HELLP, diseminovaná intravaskulárna koagulopatia (DIC), kardiálne zlyhanie, hypotónia, abrupcia placenty, kardiomyopatie či embolizácia do pľúcnej artérie. Medzi transportmi na JIS u pacientok po spontánnej koncepcii patrili k najčastejším indikáciám masívne krvácanie, HELLP, eklampsia[6].

V sledovanom období bolo zaznamenaných 85 prípadov sepsy. Z nich 7 (8,26 %) bolo u pacientok v gravidite po ART. Incidencia sepsy na 1 000 pôrodov bola signifikantne vyššia 0,67 (95% CI 0,27-1,34) ($p < 0,01$) v skupine pacientok po ART než po spontánnej koncepcii 0,14 (95% CI 0,11-0,18). Priemerný vek pacientok bol 34 rokov, priemerné BMI 26,02. Najčastejším obdobím výskytu sepsy bolo v oboch skupinách šestonedelie a najčastejším zdrojom sepsy bola infekcia močových ciest a prsníka[7].

HELLP syndróm bol diagnostikovaný v sledovanom období u 283 pacientok. Z nich 35 (12,37 %) bolo z gravidít po ART. Incidencia HELLP na 1 000 pôrodov bola signifikantne vyššia 3,37 (95% CI 2,35-4,69) ($p < 0,01$) v skupine pacientok po ART než po spontánnej koncepcii 0,47 (95% CI 0,41-0,53). Priemerný vek pacientok s výskytom HELLP syndrómu bol v graviditách po ART 32,3 roka, priemerné BMI 29,96, priemerný gestačný týždeň v čase ukončenia gravidity bol 33,2 gestačného týždňa, priemerná hodnota tlaku krvi (TK) pri hospitalizácii bola 162/97 mmHg.

Placentárna patológia PAS sa vyskytla v sledovanom období u 180 pacientok. 5 prípadov PAS bolo v graviditách po IVF. Incidencia PAS na 1 000 pôrodov bola vyššia 0,482 (95% CI 0,157-1,124) (p 0,358) v skupine pacientok po ART ako po spontánnej koncepcii 0,319 (95% CI 0,273-0,370), no nie signifikantne - p 0,358. Priemerný vek pacientok po ART bol 38,3 roka, priemerné BMI 28,95. Priemerná strata krvi bola 1300 ml. U žiadnej z pacientok nebola použitá chirurgická intervencia na záchranu uteru, všetky skončili vykonaním peripartálnej hysterektómie[8]. Prehľad výskytu materskej morbidity uvádza tabuľka č. 1.

Tabuľka 1 Porovnanie výskytu materskej morbidity v graviditách po spontánnej koncepcii a ART v rokoch 2012-2021

Závažná materská morbidita	ART		Spontánna koncepcia		P
	n	%	n	%	
Peripartálna hysterektómia	16	0,16	428	0,08	0,006
Transport rodičiek na JIS	28	0,27	718	0,13	<0,001
Sepsa	7	0,08	78	0,014	<0,001
HELLP syndróm	35	0,34	258	0,05	<0,001
PAS	5	0,05	175	0,03	0,358

ART- assisted reproductive technologies, JIS - Jednotka intenzívnej starostlivosti, HELLP- Hemolysis, Elevated liver enzymes, Low Platelets, PAS – placenta accreta spektrum

Diskusia

Každá zo sledovaných morbidít sa v SR vyskytovala častejšie v skupine gravidít po ART ako po spontánnej koncepcii. Výskyt peripartálnej hysterektómie v skupine gravidít po ART predstavoval 0,16 % a po spontánnej koncepcii 0,08 %. Na porovnanie, v štúdii z Kanady tvoril výskyt peripartálnej hysterektómie 0,36 % v graviditách po spontánnej koncepcii a 0,39 % v graviditách po ART[8]. Sepsa bola v SR diagnostikovaná u 0,07 % pacientok po ART a iba u 0,014 % pacientok po spontánnej koncepcii. Podobné výsledky publikovala americká štúdia, kde výskyt sepsy u pacientok v graviditách po ART tvorilo 15/10 000 pôrodov a po spontánnej koncepcii 7/10 000 pôrodov[9]. Abnormálne invazívna placenta sa dokázala u 0,05 % pacientok po ART a u 0,03 % pacientok po spontánnej koncepcii. V čínskej štúdii bol výskyt placenty accrety u 4,1 % pacientok v graviditách po IVF a po spontánnej koncepcii u 2,2 %[10]. Transport rodičiek na JIS v ART skupine tvoril 0,27 % a po spontánnej koncepcii 0,13 %. Už v spomínanej kanadskej štúdií tvoril transport rodičiek na JIS v graviditách po ART 0,69 % a po spontánnej koncepcii 0,46 %[8]. HELLP syndróm bol potvrdený u 0,43 % pacientok po ART a u 0,05 % pacientok po spontánnej koncepcii. Všetky zo sledovaných morbidít okrem AIP preukázali štatistickú významnosť. Z daného sledovania sme potvrdili význam veku pri výskyte závažnej materskej morbidity, ktorý bol signifikantne vyšší (okrem HELLP syndrómu) pri všetkých morbiditách v graviditách po ART.

Záver

V sledovanom období bola v Slovenskej republike dokázaná zvýšená incidencia materskej morbidity v graviditách po ART ako po spontánnej koncepcii, podobne ako v štúdiách z iných krajín Európy a sveta.

Zoznam použitej literatúry

1. World Health Organisation. Mother or nothing: the agony of infertility. Bull World Health Organ. 2010; 88:881–882.
2. Fauser, B. Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes,2018, Reproductive BioMedicine Online.

3. ŠP 0289: 2023, Diagnostika,liečba a prevencia porúch plodnosti
4. Adamec A, Analýza peripartálnych hysterektómii v Slovenskej republike: dizertačná práca. Bratislava: Univerzita Komenského, 2023
5. Vargová M, Závažná akútna materská morbidita v Slovenskej republike vyžadujúca intenzívnu multidisciplinárnu starostlivosť: dizertačná práca. Bratislava: Univerzita Komenského, 2023
6. Krištúfková A, Kováč L, Borovský M. Analýza septických stavov v pôrodníctve v Slovenskej republike v rokoch 2012 – 2020. Gynekol prax 2022; (2) x-x.
7. Adamec A, Vargová M, Kotríková D. Morbídne adherentná placenta ako príčina peripartálnej hysterektómie v Slovenskej republike v rokoch 2012 – 2020. Ceska gynekol 2023; 88 (5): 321-327.
8. Dayan N, Josef KS, Fell DB, et al. Infertility treatment and risk of severe maternal morbidity: a propensity score matched cohort study. CMAJ 2019; 191(5): e118-127. doi: 10.1503/cmaj.181124
9. Martin AS, Monsour M, Kissin DM, et. al. Trends in Severe Maternal Morbidity After Assisted Reproductive Technology in the United States, 2008–2012. Obstet Gynecol *2016; 127(1): 59-66.*
10. J Wang J, Liu Q, Deng1 B, et al. Pregnancy outcomes of Chinese women undergoing IVF with embryonic cryopreservation as compared to natural conception. BMC Pregnancy Childbirth 2021; 21:39, 1-12.

42. 10 rokov sledovania závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike. Posunuli sme sa niekam?

MUDr. Jakub Daniš
(gynekológia a pôrodníctvo)

Školiteľ: prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.
I. gynekologicko – pôrodnícka klinika LFUK a UNB

Úvod

Závažné popôrodné krvácanie (Severe Postpartum Haemorrhage, SPPH) je celosvetovo zodpovedné približne za 27 % z 303 000 materských úmrtí ročne (incidencia 1 úmrtie na 1 200 pôrodov), pričom približne 20 miliónov žien poznačí dlhodobými následkami (1-4). Úmrtiam na SPPH sa dá do značnej miery predchádzať a v krajinách s vysokými príjmami sa postupne úmrtnosť znižuje. Prevažná časť úmrtí je v subsaharskej Afrike a južnej Ázii (5). Zvyšujúcu sa incidenciu popôrodného krvácania možno pripísať zvyšujúcemu sa veku rodičiek, stúpajúcemu počtu viacplodových tehotností a cisárskych rezov (6). Aj napriek množstvu publikácií venujúcich sa popôrodnému krvácaniu nie je definícia a rozdelenie jednoduché. Definícia na základe vizuálne odhadovanej krvnej straty je nepresná v dôsledku výrazného podhodnocovania odhadu, čo sme opakovane deklarovali aj v našich publikáciách (7-11). Jednoznačné kritérium SPPH v literatúre neexistuje.

Pre uvedené problémy bolo kritérium popôrodného krvácania definované podaním štyroch a viac transfúznych jednotiek (transfusion unit – TU) erytrocytov bez ohľadu na spôsob vedenia pôrodu počas 24 hodín od ukončenia tehotnosti a/alebo krvná strata presahujúca 2 000 ml. Toto kritérium prijal medzinárodný panel expertov INOSS-u (International Network of Obstetric Survey Systems) z 13 členských krajín, vrátane SR, na základe Delphi metodiky, na ktorých sa pracovalo od r. 2015 a boli publikované vo februári 2019 (12).

SOSS (Slovak Obstetric Survey System) - pracovná skupina sekcie perinatálnej medicíny (SPM) Slovenskej gynekologicko-pôrodníckej spoločnosti (SGPS) zhromažďuje od roku 2012 údaje o závažných akútnych materských morbiditách v SR a analyzuje ich (13-15). Jednou zo sledovaných morbidít je aj závažné popôrodné krvácanie. Cieľom tohto sledovania bolo zistiť skutočnú incidenciu prípadov SPPH v SR a zároveň publikovaním výsledkov a poukázaním na možnosti zlepšenia tieto prípady postupne minimalizovať.

Cieľom tejto práce je poukázať, či za 10 rokov sledovania SPPH došlo k zmene incidencie a spôsobu manažmentu v SR.

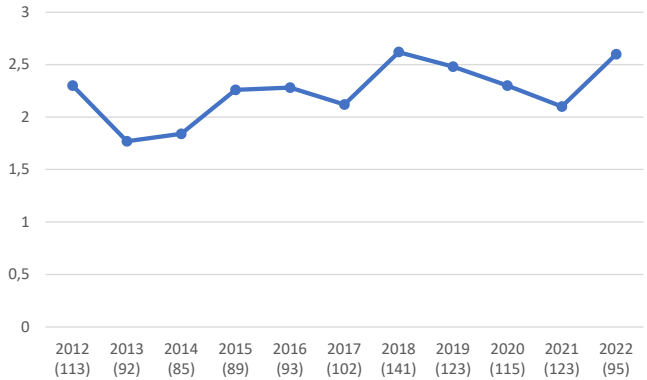
Materiál a metódy

Retrospektívne boli analyzované jednotlivé prípady SPPH v SR v rokoch 2012 – 2022. Kritériom bolo podanie 4 a viac TU erytrocytov podľa zjednotenej definície INOSS. Údaje boli získané trojkrokovou analýzou – v prvom kroku boli informácie o počte jednotlivých prípadov získané z ročných perinatologických hlásení zasielaných SPM SGPS. V druhom kroku boli

gynekologicko-pôrodníckym pracoviskám zaslané štandardizované dotazníky k hláseným prípadom. V treťom kroku boli vyplnené dotazníky analyzované komisiou SOSS na základe definovaných kritérií a z nich selektované pacientky podľa veku. Incidencia prípadov bola počítaná na 1000 pôrodov.

Výsledky

Po analýze prípadov bolo závažné popôrodné krvácanie dokázané u 1172 pacientok. Incidencia SPPH v sledovaných rokoch v SR bola 2,18/1000 pôrodov (graf 1).



Graf 1. Incidencia SPPH v SR v rokoch 2012 – 2022 (zdroj: SOSS)

Aj napriek každoročnému publikovaniu výsledkov perinatologických analýz nedošlo v priebehu sledovaných rokov k výraznejšiemu zníženiu incidencie SPPH. Bratislavský kraj je svojou incidenciou (6,7/1000 pôrodov) krajom s najvyšším počtom prípadov popôrodného krvácania.

Z 1172 analyzovaných prípadov 32 % tvorili prvorodičky, v 68 % išlo o viacrodičky. Pomer SPPH po vaginálnom pôrode a cisárskom reze bol počas celého obdobia takmer zhodný – 49,5 % po vaginálnom pôrode a 50,5 % po cisárskom reze. Z cisárskych rezov dominovalo krvácania počas alebo po akútnom cisárskom reze.

Priemerný vek pacientok bol 34,5 roka (16 – 47 rokov). Kým v roku 2012 bol priemerný vek pacientok s SPPH 29,7 roka, v roku 2022 to bol 36,2 roka.

Medzi príčinami závažného popôrodného krvácania dominovala hypotónia maternice – 37,7 %, krvácanie z pôrodných poranení – 19,4 %, krvácanie pri predčasnom odlučovaní placenty – 16,9 %, krvácanie pri abnormálnej invázii placenty – 12,9 %, 9,21 % pri poruchách koagulácie a 2,8 % pri ruptúre maternice. 1,5 % závažného popôrodného krvácania boli v kategórii iné – inverzia maternice a krvácanie z iných ako gynekologických príčin (tabuľka 1). Medzi príčinami popôrodného krvácania dominuje stále hypotónia maternice, avšak poklesol podiel krvácania pri abnormálne invazívnej placente (z 11,5 % na 9,4 %) na úkor krvácania z pôrodných poranení (16,8 % a 28,4 % v roku 2021).

morbidita	roky											
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	spolu
hypotónia maternice	45,1	32,6	43,5	28	36,5	40,1	34,4	44	33,6	34,1	43,1	37,7
predčasné odlučovanie placenty	15	25	15,2	15,7	19,3	19,6	22,1	13,9	19,5	14,6	6,3	16,9
abnormálna invázia placenty	11,5	15,2	10,5	14,6	15	15,6	15,5	11,8	17,3	6,5	9,4	12,9
pôrodné poranenia	16,8	23,9	20	11,2	21,5	17,6	20,4	16,1	22,8	28,4	14,7	19,4
poruchy koagulácie	9,7	23,9	5,8	6,7	12,9	23,5	5,4	3	2,1	3,2	5,2	9,21
ruptúra maternice	0	0	0	6,7	4,3	4,9	1,6	3,2	2,1	3,2	5,2	2,8
iné	0	0	0	0	0	0	1,6	6	0	4,8	4,2	1,5

Tabuľka 1. Príčina SPPH v SR v rokoch 2012 – 2022 (zdroj: SOSS)

Celkovo bolo podaných 6 207 TU erytrocytov. Najviac TU erytrocytov bolo podaných v Bratislavskom kraji – 26,6 % z celkového počtu TU erytrocytov, najmenej v Nitrianskom kraji (5 %) a Trenčianskom kraji (5,1 %).

Z príznakov a objektívneho nálezu indikujúcich podanie hemosubstitučnej liečby dominovali vizuálny odhad krvnej straty, kolapsový stav a tachykardia pacientky. Kým v roku 2012 bolo podávaných najviac TU z indikácie subjektívnych a objektívnych príznakov anemického syndrómu, v rokoch 2019 – 2022 to bola vizuálne odhadovaná krvná strata. Priemerná krvná strata v prípadoch závažného popôrodného krvácania v SR bola 1 346 ml (150 – 4 500 ml). Aj v tomto ukazovateli sme zaznamenali zlepšenie – v roku 2012 bola priemerná vizuálne odhadovaná krvná strata 850 ml a o 10 rokov neskôr 1350 ml.

V medikamentóznej liečbe hypotónie/atónie maternice dominovalo použitie oxytocínu a methylergometrínu bez evidentných rozdielov v priebehu sledovaných rokov. Použitie karbetocínu sa držalo konštantne na nízkej úrovni, iba v rokoch 2014 – 2018 bolo jeho použitie viac ako 20%.

V hematologickej podpornej liečbe sme však zaznamenali najväčšie rozdiely. Kyselina tranexámová v rokoch 2012 – 2014 nebola použitá v žiadnom prípade SPPH. Od roku 2015 začalo jej použitie stúpať a v rokoch 2021 – 2022 dosiahlo 42,3 %. Rovnako pozorujeme stúpajúci počet prípadov podania fibrinogénu – z 10,6 % na 33,6 %.

