



# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry  
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

**Číslo 1/2017**

Ročník XXII.



# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry  
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

**Číslo 1/2017**

Ročník XXII.

## PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Oliver Rác

## REDAKČNÁ RADA

Ján Balla  
Darína Behúlová  
Pavel Blažíček  
Marta Dobáková  
Michal Farkaš  
Vladimír Heriban  
Marko Kapalla  
Katarína Lepejová  
Angela Molčányová  
Ingrid Schusterová  
Július Špaňár  
Ladislav Turecký

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS  
Povolené Ministerstvom Kultúry SR pod reg. č. 1531/96

ISSN 1335-2644

# OBSAH

LEPEJ, J., LEPEJOVÁ, K., MAJERNÍK, J., ŠOLTÉS, P.: TELEMEDICÍNA – BLÍZKOSTĚ NA DIAVKU? .....	5
MAREKOVÁ, M., RABAJDOVÁ, M., URBAN, P., ŠPAKOVÁ, I., RÁCZ, O., SOBOLOVÁ, V., NAGY, V.: DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL MiRNA PRI PROGRESII UROTELIÁLNEHO KARCINÓMU .....	11
ZALEJSKA-FIOLKA J., HUBKOVÁ B., BIRKOVÁ A., VELIKÁ B., BŁASZCZYK U., ĎUROVCOVÁ E.: MONITORING ÚČINNOSTI TERAPIE OBEZITY VYUŽITÍM ANALÝZY LIPOPROTEÍNOV SYSTÉMOM LIPOPRINT.....	12
RABAJDOVÁ M., VELIKÁ B., BIRKOVÁ A., BRENÍŠIN M., DUDIČ R., URDZÍK P., MAREKOVÁ M.: VYUŽITIE METABOLOMICKÝCH A MOLEKULOVÝCH TECHNÍK PRI PREDIKCII INTRAUTERINNÝCH PATOLÓGIÍ PLODU .....	17
BIŠČÁKOVÁ, Z., BOJČÍKOVÁ, P., RABAJDOVÁ, M., MAREKOVÁ, M.: MiRNA AKO DIAGNOSTICKÝ MARKER VYBRANÝCH RAKOVINOVÝCH OCHORENÍ.....	20
HORVÁTHOVÁ, F., DANIELISOVÁ, V., MIHALIK, J.: DEPRENYL POZITÍVNE OVPLYVŇUJE ANTIOXIDAČNÝ STATUS V SEMENNÍKU POTKANA A ZVYŠUJE POČTY SPERMII.....	29
HORVÁTHOVÁ, F., MATÉFFY, S.: VPLYV ANTIOXIDANTOV NA MUŽSKÉ REPRODUKČNÉ PARAMETRE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON MALE REPRODUCTIVE PARAMETERS.....	34
KLABNÍK T., BOLERÁZSKA B., STUPÁK, M., RABAJDOVÁ M., TOMEČKOVÁ V., VELIKÁ B.: BIOCHEMICKÉ MARKERY OSTEOMYELITÍD SÁNKY A ČELUSTE .....	40
ŠTOFILOVÁ, J., SALAJ, R., LANGERHOLC, T., ŠOLTÉSOVÁ, A., STROJNÝ, L., BOMBA, A.: IMUNOMODULAČNÝ ÚČINOK <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> LS/07 <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i> .....	46
VÍŠČOROVÁ, Z., SABO, J., ANDRAŠINA, I.: VYUŽITIE PROTEOMICKEJ ANALÝZY LEUKOCYTOV V ONKOLÓGIÍ.....	54



## TELEMEDICÍNA – BLÍZKOSŤ NA DIAĽKU ?

LEPEJ, J.<sup>1</sup>, LEPEJOVÁ, K.<sup>2</sup>, MAJERNÍK, J.<sup>3</sup>, ŠOLTÉS, P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Klinika nukleárnej medicíny, UPJŠ LF a Inštitútu nukleárnej a molekulárnej medicíny, Košice

<sup>2</sup>OKBaHI, Cumulus s.r.o., Košice

<sup>3</sup>Ústav lekárskej informatiky, UPJŠ LF, Košice

<sup>4</sup>Roche Slovensko, s.r.o. Bratislava

### SÚHRN

V článku autori definujú pojem telemedicína. Podávajú súhrnný prehľad jej vývoja za predchádzajúcich 50 rokov. História je rozdelená do 7 období, od začiatkov založených na analógových telekomunikačných sieťach až po súčasnosť, v ktorej sa začínajú zavádzať princípy umelej inteligencie (AI). Popisujú rôzne formy a metódy telemedicíny s podrobnejším zameraním na laboratórnu medicínu a diskutujú jej prínosy. V závere upozorňujú na riziká a filozofické aspekty možného vývoja telemedicíny.

**Kľúčové slová:** Telemedicína, komunikácia v medicíne, informačné systémy, digitálne obrazy, umelá inteligencia.

### ABSTRACT

In this article the authors define the term telemedicine. They give an overview of its development over the past 50 years. The history is divided into 7 periods — from beginnings ba-

sed on analogue telecommunication networks to the present, in which the principles of Artificial Intelligence (AI) are being introduced. They describe various forms and methods of telemedicine with a more detailed focus on laboratory medicine and discuss its benefits. Finally, they highlight the risks and philosophical aspects of the development of telemedicine.

**Keywords:** Telemedicine, medical information and communication systems, digital imaging, artificial intelligence.

### ÚVOD

Podľa definície WHO, telemedicína predstavuje súhrnné označenie pre zdravotnícke aktivity, služby a systémy prevádzkované na diaľku cestou informačných a komunikačných technológií za účelom podpory globálneho zdravia, prevencie a zdravotnej starostlivosti, ale aj vzdelávania, riadenia systému zdravotníctva a zdravotníckeho výskumu.

Telemedicína je súčasťou širšieho pojmu e-health. Pre medicínsku starostlivosť môže byť

kritický faktor veľká vzdialenosť pacienta od poskytovateľa zdravotníckej starostlivosti (ZS). Telemedicína umožňuje riešiť problém dostupnosti zdravotnej starostlivosti v prípadoch:

1. Krajiny s riedko obývanými, zle dostupnými oblasťami (USA, Kanada, Austrália, Rusko) majú lokality, kde je vzdialenosť od najbližšieho lekára > 100 km.
2. Krajiny s malým počtom lekárov na 1000 obyvateľov (v roku 2013):
  - GR = 6,3!
  - SK = 3,4
  - priemer OECD = 3,3
  - USA = 2,6
  - Indonézia = 0,3
  - Afrika < 0,1).
3. Špeciálne situácie (expedície, námorné lode, kozmické lode).
4. Neprimerane veľa návštev u lekára pri priemernom počte lekárov (problém Slovenska).

**Ciele telemedicíny:** Zlepšenie dostupnosti, zvýšenie kvality a zníženie nákladov zdravotnej starostlivosti.

## VÝVOJOVÉ ETAPY, METÓDY A SLUŽBY TELEMEDICÍNY

### I. Analógová komunikácia

V 60-tych rokoch minulého storočia vznikla snaha o zlepšenie zdravotnej starostlivosti pre odľahlé oblasti (USA, Austrália) formou telefonnickej komunikácie. Počas 70-tych rokov pokračoval rozvoj **hlasových služieb**, ktoré predstavujú prvé najjednoduchšie metódy telemedicíny, založenej na využívaní vtedy ešte analógovej telefónnej siete. Typickými príkladmi sú: linky dôvery, linky bezpečia, či iné konzultačné a poradenské linky. Podmienkou rozvoja telemedicíny sú **dobře fungujúce telekomunikácie**. Pochopiteľne, v tom čase telemedicína ešte nebola definovaná.

### II. Osobné počítače

V 80-tych rokoch sa začali používať osobné počítače, ktoré znamenali významný prínos

aj pre medicínu. V 90.-tych rokoch boli technológie na vzdialenú diagnostiku pôvodne určené pre vojenské účely a vesmírne misie. Bola navrhnutá technológia s názvom **Telemedicine Instrumentation Pack (TIP)**. Kufrík obsahoval osobný počítač, analógovú videokameru schopnú aj fotografovať, otoskop, oftalmoskop, elektrický stetoskop, elektrokardiograf, tlakomer a pulzný oximeter. Neodborníci vyškolení na ich obsluhu elektronicky zaslali zistené údaje lekárovi, ktorý následne rozhodol o ďalšej liečbe.

### III. Informačné systémy a siete (Internet)

V 90-tych rokoch začína digitálne prepojenie počítačov – vytvorenie SIETÍ – základ na zjednodušenie prenosu nielen hlasu (ako v minulosti), ale aj údajov a neskôr aj obrazovej informácie. Vytvárané sú informačné systémy (NIS, LIS, RIS, AIS...). Vznikajú **dátové služby**, ktoré sú dnes v prevažnej miere založené na službách internetu a pre prenos údajov sa využívajú protokoly TCP/IP. Postupne sa diferencujú prvé **metódy telemedicíny**, ktoré sa môžu uplatniť v širokom spektre lekárskeho odboru. Patria sem:

- **Telekonzultácie** – prístup k poznatkom alebo expertíze špecialistu na diaľku.
- **Telediagnostika** – určenie diagnózy u pacienta za pomoci vzdialeného lekára.
- **Telemonitorovanie** – diaľkové monitorovanie pacienta, ktorý sa nachádza mimo zdravotníckeho zariadenia.
- **Telestarostlivosť** – využitie údajov z telemonitorovania pri poskytovaní lekárskej a zdravotnej pomoci na diaľku.
- **Televzdelávanie** (teleedukácia) – vzdelávanie pacientov, lekárov i študentov medicíny na diaľku vrátane možnosti Teleevaluácie, t.j. vyhodnocovania získaných poznatkov na diaľku = E-learning.
- **Teleprezencia** – zaistenie virtuálnej prítomnosti osoby na diaľku.