V chirurgickej liečbe závažného popôrodného krvácania v SR dominovala peripartálna hysterektómia – 19,9 %. Kým v roku 2012 bolo vykonaných 9,7 % peripartálnych hysterektómií na zvládnutie SPPH, v roku 2022 to bolo už 17,8 %. Zároveň pretrváva stúpajúci trend uterus zachovávajúcich operácií – z 2,6 % v roku 2012 na 10,5 % v roku 2022.

Diskusia

Incidencia SPPH v rokoch 2012 – 2022 bola 2,18/1000 pôrodov. Aj napriek publikáciám a štandardným postupom na prevenciu, diagnostiku a liečbu popôrodného krvácania sa nedarí jeho incidencia v priebehu 10 rokov znížiť. Incidencia závažného popôrodného krvácania sa celosvetovo pohybuje v rozmedzí 1 – 19 %, v rozvinutých krajinách 4 – 8 % a v rozvojových krajinách okolo 19 % (16,17). WHO v multicentrickej štúdii na 275 000 pôrodoch

udáva incidenciu popôrodného krvácania 1 % (18). Carolli a spol. uvádzajú incidenciu závažného popôrodného krvácania na africkom kontinente 0,3 – 3,8 %, v Ázii 0,7 – 2,7 % a v Európe 1,7 – 5,5 % (17). Vzostupný trend však pozorovať už aj v industriálnych krajinách: kým riziko SPPH bolo na konci minulého storočia 1 : 1 000 pôrodov, dnes už je to 1,2 % v Spojenom kráľovstve a 11,4 % v USA (19,20).

Ako najčastejšia príčina popôrodného krvácania sa uvádza v niektorých prácach hypotónia/atónia maternice (70 – 90 %), nasledovaná pôrodnými poraneniami, retenciou zvyškov placenty a poruchami koagulácie. Iné práce uvádzajú ako najčastejšiu príčinu abnormálne invazívnu placentáciu – 27 %, nasledovanú atóniou maternice – 21 %, predčasným odlučovaním placenty – 17 % a koagulopatiami – 15 % (21). V SR v priebehu všetkých sledovaných rokov dominovalo krvácanie z hypotónie/atónie maternice (37,7 %), z pôrodných poranení (19,4 %), pri predčasnom odlučovaní placenty (16,9 %), abnormálne invazívnej placentácii (12,9 %), pri poruchách koagulácie (9,21 %). Priemerná krvná strata v prípadoch závažného popôrodného krvácania v SR bola 1 346 ml. V prvých rokoch sledovania morbidity bolo výrazné podhodnocovanie krvných strát, avšak v priebehu ďalších rokov sa situácia zlepšovala. Výrazné podhodnocovanie odhadu krvných strát však ostáva v SR dlhoročným javom (7-11).

Významnú úlohu v manažmente závažného popôrodného krvácania zohráva dostupnosť a možnosť hemosubstitučnej liečby (22). V rokoch 2012 – 2022 bolo v SR v súbore pacientok s SPPH podaných priemerne 5,4 TU erytrocytov na pacientku. WHO aj Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky odporúča intravenózne podanie kyseliny tranexámovej do 3 hodín od pôrodu plodu pri riziku vzniku SPPH ako štandardný postup na jeho zvládnutie (24,25). V SR sa k využitiu kyseliny tranexámovej do roku 2015 pri liečbe SPPH nedá vyjadriť, avšak v rokoch 2016-2022 pozorovať vzostup jej použitia na 5,18 % až 42,3 % prípadov. Do roku 2015 nepatrila do odporúčaní na liečbu SPPH, rovnako jeho dostupnosť na pôrodníckych pracoviskách v SR bola nízka, resp. žiadna. Používanie uterokinetík v SR by sa malo riadiť štandardným postupom MZSR na prevenciu, diagnostiku a liečbu SPPH (25). Nie vo všetkých prípadoch však bol tento postup plne akceptovaný.

Záver

Analýza údajov o závažnom popôrodnom krvácaní v SR v rokoch 2012-2022, ktoré boli publikované v odborných časopisoch SR mohla postupne viesť k zlepšeniu jeho diagnostiky a liečby. Napriek tomu nedochádza k znižovaniu incidencie SPPH. Na druhej strane je pozitívny zvyšujúci sa počet intervencií zachovávajúcich uterus na zvládnutie peripartálneho krvácania a použitie podpornej hematologickej liečby. So snahou o znižovanie incidencie SPPH, ako aj manažmentu krvácania a znižovaniu peripartálnych hysterektómií sledovaním morbidity budeme pokračovať.

Zoznam použitej literatúry

1. Binestoch JL, Azikechukwu CE, Hueppchen MD. Postpartum Hemorrhage. N ENgl J Med 2021; 384: 1635-45.

2. Feyereisl J, Krofta L, Křepelka P. Etiologické faktory postpartálni hemoragie a jejich detekce. In Feyereisl J, Krofta L, Křepelka P: Postpartálni hemoragie. Praha: Mladá fronta. 2018, 46-158.
3. Lier H, von Heyman C, Korte W, et al. Peripartum haemorrhage: Haemostatic aspects of the new german PPH Guideline. Transfus Med Hemother 2018; 45: 127-135.
4. WHO. Trends in maternal mortality 2000 to 2020. Estimates by WHO, UNICEF, UNFPA, World bank group and UNDESDA/Population division. 2023.
5. Carriere BL, Cates E, Cavan B et al. Prevention and management of postpartum hemorrhage. 2024.
6. Fan D, Xia Q, Liu L, et al. The incidence of postpartum hemorrhage in pregnant women with placenta previa: a systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 2017; 33-36.
7. Daniš J, Korbeľ M, Borovský M, et al. Analýza prípadov závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike v rokoch 2012 – 2013. Gynekol prax 2016; 14(2): 100-103.
8. Daniš J, Korbeľ M, Krištúfková A, et al. Analýza prípadov závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike v rokoch 2012 – 2014. Gynekol prax 2017; 15(1): 33-36.
9. Daniš J, Korbeľ M, Krištúfková A, et al. Analýza prípadov závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike v rokoch 2012 – 2015. Gynekol prax 2018; 16(1): 28-35.
10. Daniš J, Korbeľ M, Krištúfková A, et al. Analýza prípadov závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike v roku 2016. Gynekol prax 2019; 17(2): 91-95.
11. Daniš J, Korbeľ M, Krištúfková A, et al. Analýza prípadov závažného popôrodného krvácania v Slovenskej republike v roku 2017.Gynekol. prax 2020; 18 (2): 93-97.
12. Schaap T, Bloemenkamp K, Deneux-Tharaux C, et al. Defining definitions: a Delphi study to develop a core outcome set for conditions of severe maternal morbidity. BJOG 2019; 126(3): 394-401.
13. Krištúfková A, Korbeľ M, Borovský M, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2012. Gynekol prax 2015; 13(4): 185-191.
14. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2013. Gynekol prax 2016; 14(2): 92-98.
15. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2014. Gynekol prax 2017; 15(1): 25-32.
16. Weeks AD, Neilson JP. Rethinking our approach to postpartum haemorrhage and uterotonics. Br Med J 2015; 351. http://bmj.com/content351/bmj.h3251
17. Carolli G, Cuesta C, Abalos E, et al. Epidemiology of postpartum haemorrhage: a systematic review. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2008; 22(6): 999-1012
18. Sheldon WR, Blum J, Vogel JP, et al. Postpartum haemorrhage management, risks, and maternal outcomes: findings from the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and NewbornHealth. Int J ObstetGyn 2014; 121(s1): 5-13.
19. Belfort MA. Overview of postpartum hemorrhage. 2015. Dostupné na www.uptodate.com/contents/overview-of-postpartum-hemorrhage. 14.04.2017.
20. Carillo AP, Chandraharan E. Postpartum haemorrhage and hematological management. Obstetr Gynaecol Reprod Med 2014; 24(10): 291-295.

21. Mhyre JM, Shilkrut A, Kuklina EV, et al. Massive blood transfusion during hospitalization for delivery in New York State, 1998 – 2007. Obstet Gynecol 2013; 122(6): 1288-1294.
22. Ramler PI, vandenAkker T, Dacia D, et al. Incidence, management and outcome of women recquiring massive transfusion after childbirth in theNetherlands: secondary analysis on nation wide cohort study between 2002 and 2006. BMC Pregnancy Childbirth 2017; 17: 197.
23. WHO. Updated WHO Recommendation on Tranexamic Acid for the Treatment of Postpartum Haemorrhage. Highlights and Key Messages from the World Health Organization's 2017 Global Recommendation. World Health Organization 2017. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259379/ WHO-RHR-17.21-eng.pdf;sequence=1.19.5.2020
24. Krištúfková, A, Borovský, M. Štandardný postup – Prevencia, diagnostika a liečba peripartálneho krvácania. Dostupné na https://www.standardnepostupy.sk/standardy-gyneklologia-a-porodnictvo/ 23.5.2022

43. Porovnanie pôrodných poranení u pacientok po 41. týždni tehotenstva po spontánnom nástupe pôrodu a indukcii pôrodu.

MUDr. Simona Rusnáková
(gynekológia a pôrodníctvo)

Školiteľ: doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, Csc.[2]
[1] Gynekologicko - pôrodnícke oddelenie NNG Bory, Bratislava, [2] I. Gynekologicko-pôrodnícka klinika LF UK a UNB, Bratislava

Úvod

Potermínové tehotenstvo je definované ako tehotenstvo, ktoré trvá dlhšie ako 42 týždňov (≥ 294 dní), a je vypočítané od prvého dňa poslednej menštruácie. Túto definíciu uznávajú popredné svetové organizácie ako Svetová zdravotnícka organizácia (WHO), International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) a American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).(1)

Pôrod po 41. týždni je spojený so zvýšeným rizikom komplikácií pre matku aj plod. Zvýšené riziko pre matku aj plod je v dôsledku starnutia placenty a následnej placentárnej insuficiencie, makrozómie plodu a protrahovanej prvej a druhej doby pôrodnej s čím je spojená väčšia pravdepodobnosť operačného vedenia pôrodu.(2) Tieto faktory môžu viesť k vyššiemu výskytu pôrodných poranení. Zvýšené riziko pôrodných poranení a operačného vedenia pôrodu vedie k dlhšiemu zotavovaniu pacientky a zvýšenej potrebe popôrodnej starostlivosti.(3)

Makrozómia plodu zvyšuje riziko dystokie ramienok plodu a tým riziko ruptúry maternice, poranení hrádze III. a IV. stupňa a traumatických poškodení mäkkých tkanív pôrodného kanála.(4) Riziko ruptúry hrádze III. a IV. stupňa je až dvojnásobne vyššie pri potermínovej tehotnosti v porovnaní s termínovými pôrodmi,(5) a je vyššie u multipár.(6) Prolongovaný pôrod vedie k zvýšenej pravdepodobnosti únavy svalov maternice a poranenia mäkkých tkanív.(6) Riziko ruptúry maternice je 2-3 násobne vyššie v porovnaní s tehotenstvami ukončenými do 40. gestačného týždňa.(5)
Potermínová tehotnosť je často spojená s nutnosťou použitia vákuumextraktora alebo pôrodníckych kliešťí, čo zvyšuje riziko poranenia pôrodného kanála, hrádze a krčka maternice o 25%.(7) U starších rodičiek sa častejšie vyskytuje znížená elasticita pôrodných ciest, čo zvyšuje riziko tkanivových poranení počas pôrodu.

Potermínová gravidita významne zvyšuje riziko cisárskeho rezu v dôsledku nepriaznivých faktorov ako sú placentárna insuficiencia, makrozómia plodu a nepostupujúci pôrod, čo zvyšuje riziko krvácania, infekcie a dlhšej rekonvalescencie pacientky.(8) Riziko cisárskeho rezu pri tehotenstve po 41. týždni predstavuje okolo 25 – 30 % pôrodov, pričom pri tehotenstve po 42. týždni môže dosiahnuť 35 – 40 %.(9,10)

K indukcii pôrodu pri potermínovej gravidite sa pristupuje za účelom zníženia rizika fetálnej morbidity a mortality. Avšak, v porovnaní so spontánnym nástupom pôrodu môže byť indukcia pôrodu spojená s vyšším výskytom pôrodných poranení, najmä v dôsledku rýchlejšieho

priebehu pôrodu, použitia farmakologických alebo mechanických metód indukcie a častejšej nutnosti asistovaného pôrodu.(11)

Indukcia pôrodu syntetickým oxytocínom alebo prostaglandínmi môže viesť k hyperstimulačným kontrakciám maternice, ktoré môžu spôsobovať poranenia krčka maternice pri jeho neúplnej dilatácii a častejšie poranenia pošvy pri rýchlom priebehu druhej doby pôrodnej.(12) Pri rýchlom postupe pôrodu, najmä v druhej dobe pôrodnej, hrozí vyšší výskyt vyšších stupňov ruptúry hrádze (III. a IV. stupňa), ktoré môžu viesť k inkontinencii stolice. Epiziotómia je pri indukovanom pôrode vykonávaná častejšie, za účelom predchádzania rizika väčšieho pôrodného poranenia.(13)

Pri indukovaných pôrodoch po 41. týždni je častejšia makrozómia plodu, ktorá môže viesť k dystokii ramienok plodu, čo je významný rizikový faktor pre poranenia plexus brachialis u plodu (Erbova obrna) a symfyziolýzi u matky.(9)

Pri indukovaných pôrodoch je vyššia pravdepodobnosť potreby vákuumextrakcie alebo použitia klieští, čo zvyšuje riziko hlbokých ruptúr hrádze a poranení hlavičky plodu (kefalhematóm, intrakraniálne krvácanie).(14)

Pri rozhodovaní medzi spontánnym nástupom pôrodu a indukciou pôrodu je jedným z dôležitých faktorov výskyt pôrodných poranení.(15,16) Caughey a kol. vo svojej štúdii zistili, že pri indukcii pôrodu po 41. týždni bolo riziko ruptúry hrádze III. a IV. stupňa 3 – 5 %, zatiaľ čo pri spontánnom pôrode len 1 – 2 %. (9) Vyšší stupeň perineálnych ruptúr (III. a IV. stupeň) bol pozorovaný častejšie po spontánnom nástupe pôrodu.(17) Podľa WHO (2018) je riziko ruptúry maternice pri indukcii oxytocínom vyššie o 1,5 – 2x u viacrodičiek s predchádzajúcou jazvou na maternici.(10) Indukcia pôrodu po 41. týždni je spojená s vyššou mierou epiziotómie, ktorá sa často vykonáva na uľahčenie pôrodu väčšieho plodu a prevenciu ruptúr vyššieho stupňa.(18) Gülmezoglu a kol. vo svojej štúdii zistili, že epiziotómia bola vykonaná pri indukovanom pôrode v 25 – 30 % prípadov, v porovnaní s 15 – 20 % pri spontánnom pôrode.(19) Pacientky po indukovanom pôrode mali vyšší výskyt cervikálnych poranení.(20)

Pôrodné poranenia hrádze sa klasifikujú podľa medzinárodne uznávaných štandardov vrátane FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), WHO a odporúčaní Slovenskej gynekologicko-pôrodníckej spoločnosti (SGPS). Základné rozdelenie zahŕňa štyri stupne poranení hrádze:

Ruptura perinei I. stupňa (Grade I), povrchové poranenie hrádze, zahŕňa drobné trhlinky alebo odreniny sliznice pošvy, vulvy či hrádze. Nezasahuje do svalových štruktúr hrádze a zvyčajne nevyžaduje veľké chirurgické ošetrenie alebo len minimálne šitie. (21)

Ruptura perinei II. stupňa (Grade II), ruptúra hrádze so postihnutím svalstva, okrem kože a sliznice pošvy zahŕňa aj trhliny v perineálnych svaloch (m. bulbospongiosus, m. transversus perinei superficialis). Nezasahuje do análneho zvierača a vyžaduje chirurgické ošetrenie. (22)

Ruptura perinei III. stupňa (Grade III), ruptúra hrádze s postihnutím análneho zvierača, zasahuje do vonkajšieho a/alebo vnútorného análneho zvierača. Medzi podtypy patrí ruptura perinei gr. IIIa kde je poškodené menej ako 50 % vonkajšieho análneho zvierača. Ruptura perinei gr. IIIb kde je poškodené viac ako 50 % vonkajšieho análneho zvierača a ruptura perinei gr. IIIc kde je poškodenie vnútorného análneho zvierača. Vyžaduje starostlivé chirurgické ošetrenie. (13)

Ruptura perinei IV. stupňa (Grade IV), ruptúra hrádze s postihnutím rekta, je najzávažnejšia forma poranenia. Zahŕňa roztrhnutie hrádze, análneho zvierača aj rektálnej sliznice. Vyžaduje chirurgickú rekonštrukciu a dlhodobú pooperačnú starostlivosť. (10)

Okrem poranení hrádze sa môžu vyskytnúť aj iné poranenia, ako napríklad epiziotómia, chirurgický nástrih hrádze, na uľahčenie pôrodu, najčastejšie mediolaterálneho typu. Lacerácie pošvy a krčka maternice môžu byť rôzneho rozsahu, od povrchových trhlín až po závažné ruptúry vyžadujúce chirurgickú intervenciu.(23)

Materiál a metódy

Práca analyzuje retrospektívne údaje pacientok, ktoré porodili po 41. týždni tehotenstva na Gynekologicko – pôrodníckom oddelení Nemocnice Bory v Bratislave v období od 1.1.2024 do 31.12.2024. Skupiny sú rozdelené na pacientky so spontánnym nástupom pôrodu a pacientky, u ktorých bol pôrod preindukovaný a následne indukovaný pomocou mechanických a farmakologických metód. Údaje boli získane z protokolov o indukcii pôrodu a pôrodných kníh. Hodnotené boli nasledujúce parametre:

Stupeň ruptúry perinea

Frekvencia epiziotómie

Percento tehotenstiev ukončených cisárskym rezom

Výsledky

Súbor predstavuje 297 pacientok odrodených po 41. týždni tehotenstva. Súbor rodičiek so spontánnym nástupom pôrodnej činnosti zahŕňa 125 pacientok čo predstavuje 42% a súbor rodičiek po indukcii pôrodu zahŕňa 172 pacientok čo predstavuje 58%. (tabuľka 1)

Výskyt pôrodných poranení v súbore pacientok po spontánnom nástupe činnosti

Sine: 11 pacientok, čo predstavuje 8,8 %.

Rpt perinei gr. I: 24 pacientok, čo predstavuje 19,2 %.

Rpt perinei gr. II: 28 pacientok, čo predstavuje 22,4 %.

Rpt perinei gr. III: 5 pacientok, čo predstavuje 4 %.

Rpt perinei gr. IV: 0 pacientok.

Epiziotómia: 27 pacientok, čo predstavuje 21,6 %.

Cisársky rez: 30 pacientok, čo predstavuje 24 %.

Výskyt pôrodných poranení v súbore pacientok po indukcii pôrodu

Sine: 13 pacientok, čo predstavuje 7,6 %.

Rpt perinei gr. I: 37 pacientok, čo predstavuje 21,5 %.

Rpt perinei gr. II: 30 pacientok, čo predstavuje 17,4 %.

Rpt perinei gr. III: 5 pacientok, čo predstavuje 2,9 %.

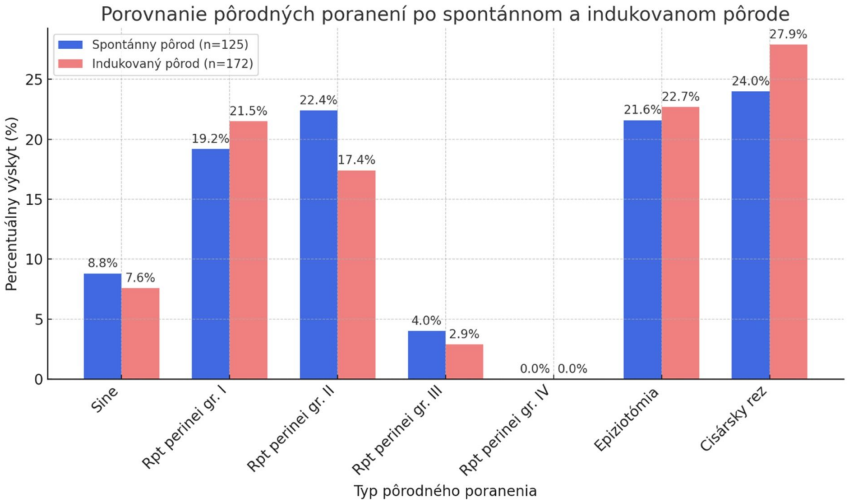
Rpt perinei gr. IV: 0 pacientok.

Epiziotómia: 30 pacientok, čo predstavuje 22,7 %.

Cisársky rez: 48 pacientok, čo predstavuje 27,9 %.

Tabuľka 1. Porovnanie poranení pri indukovaných a spontánnych pôrodoch po 41. týždni tehotenstva.

Typ poranenia	Spontánny pôrod (n=125)	%	Indukovaný pôrod (n=172)	% (p=0,534)
	N – 42%		N – 58%	
Bez poranenia (sine)	11	8,8	13	7,6
Ruptúra perinea I. st.	24	19,2	37	21,5
Ruptúra perinea II. st.	28	22,4	30	17,4
Ruptúra perinea III. st.	5	4	5	2,9
Ruptúra perinea IV. st.	0	0	0	0
Epiziotómia	27	21,6	30	22,7
Cisársky rez	30	24	48	27,9



Diskusia

Výsledky tejto práce poukazujú na významný vplyv potermínovej tehotnosti a indukcie pôrodu na výskyt pôrodných poranení a frekvenciu cisárskeho rezu. Výskyt pôrodných poranení bol v oboch skupinách porovnateľný, avšak v niektorých skupinách sú rozdiely výraznejšie. Zatiaľ čo ruptúra perinea I. stupňa bola mierne častejšia pri indukovaných pôrodoch (21,5 % oproti 19,2 %), ruptúra perinea II. stupňa bola naopak častejšia pri spontánnych pôrodoch (22,4 % oproti 17,4 %).

V našej analýze bol výskyt ruptúry hrádze III. stupňa a vyššieho stupňa relatívne nízky, pričom

nebol zaznamenaný žiadny prípad ruptúry IV. stupňa. Tento výsledok korešponduje s literatúrou, ktorá uvádza, že ruptúra hrádze III. a IV. stupňa je častejšia pri makrozómii plodu a asistovaných vaginálnych pôrodoch. Zistenia naznačujú, že výskyt ruptúry III. stupňa bol mierne vyšší u pacientok so spontánnym nástupom pôrodu (4 %) v porovnaní s indukovanými pôrodmi (2,9 %). Tento rozdiel môže byť spôsobený tým, že pri indukovaných pôrodoch sa častejšie pristupuje k epiziotómii.

Epiziotómia bola vykonaná častejšie v skupine indukovaných pôrodov (22,7 %) v porovnaní so spontánnymi pôrodmi (21,6 %). Tento rozdiel je v súlade so zisteniami WHO, podľa ktorých sa epiziotómia pri indukovaných pôrodoch používa ako preventívne opatrenie na minimalizáciu rizika vyšších stupňov ruptúr.(10)

Významné rozdiely sa vyskytli pri frekvencii cisárskeho rezu, ktorý bol vyšší v skupine pacientok po indukcii pôrodu (27,9 % oproti 24 %). Tento výsledok je v súlade so závermi viacerých štúdií, ktoré naznačujú, že indukovaný pôrod je spojený s vyšším rizikom operačného vedenia pôrodu, najmä v prípadoch nepostupujúceho pôrodu alebo fetálneho distresu. Štúdia z roku 2023 z Michigan University of Medicine analyzovala údaje z viac než 14 000 pôrodov v Michigane a ukázala, že u low risk prvorodičiek nebolo preukázané zníženie rizika cisárskeho rezu pri indukcii pôrodu v 39. týždni. Naopak, ženy, ktoré podstúpili elektívnu indukciu, mali vyššiu mieru cisárskych rezov v porovnaní s tými, ktoré čakali na spontánny nástup pôrodu (30% oproti 24%).(24) Dôležitým faktorom je aj vyššia pravdepodobnosť makrozómie plodu pri potermínových graviditách, čo môže komplikovať vaginálny pôrod a viesť k potrebe cisárskeho rezu.

Záver

Potermínová gravidita a indukcia pôrodu sú významnými faktormi ovplyvňujúcimi výskyt pôrodných poranení a spôsob vedenia pôrodu. Hoci indukcia pôrodu môže znížiť riziko fetálnej morbidity a mortality, je spojená s vyššou frekvenciou epiziotómie a cisárskeho rezu, čo by malo byť brané do úvahy pri rozhodovaní o optimálnej stratégii manažmentu pôrodu po 41. týždni gravidity. rozhodnutie o indukcii pôrodu by malo byť individualizované s dôkladným zvážením rizík a benefitov.

Zoznam použitej literatúry

1. WEISS, E. et al. S1-Guideline: Management of late-term and post-term pregnancy. In Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 2014; 74(12): 1099–1103.
2. SIMPSON, K.R., CREEHAN, P.A. AWHONN's Perinatal Nursing. In Lippincott Williams & Wilkins. 2015.
3. RöNNER, A.C., et al. Post-term pregnancy and macrosomia: Outcomes and consequences. In Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 2019; 95(2): 153-158.
4. SMITH, G.C.S., et al. The effect of gestational age on pregnancy outcomes. In American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2017; 196(6): 558.1-558.8.
5. MUGLU, J., et al. Risks of stillbirth and neonatal complications in prolonged pregnancy: A systematic review and meta-analysis. In PLOS Medicine. 2019; 16(3).
6. OLESEN, A.W., et al. Perinatal and maternal complications related to postterm delivery: A national register-based study. In American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2015; 189(1): 222-227.

7. GALAL, M., et al. Postterm pregnancy. In Facts, Views & Vision in ObGyn. 2012; 4(3): 175-187.
8. WHO Recommendations for induction of labour. In World Health Organization [online]. 2021. [cit. 2025-03-24]. Dostupné na internete: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241501156>.
9. CAUGHEY, A.B., et al. Systematic Review: Induction of Labor for Women With a Postterm Pregnancy. In Obstetrics & Gynecology. 2007; 109(6): 1357–1368.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Intrapartum care for a positive childbirth experience. 2018. ISBN 978-92-4-155021-5.
11. AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Induction of labor and related considerations for post-term pregnancies. 2021; 146.
12. Slovenská gynekologicko-pôrodnícka spoločnosť (SGPS). Odporúčania pre manažment potermínovej gravidity a indukcie pôrodu. 2022.
13. SULTAN, A.H., THAKAR, R. Third and fourth degree perineal tears: prevention and management. In Current Obstetrics & Gynaecology. 2017.
14. ISMAIL,S.I., et al. The management of obstetric anal sphincter injuries (OASIS): A national postal questionnaire survey in hospitals in the U.K. In J Obstet Gynaecol. 2015; 35(3): 229.
15. SMITH, J., et al. The impact of post-term pregnancy on maternal and fetal outcomes. In Journal of Prenatal Studies. 2018; 16(6): 201-214.
16. JONES, K., BROWN, P. Post-term pregnancy management: Risks and benefits of induction. In Maternal Health Review. 2020; 10(2): 87-102.
17. JOHNSON, H., et al. Perineal ruptures in spontaneous vs. induced labor: A systematic review. In Obstetric & Perinatal Journal. 2021; 18(4): 223-237.
18. GARCIA, L., LOPEZ, M. Episiotomy rates and labor induction outcomes. In International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2022; 29(1): 45-52.
19. GÜLMEZOGLU, A.M., et al. Induction of labour for improving birth outcomes for women at or beyond term. In Cochrane Database of Systematic Reviews. 2012; 6: CD004945.
20. DAVIS, R., NGUYEN, T. Cervical injuries in induced labor: A comparative study. In Journal of Obstetric Medicine. 2020; 15(3): 112-119.
21. ISMAIL, S.I., et al. The management of obstetric anal sphincter injuries: A national postal questionnaire survey in hospitals in the U.K. In J Obstet Gynaecol. 2015; 35(3): 229.
22. ZÁHUMENSKÝ, J., KORBEĽ, M., KAŠČÁK, P. Ruptúry hrádze 3. a 4. stupňa (odporúčané postupy). V Gynekol. Prax. 2015; 13(4): 196-199.
23. COMMITTEE ON PRACTICE BULLETINS-OBSTETRICS. ACOG Practise Bulletin No. 198: Prevention and Management o Obstetric Lacerations at Vaginal Delivery. In Obstet Gynecol. 2018; 132(3): 87-102..
24. SCIENCE DAILY. New research explores innovations in obstetric care. In *ScienceDaily*. 2023. Dostupné na: https://www.sciencedaily.com/releases/2023/05/230502090639.htm?utm_source=chatgpt.com

44. Niektoré parametre neinvazívnej diagnostiky srdcového zlyhávania pri stenóze aortálnej chlopne

MUDr. David Čmejrek
(vnútorné choroby)

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Dúbrava, CSc.[2]
[1] Kardiocentrum SUSCH, Banská Bystrica, [2] I. klinika geriatrie LF UK a UN, Bratislava

Úvod:

Ochorenie chlopňového aparátu je neoddeliteľnou súčasťou komplexného syndrómu zlyhávania srdca. Jednou z najdôležitejších primárnych valvulopatií je aortálna stenóza, kedysi známa ako „senilná" choroba aortálnej chlopne. Definovaná je ako obštrukcia v prietoku krvi degeneratívne zmenenou aortálnou chlopňou počas vypudzovania krvi z ĽK(1). Epidemiologické dáta ukazujú na stále narastajúcu mieru prevalencie ako srdcového zlyhávania, tak aj aortálnej stenózy a napriek pokroku v medicíne je mortalita na obe ochorenia veľmi vysoká(2,3). Diagnostika je základným pilierom pre zvolenie správnej liečby a načasovania intervencie a v súčasnosti máme k dispozícií dve kľúčové možnosti – laboratórne odbery a zobrazovacie modality.

Najčastejšie využívaným laboratórnym ukazovateľom je NTproBNP , ktorý je zaraďovaný do spektra nátriuretických peptidov(4). Uvoľňuje sa na základe podnetu pri zvýšení napätia stien srdca alebo hypoxii myokardu. Špecifická situácia jeho zvýšených hodnôt pri srdcovom zlyhávaní so simultánne prítomnou aortálnou stenózou je u seniorov, kde štúdie ukazujú priamu závislosť zvyšujúcej sa hodnoty NTproBNP vo vzťahu k závažnosti diastolickej aj systolickej funkcie ĽK(5). Laboratórna referenčná hodnota je ≤ 125 ng/l, koriguje sa ale na vek pacienta:

do 50 rokov ≤ 450 ng/l

od 50 – 75 rokov ≥ 900 ng/l

nad 75 rokov ≥ 1800 ng/l

Za posledné roky sa s vývojom technológií zdokonalili aj možnosti echokardiografie, ktorá je základnou diagnostickou modalitou v klinickej kardiológií. Má v nej unikátne miesto a poskytuje nám možnosti neinvazívneho merania veľkého množstva parametrov. Medzi ne zaraďujeme merania geometrie ĽK, diastolickej a systolickej funkcie ĽK.

Na základe ejekčnej frakcie sa vyčleňujú 3 skupiny podľa hodnoty EF ĽK. Pacienti s významne zníženou systolickou funkciou ĽK(EF ĽK < 40 %) predstavujú skupinu HFrEF. Pacienti so zachovanou systolickou funkciou ĽK (EF ĽK > 50 %) predstavujú skupinu HFpEF. Medzi skupinami s redukovanou a zachovanou EF ĽK sa nachádzajú pacienti so srdcovým zlyhávaním v kategórii mierne zníženej systolickej funkcie ĽK nazývanej HFmrEF, kde hodnota EF ĽK je medzi 40 – 50 %(6).

Aortálna stenóza je hodnotená prostredníctvom triády príznakov – Vmax, Pgmean a AVA na ľahkú, stredne ťažkú a ťažkú(7).

Stupeň závažnosti	*AVA(cm2)*	*PGmean(mmHg)*	*Vmax (m/s)*
Ľahká	1,5	< 25	< 3
Stredná	1,0 – 1,5	25 - 40	3 - 4
Ťažká	< 1,0	> 40	> 4

Pacienti a metódy

V našom súbore bolo retrospektívne analyzovaných 121 pacientov hospitalizovaných v kardiocentre SUSCCH v období od marca 2024 do marca 2025. Z tohto bolo 66 mužov a 55 žien.