V tejto etape začína aj prvé využívanie informačných systémov v laboratórnej medicíne (LIS).

**Telemedicína a klinická biochémia.** Medzi priekopníkmi informačných inovácií v zdravotníctve boli práve laboratória klinickej biochémie, hematológie a ďalších odborností. Rozvoj prístrojovej techniky v laboratóriách priniesol nevyhnutne potrebu spracovávať veľké množstvo dát, výsledkov, ktoré bolo potrebné uchovávať, vyhodnocovať a porovnávať s predošlými. Analyzátory sa začali prepájať s počítačom a pre ich vzájomnú komunikáciu bol stanovený ako štandard ASTM (American Society for Testing and Materials) protokol, ktorý dodržia všetci renomovaní výrobcovia prístrojovej techniky.

Ako bolo spomenuté, na začiatku 90-tych rokov sa začali budovať **počítačové siete**, ktoré umožnili viacerým súčasne pracujúcim počítačom vstupovať do jedného programu nad jednou databázou údajov, čím sa zrodil **laboratórny informačný systém**.

Nasledujúcou hybnou silou rozvoja sa stalo budovanie LAN (Local Area Network) ethernetových sietí, od prvotných koaxiálnych s prenosovou rýchlosťou do 10 Mbps (megabits per second) cez krútené dvojlinky s prenosovou rýchlosťou bližiacou sa hranici 10 Gbps až po optické siete, ktoré idú prenosovou rýchlosťou za hranicu 10 Gbps. Okrem takzvaných „pevných“ sietí sa rozvíjajú aj **bezdrôtové siete WLAN** (Wireless LAN). Tento rozvoj umožňuje prepojiť medzi sebou aj vzdialené pracoviská nielen v rámci jedného zdravotného zariadenia, ale prakticky kdekoľvek na svete.

A opäť medzi prvými, ktorí využívali moderné prostriedky, sú biochemické laboratória, prepájajú sa laboratórne informačné systémy (LIS) s nemocničnými informačnými systémami (NIS), s prístrojmi pri lôžku pacienta (POCT). Výsledky pacientov sú zasielané zabezpečeným prenosom cez internet aj súkromným lekárom, ktorí nie sú zapojení v rámci NIS, či už formou kódovanej prílohy k mailu alebo prístupom na webové rozhranie cez zabezpečený HTTPS protokol. Väčšinou sú tieto možnosti spojené s jednoduchým uložením zaslaných výsledkov (vo formáte XML) do dokumentácie pacienta v ambulantnom informačnom softvéri (AIS).

Obdobne funguje aj opačný smer komunikácie, elektronické žiadanky sú zasielané z oddelení a ambulancií priamo do laboratórneho informačného systému.

Ďalším veľkým prínosom rozvoja informačných technológií je možnosť **vzdialenej správy** zariadení, či sa jedná o LIS alebo analyzátor. Použitím SSL (Secure Socket Layer) protokolu sú dáta prenášané šifrovane, pre komunikujúce strany sú vydávané bezpečnostné certifikáty, na základe ktorých dochádza k overeniu dôveryhodnosti komunikujúcich subjektov, je kontrolovaná **MAC adresa** sieťového prvku, čo je jedinečný 48-bitový identifikátor, ktorý prvok (sieťová karta) dostane pri výrobe. Všetky **bezpečnostné opatrenia** musia byť vykonávané vzhľadom na to, že sa pohybuje v oblasti **s citlivými patientskými dátami**. Dnešné moderné analyzátory majú pripojenie do informačných sietí, prostredníctvom ktorých získavajú aktuálne informácie k metodikám, zmenám v šaržiach reagensov, kalibrátorov, kontrol kvality bez manuálneho zásahu užívateľa. Využívajú vzdialenú podporu aplikačných špecialistov a servisných inžinierov, ktorí na diaľku vedia analyzovať a vyriešiť problém alebo sa pripraviť na osobnú návštevu.

Virtuálny svet informačných technológií (telemedicína, manažment dát) sa svojou dôležitosťou približuje k diagnostike a liečbe pacienta. Tieto odbory vytvárajú tak silné väzby, že jedine ich spoločným rozvojom budeme môcť v budúcnosti zlepšovať zdravotnú starostlivosť o pacienta.

#### IV. Digitálne obrazy

Digitalizácia obrazov začala už v 60-tych rokoch (nukleárna medicína), pokračovala s CT (70. roky) a MR (80. roky). Zavedenie digitálnej zobrazovacej zdravotníckej techniky, ale aj bežnej digitálnej fotografie a videa, vytvorilo podmienky pre rozvoj **obrazových služieb** v 90-tych rokoch. Tieto sú primárne zamerané na sprostredkovanie prenosu obrazových informácií. Do tejto kategórie služieb patria **telerádiológia, telesonografia, telepatológia, teledermatológia**. V elektronic-



kej forme je obrazová dokumentácia ukladaná a prenášaná pomocou samostatných systémov PACS (Picture Archiving and Communications System). Pre komunikáciu s jednotlivými modalitami, medzi PACS systémami a s nemocničnými informačnými systémami využívajú štandard DICOM. Pre Slovensko sa používa privátna sieť T3C a obrazové dáta sa dajú poslať len pracoviskám s licenciou.

## V. Rozmach telekomunikácií a nové materiály

Na prelome tisícročia začína intenzívny rozvoj telekomunikácií a nových materiálov, ktorý je urýchľovaný biznisom okolo masového používania mobilných telefónov. Všeobecná dostupnosť mobilných telefónov (od 2007 aj smartfóny), ale aj nové technológie podporujú rozvoj ďalšej kategórie dátových služieb, sledovanie fyziologických funkcií na diaľku – **telemetria**. Postupným vývojom technológií a medicínskych poznatkov sa telemedicína začala uplatňovať aj v ďalších oblastiach, ako sú **telefarmácia**, **telekardiológia**, **tediabetológia**. Bežne sa cez mobil dajú monitorovať pulz, tlak, EKG, hladina cukru a iné fyziologické parametre.

## VI. Robotizácia

Roboty nie sú objav tohto storočia. Ale v medicíne sa operačné roboty začali uplatňovať len nedávno. Začína sa rozvíjať **teleterapia** a **telechirurgia**. Operačné roboty umožňujú lekárovi urobiť operáciu zo vzdialeného miesta, bez kontaktu s telom pacienta. Chirurg vykonáva operáciu v sede pri ovládaní prístroji a pomocou joystickov ovláda pohyb robotických ramien s nástrojmi.

## VII. Umelá inteligencia

Umelá inteligencia (AI – Artificial intelligence) nachádza uplatnenie napríklad v onkológii. **Expertný software** pomáha pri rozhodovaní o liečebnom režime – pre konkrétneho pacienta optimálny terapeutický protokol. Predpokladajú sa aj ďalšie možnosti jej využitia v medicíne.

**Realita súčasnosti** je on-line prístup k databázam, resp. elektronickej zdravotnej dokumentácii. Vzhľadom k tomu, že multimediálne infor-

mácie sú už súčasťou elektronickej zdravotnej dokumentácie, dochádza k postupnému **splyvaniu obrazových a dátových telemedicínskych služieb**. Jednotlivé služby zabezpečujú prenos informácií medzi lekárom a pacientom, medzi lekármi, medzi jednotlivými zdravotníckymi pracoviskami, medzi jednotlivými zobrazovacími oddeleniami, či medzi inými pracoviskami, ako sú napríklad orgány štátnej správy, poisťovne a pod., bez ohľadu na geografickú lokalizáciu zúčastnených strán. Význam začínajú mať **veľké dátové úložiská** a pribúdajú **cloudy**, ktoré obsahujú aj programy, priveľké na inštaláciu v počítači užívateľa.

Za guru telemedicíny je považovaný **Dr. Eric Topol**. V knihe *The Creative Destruction of Medicine*, priekopnícky genetik a kardiológ Eric Topol predstavuje radikálne nový prístup a predpovedá príchod éry **veľkých dát** na kliniky, do laboratórií a nemocníc. Pomocou **personálne orientovanej technológie môžu lekári vidieť úplný, priebežne aktualizovaný obraz každého pacienta a tak zvoliť viac individuálny terapeutický prístup**. Nové technológie umožňujú **sekvenovať genóm** každého jedinca s cieľom predpovedať účinky liekov a zlepšené zobrazovanie a technológia 3D tlačiarň sú začiatkom možností **tlačiť orgány** na požiadanie.

Eric Topol je aj riaditeľom **Scripps Translational Science Institute** a spoluzakladateľom a podpredsedom **West Wireless Health Institute** v LA Jolla, California. Vybuďoval si celosvetovú povest' osobnosti s výnimočnými znalosťami v oblasti **genomiky a bezdrôtovej zdravotnej starostlivosti**, ako aj osobnosti, ktorá **vedie revolúciu v medicíne**.