Inklúznymi kritériami boli - vek nad 65 rokov a prítomnosť ťažkej aortálnej stenózy(PGmean nad 40mmHg).

Exklúznymi kritériami bola neprítomnosť všetkých dát u jednotlivých pacientov. Vyčlenených bolo aj 14 pacientov, ktorí patrili do kategórií LF-LW alebo paradoxnej LW-LG aortálnej stenózy(8).

Vyšetrenia boli robené na analyzátore *cobas e411* od firmy ROCHE. Vzorky boli spracované elektrochemiluminiscenčnou imunoalýzou na mikročasticiach, pričom reagenčný set bol *Elecsys pro BNPII*.

Echokg vyšetrenie bolo realizované na stroji *EPIQ CVx*. Na týchto strojoch sme hodnotili celú škálu parametrov – *LAVi, pomer E/e´ a EF ĽK.*

Na posúdenie geometrie ľavej komory je vhodné hodnotenie masy ĽK. Uvádzaná je v gramoch a aj dnes je rutinne využívana metóda merania v 2D projekcii, kde schému merania môžeme prirovnať k elipse. Podľa tohto vzoru vznikla rovnica založená na Penn konvencií:

$$\text{Hmotnosť ĽK} = 1{,}04 \times [(\text{IVSd} + \text{ĽKd} + \text{ZSd})3 \times \text{ĽKd3}] - 13{,}6\text{g}$$

Hmotnosť ĽK je však kontinuálna premenná a stanovenie ostrej hranice medzi normálnymi a patologickými hodnotami je striktne arbitrárne(9). V práci sme merali hodnotu IVS, ĽKd a ZS, nakoniec sme neidexovanú hodnotu masy ĽK vypočítali prostredíctvom aplikácie *ECHOlab*.

Plnenie ĽK vieme vyšetrovať relatívne veľkým množstvom parametrov. Medzi najvýznamnejšie patrí pomer E/e´ a LAVi.

E je vrcholová rýchlosť plnenia vo včasnej diastole(koreluje s maximálnym tlakovým gradientom ledzi ĽP a ĽK vo včasnej diastole). ĽK sa plnením v diastole predlžuje od bázy smerom k vrcholu a objem sa zväčšuje ako v pozdĺžnom, tak priečnom smere. Rýchlosť pozdĺžneho myokardiálneho predlžovania v diastole je parameter, ktorý hodnotíme v rámci tkanivového dopplerovského zobrazenia. Pre klinickú aj echokardiografickú prax má dominantný význam zrkadlová komponenta diastolickej fázy k transmitrálnemu prietoku – e´, ktorá zodpovedá včasnej diastolickej relaxácii. Dôležitým ukazovateľom je pomer medzi E/e´,

ktorý vypovedá o plniacich tlakoch ĽK, pričom napriek rozdielnym literárnym prameňom sa za patologickú hodnotu podkladá číslo nad 14(10).

Meranie LAV sa odporúča na posúdenie veľkosti a remodelácie ĽP. Dobre koreluje s chronicky zvýšenými plniacimi tlakmi v ĽK. Na meranie LAV sa preferenčne používa Simpsonova biplanárna metóda – zobrazuje kontúry ĽP v dvoch na seba kolmých projekciách(A2C a A4C).Objem ĽP sa líši u mužov a žien, preto sa objem ĽP indexuje na telesný povrch a mali by sa udávať iba indexované hodnoty – LAVi. Normálna hodnota LAVi nepresahuje 34ml/m^2(11).

Na meranie EF ĽK v 2D projekciách sa ukazuje ako najvhodnejšie použiť *Simpsonovu metódu sumácie diskov*, ktorá ráta objem ĽK sumáciou série paralelne prebiehajúcich diskov od bázy po hrot(12).

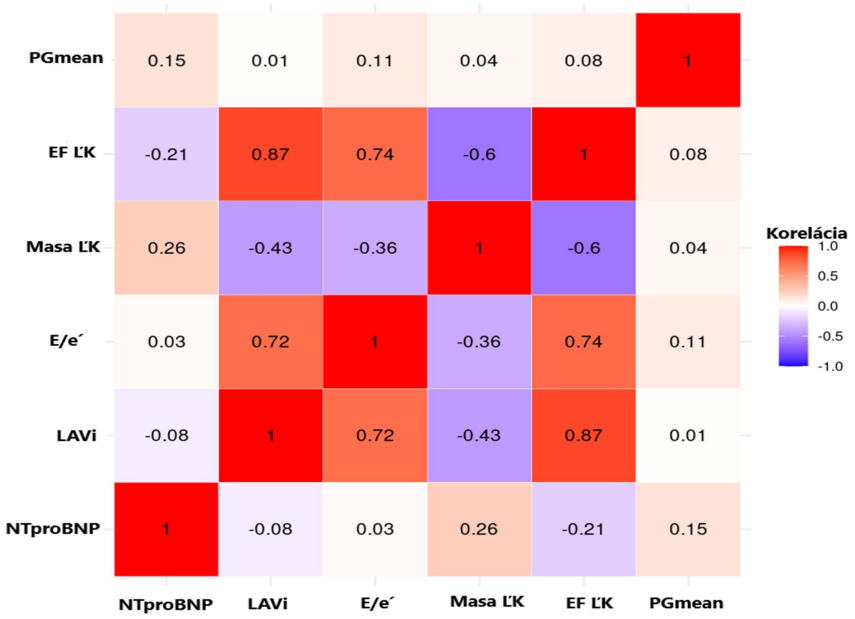
Aj keď je v literatúre popisovaných množstvo možných echokardiografických okien prostredníctvom ktorých sa dá merať aortálna stenóza, v našom súbore boli v drvivej väčšine využívané A3C a A5C projekcie(13).

V práci sme analyzovali súbor údajov obsahujúci závislú premennú NTproBNP a súbor prediktorov (LAVi, E/e´, neindexovaná masa ĽK, EF ĽK, Pgmean). Najskôr boli údaje dôsledne vyčistené odstránením všetkých nekompletných záznamov (chýbajúcich hodnôt), pričom táto operácia bola vykonaná v prostredí R pomocou knižnice *dplyr*. Pre identifikáciu možných lineárnych vzťahov medzi premennými bola vypočítaná Pearsonova korelačná matica, ktorej vizuálna reprezentácia bola vytvorená vo forme teplotnej mapy (*heatmap*) pomocou balíka *corrplot*. Táto analýza poskytla základné informácie o smere a sile lineárnych vzťahov medzi jednotlivými premennými, čím sa zabezpečilo lepšie pochopenie štruktúry údajov.

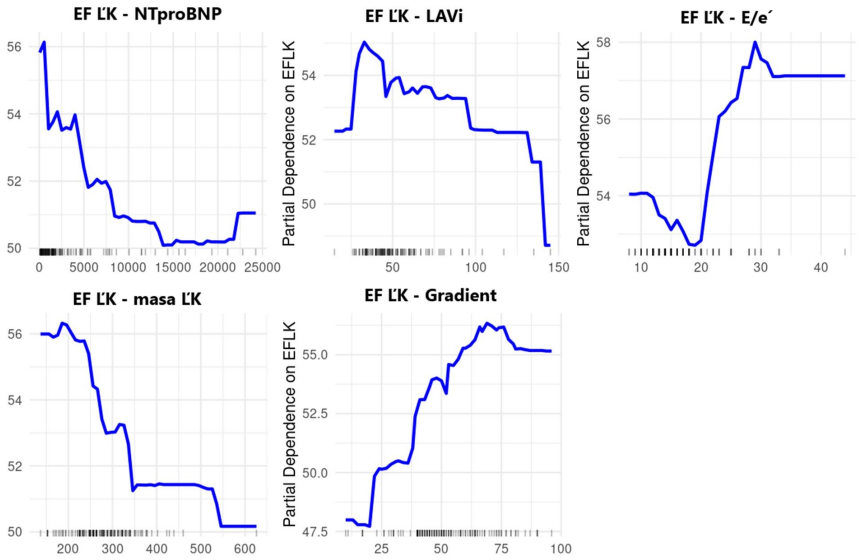
Následne bol vytvorený prediktívny model typu Random Forest, ktorý bol zostrojený pomocou balíka *ranger*. Na interpretáciu a hlbšie pochopenie výsledkov modelu boli vypočítané SHAP(SHapley Additive exPlanations) hodnoty, ktoré kvantifikujú príspevok každého prediktora k predikovaným hodnotám cieľovej premennej. Tieto SHAP hodnoty boli odhadnuté pomocou *Monte Carlo aproximácie*(100 simulácií) s využitím balíka fastshap. Vypočítané SHAP hodnoty boli následne zhrnuté, zoradené podľa veľkosti cieľovej premennej (NTproBNP) a graficky znázornené s cieľom jasne identifikovať, ktoré prediktory prispievajú k zvýšeniu (pozitívne SHAP hodnoty) alebo zníženiu (negatívne SHAP hodnoty) hodnoty cieľovej premennej.

Napokon sme na detailnejšiu interpretáciu výsledkov zostrojili grafy čiastočných závislostí (Partial Dependence Plots – PDP) pre každý prediktor, čím sme zachytili priemerný vplyv jednotlivých prediktorov na výslednú predikciu cieľovej premennej. Tieto PDP grafy boli vytvorené pomocou balíka pdp a umožnili nám interpretovať nelineárne vzťahy medzi prediktormi a závislou premennou v kontexte vytvoreného modelu. Grafické výstupy boli realizované pomocou balíka ggplot2.

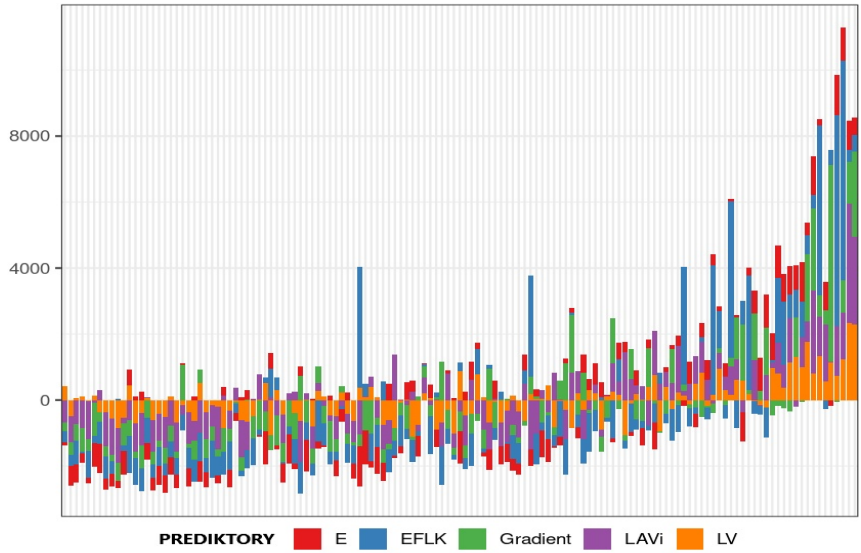
Výsledky



Obrázok č. 1 - Pearsonova korelačná matica vizualizovaná vo forme teplotnej mapy(heatmap)



Obrázok č. 2 – Graf čiastočnej závislosti EF ĽK



Obrázok č. 3 – SHAP príspevky každého prediktora v ovzťahu k NTproBNP

Diskusia

Dnes už je pomenovanie systolické a diastolické srdcové zlyhávanie zaradené medzi termíny označené pojmom obsolentné. S nárastom poznatkov došlo aj k rozdielnej fenotypickej klasifikácií srdcového zlyhávania, no pri aotálnej stenóze je situácia mierne iná, nakoľko pri nej najprv dochádza k rozvoju diastolickej dysfunkcie ĽK, ktorá následne prechádza do zlyhania systolickej funkcie ĽK(14). Veľmi peknou ilustráciou tejto aj experimentálne preukázanej hypotézy sú odporúčania Americkej spoločnosti pre echokardiografiu, ktorý rozdeľujú aortálnu stenózu na štyri skupiny A-D rozdelené podľa stupňa závažnosti chlopne. Pre klinickú prax sú rozhodujúce štádiá C a D, kedy je už prítomná ťažká stenóza. V štádiu C je pacient asymptomatický aj keď môže aj nemusí mať redukovanú EF ĽK(pod 50%), no v štádiu D sú už prítomné aj klinické symptómy. Už od štádia B je uvádzaná diastolická dysfunkcia ako súčasť komplexu aortálnej stenózy, no presné merania na jej detekciu a prípadne stratifikáciu miery jej závažnosti absentujú, čo je príkladom opomínania tohto významného pojmu akým je diastolická dysfunkcia ĽK(15).

NTproBNP je základým laboratórnym parametrom v kardiológií, jeho využitie pri ťažkej stenóze aortálnej chlopne je však neisté. Podľa posledných štúdií môže slúžiť ako súčasť strafitikačného systému s významnou mierou prínosu k určeniu správneho načasovania intervencie a posúdenia pokročilosti aortálnej stenózy a zhodnoteniu simultánnej prítomnosti srdcového zlyhávania. Jeho hodnoty v rámci tohto ochorenia značne varírujú a sú závislé na diastolickej aj systolickej funkcií ĽK(16). My sme si položili dve otázky – aký je jeho vzťah k diastolickej a systolickej funkcií ĽK pri ťažkej stenóze aortálnej chlopne a potom aj vplyv geometrickej remodelácie komory na jeho hodnoty.

NTproBNP je nutné korelovať aj na vek. Jeho hodnoty u seniorov sú podstatne vyššie ako u mladšej populácie, čo je spojené s fyziologickými procesmi asociovanými so starnutím. Prekvapivým zistením v našom súbore bola jeho nesignifikantná korelácia s ostatnými parametrami. S LAVi aj E/e´vykazovali nesignifikantnú pozitívnu koreláciu, s EF ĽK a masou ĽK vykazoval nesignifikantný negatívny vzťah. Tieto výsledky môžu byť podmienené neurčitou výpovednou hodnotou a limitáciou tohto markera v špecifických podmienkach aortálnej stenózy, kedy až do veľmi pokročilého obdobia ochorenia u seniorov NTproBNP nemá prediktívne postavenie vypovedajúce o nutnosti včasnejšieho terapeutického zásahu do vývoja ochorenia. Toto tvrdenie podporuje graf čiastočnej závislosti, kedy je redukcia EF ĽK spojená s nárastom NTproBNP. Dá sa teda predpokladať, že do obdobia redukcie EF ĽK po 50% je NTproBNP napriek relatívne pokročilej diastolickej dysfunkcií málo výpovedné. Podľa SHAP grafu parametre LAVi, E/e´, masa ľavej komory a taktiež gradient nezvyšujú hodnotu NTproBNP v podmienkach ťažkej aortálnej stenózy, ale skôr naopak k prispievajú k jeho nízkym hodnotám. Opačná situácia nastáva až v pokročilých fázach, kedy je NTproBNP vysoké, čo je pravdepodobne spojené s veľmi pokročilými zmenami myokardu v štádiu redukovanej EF ĽK vyvolanými ťažkou stenózou aortálnej.

Ďalej sme sa zamerali na hodnotenie diastolickej funkcie ĽK prostredníctvom LAVi a E/e´. Oba tieto ukazovatele v heatmap preukázali signifikantný pozitívny korelačný vzťah k EF ĽK. Jednotlivé analýzy vzťahu EF ĽK k LAVi aj E/e´preukázali zaujímavé skutočnosti.

EF ĽK má veľmi pozitívnu koreláciu s LAVi, v grafe čiastočnej závislosti vidíme úzky vzťah zachovanej EF ĽK(nad 50%) k postupne narastajúcemu LAVi až do zlomového bodu, kedy dochádzka k poklesu ejekčnej frakcie a podľa nášho dáta sa LAVi nezvyšuje. Tento fenomén

dokazuje pravdivosť výskumných dát o úzkom prepojení diatolickej a systolickej funkcie ĽK. Po vyčerpaní funkčných diastolických reverz ĽK už nedochádza k ďalšej progresií diastolickej dysfunkcie, ale klesá systolický výkon ĽK. V týchto podmienkach by LAVi mohol byť dôležitým parametrom slúžiacim k prognostickej stratifikácií pacientov s aortálnou stenózou.

Veľmi podobná situácia je spojená aj E/e´. V heatmape sa preukázala veľmi silná pozitívna korelácia s EF ĽK. V grafe čiastočnej závislosti EF ĽK pri poklese EF ĽK došlo k zlomovému poklesu hodnoty E/e´. Na druhej strane pri hodnote EF ĽK malo E/e´relatívne stabilnú zvýšenú hodnotu.

Vzťah LAVi a E/e´mali v heatmape signifikantne pozitívny korelačný vzťah. Táto skutočnosť preukazuje význam spoločného merania oboch parametrov a nie jedného zvlášť, čím sa nám môže poskytnúť komplexnejší obraz o diastolickej funkcií ĽK.

Zaujímavým a prekvapivým nálezom bol inverzný signitikantný korelačný vzťah medzi EF ĽK a masou ĽK v heatmape. Aortálna stenóza je neodmysliteľne spojená s vývojom koncentrickej hypertrofie ĽK, ktorá vedie k fibrotickým zmenám myokardu, čo sa spája s ďalšími mechanizmami, ktoré postupe vedú k dysfunkcií srdca. Negatívny lineárny vzťah poklesu EF ĽK k nárastu masy ĽK bol preukázateľný aj v grafe čiastočnej závislosti. Hodnotenie geometrického tvaru ĽK ako aj masy ĽK by teda mohlo byť veľmi dobrým a užitočným faktorom v hodnotení predikcie prognózy a rizika dysfunkcie ĽK a to hlavne u asymptomatických pacientov(štádium C) a včasnejšie predikovať potencionálny rozvoj poklesu EF ĽK. Je nutné ale skonštatovať aj charakter merania masy ĽK. V našom súbore sme využívali neindexovanú masu a otázkou prislúchajúcou ďalšiemu výskumu je potencionálny rozdiel medzi indexovanou a neindexovanou hodnotou tohto parametra.

Samozrejme na druhej strane je nutné poznamenať limitáciu aj v miere súboru. Aj keď je súbor v početnosti pacientov relatívne suficientný, štatistické metódy, ktoré sme využili odporúčajú na zvýšenie presnosti nálezov omnoho vyšší podiel pacientov. Je nutný ďalší výskum a zber dát omnoho väčšieho množstva pacientov na zhodnotenie využitia NTproBNP v podmienkach aortálnej stenózy, využitie LAVi a E/e´ v predikcii redukcie EF ĽK ako aj možnosť hodnotenia geometrie ĽK a jej vzťahu k prognóze pacientov. Aj naďalej je nutné prihliadať na vekový aspekt 65 rokov a to hneď z niekoľkých dôvodov. Prevalencia ako srdcového zlyhávania, tak aj aortálnej stenózy narastá s vekom a populačné štúdie ukazujú tento trend aj v najbližších desaťročiach. Ďalším dôvodom je špecifickosť týchto pacientov, čo je spojemné s množstvom fyziologických zmien asociovaných so starnutím a je nutné na tieto skutočnosti prihliadať, aby boli správne nastavené kritériá pre adekvátne načasovanie intervencie.

Zoznam použitej literatúry

1. PUJARI SH, AGASTHI P. Aortic Stenosis. 2023 Apr 16. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2025 Jan–. PMID: 32491560.
2. JOHANSSON, I, JOSEPH, P, BALASUBRAMANIAN, K et al. Health-Related Quality of Life and Mortality in HeartFailure: The Global Congestive Heart Failure Study of 23 000 Patients From 40 Countries. Circulation. 2021 Jun;143(22):2129-2142.
3. GÉNÉREUX, P, SHARMA, RP, CUBEDDU, RJ et al., The Mortality Burden of Untreated Aortic Stenosis. J Am CollCardiol. 2023 Nov 28;82(22):2101-2109.
4. KUWAHARA, K. Thenatriuretic peptide system in heartfailure: Diagnostic and therapeutic implications. PharmacolTher. 2021 Nov;227:107863.

5. MARINESCU, M, OPREA, VD, NECHITA, A et al. The Use of Brain Natriuretic Peptide in the Evaluation of HeartFailure in Geriatric Patients. Diagnostics (Basel). 2023 Apr 23;13(9):1512.
6. GOLLA, MSG, SHAMS, P. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction (HFpEF). 2024 Mar 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearlsPublishing; 2025 Jan–. PMID: 38320083.
7. TASTET, L, Ali M, PIBAROT, P et al. Grading of AorticValve Calcification Severity and Risk Stratification in Aortic Stenosis. J Am Heart Assoc. 2024 Aug 6;13(15):e035605.
8. OH, JK, ITO, S. Severity of Aortic Stenosis: A Moving Target. J Am Coll Cardiol. 2022 Aug16;80(7):677-680.
9. BARBIERI, A, BURSI, F, CAMAIONI, G et al. Echocardiographic Left Ventricular Mass Assessment: Correlation between 2D-Derived Linear Dimensions and 3-Dimensional 53 Automated, Machine Learning-Based Methods in Unselected Patients. J Clin Med.2021 Mar 19;10(6):1279.
10. POPESCU, BA, BELADAN, CC, Nagueh SF et al. How to assess left ventricular filling pressures by echocardiography in clinical practice. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2022 Aug 22;23(9):1127-1129.
11. MAHESHWARI M, TANWAR CP, KAUSHIK SK. Echocardiographic assessment of left atrial volume index in elderly patients with left ventricle anterior myocardial infarction. Heart Views. 2012 Jul;13(3):97-9.
12. KIM WC, BEQIRI, A, LEWANDOWSKI, AJ et al. Beyond Simpson's Rule: Accounting for Orientation and Ellipticity Assumptions. Ultrasound Med Biol. 2022 Dec;48(12):2476-2485.
13. RING L, SHAH BN, BHATTACHARYYA S et al. Echocardiographic assessment of aortic stenosis: a practical guideline from the British Society of Echocardiography. Echo Res Pract. 2021 Apr 28;8(1):G19-G59.
14. INOUE, K, SMISETH, OA. Leftatrium as key player and essential biomarker in heart failure. J Cardiol. 2025 Jan;85(1):8-16.
15. OTTO CM, NISHIMURA RA, BONOW RO, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. Circulation. 2021 Feb 2;143(5):e35-e71.
16. CAVALCANTE PN, KANHOUCHE G, ROSA VEE, et al. B-type natriuretic peptide and N-terminal Pro-B-type natriuretic peptide in severe aortic stenosis: a comprehensive literature review. Front Cardiovasc Med. 2023 Sep 1;10:1182530.

45. Eight-year survival analysis of patients with dilated cardiomyopathy: Does treatment era affect prognosis?

MUDr. Lukáš Kučera
(vnútorné choroby)

Spoluautori: MUDr. Martin Chudý, PhD[1]., MUDr. Marcela Danková PhD.,.[1]
Školiteľ: doc. MUDr. Eva Goncalvesová, Csc., FEFH, FHFA.[1]
[1]Kardiologická klinika LFUK a NÚSCH, Bratislava

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of the most common cardiomyopathies and a frequent cause of heart failure (HF) in the adult population. DCM is defined as the presence of left ventricular (LV) dilation and global or regional systolic dysfunction that cannot be explained by abnormal preload or afterload, nor by direct myocardial loss in the context of coronary artery disease (1). Today, DCM is an umbrella term encompassing various pathological processes and genotype-environment interactions that result in a common phenotype of a dilated, dysfunctional LV (2). The epidemiology of DCM remains insufficiently explored, partly due to diagnostic challenges and the dominant manifestation, which can lead to an initial diagnosis of an otherwise unrecognized cardiomyopathy (e.g., arrhythmias, thromboembolism, or incidental coronary artery disease). Recent surveys suggest that the prevalence of DCM is around 120 per 100,000 of population, with idiopathic DCM accounting for around 60 per 100,000 (3). The etiology and clinical course of DCM are highly variable, as is the response to treatment. Risk stratification, survival data, disease progression, and complications are crucial for effective management and personalization of treatment.

Matherials and methods

A retrospective analysis of medical records of patients admitted to a tertiary cardiac center with advanced HF treatment options with a diagnosis of DCM between January 1, 2016, and December 31, 2023 was performed. Data were collected through an analysis of hospital information system records. The study included patients with a newly diagnosed HF and also patients with known DCM referred for evaluation of advanced treatment of HF. As a result the duration of DCM diagnosis varied among patients, including those with a short medical history as well as those with long-standing DCM. Patients with DCM underwent a comprehensive protocol-based diagnostic evaluation, including clinical examination and laboratory tests such as creatinine, electrolytes, fasting glucose, lipid profile, liver enzymes, high-sensitivity troponin T, N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), C-reactive protein, complete blood count, electrocardiogram (ECG), echocardiography, and coronary catheterization (4). Echocardiography exam was done by an experienced cardiologist. After excluding other causes of HF, the diagnosis of DCM was established or confirmed.

All statistical analyses were conducted using IBM-SPSS software. Quantitative variables were analyzed using descriptive statistics, including the number of measurements, mean, and standard deviation. Qualitative variables were analyzed using absolute and relative frequencies. Differences between groups for quantitative variables were tested using an independent samples t-test or analysis of variance (ANOVA), and for qualitative variables using the chi-square test of independence. Kaplan-Meier survival curves were estimated and compared between groups using the log-rank test. Univariate and multivariate cox proportional hazards model (Hazard Ratio, HR) was used to identify independent prognostic factors. The level of statistical significance was set at $\alpha = 0.05$.

Results

The study population included 622 patients with DCM. Patients were referred to our tertiary centre for further management of the disease or for consideration of more advanced treatment options for HF. The time period from diagnosis to the visit in the tertiary centre was not taken into account. Baseline characteristics of population are in table 1.

Table 1. Baseline characteristics of the study cohort

	All patients	1. era	2. era	p-value
Male n (%)	484 (78)	258 (76)	226 (80)	0,154
Female n (%)	138 (22)	83 (24)	55 (20)	
Age (mean ± SD)	54 ± 13	54 ± 13	55 ± 13	0,794
Arterial hypertenson n (%)	333 (54)	183 (54)	150 (53)	0,943
Diabetes mellitus n (%)	119 (19)	65 (19)	54 (19)	0,961
Hyperlipidemia n (%)	280 (45)	144 (42)	136 (48)	0,124
Atrial fibrilation n (%)	152 (24)	81 (24)	71 (25)	0,662
History of smoking n (%)	292 (47)	144 (42)	148 (53)	0,009*
Familiar DCM n (%)	44 (7,1)	31 (9,1)	13 (4,6)	0,031*
NYHA 1/2 n (%)	301 (48)	178 (52)	123 (44)	0,036*
NYHA 3/4 n (%)	321 (52)	163 (48)	158 (56)	
SBP mmHg (mean ± SD)	121 ± 17	121 ± 17	121 ± 18	0,784
DBP mmHg (mean ± SD)	77 ± 11	76 ± 11	79 ± 12	0,002*
Heart rate /min (mean ± SD)	80 ± 16	80 ± 16	80 ± 17	0,677
Height cm (mean ± SD)	175 ± 9	174 ± 9	175 ± 10	0,250
Weight kg (mean ± SD)	88 ± 20	88 ± 20	89 ± 20	0,628
BMI kg/m^2(mean ± SD)	29 ± 6	29 ± 6	29 ± 6	0,889
Chol mmol/l (mean ± SD)	4,5 ± 1,3	4,5 ± 1,3	4,5 ± 1,2	0,838
HDL-C mmol/l (mean ± SD)	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3	0,858
TG mmol/l (mean ± SD)	1,6 ± 1,1	1,6 ± 1	1,6 ± 1,2	0,858
LDL mmol/l (mean ± SD)	3,5 ± 1	3,9 ± 0,9	3,2 ± 1	0,001*

Creatinin umol/l (mean ± SD)	92 ± 44	89 ± 25	96 ± 59	0,067
Troponin ng/l (mean ± SD)	30 ± 75	25 ± 48	34 ± 95	0,269
NTproBNP ng/l (mean ± SD)	3057 ± 4355	3017 ± 4171	3103 ± 4567	0,809
BIL-T umol/l (mean ± SD)	15,6 ± 12,2	15,5 ± 12,4	15,7 ± 11,9	0,819
CKD-EPI [ml/s/1,73m] (mean ± SD)	1,36 ± 0,35	1,37 ± 0,33	1,35 ± 0,38	0,598
HGB g/l (mean ± SD)	144 ± 17	144 ± 16	145 ± 17	0,383
RV mm (mean ± SD)	35 ± 7	34 ± 6	36 ± 7	0,001*
LVEDD mm (mean ± SD)	67 ± 7	66 ± 7	68 ± 8	0,001*
IVS mm (mean ± SD)	9,8 ± 1,7	9,9 ± 1,7	9,8 ± 1,8	0,850
PWD mm (mean ± SD)	9,7 ± 1,5	9,9 ± 1,4	9,5 ± 1,6	0,002*
LVEF % (mean ± SD)	26 ± 7	26 ± 7	26 ± 8	0,545
TAPSE mm (mean ± SD)	18 ± 5	18 ± 5	19 ± 5	0,992
LA mm (mean ± SD)	47 ± 6	47 ± 6	48 ± 6	0,259

n- amount, NYHA- New York heart assosciation, SBP- systolic blood pressure, DBP- diastolic blood pressure, DCM- dilated cardiomyopathy BMI- body mass index, chol- cholesterol, NTproBNP- N-terminal pro–B-type natriuretic peptide, CKD-EPI - The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, HGB- hemoglobin LVEDD- left ventricular end diastolic diameter, IVS- interventricular septum, LA- left atrium, LVEF- left venticular ejection fraction, RV- right ventrikle Statistically significant results are marked with an asterisk (*, $p < 0.05$).

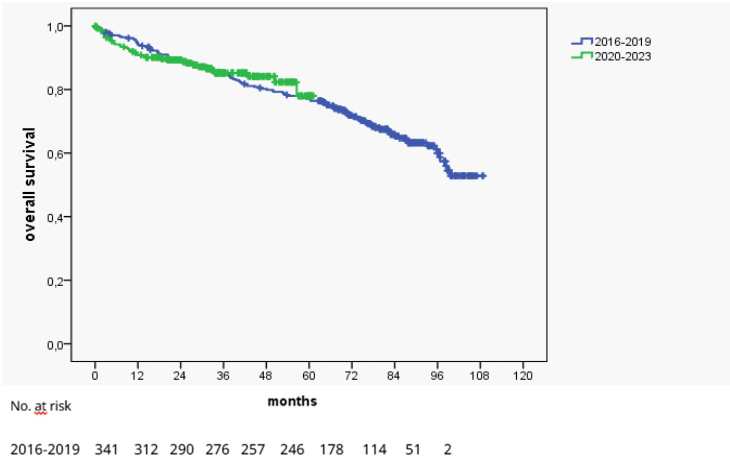


Figure 1. Kaplan-Meier curve for all cause mortality according to enrolment period.

Patients aged ≥60 years had significantly worse survival than younger patients (p=0,011). There were also gender differences, with women being older, but having better survival than men (p=0,017).

Regarding body mass index (BMI), survival was compared among patients with normal weight (BMI ≤ 25 kg/m²), overweight (BMI 25–30 kg/m²), and obesity (BMI >30 kg/m²). Obese patients had significantly better survival compared to those with normal weight (p = 0.013).

A subgroup analysis was performed to evaluate the effect of New York heart association (NYHA) class and LVEF on survival. Patients in NYHA class III/IV had significantly worse survival compared to those in NYHA class I/II (p=0,002). Similarly, patients with LVEF <

25% and LVEF 25–39% had worse overall survival compared to those with LVEF >40% (p = 0.002, p = 0.022, respectively).

We assesed survival in patients with chronic kidney disease (CKD). Patients with advanced CKD (stage 3-5) had significantly worse survival compared to patients with milder kidney involvement (stage 1-2) (p=0.001). Considering the novel investigation of the cardio-reno-metabolic (CRM) phenomenon, we compared the survival of patients among specific subgroups. Patients with LVEF <40% and CKD (stage1,2) had better survival compared to patients with CKD (stage 3-5) (p=0,001). Difference in survival was also in a group with LVEF <40% with diabetes mellitus (DM) vs. without DM. Patients without DM had better survival (p=0,027). In a subgroup with a patients with LVEF <40%, CKD (stage 3+), DM vs. without DM there was not a difference in survival (p=NS). Then we compared a subgroup of patients with LVEF <40%, CKD (stage 3-5), DM vs CKD 1,2). Patients in the second group had a better survival (p=0,016). Also patients with documented atrial fibrilation had worse survival compared to patients with sinus rhytm (p=0,002).