**Za najvýznamnejšie prínosy telemedicíny možno považovať:**

**1. Možnosti konzultácií** špičkových odborníkov, vzdialená diagnostika, prenos informácií medzi zdravotníckymi zariadeniami. Zjednodušená komunikácia medzi lekárom a pacientom, hlavne pre tých, ktorí sú vzdialení, zle mobilní alebo ťažko chorí a tak zmiernenie ich sociálnej izolácie.

2. Skrátenie doby hospitalizácie pacientov cez **možnosti monitorovania** ich životných funkcií v domácej starostlivosti. Zvýšenie kvality diagnosticko-liečebného procesu.
3. **Dostupnosť aktuálnych laboratórnych informácií** (on-line) na najvýhodnejšom mieste pre pacienta a lekára (operačná sála, ambulancia, lôžkové oddelenie, konzílium).
4. **Integrácia jednotlivých zobrazovacích metód do ucelených systémov**, porovnanie SONO, CT, MR, SPECT/CT, PET/CT, PET/MR atď. možnosť dvojitého čítania (kontrola) nálezov. Výrazne kvalitnejšia diagnostika v dôsledku rozsiahlych možností práce s elektronickou obrazovou dokumentáciou, okamžitá a **časovo neobmedzená dostupnosť obrazovej dokumentácie** vzniknutej v iných zdravotníckych zariadeniach.
5. Vyššia **komplexnosť zdravotnej dokumentácie** (prepojenie informačných systémov), **možná úspora financií na opakovanie nákladných diagnostických metód a nedostupných špecialistov**.
6. Rozsiahle vzdelávanie pomocou videokonferencií a on-line prenosov, vytváranie informačných sietí pre zdravotnícku výchovu a osvetu – **teleedukácia**. Vyššia kvalita v pre- a postgraduálnej výchove E-learning.
7. Možnosť kontrolovať si svoje platby za zdravotnú starostlivosť samotným pacientom pomocou prístupu do vlastného účtu zdravotnej poisťovne.

**Ako asi bude vyzerat naša budúcnosť? Sci-fi na pobavenie.** *Ráno sa necítim dobre, prikladám si svoje „smart zariadenie“ na hrud', cítim jemné vibrácie, je to príjemné. Ten starší model bol otravný, našťastie to výrobca uznal a rýchlo nahradil stávajúci model novou generáciou. O päť minút je po všetkom, môj lekár dostal správu o mojom stave a poslal mi termín. Ešte stále je nutné osobné vyšetrenie u lekára, ale počul som, že sa testuje technológia, keď to moje „smart-íčko“ vyšetří aj základné parametre v krvi a objedná rovno donášku potrebného lieku. Čo potom budú robiť tí chudáci v labáku, a čo môj doktor??? A čo ja? To už nevsta-*

*nem ani z postele? Ešteže musím za tým doktorom. Aj keď mi nie je najlepšie, vonku je krásny prvý jarný deň roku 2037. Trochu sa prejdem... možno ma to prejde... len aby ma neprešlo nejaké robo-auto!*

### Možné riziká telemedicíny

Základný problém v súčasnosti na Slovensku je, že **chýba komplexná legislatíva pre telemedicínu**. V prípade zlej rady cez e-mail, kto bude zodpovedať za možné nepriaznivé dôsledky pre pacienta?

Aká je optimálna miera **závislosti** pracovníkov na technológiách, **spoliehanie sa na externé zdroje informácií**, bez potreby osvojiť si **trvalé znalosti**? To vedie k veľmi nebezpečnej **strate zručností**, ak ich nepoužívame, to platí aj pre **stratu asociatívneho myslenia**. **Závislosť znamená stratu slobody**.

Ale nielen to. **Každá technológia môže zlyhať**. Kontrola technológie taktiež vyžaduje čas a peniaze.

Pri výpadku siete sa nielen **nedostaneme k výsledkom**, ktoré prechádzajú z analyzátoru do LISu, ale **analyzátor ani nevie, čo má merať**. Situácia, ktorú pozná každý z nás a ktorá nám dáva **pocit bezmocnosti**, ak sa jedná o akútne stavy.

Veľmi nebezpečný je problém úniku a **zneužitia zdravotníckych informácií** a osobných dát. Chamtivosť tu bola a vždy bude, preto zlé úmysly nemožno nikdy vylúčiť. **Hackeri** už pre zisk zablokovali počítače mnohých nemocníc vo viacerých štátoch sveta (viď správa TA3 z 12.5.2017).

Systémy vyžadujú zapojiť veľa ďalších ľudí a novú techniku. To všetko stojí peniaze. Ale ako sa dá posúdiť „**hodnota za peniaze**“ v tejto oblasti, keď vôbec **nevieme, aké sú skutočné náklady** a prínosy z využívania telemedicíny? Môže dôjsť k rastu nákladov na prenos dát bez priameho úžitku pre pacienta.

Tieto **činnosti vyžadujú čas**. Koľko času venujeme práci s počítačom a koľko samotnému mysleniu alebo osobnému rozhovoru z očí do očí a hrejivému slovu pre pacienta? **Čas je naša najvzácnejšia komodita**, ktorej význam si často nevedomujeme. Benjamin Franklin povedal: „čas



sú peniaze“. Čo potrebujeme dnes nie je veľa peňazí ale viac času pre pacienta.

Iba **ekonomické motivácie** pre využívanie telemedicíny môžu byť veľmi znepokojujúce. Je dobrá spoločnosť, ktorá zdôrazňuje iba funkčné, efektívne plánovanie a uskutočňovanie ekonomických cieľov bez ohľadu na sociálne, kultúrne, potreby ľudí? **Technokratom ide predovšetkým o zisk, poslanie medicíny je však niekde úplne inde.** Medicínu možno robiť aj s holými rukami, keď človeka utešíme a pomôžeme mu v utrpení ako v zákopoch svetových vojen.

**Strach pacienta z výsledkov**, ktoré získa zo súčasnej a budúcej POCT technológie (self-monitoring), ktoré nie sú dostatočne overené skúsenosťou a komplexným pohľadom lekára, môže mať veľmi nebezpečné dôsledky. **Internet** za pár rokov poskytol tisíce stránok so zdravotníckymi (aj pseudo) informáciami a reklamou pre pacientov. Už dnes často vnášajú do myslenia pacienta chaos a nie vždy prospievajú k zlepšeniu zdravotnej starostlivosti, ktorá má byť hlavne adresná. Takto poskytované „**všeobecné rady**“ sú **ďaleko od pojmu personalizovaná medicína.**

**Ukladáme a presúvame všetky naše dáta.** Naše myšlienky sa stlačením klávesy ocitajú v ľahko spracovateľnej forme v neznámom **kyberpriestore** (W.F. Gibson, 1984). Strácame ich originalitu a stávame sa len anonymným článkom „**samo sa budujúceho niečoho**“. Čoho? „Kto“ má prístupové práva, aby mohol vaše myšlienky použiť? Na čo ich použije? Aké sú „jeho“ motivácie?

Dnes futurologicky a vzdialene vyzerá problém umelej inteligencie (AI) a jej nezávislosti na ľudskom rozhodovaní. Ale **aké budú rozhodnutia AI, ak preváži jej miera racionality (IQ) nad rozsahom empatie a súcitu (EQ)?** Pamätajte si: **Informácie ≠ vedomosti ≠ múdrosť!**

## ZÁVER

**Nesmieme vytesniť lekára zo systému zdravotnej starostlivosti.** Počítače neskladajú Hippokratovu prísahu. Myslíte si, že virtuálny lekár je lepší, ako skutočný, aj keď nie až taký dokonalý?

**BUDÚCNOSŤ?** Pozrite si série **Voyager** zo sci-fi seriálu **Star Trek**, „**The Doctor**“ je USS Voyager Emergency Medical Holographic program. Všetko je už vymyslené... stačí zrealizovať.

Pacient potrebuje upokojujúce slovo človeka, posilnenie vo viere a nie len informácie a lieky. Prípady z histórie jednoznačne dokazujú, že každá technológia môže byť dobrý sluha, ale veľmi zlý pán. **Prospech pacienta má byť jediné kritérium!**

## LITERATÚRA

1. <http://createdestructionofmedicine.com/>
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810531/>
3. MAJERNÍK, J., ŠVÍDA, M., MAJERNÍKOVÁ, Ž.: *Medicínska informatika*, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, 2010 Košice, 200 s. ISBN 978-80-7097-811-5.



## DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL MI RNA PRI PROGRESII UROTELIÁLNEHO KARCINÓMU

MAREKOVÁ, M.<sup>1,2</sup>, RABAJDOVÁ, M.<sup>1</sup>, URBAN, P.<sup>1</sup>, ŠPAKOVÁ, I.<sup>1</sup>, RÁCZ, O.<sup>3</sup>  
SOBOLOVÁ, V.<sup>4</sup>, NAGY, V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

<sup>2</sup>Medirex a.s., Košice

<sup>3</sup>Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

<sup>4</sup>Urologická klinika, UPJŠ LF a UNLP v Košiciach

Onkologické ochorenia patria v súčasnosti medzi najčastejšie sa vyskytujúce civilizačné ochorenia, postihujúce všetky vekové kategórie s veľmi vysokou hladinou mortality a morbiditu vyplývajúcej z neskorého odhalenia prítomnosti solídnych nádorov. Súčasný klinicko-biochemický výskum sa preto zameriava na identifikáciu a charakterizáciu nových molekulových markerov využiteľných ako prediktívne ukazovatele pri diagnostike nielen nádorových, ale aj prekancerózných ochorení. Jedným z novších markerov sú aj molekuly miRNA. Jednovláknové endogénne molekuly miRNA, patria do skupiny významných regulátorov génovej expície na posttranskripčnej úrovni. Zvýšená alebo znížená expícia miRNA má vplyv aj na expíciu onkogénov a tumor-supresorových génov. Molekuly miRNA sa okrem špecifických expresných profilov v nádorovom tkanive vyznačujú aj ďalšími vlastnosťami, ako jednoduchou detekciou, vysokou stabilitou, širokým dynamickým rozsahom a koreláciou s už známymi klinicko-patologickými charakteristikami. Vďaka svojim vlastnostiam by miRNA mohli slúžiť ako vhodný diagnostický marker, napr. pre zistenie pravdepodobnosti vzniku ochorenia, recidívy, alebo odpovede na liečbu

Práca bola zameraná na štúdium molekulových zmien expície miR-17-5p a miR-99 v moči

pacientov s histologicky potvrdeným uroteliálnym karcinómom (n = 20) v porovnaní s kontrolnou skupinou (n = 10). Izolácia miRNA molekúl z moču bola uskutočnená využitím komerčného kitu Norgen Biotek. Kvantifikácia zmien expície vybraných miRNA bola detegovaná metódou qRT-PCR využitím kitov Taqman microRNA RT a Taqman Advanced miRNA. Relatívna hladina expície miR-17-5p a miRNA 99 bola stanovená normalizáciou na základe vzťahu  $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_a - Ct_{40})}$ .

Získané výsledky dokázali signifikantne zvýšenú expíciu miR-17-5p v moči pacientov s uroteliálnym karcinómom v porovnaní s kontrolnou skupinou (o 116,7%). Pri miR-99 bolo pozorované zníženie expície oproti kontrolným vzorkám (o 19,4%). Rozdielne hladiny relatívnej expície miR-17-5p a miR-99 naznačujú možné využitie študovaných miRNA pri diferenciálnej diagnostike prekancerózných stavov a stavov karcinómov vo včasných štádiách. Tento komplexný experimentálny prístup umožní neinvazívny odber vzoriek, následnú analýzu vybraných miRNA v moči pacientov, čo môže prispieť k presnejšej prognóze ochorenia a následne k zlepšeniu kvality života pacientov.

*Táto práca bola podporená grantovým projektom VEGA 1/0372/17.*



Laboratórna Diagnostika, XXII, 1, 2017: 12—16

## MONITORING ÚČINNOSTI TERAPIE OBEZITY VYUŽITÍM ANALÝZY LIPOPROTEÍNOV SYSTÉMOM LIPOPRINT

ZALEJSKA-FIOLKA J.<sup>1</sup>, HUBKOVÁ B.<sup>2</sup>, BIRKOVÁ A.<sup>2</sup>, VELIKÁ B.<sup>2</sup>, BŁASZCZYK U.<sup>1</sup>  
ĎUROVCOVÁ E.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Polska

<sup>2</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta

<sup>3</sup>Medirex a.s., Košice

Slovensko

### SÚHRN

Miera obezity neustále narastá, rovnako aj počet pridružených zdravotných problémov. Narastá však aj záujem o skupinové, takzvané extrémne chudnutia. Priemysel postavený na chudnutí a diétnych potravinách prekonáva dlhoročné rekordy bez toho, aby sa to odzrkadlilo na zvrátení rastúceho trendu obezity. Veľakrát sa totiž zabúda na individuálne potreby jednotlivcov. Cieľ chudnutia má byť reálny, má viesť najmä k zlepšeniu celkového zdravotného stavu organizmu. Terapia má zohľadňovať najmodernejšie trendy v oblasti liečby obezity. Jedným takýmto nástrojom je sledovanie hladiny cholesterolu v subfrakciách lipoproteínov systémom LipoPrint. Cieľom našej práce bol monitoring účinnosti terapie obezity u 54 pacientov s nadváhou až ťažkou obezitou. Naše výsledky poukázali na individuálnu variabilitu vo výsledkoch zmien aterogénnych a neaterogénnych subfrakcií lipoproteínov, ako aj na variabilitu medzi pohlaviami. U mužov sme zaznamenali výraznejší pokles aterogénnych subfrakcií LDL (subfrakcie 3 až 7) ako aj výraznejší nárast neaterogénnych subfrakcií HDL

(subfrakcie 1 až 7) po šiestich mesiacoch terapie v porovnaní so ženami.

### ABSTRACT

The rate of obesity is steadily increasing, as well as the occurrence of associated health problems. There is also an increasing interest in extreme-weight loss programmes. The weight-loss industry is fuelled, but without reflecting in positive health outcomes. The needs of an individual are forgotten in many cases. The goal of weight loss should be realistic, aimed to improve the overall health of the patient. The latest knowledge should be implemented in the treatment of obesity. A modern tool is cholesterol level monitoring in particular lipoprotein subfractions — the LipoPrint fractionation system. The aim of our work was to monitor the effectiveness of obesity treatment in 54 overweight and obese patients. Our results showed individual variability in changing of atherogenic and non-atherogenic lipoprotein subfractions, as well as in gender-specific transitions of these subfractions with weight

**loss. We observed a more significant decrease in atherogenic LDL subfractions (subfractions 3 to 7) as well as a more pronounced increase in non-atherogenic subfractions of HDL (subfractions 1 to 7) in men compared to women after six months of obesity treatment.**

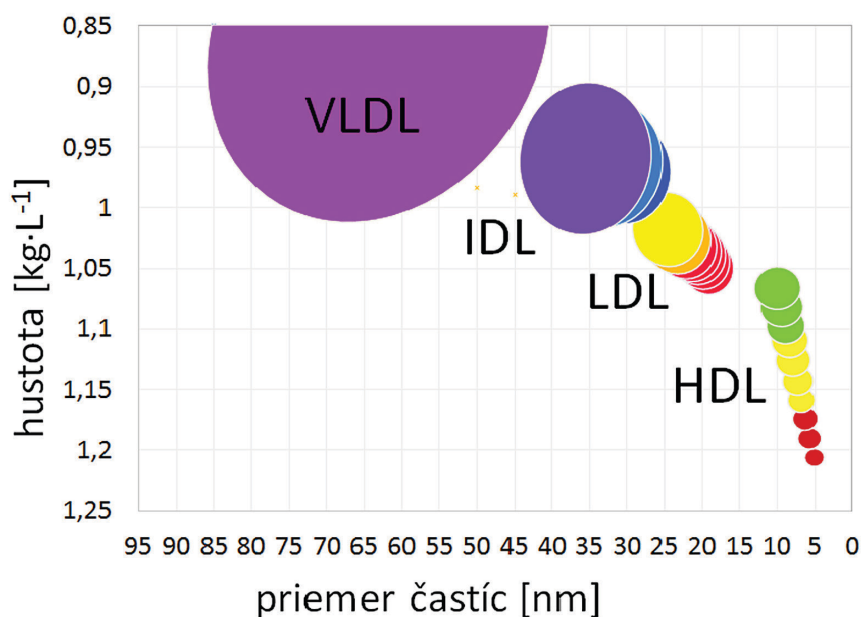
## ÚVOD

Obezita je choroba, o ktorej sa najčastejšie hovorí v spojení s obyvateľmi USA, pričom jej nárast v Európe je tak isto alarmujúci. Najväčší výskyt obéznych ľudí v rámci Európy je podľa správy OECD z roku 2017 v Maďarsku (až 30 % populácie nad 15 rokov), na Slovenku a v Poľsku je prevalencia obezity nižšia (16,3 %, resp. 16,7 % populácie nad 15 rokov), avšak so stúpajúcim trendom. Obezita je rizikovým faktorom mnohých ochorení, pričom medzi najzávažnejšie patria kardiometabolické následky nadmerného obsahu tuku v tele. Preto je mimoriadne dôležitá včasná terapeutická intervencia a monitorovanie obéznych pacientov. Jedným z prostriedkov umožňujúcich monitoring znižovania rizika aterosogenity je kvantifikácia cholesterolu v lipoproteínových frakciách systémom LipoPrint.

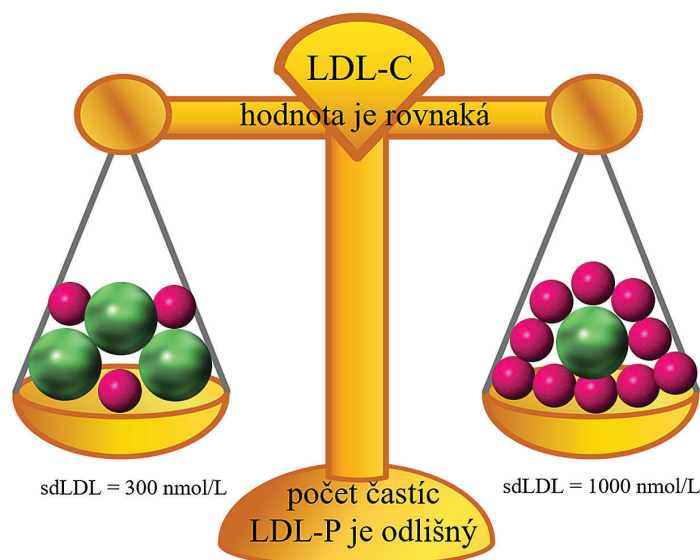
V klinickej biochémií je možné stanoviť lipoproteíny, ako aj v nich obsiahnutý cholesterol viacerými metódami. Tie poskytujú informácie aj o rôznych ďalších charakteristikách, ako napríklad o počte častíc, obsahu lipidov, povrchovom náboji, oxidačnom stave, obsahu a pomere proteínov atď. Medzi používané technológie patria ultracentrifugácia, elektroforéza využívajúca rôzne médiá, kapilárna izotachoforéza, nefelometria, elektrónová mikroskopia, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, selektívna precipitácia, nízkouhlový rozptyl RTG žiarenia a neutrónov, diferenčná skenovacia kalorimetria, NMR, a rôzne techniky spektroskopie.

## METÓDA

LipoPrint patrí medzi metódy založené na separácii častíc v elektrickom poli na polyakrylamidovom géli. Využíva farbenie lipofilným farbivom, ktoré sa viaže proporcionálne k množstvu cholesterolu obsiahnutého v jednotlivých lipoproteínových časticiach. K deleniu dochádza na základe veľkosti častíc. Menšie, denzné častice sú pohyblivejšie, zatiaľ čo väčšie častice migrujú pomalšie. Týmto spôsobom je možné separovať



Obr. 1. Závislosť hustoty jednotlivých lipoproteínov delených systémom LipoPrint od veľkosti častíc



Obr. 2. Znárodnenie rozdielu medzi cholesterolom viazaným na lipoproteíny nízkej hustoty (LDL-C) a počtom častíc lipoproteínov nízkej hustoty (LDL-P). Za rovnakou hodnotou LDL-C sa môže skrývať iný počet častíc LDL-P. Ak je počet častíc menší, najčastejšie ide o fenotyp s vyšším obsahom veľkých, menej aterogénnych LDL častíc. Ak je počet častíc väčší, ide o fenotyp s väčším počtom malých, denzných, aterogénnych častíc LDL (sdLDL)

heterogénnu zmes jednotlivých lipoproteínových častíc intermediárnej hustoty (IDL), nízkej hustoty (LDL) aj vysokej hustoty (HDL). Výsledkom je elektroforetogram s pásmom VLDL, tromi pásmami IDL, siedmymi pásmami LDL (LipoPrint LDL) a desiatimi pásmami HDL (LipoPrint HDL).

Kým veľké, menej denzné subfrakcie vykazujú neaterogénne (frakcie HDL 1 až 3) resp. menej aterogénne vlastnosti (frakcie HDL 4–7, LDL 1 a 2 a IDL C), malé, denzné IDL B a A, LDL 3–7 a HDL 8–10 frakcie prispievajú k rozvoju aterosklerózy. Na obrázku č.2 je znázornený rozdiel medzi termínom „cholesterol viazaný na lipoproteíny nízkej hustoty“ (LDL-C) a termínom „počet častíc LDL“ (LDL-P).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom predkladanej práce bolo monitorovanie účinnosti terapie obezity porovnaním výsledkov frakcionácie lipoproteínov nízkej a vysokej hustoty u obéznych pacientov a u pacientov s nadváhou pred začatím terapie a po šiestich mesiacoch terapie. Liečba bola nemedikamen-

tózna a pozostávala z úpravy energetického príjmu na 85 % z hodnoty bazálneho metabolizmu. Navyše mali pacienti predpísanú fyzickú aktivitu v trvaní pol hodiny trikrát týždenne, ako napríklad 1× plávanie, 2× rýchla chôdza, alebo 3× cvičenie fitness; podľa fyzických predpokladov pacientov. Súbor pacientov pozostával zo 180 ľudí, pričom liečbu úspešne absolvovalo len 54 pacientov (vek  $47 \pm 11$ ), z toho 16 mužov a 38 žien. Medzi pacientami boli 4 muži a 9 žien s ťažkou obezitou (index telesnej hmotnosti – BMI nad

Tab. 1. Priemerné hodnoty sledovaných parametrov pred a po 6 mesiacoch terapie

n = 53	pred terapiou	po terapii [6 mes.]
hmotnosť [kg]	95.5 ± 27.0	86.0 ± 24.0
BMI	36 ± 7	32 ± 6
VFA [cm <sup>2</sup> ]	140.0 ± 35.7	117.2 ± 32.3
TC [mmol·L <sup>-1</sup> ]	5.73 ± 1.40	5.55 ± 1.29
LDL-C [mmol·L <sup>-1</sup> ]	3.30 ± 1.10	3.24 ± 1.00
HDL-C [mmol·L <sup>-1</sup> ]	1.46 ± 0.28	1.59 ± 0.30

BMI – index telesnej hmotnosti; VFA – plocha viscerálneho tuku  
TC – celkový cholesterol; LDL-C = cholesterol lipoproteínov nízkej hustoty  
HDL-C – cholesterol lipoproteínov vysokej hustoty

**Tab. 2. Štatistické vyhodnotenie rozdielov v sledovaných parametroch medzi pacientami s ohľadom na zmeny aterogénnych LDL častíc**

zmena aterogénnych LDL častíc	Δ hmotnosti [%]	Δ BMI	Δ VFA [cm <sup>2</sup> ]	Δ TC [mmol·L <sup>-1</sup> ]
↓ vs. ≈	0.136	0.109	0.097	<b>0.045*</b>
↓ vs. ↑	0.862	0.766	0.742	0.313
≈ vs. ↑	0.159	0.129	0.051	0.211

↓ – pacienti s poklesom aterogénnych LDL častíc počas terapie, n = 14; ≈ – pacienti bez zmeny aterogénnych LDL častíc počas terapie, n = 28  
 ↑ – pacienti s nárastom aterogénnych LDL častíc počas terapie, n = 11; \* = p < 0.05, štatistická významnosť Studentovho t testu

**Tab. 3. Štatistické vyhodnotenie rozdielov v sledovaných parametroch medzi pacientmi s ohľadom na zmeny neaterogénnych HDL častíc**

zmena neaterogénnych HDL častíc	Δ hmotnosti [%]	Δ BMI	Δ VFA [cm <sup>2</sup> ]	Δ TC [mmol·L <sup>-1</sup> ]
↑ vs. ↓	0.029*	0.035*	0.418	0.008**

↑ – pacienti s nárastom neaterogénnych HDL častíc počas terapie, n = 42; ↓ – pacienti s poklesom neaterogénnych HDL častíc počas terapie, n = 11  
 \* – p < 0.05, štatistická významnosť Studentovho t testu; \*\* – p < 0.01, štatistická významnosť Studentovho t testu

40) 10 mužov a 21 žien s obezitou (BMI 30 až 39,9) 2 muži a 8 žien s nadváhou (BMI 25 až 29,9).

Priemerné hodnoty sledovaných parametrov sú znázornené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 1).

K zníženiu hmotnosti a BMI došlo u každého pacienta. V prípade 75 % pacientov došlo k nárastu hodnoty HDL-C a približne u 50 % k redukcii hodnoty celkového cholesterolu (TC) a LDL-C. K poklesu aterogénnych LDL častíc došlo v prípade 14 pacientov, a to v prípade 50 % mužov a 16 % žien. K zvýšeniu aterogénnych LDL častíc došlo v prípade 30 % žien, avšak nie v prípade mužov. U ostatných 28 pacientov sme nezaznamenali zmenu obsahu aterogénnych častíc LDL. U pacientov, u ktorých došlo k zníženiu aterogénnych LDL častíc sme zaznamenali aj pokles hodnoty TC a naopak u pacientov, u ktorých k tejto zmene nedošlo, stúpila hodnota TC po 6 mesiacoch terapie (Tab. 2).

K poklesu percentuálneho podielu aterogénnych LDL aj HDL častíc došlo v prípade 37 pa-

cientov (81 % mužov a 65 % žien). U 42 pacientov došlo k zvýšeniu percentuálneho podielu neaterogénnych HDL častíc (81 % mužov a 78 % žien). Porovnaním výsledkov pacientov, u ktorých došlo k zvýšeniu neaterogénnych HDL častíc s výsledkami pacientov, u ktorých k tejto zmene nedošlo, sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel v zmene hmotnosti, hodnôt BMI a TC po 6 mesiacoch terapie (Tab. 3).

## ZÁVER

Hlavnými závermi našej práce sú nasledujúce myšlienky:

1. chudnúť by sa malo pod dohľadom odborníka,
2. monitoring účinnosti terapie má zohľadniť najnovšie poznatky o lipidoch a lipoproteínoch,
3. odporúčania počas chudnutia majú byť personalizované. Štandardizované postupy terapie obezity nemusia zohľadniť niektoré špecifi-

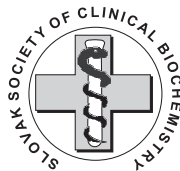


ká pacientov, akým je fenotyp lipoproteínov. Naše výsledky poukázali na výraznejší pokles aterogénnych LDL častíc a výraznejší nárast neaterogénnych HDL častíc počas terapie u mužov v porovnaní so ženami. Popri týchto skutočnostiach treba brať ohľad aj na to, aby bol cieľ terapie dosiahnuteľný a zamera-

ný na celoživotný manažment starostlivosti o zdravie.