Patients with NT-proBNP levels >3000 ng/L had significantly worse survival than those with NT-proBNP ≤3000 ng/L. (p = 0.001).

We performed Cox regression analysis to identify independent predictors of survival in patients with dilated cardiomyopathy. The results are presented in the table 2., Negative risk factors (worsening survival) were age (HR=1,024, 95% CI 1,008-1,040, p=0,003) NYHA III/IV (HR=1,573, 95% CI 1,080-2,289 p=0,018), CKD stage 3+ (HR=1,576, 95% CI 1,021-2,434, p=0,040), NT-proBNP> 3000 ng/l (HR= 2,020, 95% CI 1,396-2,922 ng/l, p <0,001), DM (HR=1,067, 95% CI 1,076-2,399) were independent negative risk factors in survival. Positive risk factor improving surival were female sex (HR=0,441, 95% CI 0,278-0,699, p= 0,001), overweight (HR=0,627, 95% CI 0,420-0,937, p= 0,023) and LVEF (HR=0,972, 95% CI 0,945-0,999, p=0,041). Factors without significant impact on survival were obesity, NYHA IV, LVEDD> 65 mm and history of Atrial fibilation

	P	HR	95,0% CI FOR HR	
			Lower	Upper
Age	,003	1,024	1,008	1,040
Female sex	,001	,441	,278	,699
Overweight	,023	,627	,420	,937
NYHA 3 / 4	,018	1,573	1,080	2,289
CKD 3 / 4 / 5	,040	1,576	1,021	2,434
LVEF	,041	,972	,945	,999
NT-proBNP> 3 000 ng/l	,001	2,020	1,396	2,922
Diabetes mellitus	,021	1,607	1,076	2,399

NYHA- New York heart assosciation, CKD- chronic kidney disease, LVEDD- left ventricular end diastolic diameter, NT-proBNP- N-terminal pro–B-type natriuretic peptide

Table 2. Multivariable analysis.

Discussion

This retrospective study presents a single tertiary center survival analysis of patients with DCM. Our findings indicate a 5-year mortality of 22,3% and 9-year mortality of 46,9%. While the prognosis of patients with DCM has improved over the years, effective risk stratification of these patients plays an importart role over the course of disease. Our data suggest a better survival rates compared to previous studies. EPICAL study reported a 5-year mortality of 65,5% among patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). Several factors may account for this discrepancy. The mean age of patients in our study was lower (54 vs. 64 years) and EPICAL study included other aetiologies of HF (5). Another study focusing only on DCM patients reported a 5-year mortality rate of 55.9% (6). In addition, our study identified age as another independent prognostic risk factor affecting survival in DCM patients, suggesting that ageing is associated with progressive deterioration of cardiac function and increased comorbidity burden.

NYHA classification is widely used system to classify patients with HF. According to our results, patients with NYHA III/IV had worse survival compared to patients with NYHA I/II. Many studies have investigated the prognostic role of NYHA classification in HF, with mixed results. The Briongos-Figuero study found that patients with worse NYHA class had an independently increased risk of cardiovascular death (7). Multivariate analysis confirmed that NYHA class III/IV was an independent predictor of worse prognosis. On the other hand, Meta-analysis from 2019 found out that NYHA classification is unreliable predictor of adverse outcome in HF (8). In light of these findings, we believe that mortality should be considered comprehensively and not just on the basis of a single parameter. Also the female sex was associated as a positive indepedent risk factor. This finding is consistent with many studies that have found that women have better outcomes with DCM than men. (9).

In our analysis, we compared patient survival between two time periods: 2016–2019 and 2020–2023. These periods were chosen to evaluate the potential impact of the COVID-19 pandemic (2019–2022) and the introduction of SGLT2i in 2022. However, we found no significant difference in survival between the two periods, nor between patients who received SGLT2 inhibitors and those who did not.

The number of patients enrolled in the second era was lower than in the first, which could be attributed to the impact of the COVID-19 pandemic on healthcare access and hospital admissions In addition, patients with stable DCM may have been managed by district cardiologists and only referred to tertiary care centres when their disease progressed. These findings suggest that despite advances in heart failure treatment, long-term survival has not significantly improved in our DCM cohort. Possible contributing factors include the stabilisation of treatment strategies.

In our study population we found that patients who were obese had better survival than patients with normal values of BMI. The so-called obesity paradox has been described in patients with HF and obesity. The latter suggests that obese HF patients have a better prognosis than those with a normal BMI (10). However in our multivariate analysis this was not confirmed. Interestingly overweight (BMI 25–30 kg/m^2) was indentified as independent negative prognostic factor. This finding suggest that intial findings may be influenced by compounding factors. However, there is no need to condemn this result, as obesity may be involved in the formation of DCM through a stimulatory effect on collagen synthesis influenced by the immune response and ferroptosis, which is related to increased oxidative stress (11).

Additionaly, patients with NT-proBNP> 3000 pg/mL had worse survival than those with lower NT-proBNP levels. Multivariate analysis confirmed that NT-proBNP> 3000 pg/ml is indepednet risk factor affecting survival. These findings allign with previous research, such as the study by Aaronson et al (12), which demonstrated that patients with NT-proBNP levels below 4500 pg/mL had better event-free survival. This highlights the prognostic value of NT-proBNP in risk stratification of patients with dilated cardiomyopathy.

With increasing age, SZ patients develop other diseases such as DM or CKD. The combination of these diseases increases the risk of adverse outcomes (13). Recently, the combination of these conditions has been termed cardio-renal-metabolic comorbidity (CRM). According to the 2022 study, patients with HF and CKD had a six- to sevenfold adjusted risk of all-cause mortality (14). Our results are in line with the following findings. According to multivariable analysis DM and CKD stage 3+ were independent risk factors for survival. The focus must therefore be on controlling individual risk factors, multidisciplinary collaboration and the use of newer drugs such as SGLT2i.

LVEF is the most frequently used measure of cardiac function and is associated with the prognosis of patients with heart failure. According to PARADIGM-HF the risk of all outcomes increased with decreasing LVEF each 5-point reduction in LVEF was associated with 9% increased risk of cardiovascular death (15). Results of our multivariate analysis suggest that each 5% increase in LVEF is associated with a 14% lower risk of death.

DCM remains one of the most important diagnoses leading to HTx. Identifying the factors that influence the prognosis of patients with this disease may help us to better stratify these patients. Further prospective studies should be performed to confirm our findings.

References

1. Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, et al.: 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. Eur Heart J 2023; 44(37): 3503-3626. doi: 10.1093/eurheartj/ehad194.
2. Eur Heart J: Editorial. Eur Heart J 2020; 41(39): 3784-3786. doi: 10.1093/eurheartj/ehz908.
3. Ababio Y, Kelly SP, Angeli FS, et al.: Prevalence and Clinical Burden of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy in the United States. Am J Med Open 2023; 10: 100038. doi: 10.1016/j.ajmo.2023.100038.
4. Goncalvesová E, et al.: Manuál diagnostických a liečebných postupov. Bratislava: Herba, 2012.
5. Agrinier N, Thilly N, Briancon S, et al.: Prognostic factors associated with 15-year mortality in patients with hospitalized systolic HF: Results of the observational community-based EPICAL cohort study. Int J Cardiol 2017; 228: 940-947. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.260.
6. Xu XR, Han MM, Yang YZ, et al.: Fifteen-year mortality and prognostic factors in patients with dilated cardiomyopathy: persistent standardized application of drug therapy and strengthened management may bring about encouraging change in an aging society. J Geriatr Cardiol 2022; 19(5): 335-342. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2022.05.003.
7. Briongos-Figuero S, Estévez A, Pérez ML, et al.: Prognostic role of NYHA class in heart failure patients undergoing primary prevention ICD therapy. ESC Heart Fail 2020; 7(1): 279-283. doi: 10.1002/ehf2.12548.
8. Caraballo C, Desai NR, Mulder H, et al.: Clinical Implications of the New York Heart Association Classification. J Am Heart Assoc 2019; 8(23): e014240. doi: 10.1161/JAHA.119.014240.
9. Cannata A, Manca P, Nuzzi V, et al.: Sex-Specific Prognostic Implications in Dilated Cardiomyopathy After Left Ventricular Reverse Remodeling. J Clin Med 2020; 9(8): 2426. doi: 10.3390/jcm9082426.
10. Merlo M, Cannatà A, Pio Loco C, et al.: Contemporary survival trends and aetiological characterization in non-ischaemic dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2020; 22(7): 1111-1121. doi: 10.1002/ejhf.1914.
11. Wang X, Liu W, Li H, et al: Exploring the Role of Obesity in Dilated Cardiomyopathy Based on Bio-informatics Analysis. J Cardiovasc Dev Dis 2022; 9(12): 462.
12. Castelli G, Fornaro A, Ciaccheri M, et al: Improving survival rates of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy in Tuscany over 3 decades: impact of evidence-based management. Circ Heart Fail 2013; 6(5): 913-921.
13. Tigen K, Karaahmet T, Kahveci G, et al.: N-terminal pro brain natriuretic peptide to predict prognosis in dilated cardiomyopathy with sinus rhythm. Heart Lung Circ 2007; 16(4): 290-294. doi: 10.1016/j.hlc.2007.02.083.
14. Pandey A, Vaduganathan M, Arora S, et al.: Temporal Trends in Prevalence and Prognostic Implications of Comorbidities Among Patients With Acute Decompensated

Heart Failure: The ARIC Study Community Surveillance. Circulation 2020; 142(3): 230-243. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047019.
15. Solomon SD, Claggett B, Desai AS, et al.: Influence of ejection fraction on outcomes and efficacy of sacubitril/valsartan (LCZ696) in heart failure with reduced ejection fraction: The Prospective Comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and Morbidity in Heart Failure (PARADIGM-HF) Trial. Circ Heart Fail 2016; 9: e002744. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002744.

46. Hodnotenie vybraných parametrov kardiovaskulárního rizika a ambulantního monitoringu tlaku krvi po transplantácii obličky

MUDr. Michaela Javorková
(vnútorné lekárstvo)

Školiteľ: Doc. MUDr. Zuzana Žilinská, PhD., MPH, MHA[1]
[1]Klinika nefrológie a transplantácii obličiek LFUK a UNB, Bratislava, [2]V. Interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

Úvod

Artériová hypertenzia zohráva kľúčovú úlohu v kardiovaskulárnej morbidite a mortalite pacientov po transplantácii obličky. Predstavuje významný nezávislý rizikový faktor v procese aterosklerózy a s tým súvisiacimi vaskulárnymi komplikáciami, hypertrofii ľavej komory srdca, srdcového zlyhávania, koronárnej choroby srdca a celkovej kardiovaskulárnej mortality (1). U pacientov po transplantácii obličky predstavuje koronárna choroba srdca najčastejšiu príčinu mortality a druhú najčastejšiu príčinu straty štepu. V snahe znížiť kardiovaskulárne riziko v po transplantačnom období je identifikácia a liečba rizikových faktorov artériovej hypertenzie kľúčová. Vzhľadom na vysokú mieru výskytu abnormálnych cirkadiánnych rytmov a patologických fenotypov artériovej hypertenzie v období po transplantácii obličky predstavuje 24 - hodinový monitoring tlaku krvi metódou podľa Holtera optimálny nástroj na hodnotenie artériovej hypertenzie (1,2).

Materiál a metódy

Hodnoty sledovaných parametrov sme zaznamenávali do tabuľky v programe MS Excel, vytvorili sme databázu pacientov, z ktorej sme tvorili tabuľky, grafy a získavali údaje pre ďalšie analýzy. Aplikovali sme metódy deskriptívnej štatistiky, prostredníctvom štatistických vzorcov sme vypočítali aritmetické priemery, mediány, minimálne a maximálne rozpätia pre jednotlivé sledované parametre. Pri štatistickom spracovaní bol použitý certifikovaný štatistický program MedCalc verzia 13.1.2. Použili sme Studentov t-test. Uvedené klinické a výskumné aktivity sú v súlade s princípmi Istanbulskej deklarácie, ktoré sú stanovené v Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism.

V súbore sme prospektívne monitorovali 50 pacientov, ktorí podstúpili transplantáciu obličky v období od 4. 1. 2022 do 1. 2. 2024. S ohľadom na zmenu v organizácii transplantačného centra pre obličky v Univerzitnej nemocnici Bratislava boli pacienti zaradení do štúdie monitorovaní v období od 4. 1. 2022 do 30. 10. 2023 na Urologickej klinike s Centrom pre transplantácie obličiek LFUK, SZU a UNB, následne od 1. 11. 2023 do 1. 2. 2024 na Klinike nefrológie a transplantácii obličiek LFUK a UNB.

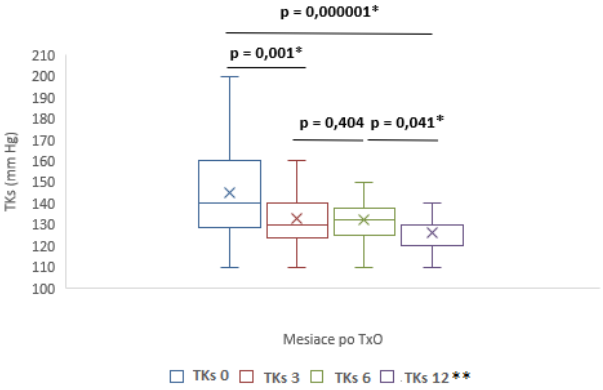
Výsledky

Sledované parametre	Vstupne	M3	*p (V vs. M3)*	M6	*p (M3 vs. M6)*	M12	*p (M6 vs. M12)*	*p (V vs. M12)*
Celkový počet pacientov	50	50		50		50		
Hb (g/l)	118	126	*0,004*	134	*0,01*	139	*0,12*	*0,000000001*
KM (µmol/l)	361	332	*0,011*	333	*0,479*	332	*0,477*	*0,024*
PTH (pg/ml)	469	206	*0,00009*	169	*0,249*	145	*0,317*	*0,00002*
eGF (ml/s/1,73 m2)	0,1	0,84	*NA**	0,94	*0,111*	1,03	*0,189*	*NA**
Krea (µmol/l)	753	153,9	*NA**	137	*0,144*	126	*0,227*	*NA**
KVP (g/24 hod)	3,17	0,26	*NA**	0,27	*0,464*	0,22	*0,337*	*NA**
Sledované parametre	Vstupne	M3	*p (V vs. M3)*	M6	*p (M3 vs. M6)*	M12	*p (M6 vs. M12)*	*p (V vs. M12)*
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,64			2,58	*0,266*	2,9	*0,326*	*0,478*
TAG (mmol/l)	2,44			2,12	*0,00001*	1,9	*0,05*	*0,00001*
RI v TxO	0,75	0,75	*0,348*	0,75	*0,389*	0,76	*0,352*	*0,438*
BMI (kg/m2)	25,8	25,9		25,4		24,6		*0,078*
Porucha metabolizmu glycidov (spolu)	50					44		*0,5*
Bez DM	40					29		
DM 1. typ	4					4		
DM 2. typ	6					11		
PGT	0					6		
Pacienti s AH (n)	46	47		45		43		
Počet antihypertenzív (spolu)	147	165		132		96		
0	4	3		5		7		
1	3	9		10		13		
2	15	13		12		15		
3	14	8		7		10		
4	5	8		8		2		

5 a viac	9	9		8		3		
TKs ABPM (mmHg)	143	132	*0,001*	136	*0,404*	126 **	*0,041*	*0,000001*
KV komplikácie (spolu)	22					38		*0,001*
Hypertenzná urgencia	4					7		
Fibrilácia predsiení	4					7		
ICHS	11					15		
STEMI	0					2		
NSTEMI	0					1		
NAP	0					1		
NCMP	3					5		
EF ĽK (%)	59					64		*0,0001*
Luminex (n)	50	50		50		50		
Negat.	36	35		35		34		
Non-DSA	4	5		5		5		
DSA	10	10		10		11		