## **POĎAKOVANIE**

*Práca vznikla pri riešení projektu KNW-1-016/N/7/2.*



## VYUŽITIE METABOLOMICKÝCH A MOLEKULOVÝCH TECHNÍK PRI PREDIKCII INTRAUTERINNÝCH PATOLÓGIÍ PLODU

RABAJDOVÁ M.<sup>1</sup>, VELIKÁ B.<sup>1</sup>, BIRKOVÁ A.<sup>1</sup>, BRENIŠIN M.<sup>2</sup>, DUDIČ R.<sup>3</sup>  
URDZÍK P.<sup>3</sup>, MAREKOVÁ M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

<sup>2</sup>Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

<sup>3</sup>Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

\*maria.marekova@upjs.sk

### SÚHRN

Priebeh tehotenstva môže byť komplikovaný mnohými patologickými stavmi. Najčastejšími príčinami maternálnej mortality sú eklampsia, intrakraniálne krvácanie, renálne zlyhanie, zlyhanie pečene a HELLP (Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets) syndróm. V štúdií bola analyzovaná transkripčnú aktivitu vybraných pro- a antiangiogénnych markerov, hladinu glukózy ale aj totálny antioxidačný status v biologickom materiáli odobratom pacientkam, ktoré porodili predčasne, v kombinácii s PE (preeklampsia) a IUGR (Intrauterine Growth Restriction) v porovnaní s fyziologicky ukončenými graviditami. Výsledky analýz poukazujú na rozdielnú transkripčnú aktivitu pro- a antiangiogénnych biomarkerov, rovnako sa líšia v hodnotách TAS (Total Antioxidant Status) v jednotlivých experimentálnych skupinách. Poznanie faktorov regulujúcich vznik a odpoveď na oxidačný stres na metabolomickej a genomickej úrovni prispieva k lepšej predstave a chápaniu etiopatogenézy gynekologicko-pôrodných komplikácií.

### SUMMARY

Pregnancy may be complicated by many pathological conditions. The most common causes of maternal mortality are eclampsia, intracranial bleeding, renal failure, liver failure, and HELLP (Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets) syndrome. We analyzed the transcriptional activity of pro- and antiangiogenic markers, glucose levels as well as total antioxidant status in women's biological materials. Women had premature birth, in combination with PE (preeclampsia) and IUGR (Intrauterine Growth Restriction), compared to physiologically completed pregnancies. The results of the analysis indicate the different transcriptional activity of pro- and antiangiogenic biomarkers, as well as the TAS (Total Antioxidant Status) values in the individual experimental groups. New information on oxidative stress regulating factors contributes to a better understanding of the etiopathogenesis of gynecological-parenteral complications.

Priebeh tehotenstva môže byť komplikovaný mnohými patologickými stavmi. Najčastejšími príčinami maternálnej mortality sú eklampsia, intrakraniálne krvácanie, renálne zlyhanie, zlyhanie pečene a HELLP (Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets) syndróm. Ku zvyšovaniu maternálnej a perinatálnej morbidity a mortality podstatne prispievajú aj preeklampsia (PE), vnútromaternicová rastová retardácia plodu (IUGR, Intrauterine growth restriction) a predčasný pôrod (PP). PE sa každoročne podieľa až na 70 000 úmrtiach matiek [1]. Okrem materskej morbidity a mortality je PE zodpovedná za 500 000 úmrtí detí za rok [2]. PP je definovaný ako pôrod pred ukončeným 37. týždňom gestácie [3]. Podieľa sa na 70–80% perinatálnej mortality a takmer na polovici závažnej neurologickej morbidite novorodencov. Slovensko patrí ku krajinám s vysokým počtom PP. Najzávažnejšia perinatálna morbidita a mortality sa týka 1–2% novorodencov narodených pred 32. gestačným týždňom s pôrodnou váhou nižšou ako 1 500 g [4]. Spúšťacie mechanizmy týchto patologických stavov sú stále neznáme. Pri diagnostike vnútromaternicového zápalu spôsobeného mikrobiálnou inváziou sa ako pomocné vyšetrenie využíva stanovenie koncentrácie glukózy v plodovej vode [5]. Intrauterinná infekcia zvyšuje riziko PP a súvisí s ďalšími tehotenskými komplikáciami, akými sú napríklad IUGR alebo PE. Mnohé štúdie uvádzajú, že insuficiencia v antioxidacnom systéme je príčinný faktor spojený s nepriaznivým priebehom pôrodu [6]. Oxidačný stres zodpovedný za správny priebeh fyziologického tehotenstva, zohráva dôležitú úlohu aj pri poklese plodnosti u žien s vyšším vekom, či iniciácií PP pre poškodenie kolagénu vo fetálnych membránach [7]. Oxidačný stres sa taktiež podieľa na rozvoji PE a predčasnom odtoku plodovej vody [8]. Intenzívnym výskumom boli identifikované biomolekuly, ktoré hrajú dôležitú úlohu v angiogenéze počas včasného vývoja placenty. Medzi ne patrí vaskulárny endotelialny faktor A (VEGF A, Vascular Endothelial Growth Factor A), placentárny rastový faktor (PlGF, Placental Growth Factor) a ich antagonisti, FMS-like ty-

rozín kináza 1 (sFlt-1, soluble FMS-like tyrosine kinase), tiež známa ako VEGFR1 a rozpustný endoglin (sEng, soluble Endoglin). Zvýšená expresia faktorov vyvolaných hypoxiou, ako je napr. HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1), stimuluje transkripčnú aktivitu anti-angiogénnych génov a génov zastávajúcich dôležitú úlohu v angiogenéze v priebehu vývoja placenty.

Cieľom pilotnej štúdie bolo stanoviť transkripčnú aktivitu vybraných pro- a antiangiogénnych markerov (VEGF, HIF-1, sEng, Flt-1, PlGF-1) vo vzorkách periférnej krvi žien, ktoré porodili predčasne, v kombinácii s PE a IUGR v porovnaní s fyziologicky ukončenými graviditami. Transkripčná aktivita špecifických génov bola detegovaná s použitím chromatín imunoprecipitačnej analýzy v kombinácii s qReal-time PCR (chip-qRT-PCR). Koncentrácia glukózy vo vzorkách plodových vôd bola stanovená štandardným laboratórnym vyšetrením (Randox Glucose, Gluc-PAP, cat. No. GL 2623). Na stanovenie totálneho antioxidacného statusu (TAS, Total Antioxidant Status) v plodovej vode, ktorý charakterizuje aktivitu všetkých prítomných antioxidantov v študovanom materiáli, bola použitá kolorimetrická metóda (Randox TAS, cat. No. NX 2332). V štúdiu boli popísané aj fluorescenčné vlastnosti plodovej vody pomocou synchronných fluorescenčných fingerprintov (SFF), ktoré charakterizujú metabolóm v biologickom materiáli. SFF boli merané v rozsahu vlnových dĺžok  $\lambda = 250 - 550$  nm spektrofluorimetrom LS 55 (Perkin-Elmer, USA), použitím kremennej kyvety (QS, 1 cm) pri izbovej teplote po centrifugácii pri 3500 ot/10 min.

Výsledky analýz poukazujú na rozdiel v hodnotách TAS medzi skupinou žien, ktorých gravidita bola bez komplikácií a skupinou žien ktorých gravidita prebehla s pridruženou komplikáciou ( $p = 4.63E^{-07}$ ). Pri porovnaní skupiny žien s fyziologickým priebehom tehotenstva a žien s patologickým priebehom tehotenstva sú hodnoty TAS v priemere vyššie ( $TAS = 5,699 \pm 0,572$ ) v porovnaní so skupinou žien s patologickým priebehom tehotenstva ( $TAS = 4,459 \pm 0,610$ ). Ďalšie výsledky analýz poukázali na signifikantné ( $p < 0,001$ )

zníženie expresie mRNA PlGF-1 a VEGF-A v skupine žien, ktoré rodili v termíne s komplikáciami a v skupine žien, ktoré rodili predčasne s komplikáciami oproti ženám v kontrolnej skupine. V daných skupinách pacientok bol zároveň analyzovaný výrazný nárast hladín mRNA pre gény HIF-1, endoglin a Flt-1 ( $p < 0,001$ ).

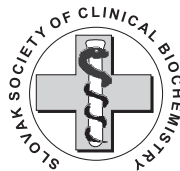
Celková fluorescencia plodovej vody sa odlišuje od fluorescencie iných biologických materiálov a nekoreluje s obsahom celkových proteínov. Je však možné nájsť závislosť pomerov intenzít fluorescencie pri určitých vlnových dĺžkach od alfa-fetoproteínu.

Poznanie faktorov regulujúcich vznik a odpoveď na oxidačný stres na metabolomickej a genomickej úrovni prispieva k lepšej predstave a chápaniu etiopatogenézy gynekologicko-pôrodných komplikácií. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že zvýšený oxidačný stres, zvýšenie hladín expresie antiangiogénnych génov a zníženie transkripčnej aktivity pro-angiogénnych génov môže v budúcnosti poskytnúť informácie využiteľné pri diagnostike intrauterinných patológií plodu a patologických komplikácií vedúcich k predčasnému pôrodu.

*Práca vznikla pri riešení projektu VEGA  
1/0873/16.*

## LITERATÚRA

1. SIBAI, B., DEKKER, G., KUPFERMINC, M., 2005: Pre-eclampsia. *Lancet*, 365 (9461): 785–799.
2. KHAN, K. S., WOJDYLA, D., SAY, L., GÜLMEZOĞLU, A. M., VAN LOOK, P. F. A., 2006: WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*, 367 (9516): 1066–1074.
3. KOUCKÝ, M., GERMANOVÁ, A., HÁJEK, Z., PAŘÍZEK, A., KALOUSOVÁ, M., KOPECKÝ, P., 2009: *Čes. Gynek*, 74, č. 1 s. 54–63.
4. KACEROVSKÝ, M., TOŠNER, J.: Mass Restricted (MR) score a intraamniální zánět, *Časopis ženských lékařů Gynekolog*.
5. KIRSHON, B., ROSENFELD, B., MARI, G., BELFORT, M., 1991: Amniotic fluid glucose and intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 164 (3): 818–820.
6. MYATT, L., 2010: Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, (31) Suppl.: S66–9.
7. PRESSMAN, E. K., CAVANAUGH, J. L., MINGIONE, M., NORKUS, E. P., WOODS, J. R., 2003: Effects of maternal antioxidant supplementation on maternal and fetal antioxidant levels: a randomized, double-blind study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 189: 1720–1725.
8. BURTON, G. J., 2009: Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J. Anat.*, 215: 27–35.



Laboratórna Diagnostika, XXII, 1, 2017: 20—28

## MI RNA AKO DIAGNOSTICKÝ MARKER VYBRANÝCH RAKOVINOVÝCH OCHORENÍ

BIŠČÁKOVÁ, Z., BOJČÍKOVÁ, P., RABAJDOVÁ, M., MAREKOVÁ, M.\*  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach

\*mária.marekova@upjs.sk

### SÚHRN

Do skupiny nekódujúcich RNA patrí aj skupina mikroRNA (miRNA), štúdiu ktorých je v posledných rokoch venovaná mimoriadna pozornosť, keďže sa významnou mierou podieľajú na regulácii génovej expresie. V súčasnosti je známych viac ako 2000 miRNA, regulačný potenciál ktorých je študovaný v mnohých špičkových laboratóriách. Vysoká stabilita, dobrá detegovateľnosť, široký dynamický rozsah a korelácia so známymi klinicko-patologickými charakteristikami, predurčuje tieto molekuly ako vhodné biomarkery mnohých ochorení, vrátane ochorení nádorových. Okrem špecifických expresných profilov v nádorovom tkanive, vykazujú miRNA aj ďalšie vlastnosti vďaka ktorým predstavujú vhodný nádorový biomarker. Práca predstavuje miRNA ako diagnostický marker nádorových ochorení žien a pri nádoroch urogenitálneho traktu.

### SUMMARY

**MicroRNAs (miRNAs) belong to a group**

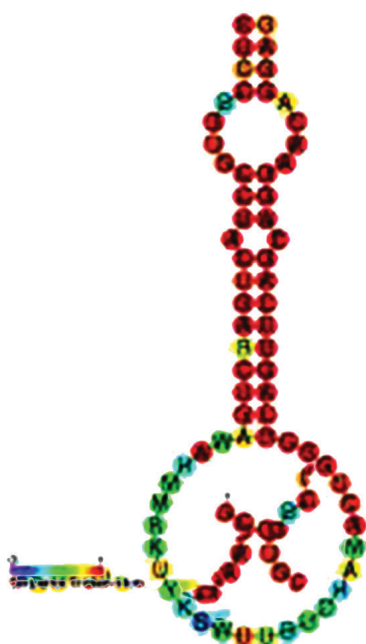
of non-coding RNAs. Recently, their study has been given extraordinary attention, since they have a significant role in regulating gene expression. More than 2,000 miRNAs are known nowadays, their regulatory potential is studied in many top laboratories. High stability, good detectability, broad dynamic range, and correlation with known clinical and pathological characteristics predict these molecules as biomarkers of diseases, including tumor diseases. In addition to specific expression profiles in tumor tissue, the miRNA also exhibits other properties that make it a suitable tumor biomarker. The work emphasizes the importance of miRNA as a diagnostic marker for tumors in women and for urogenital tract tumors.

### ÚVOD

Na začiatku 90. rokov sa v laboratóriu profesora Horvitza (nositeľ Nobelovej ceny za objav regulácie bunkového cyklu a apoptózy) na Massachusettskom technologickom inštitúte v Cambridgi Victor Ambros a Gary Ruvkun zaoberali štúdiom génov podieľajúcich sa na re-

gulácii prechodu medzi jednotlivými vývojovými štádiami hlísty *Caenorhabditis elegans*. Jedným zo študovaných génov bol **lin-4**, ktorého inaktivačná mutácia vedie k zásadným vývojovým chybám hlísty (Lee a kol., 1993), a ktorý je považovaný za prvú popísanú mikroRNA (miRNA). Druhým kľúčovým génom bol **lin-14**, ktorého supresorová mutácia dokázala zvrátiť efekt spôsobený inaktíváciou **lin-4**, čo naznačovalo možný regulačný efekt **lin-4** na **lin-14** za fyziologických podmienok. Ambros a Ruvkun popísali krátky nekódujúci transkript **lin-4**, ktorý väzbou na 3'UTR (Untranslated Region) oblasť mRNA reguloval post-transkripčné hladiny expície génu **lin-14** (Reinhart a kol., 2000).

MikroRNA (miRNA) patrí do skupiny nekódujúcich RNA molekúl a vyskytuje sa vo väčšine eukaryotov, vrátane ľudí, kde sa významne podieľa na regulácii génovej expície napr. kontrolou mnohých fyziologických a patologických procesov v organizme, vrátane malígnej transformácie. MiRNA je krátka, 19–25 nukleotidov dlhá jednoreťazcová RNA, ktorá vzniká z dlhého primárneho transkriptu (pri-miRNA) a vlásoknicovej prekurzorovej štruktúry (pre-miRNA) účinkom ribonukleáz v jadre a cytoplazme (Obr. 1). Ich hlavnou funkciou je post-transkripčná regulácia génovej expície (Farazi a kol., 2001).



Obr. 1. Štruktúra pre-miRNA

### MiRNA musí spĺňať niekoľko kritérií:

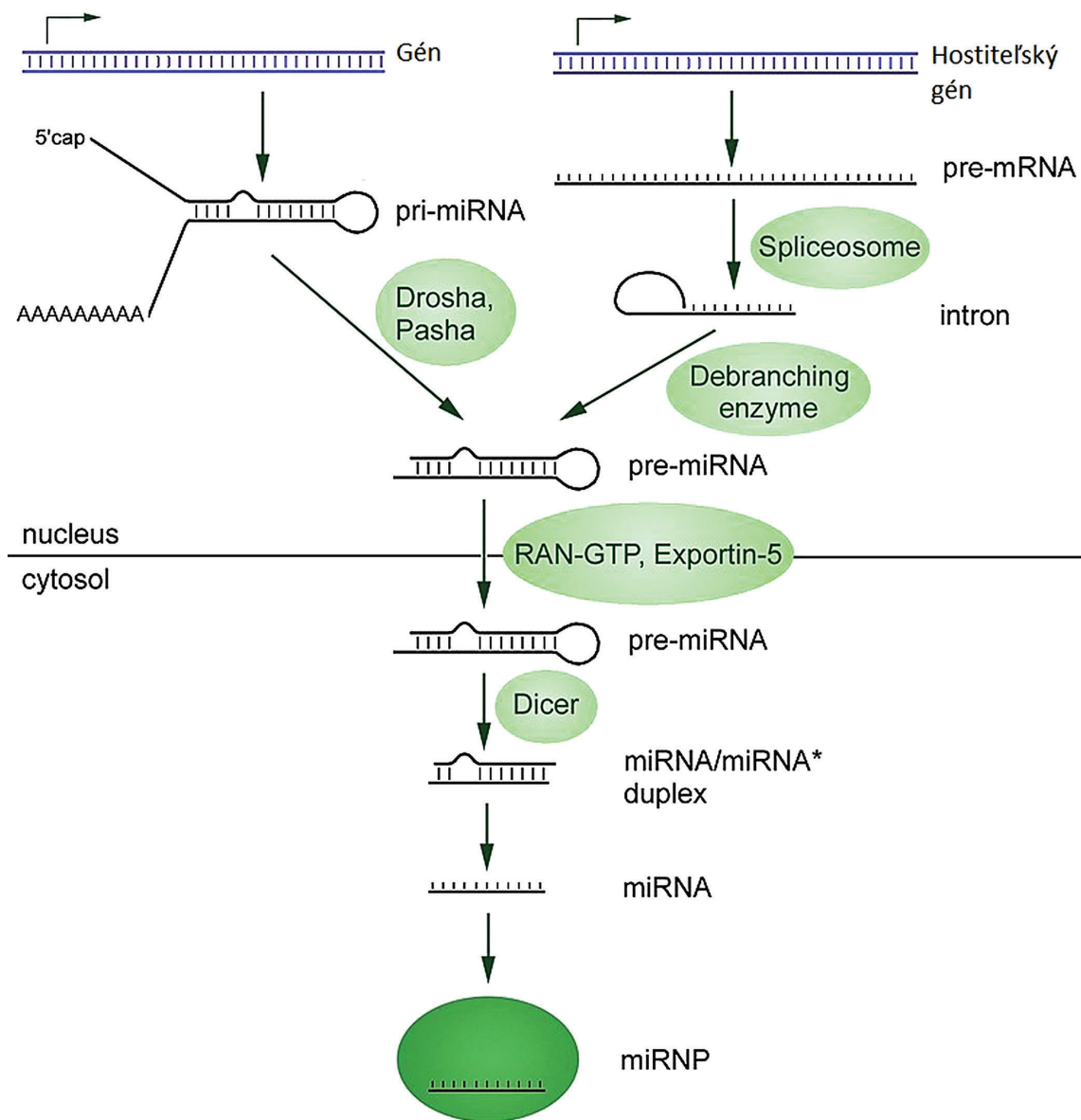
- musí byť detegovateľná pomocou northern blotu, RT-PCR alebo inej štandardnej metódy umožňujúcej detekciu RNA;
- vyskytuje sa vo vlásoknicovej kmeňovej časti, asi 70 nukleotidov dlhej prekurzorovej štruktúry;
- sekvencie RNA a prekurzorov sú fylogeneticky konzervované;
- inhibícia kľúčových ribonukleáz v biogenéze miRNA musí viesť k poklesu hladín krátkych RNA a k akumulácii jej prekurzorových štruktúr (Ambros a kol., 2003).