Tabuľka 1 Výsledky v sledovanom súbore pacientov

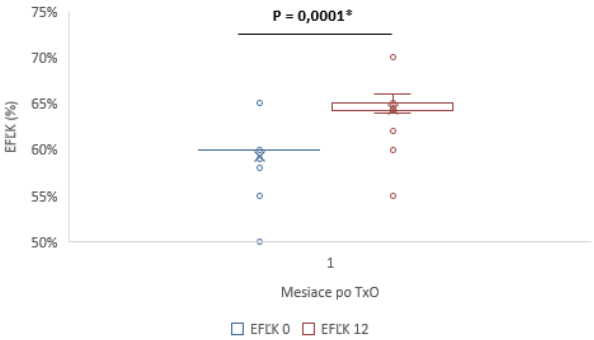
*Skratky: TxO, transplantácia obličky; M3, 3 mesiace po TxO; vs., versus; V, parametre pred TxO; M6, 6 mesiacov po TxO; M12, 12 mesiacov po TxO; Hb, hemoglobín; KM, kyselina močová; PTH, parathormón; eGF, odhadovaná glomerulárna filtrácia; krea, kreatinín; KVP, kvantitatívna proteinúria; LDL lipoproteín s nízkou denzitou; TAG, triacylglyceroly; RI, index rezistencie; BMI, body mass index; DM, diabetes mellitus; AH, antihypertenzíva; TKs, systolická zložka tlaku krvi; ABPM, 24-hodinový monitoring tlaku krvi metódou podľa Holtera; **, hodnota TK meraná počas kontroly v ambulancii; KV, kardovaskulárne; ICHS, ischemická choroba srdca; STEMI, infarkt myokardu s ST eleváciami; NSTEMI, infarkt myokardu bez ST elevácií; NAP, nestabilná angina pectoris; NCPM, náhla cievna mozgová príhoda; EFĽK, ejekčná frakcia ľavej komory; DSA, donor špecifické protilátky; NA*, neporovnateľné údaje*



Graf 1 Systolický tlak krvi v prvom roku po transplantácii obličky

**p < 0,05 štatisticky významný t-test*

*Skratky: TKs 0, systolický TK počas 24-hodinového monitoringu TK metódou podľa Holtera v 1. týždni po TxO; TKs 3, systolický TK počas 24-hodinového monitoringu TK metódou podľa Holtera v 3. mesiaci po TxO; TKs 6, systolický TK počas 24-hodinového monitoringu TK metódou podľa Holtera v 6. mesiaci po TxO; TKs 12 **, systolická zložka TK počas merania tlaku v ambulancii v 12. mesiaci po transplantácii obličky; TxO, transplantácia obličky*



Graf 2 EF ĽK v prvom roku po transplantácii obličky

**p < 0,05 štatisticky významný t-test*

Skratky: EFĽK 0, ejekčná frakcia ľavej komory pred TxO; EFĽK 12, ejekčná frakcia ľavej komory 12 mesiacov po TxO; TxO, transplantácia obličky

Diskusia

Artériová hypertenzia je v skupine pacientov po transplantácii obličky podľa dostupnej literatúry prítomná u 70 – 90 % pacientov (3). Ako artériovú hypertenziu po transplantácii obličky sme hodnotili tlak krvi > 130/80 mm Hg alebo užívanie aspoň jedného antihypertenzíva denne v chronickej medikácii podľa KDIGO odporúčaní z roku 2021 (4). V sledovanom súbore pacientov bola artériová hypertenzia v pred transplantačnom období prítomná u 92 % pacientov, na konci prvého roka po transplantácii obličky sme zaznamenali pokles incidencie na 86 %. Podobný trend sme zaznamenali v spotrebe antihypertenzívnej medikácie. Kým vstupne pred transplantáciou obličky bol súčet užívaných antihypertenzív v sledovanom súbore 147, na konci prvého roka po transplantácii obličky klesol súčet celkového počtu antihypertenzív na 96, čo predstavuje zníženie o 35 % v porovnaní so vstupnými parametrami. V rámci analýzy sme preukázali najvýznamnejší pokles v počte pacientov, ktorí užívali viac ako 3 - kombinácie antihypertenzív.

Hodnotením 24 - hodinového monitoringu tlaku krvi metódou podľa Holtera sme v sledovanej skupine pacientov preukázali štatisticky významný pokles systolického tlaku krvi 3 mesiace po transplantácii obličky oproti hodnotám zisteným v druhom týždni. Počas prvého roka sme zaznamenali pokles počtu abnormálnych cirkadiánnych rytmov, porovnaním hodnôt tlaku krvi v 1. a 6. mesiaci po transplantácii obličky sme zaznamenali pokles počtu non-dipperov o 8 % a pokles počtu reverzných dipperov o 4 %. Normálny dippingový status bol na konci prvého roka po transplantácii obličky prítomný u 10 pacientov, čo predstavuje úpravu cirkadiánneho rytmu u 12 % pacientov.

Publikované štúdie, ktoré sa venovali echokardiografickým zmenám v období po transplantácii obličky preukázali pozitívny vplyv transplantácie obličky na zníženie hypertrofie ľavej komory srdca, zlepšenie systolickej aj diastolickej funkcie ľavej komory počas prvých 6 mesiacov po transplantácii obličky a preukázali lineárny vzťah medzi vzostupom hodnôt hemoglobínu a funkciou ľavej komory srdca (5,6). Pri porovnaní echokardiografických nálezov v období pred transplantáciou obličky a na konci prvého roka po transplantácii obličky sme v sledovanom súbore potvrdili zníženie výskytu hypertrofie ľavej komory srdca, v rámci koncentrickej hypertrofie ľavej komory srdca sme zaznamenali pokles v incidencii o 69 % a pokles excentrickej formy hypertrofie ľavej komory o 70 %. Zaznamenali sme štatisticky významné zlepšenie na úrovni systolickej funkcie ľavej komory srdca v prvom roku po transplantácii obličky a významné zlepšenie aj na úrovni diastolickej funkcie ľavej komory srdca a dilatácie ľavej predsiene srdca.

Na základe výsledkov v sledovanom súbore pacientov sme preukázali štatisticky významné zlepšenie kompenzácie sekundárnej anémie, sekundárnej hyperurikémie, hyperparatyreózy, metabolizmu triglyceridov, sekundárnej artériovej hypertenzie a s tým súvisiace zlepšenie echokardiografických nálezov, predovšetkým systolickej funkcie ľavej komory srdca, zmien geometrie ľavej komory srdca v zmysle redukcie hypertrofie ľavej komory a dilatácie ľavej predsiene v prvom roku po transplantácii obličky v porovnaní so vstupnými parametrami pred transplantáciou obličky. Zaznamenali sme pozitívny trend v poklese incidencie abnormálnych cirkadiánnych rytmov a množstve užívanej antihypertenzívnej liečby. Štatisticky nevýznamnými boli v sledovanom súbore zmeny na úrovni BMI, LDL-cholesterolu a indexu rezistencie renálnej artérie v štepe pri duplexnom Dopplerovskom vyšetrení. Zaznamenali sme štatisticky významné zmeny na úrovni metabolizmu glycidov v zmysle nárastu počtu pacientov s poruchami glukózovej tolerancie a diabetes mellitus 2. typu, čo koršeponduje so

známymi údajmi zo svetovej literatúry. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že transplantácia obličky vedie k zlepšeniu kompenzácie artériovej hypertenzie, zlepšeniu metabolického profilu a echokardiografických nálezov pacientov. Kardiovaskulárne riziko v po transplantačnom období pretrváva aj napriek odstráneniu niektorých rizikových faktorov, manažment pacientov sa pre neprítomnosť špecifických odporúčaní pre pacientov po transplantácii obličky vo veľkej mierne opiera o skúsenosti transplantačných centier. V snahe minimalizovať kardiovaskulárne riziko u pacientov po transplantácii obličky sa odporúča dlhodobo udržiavať systolický tlak krvi pod 140 mm Hg, včas iniciovať liečbu dyslipidémie, dbať na skorý skríning a liečbu porúch metabolizmu glycidov, venovať pozornosť prevencii a liečbe obezity a individualizovať imunosupresívnu liečbu s ohľadom na prípadné komorbidity pacienta.

Zoznam použitej literatúry

1. Birdwell K, Meyeon P.: Post-Transplant Cardiovascular Disease. In *CJASN* . 2021. Dec. 16(12):p 1878-1889.
2. Williams B., Mancia G, Spiering W. et al.: ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. In *J Hypertens*. 2018. 36:1953–2041.
3. Korogiannou M., Sarafidis P: Diagnostic Performance of Office versus Ambulatory Blood Pressure in Kidney Transplant Recipients. In *Am J Nephrol.* 2021. 52:548–558.
4. KIDNEY DISEASE: Improving Global Outcomes (KDIGO) Blood Pressure Work Group. 2021. KDIGO. Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. In *Kidney Int.* 2021. 99:S1–S87.
5. Hart A, Wir M, Kasisske B.: Cardiovascular risk assessment in kidney transplantation. In *Kidney Int.* 2015. 87(3):527–34.
6. Jhinger M, Sohal P.M, Makkar V: Changes in Cardiac Structure and Function Before and After Renal Transplantation: A Longitudinal Study. In *Transplantation Proceedings.* 2021. Vol 53.3. 0041-1345.

47. Vybrané neuropsychiatrické aspekty idiopatického normotenzného hydrocefalu: pilotná štúdia.

MUDr. Simona Holkovičová
(neurológia)

Školiteľ: doc. MUDr. Igor Straka, PhD.
II. neurologická klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

Idiopatický normotenzný hydrocefalus (iNPH) je špecifická forma komunikujúceho hydrocefalu a predstavuje potenciálne liečiteľné neurodegeneratívne ochorenie (1). Je charakterizovaný nadmerným hromadením cerebrospinálneho moku (CSF) v mozgových komorách pri normálnom tlaku (70–200 mm H_2O) s typickým klinickým obrazom Hakimovej triády: poruchy chôdze, inkontinencia moču a kognitívny deficit (2). Napriek tomu, že bol iNPH opísaný už v 60. rokoch 20. storočia, jeho skutočná prevalencia zostáva nejasná. Veľké populačné štúdie naznačujú, že iNPH môže postihovať až 3,7 % osôb starších ako 65 rokov (3). Patofyziológia iNPH nie je úplne objasnená (4, 5). Súčasné poznatky poukazujú na zmeny v dynamike CSF a mozgovej mikrocirkulácie, ktoré vedú k ventrikulomegálii a poškodeniu periventrikulárnych oblastí. To môže narušiť integritu bielej hmoty a funkciu frontálnych lalokov, čo sa prejavuje poruchami správania, nálady, exekutívnych funkcií a emočnej regulácie (6, 7). Difúzne poškodenie bielej hmoty zároveň negatívne ovplyvňuje motoriku aj kognitívne schopnosti (8). Diagnostika iNPH je komplikovaná kvôli symptomatickému prekrytiu s inými neurodegeneratívnymi ochoreniami a rozdielom v diagnostických kritériách medzi západnými a japonskými odporúčaniami (9, 10). Okrem motorických symptómov sa často vyskytujú aj kognitívne a neuropsychiatrické poruchy, napr. bradyfrenia, apatia, depresia či emočná dysregulácia (11). Cieľom našej pilotnej štúdie bolo zhodnotiť neuropsychiatrické aspekty iNPH v rôznych štádiách ochorenia a posúdiť ich súvislosť s emocionálnou pohodou a celkovou kvalitou života. Na rozdiel od predchádzajúcich výskumov, ktoré zdôrazňovali prevažne motorické a kognitívne symptómy, naša práca poukazuje na nedostatočne preskúmané emocionálne a psychosociálne dimenzie iNPH s použitím komplexného súboru štandardizovaných nástrojov.

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 15 pacientov s diagnózou iNPH a ich opatrovateľov, ktorí spĺňali diagnostické kritériá pre iNPH podľa Relkin et al. (4). Všetci pacienti boli sledovaní v Centre pre extrapyramídové ochorenia II. neurologickej kliniky LF UK a UNB. Exklúzne kritéria zahrňovali organické poškodenie mozgu potvrdené na MR (napr. traumatické, encefalopatia); iné typy hydrocefalu (sekundárny alebo obštrukčný hydrocefalus); aktívne malignity; závažné psychiatrické komorbidity; abúzus alkoholu alebo drog; závažné systémové ochorenia (napr. pokročilé srdcové alebo obličkové zlyhanie); nedostatočná spolupráca pacienta a/alebo jeho

rodiny. Vzťah implantácie VP shuntu na kvalitu života a emocionálne zdravie bol u pacientov hodnotený prostredníctvom štandardizovaných dotazníkov:

Dotazník kvality života WHOQOL-BREF: Nástroj vyvinutý WHO na hodnotenie kvality života v oblastiach fyzického a psychického zdravia, sociálnych vzťahov a životného prostredia.

DAS (Dimensional Apathy Scale): Hodnotí apatiu v troch oblastiach – exekutívnej, emocionálnej a iniciačnej.

SCL-90 (Symptom Checklist-90): Sebahodnotiaci dotazník na meranie psychických symptómov a stresu v deviatich dimenziách, vrátane depresie, úzkosti a somatizácie.

GAD-7 (Generalized Anxiety Disorder-7): Skríningový dotazník na hodnotenie závažnosti generalizovanej úzkosti.

PHQ-9 (Patient Health Questionnaire-9):Deväť položkový dotazník na skríning depresívnych symptómov podľa DSM-IV.

CFQ (Cognitive Failures Questionnaire): Zameraný na frekvenciu každodenných kognitívnych zlyhaní v oblasti pamäti, vnímania a motorickej kontroly.

Na objektívne hodnotenie kognície boli použité testy MoCA (Montreal Cognitive Assessment) a FAB (Frontal Assessment Battery).

Na hodnotenie apatie pacientov z pohľadu opatrovateľov bol použitý 24-položkový dotazník **Dimensional Apathy Scale (DAS)**, ktorý rozlišuje exekutívnu, emočnú a iniciačnú apatiu (21). Miera záťaže opatrovateľov bola posudzovaná pomocou **Zarit Caregiver Burden Interview (ZBI)**, ktorý hodnotí dopad starostlivosti na psychickú pohodu, vzťahy, financie a spoločenský život opatrovateľa.

Údaje boli analyzované v programe IBM SPSS Statistics (verzia 26) pomocou deskriptívnej štatistiky, Spearmanovej korelácie a neparametrických testov (Mann-Whitneyho U, Wilcoxonov test). Praktická významnosť rozdielov bola posudzovaná pomocou Cohenovho d koeficientu s korekciou na veľkosť skupín.

Výsledky

Štúdie sa zúčastnilo 15 pacientov s diagnostikovaným iNPH (5 žien, priemerný vek=73,1; SD=3,96). Subjektívne poruchy kognície, chôdze a inkontinencie uviedlo 86,7% pacientov, pričom poruchy chôdze boli objektívne potvrdené u všetkých participantov. Na základe MoCA skóre pod 26 bodov bolo možné kognitívny deficit predpokladať u 86,7 % pacientov. Osem pacientov malo zavedený VP shunt, priemerný čas od implantácie bol 3,13±1,73 roka. Úroveň apatie a záťaže opatrovateľov hodnotilo 15 blízkych osôb (10 manželov/manželiek, 4 dcéry, 1 priateľ), vo veku 41–78 rokov (priemer=63,5; SD=11,9).

Tabuľka 1: Rozdiely v úrovni skúmaných premenných v závislosti od implantácie VP shuntu.

	VP shunt Medián (IQR)				
	Nie	Áno	U	p	*d*
Somatizácia (0-4)	0.75 (0.3-1.4)	0.46 (0.3-0.7)	20.0	0.352	0.492
Obsesie-kompulzie (0-4)	1.23 (0.9-1.8)	0.65 (0.5-1.2)	9.5	0.031	1.327
Interpersonálna citlivosť (0-4)	0.89 (0.4-1.6)	0.48 (0-1.1)	15.5	0.147	0.805
Depresia (0-4)	1.13 (0.6-1.6)	0.23 (0.2-1.0)	10.0	0.036	1.276
Anxieta (0-4)	0.67 (0.5-1.5)	0.23 (0-0.5)	10.5	0.042	1.227
Hostilita (0-4)	0.50 (0.3-1.0)	0.40 (0.2-0.7)	21.0	0.408	0.428
Fobická anxiety (0-4)	0.52 (0-1.3)	0.14 (0-1.0)	20.5	0.375	0.460
Paranoidné ideácie(0-4)	0.67 (0.5-1.0)	0.33 (0-0.5)	8.0	0.018	1.491
Psychoticizmus (0-4)	0.40 (0-0.5)	0.15 (0-0.3)	19.0	0.285	0.558
Global Severity Index (0-4)	0.90 (0.5-1.1)	0.30 (0.2-0.8)	10.5	0.042	1.227
GAD-7 (0-21)	4.75 (3-7)	1.50 (0-3.8)	10.0	0.035	1.276
PHQ-9 (0-29)	7.67 (5-11)	5.00 (1.3-8.5)	15.5	0.147	0.805
Apatia (0-72)	38.00 (30-42)	29.00 (27.3-39.3)	19.0	0.297	0.558
Apatia – opatrovateľ (0-72)	31.00 (25-44)	34.33 (23.5-41.5)	26.0	0.816	0.004
Kognitívne zlyhania (0-100)	25.00 (20-48)	19.00 (7.3-27.8)	13.5	0.093	0.961
MoCA (0-30)	21.00 (19-23)	22.33 (19.5-25.0)	24.5	0.683	0.210
Fyzické zdravie (0-20)	11.43 (9.7-14.9)	14.71 (12.6-16.4)	17.0	0.197	0.696
Psychické zdravie (0-20)	11.56 (10.7-14.0)	13.17 (12.7-16.5)	12.0	0.062	1.089
Sociálne vzťahy (0-20)	14.00 (12.0-16.0)	16.27 (14.0-17.3)	18.0	0.235	0.626
Prostredie (0-20)	13.00 (10.5-16.5)	15.33 (14.6-16.8)	15.5	0.147	0.805
Kvalita života (0-130)	77.00 (72-101)	92.50 (85.3-108.0)	14.0	0.105	0.921
Záťaž opatrovateľa (0-88)	15.00 (0-34)	12.00 (7.3-23.3)	28.0	1.000	0

Zo zvyšujúcou sa úrovňou depresie (rs=-0,69, p=0,004), úzkosti (rs=-0,67, p=0,006), fóbickej úzkosti (rs=-0,66, p=0,008) a paranoidných predstáv (rs=-0,66, p=0,008) sa znižuje kvalita života (QoL). Medzi premennými sa zistil silný vzťah s rs > 0,60. Celkové skóre QoL korelovalo aj s apatiou (rs=-0,71, p=0,003), skóre v skríningu PHQ-9 (rs=-0,61, p=0,016), GAD-7 (rs=-0,68, p=0,005) a MoCA (rs=-0,60, p=0,018). Vzťah medzi QoL a apatiou hodnotenou blízkym príbuzným (rs=-0,36, p=0,187), ako aj vnímanou záťažou opatrovateľa bol nízky (rs=-0,29, p=0,290). V Tabuľke 2 uvádzame hodnoty korelačných koeficientov pre jednotlivé dimenzie QoL.

Na základe hraničného skóre stanoveného pre slovenskú populáciu sme identifikovali najčastejšie oblasti psychiatrických a behaviorálnych problémov u pacientov s iNPH. Zvýšená miera obsedantno-kompulzívneho správania bola prítomná u 46,7% pacientov. Zvýšenú depresívnu symptomatiku uviedlo 40% pacientov. Tendencia k obsesívno-kompulzívnemu správaniu sa u 60 % pacientov prejavovala ako neznášanlivosť voči povrchnosti a nedbanlivosti. Tretina pacientov uvádzala nerozhodnosť a nutkavé obavy o svoju pamäť a myslenie. Depresívne zážitky sa najvýraznejšie prejavovali pocitmi nedostatku energie (67%), nadmernými obavami (33%) a pocitmi skľúčenosti a smútku (27%). Kognitívne poruchy v každodennom živote sa u pacientov prejavovali predovšetkým neschopnosťou vybaviť si správne slová (73%), zníženou schopnosťou rozhodovania (60%), zabúdaním (53%) a ťažkosťami so sústredením sa na mená ľudí (60%). Subjektívne vnímanie kognitívnych funkcií slabo korelovalo s objektívnym hodnotením výkonu prostredníctvom skríningu MoCA (rs=0,27, p=0,34).

Vnímanú záťaž vyplývajúcu zo starostlivosti o pacienta s iNPH uviedlo 36% opatrovateľov. Najvýznamnejšími ukazovateľmi zvýšenej záťaže opatrovateľa sú obavy o budúcnosť (60%), nadmerná zodpovednosť (40%) a závislosť pacienta od ich podpory (40%). Rozdiel v hodnotení apatie medzi pacientom a opatrovateľom nebol významný (p=0,691).

Účastníci bez implantácie VP shuntu dosiahli významne vyššie skóre (d=1,227 - 1,491) v dimenziách obsesie-kompulzie, depresie, úzkosti a paranoidných predstáv. Pacienti bez VP shuntu tiež uvádzali horšiu kvalitu života (d=0,921). Výsledky porovnávacej analýzy sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 2: Korelácie medzi premennými v štúdii

	Kvalita života	Fyzické zdravie	Psychické zdravie	Sociálne vzťahy	Prostredie
Somatizácia	-0.36	-0.32	-0.45	-0.04	-0.31
Obsesie-kompulzie	-0.52*	-0.45	-0.65**	-0.18	-0.31
Interpersonálna citlivosť	-0.59*	-0.45	-0.66**	-0.31	-0.50
Depresia	-0.69**	-0.59*	-0.78**	-0.39	-0.57*
Anxieta	-0.67**	-0.51	-0.81**	-0.41	-0.56*
Hostilita	-0.45	-0.34	-0.34	-0.47	-0.30
Fobická anxiety	-0.66**	-0.66**	-0.70**	-0.27	-0.53*
Paranoidné ideácie	-0.66**	-0.59*	-0.67**	-0.56*	-0.61*
Psychoticizmus	-0.49	-0.33	-0.58*	-0.42	-0.40
Global Severity Index	-0.65**	-0.52*	-0.74**	-0.36	-0.53*
GAD-7	-0.68**	-0.53*	-0.81**	-0.54*	-0.52*
PHQ-9	-0.61*	-0.62*	-0.63*	-0.26	-0.43
Apatia	-0.71**	-0.73**	-0.59*	-0.56*	-0.67**
Apatia (opatrovateľ)	-0.36	-0.38	-0.21	-0.35	-0.19
Kognitívne zlyhania	-0.24	-0.16	-0.34	0.04	-0.03
MoCA	0.60*	0.68**	0.42	0.47	0.62*
Záťaž opatrovateľa	-0.29	-0.41	-0.17	-0.17	-0.14
*p<0.05, **p<0.01					

Diskusia

Táto pilotná štúdia prináša nový pohľad na neuropsychiatrické symptómy, kognitívne funkcie, behaviorálne prejavy a kvalitu života (QoL) u pacientov s iNPH. Zatiaľ čo predchádzajúce výskumy sa zameriavali najmä na motorické a kognitívne prejavy iNPH, naše zistenia poukazujú na dôležitosť emocionálnych a psychologických aspektov ochorenia, ktoré sú často podceňované. Zistili sme, že až 40% pacientov vykazovalo symptómy zodpovedajúcej depresii, pričom najčastejšie uvádzané ťažkosti zahŕňali nedostatok energie (67%), nadmerné obavy (33%) a pocity skľúčenosti (27%). Tieto údaje sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami (12). Okrem depresie sme zaznamenali aj prítomnosť ďalších neuropsychiatrických symptómov, najmä obsedantno-kompulzívne správanie (46,7%), ktoré sa prejavovalo zvýšenou neznášanlivosťou voči povrchnosti a nedbalosti. Taktiež sme pozorovali časté kognitívne zlyhania v každodennom živote, najmä v zmysle ťažkosti s vybavovaním slov (73%), zníženú flexibilitu pri rozhodovaní (60%), zabúdanie (53%) a problémy so zapamätaním si mien (60%). Nízka korelácia medzi subjektívnymi ťažkosťami a výkonom v MoCA naznačuje, že pacienti nemusia mať dostatočný náhľad na svoj kognitívny deficit. Tento rozpor medzi

sebahodnotením a objektívnym meraním môže súvisieť so zníženým sebauvedomením, typickým pre MCI či demenciu, a prameniť z anozognózie alebo dysfunkcie frontálneho laloku (26). Z našej analýzy vyplynulo, že depresia bola jedným z najvýznamnejších prediktorov zníženej kvality života (rs=–0,69; p=0,004). Výrazná bola aj negatívna korelácia medzi QoL a úrovňou úzkosti, fóbickej úzkosti, paranoidných predstáv a apatie. Tieto výsledky potvrdzujú, že psychický stav pacienta významne ovplyvňuje jeho subjektívne vnímanie života a celkovú funkčnú kapacitu. Zaujímavým zistením bol vplyv VP shuntovania na neuropsychiatrické príznaky. Pacienti bez VP shuntu vykazovali vyššie skóre v oblastiach obsedantno-kompulzívneho správania, depresie, úzkosti a paranoje v porovnaní s pacientmi so zavedeným VP shuntom. Rovnako bola QoL výrazne nižšia u pacientov bez implantovaného shuntu. Treba však poznamenať, že naša štúdia nemá longitudinálny dizajn, a preto nemožno s istotou určiť dlhodobú stabilitu pozorovaných efektov. V súlade s literatúrou (13, 14, 15) sú výsledky týkajúce sa vplyvu VP shuntovania na psychiatrické symptómy rozporuplné. Niektoré štúdie preukázali trvalé zlepšenie psychického stavu, iné uvádzajú len dočasné zlepšenie alebo žiadny efekt. Tieto rozpory môžu byť spôsobené rozdielmi v metodológii, sledovanom období, rozsahu kognitívneho poškodenia či odlišnej definícii psychopatologických prejavov. Záťaž opatrovateľov si taktiež vyžaduje osobitnú pozornosť. V našej vzorke uviedlo 36% opatrovateľov významný stres súvisiaci so starostlivosťou o pacienta s iNPH, pričom najčastejšími stresormi boli obavy o budúcnosť (60%), nadmerná zodpovednosť (40%) a závislosť pacienta od ich podpory (40%). Zaujímavé je, že hodnotenie apatie medzi pacientmi a opatrovateľmi sa významne nelíšilo (p=0,691). Apatia sa v našej vzorke ukázala ako častý, ale často podceňovaný symptóm, ktorý výrazne vplýva na funkčnosť, ak aj na celkovú QoL. Hoci zlepšenie motorických funkcií po VP shunte môže viesť k väčšej nezávislosti pacienta, pretrvávajúce kognitívne a psychické symptómy môžu naďalej predstavovať významnú záťaž pre opatrovateľa.

Záver

Záverom možno konštatovať, že výsledky našej pilotnej štúdie podporujú predpoklad, že implantácia VP shuntu môže priaznivo ovplyvniť nielen motorické, ale aj kognitívne a psychiatrické prejavy iNPH. Zaradenie hodnotenia psychického stavu a kvality života do rutinného klinického vyšetrenia by mohlo prispieť k zlepšeniu starostlivosti o pacientov a pozitívne ovplyvniť aj ich celkový zdravotný stav a pohodu opatrovateľov.

Zoznam použitej literatúry

1. Graff-Radford NR, Jones DT. Normal pressure hydrocephalus. Continuum (Minneap Minn). 2019;25(1):165-186.
2. Xiao H, Hu F, Ding J, Ye Z. Cognitive Impairment in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. Neurosci Bull. 2022 May 15;38(9):1085–96.
3. Andersson J, Rosell M, Kockum K, Lilja-Lund O, Söderström L, Laurell K. Prevalence of idiopathic normal pressure hydrocephalus: A prospective, population-based study. Burger MC, editor. PLoS ONE. 2019 May 29;14(5):e0217705.
4. Relkin N, Marmarou A, Klinge P, Bergsneider M, Black PMcL. Diagnosing Idiopathic Normal-pressure Hydrocephalus. Neurosurgery. 2005 Sep 1;57(suppl_3):S2-4-S2-16.

5. Mori E, Ishikawa M, Kato T, Kazui H, Miyake H, Miyajima M, et al. Guidelines for management of idiopathic normal pressure hydrocephalus: Second edition. Neurol Med Chir(Tokyo) 2012, 52: 775–809.
6. Miyoshi N, Kazui H, Ogino A, Ishikawa M, Miyake H, Tokunaga H, Ikejiri Y, Takeda M. Association between cognitive impairment and gait disturbance in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. Dement Geriatr Cogn Disord. 2005;20:71–76. doi: 10.1159/000085858
7. Picascia M, Minafra B, Zangaglia R, Gracardi L, Pozzi NG, Sinforiani E, et al. Spectrum of cognitive disorders in idiopathic normal pressure hydrocephalus. Funct Neurol 2016, 31: 143–147.
8. Hellström P, Klinge P, Tans J, Wikkelsø C. The neuropsychology of iNPH: Findings and evaluation of tests in the European multicentre study. Clinical Neurology and Neurosurgery. 2012 Feb 1;114(2):130–4.
9. Luikku AJ, Hall A, Nerg O, Koivisto AM, Hiltunen M, Helisalmi S, et al. Predicting Development of Alzheimer's Disease in Patients with Shunted Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. JAD. 2019 Oct 15;71(4):1233–43.
10. Mattoli MV, Treglia G, Calcagni ML, Mangiola A, Anile C, Trevisi G. Usefulness of Brain Positron Emission Tomography with Different Tracers in the Evaluation of Patients with Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. IJMS. 2020 Sep 7;21(18):6523.
11. Hülser M, Spielmann H, Oertel J, Sippl C. Motor skills, cognitive impairment, and quality of life in normal pressure hydrocephalus: early effects of shunt placement. Acta neurochirurgica. 2022;164(7):1765–75.
12. Israelsson H, Allard P, Eklund A, Malm J. Symptoms of Depression are Common in Patients With Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: The INPH-CRasH Study. Neurosurgery. 2016 Feb;78(2):161–8.
13. Ogino, A., Kazui, H., Miyoshi, N., Hashimoto, M., Ohkawa, S., Tokunaga, H., Takeda, M. Cognitive Impairment in Patients with Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders. 2006; 21(2), 113–119. doi:10.1159/000090510
14. Bugalho, P., Alves, L., Miguel, R., & Ribeiro, O. Profile of cognitive dysfunction and relation with gait disturbance in Normal Pressure Hydrocephalus. Clinical Neurology and Neurosurgery. 2014 118, 83–88.doi:10.1016/j.clineuro.2014.01.006
15. Oliveira MF, Oliveira JRM, Rotta JM et al. Psychiatric symptoms are present in most of the patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. Arq Neuropsiquiatr 2014; 72 (6): 435–438. doi: 10.1590/0004-282x20140047.

Obsah

Samuel Bílek 11
Vladimír Harvan 19
Martina Fričová 26
Ondrej Tomášik 32
Dominik Melich 38
Abdulhamid Haydarov 43
Mária Lojová 46
Tomáš Bezák 52
Martin Vrždiak 58
Marek Ujpál 66
Matej Kühnel 71
Juraj Hutník 77
Steven Arthur Calle 82
Dominika Stoláriková 88
Nikola Janoštiaková 94
Mgr. Dominik Kodada 101
Mgr. Aneta Ševčíková 121
MUDr. Alena Trtolová 131
MDDr. Alexandros Tzigeris 136
PharmDr. Orsolya Hrubá 157
Pendar Donyawie 163
Simon Michael Strünck 170
Benjamin Mimler 176
Yelyzaveta Yatsyk 182
Mgr. Paulína Belvončíková 188
Mgr. Natália Andová 196
Mgr. Michaela Kardohelyová 202
RNDr. Gabriela Bľandová 210
Mgr. Petronela Sušienková 216
Mgr. Emma Skybová 223
MUDr. Mária Szighardtová 229
Mgr. Nikola Tóthová 236
Emil Bečka 244

Mgr. Filip Baran 251
MUDr. Liam McCullough 256
MUDr. Adriána Goldbergerová 261
MUDr. Dominika Kotríková 267
MUDr. Diana Štrbová 272
MUDr. Jakub Daniš 276
MUDr. Simona Rusnáková 282
MUDr. David Čmejrek 288
MUDr. Lukáš Kučera 296
MUDr. Michaela Javorková 304
MUDr. Simona Holkovičová 310

Zborník študentských vedeckých prác 2025
63. fakultná konferencia študentskej vedeckej odbornej činnosti
XX. vedecká konferencia doktorandov LF UK

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2025
Za jazykovú korektúru (jazykovú a gramatickú stránku príspevku) zodpovedajú autori
Technická redakcia, návrh obálky: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.

Rozsah 319 strán, 19.9 AH, prvé vydanie
Vyšlo ako elektronická publikácia