Počet známych miRNA stále narastá a v súčasnosti je identifikovaných a popísaných viac ako 2000 (<https://www.miRBase.org>). Tieto molekuly majú potenciál regulovať viac než polovicu kódujúcich génov v ľudskom genóme, pričom každá miRNA môže regulovať stovky cieľových mRNA (Hansen a kol., 2011).

### BIOGENÉZA A FUNKCIA MiRNA

V rámci biogenézy (Obr. 2) obsahujú gény pre miRNA vlastné promótoary a sú prepisované pomocou RNA polymerázy II do primárnych transkriptov (pri-miRNA). Pri-miRNA sú následne zostrihované ribonukleázou III (Drosha) a viažu sa na dsRNA (double-strand RNA) pomocou proteínu označovaného Pasha (alebo DGCR8, DiGeorge syndrome chromosomal region 8) na krátke, 70 nukleotidov dlhé vlásoknicové štruktúry pre-miRNA. Spoločne vytvárajú multiproteínový komplex nazývaný mikroprocesor. Pre-miRNA sú ďalej transportované do cytoplazmy pomocou GTP-dependentného transportného proteínu Exportín 5 (Exp-5). Exp-5 rozpoznáva dvojnukleotidové prečnievanie, ktoré zanechá na 3'konci vlásoknicovej pre-miRNA ribonukleáza Drosha. Transport je aktívny, energeticky závislý na väzbe GTP s malým proteínom s GTPázovou aktivitou Ran, ktorá je súčasťou transportného komplexu. V cytoplazme sú pre-miRNA spracované do podoby maturovaných





Obr. 2. Model biogenézy a biologickej funkcie mikroRNA

dvojreťazových miRNA interakcií s endonukleázou Dicer, ktorá je v komplexe dsRNA s väzobným proteínom TRBP (human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) (Carthew a kol., 2009).

Pri spracovávaní endonukleázou Dicer dochádza k rozvinutiu dvojreťazovej miRNA. Prvý reťazec maturovanej miRNA označovaný ako „guide strand“ je inkorporovaný do multiproteínového komplexu miRISC (miRNA Induced Silencing Complex). Druhý reťazec tzv. „passen-

ger strand“ je uvoľnený a degradovaný. O osude reťazca rozhoduje stabilita párovania na 5'konci; vedúci reťazec je ten, ktorý je menej stabilný na 5'konci duplexu guided strand/passenger strand. Pozíciu zostihovaných miest pre enzýmy Drosha a Dicer určujú vlastnosti 5' terminálnych alebo 3' terminálnych nukleotidov (Winter a kol., 2011).

Spracovanie prekurzorových štruktúr týmito enzýmami nie je vždy identické, môže tak viesť k vzniku izoforiem miRNA s rozdielnymi zakon-

čienami a následne aj s rozdielnym osudom jednotlivých reťazcov miRNA. Gény pre miRNA produkujú predovšetkým jeden dominantný reťazec miRNA (Winter a kol., 2009). Pomer duplexu sa môže meniť v rôznych tkanivách, v rozdielnych vývojových štádiách či v priebehu nádorovej transformácie. Maturovaná miRNA, ktorá je začlenená do multiproteínového komplexu miRISC realizuje svoju funkciu väzbou na nie úplne komplementárne miesta v rámci 3'UTR cieľovej mRNA (Krol a kol., 2010). 3'UTR oblasť kontroluje mnoho aspektov metabolizmu mRNA akými sú transport, lokalizácia, účinnosť translácie a stabilita. Tieto oblasti môžu dosahovať dĺžky niekoľkých kilobáz (kb) a obsahujú väzobné miesta pre rôzne regulačné proteíny a miRNA, čo umožňuje značnú dynamickú reguláciu (Newman a Hammond, 2010).

MiRNA inhibuje expresiu cieľových génov post-transkripčne na úrovni translácie, pričom komplex miRISC je tvorený predovšetkým proteínmi Ago1-4 (Argonaute), proteínmi Gemin3 a Gemin4 (Gen nuclear organelle associated protein) a je analogický ku komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Úplná komplementarita miRNA s cieľovou mRNA preto umožňuje degradáciu komplexu miRISC katalyzovanú proteínom Ago2. Neúplná komplementarita je spojená s inhibíciou translácie (Carthew a kol., 2009).

## MiRNA A LUDSKÝ GENÓM

Väčšina medzigénových miRNA má primárne transkripty dlhé približne 3–4 kb s jasne definovaným štartovacím nukleotidom a poly(A) signálom vymedzujúcim hranicu transkriptu. Gény pre miRNA sú rozmiestnené na všetkých ľudských chromozómoch s výnimkou chromozómu Y. Približne 50 % miRNA sa nachádza v podobe klastrov, ktoré sú prepisované ako polycistronické primárne transkripty (Kim a Nam, 2006). V genóme sa miRNA vyskytujú v rôznom vzťahu vzhľadom k známym a definovaným transkripčným jednotkám. Medzigénové

miRNA môžu byť monocistronické so svojím vlastným promótorom alebo polycistronické, pričom niekoľko miRNA je prepisovaných ako klastre primárnych transkriptov, deliacich sa o jeden promótor. Ďalšia skupina génov pre miRNA sú intrónové miRNA, ktoré sa vyskytujú v intrónových oblastiach kódujúcich gén alebo gén pre nekódujúcu RNA. Intrónové RNA sa môžu vyskytovať samostatne alebo v klastroch a sú prepisované z promótoru hostiteľského génu, následne spracované klasickou biogenetickou dráhou z daného intrónu. Špeciálny prípad tvorí tzv. miRtróny, kde intrón priamo zodpovedá sekvencii pre-miRNA so zastrihnutými miestami na oboch koncoch. V takom prípade nie je potrebný k maturácii miRtrónu mikroprocesorový komplex. Najväčšou skupinou miRNA sú exónové miRNA, ktoré sa často nachádzajú na prechode exónu a intrónu v rámci génu pre nekódujúcu RNA. Tieto miRNA sú transkribované z promótoru hostiteľského génu a ich maturácia často vedie k inaktivácii jeho transkriptu (Olena a Patton, 2010).

## MiRNA AKO BIOMARKER

MiRNA má dôležité postavenie v post-transkripčných reguláciách génovej expzie mnohých onkogénov a nádorových supresorov. Okrem špecifických expresných profilov v ná-

Tab. 1. Príklady mikroRNA nachádzajúce sa v telových tekutinách pri vybraných nádorových ochoreniach (Cortez a kol., 2011)

Telová tekutina	miRNA
Nádor prsníkov	miR-195, let-7-a
Nádory vaječníkov	miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a
Nádory močového mechúra	miR-126, miR-152, miR-182
Nádory pečene	miR-500
Nádory žalúdka	miR-17, miR-21, miR-106a, miR-106b
Nádory prostaty	miR-141, miR-16, miR-92a, miR-92b, miR-103, miR-107, miR-197, miR-34b, miR-328, miR-636, miR-640, miR-766

dorovom tkanive, vykazujú miRNA aj ďalšie vlastnosti vďaka ktorým predstavujú ideálny nádorový biomarker (Tab. 1). Medzi tieto vlastnosti patrí napríklad ich vysoká stabilita, ľahká detekcia, široký dynamický rozsah a korelácia so známymi klinicko-patologickými charakteristikami (Chan a kol., 2011). Cirkulujúca miRNA preukázala veľmi dobré analytické vlastnosti nielen v diagnostike rôznych typov solídnych nádorov, ale aj v ďalších klinicko-patologických stratifikáciách (Brase a kol., 2010; Reid a kol., 2011).

### Nádorové ochorenia žien

**Nádory prsníkov** predstavujú celosvetovo najčastejšie diagnostikované nádorové ochorenie u žien. U žien do 25 rokov sú karcinómy vzácné. S pribúdajúcim vekom sa frekvencia ich výskytu zvyšuje. Približne tretina pacientiek umiera v dôsledku metastázovania nádoru. Na vzniku a rozvoji ochorenia sa podieľa celý rad faktorov, ktoré možno všeobecne rozdeliť na genetické, napr. mutácie v génoch **BRCA1**, **BRCA2** (Breast Cancer), **PTEN** (Phosphatase and Tensin homolog) a ďalšie, ako hormonálne (napr. dĺžka expozície estrogénu, prolaktínu), alebo environmentálne (napr. ionizujúce žiarenie, obezita, nevhodná strava, nedostatok fyzickej aktivity). Zatiaľ čo prvá skupina sa uplatňuje prevažne pri vzniku dedičných foriem karcinómu prsníkov (približne 10–15 % prípadov), ostatné skupiny zohrávajú významnú úlohu pri zriedkavejších formách karcinómu prsníkov (Klener a Abrahámová, 2002).

Väčšina malígnych nádorov prsníkov vzniká z epiteliálnych buniek mliečnej žľazy, a to najčastejšie z terminálnych lalôčikov prsnej žľazy a z jej vývodov. Vzniku karcinómu predchádza atypická duktálna alebo lobulárna hyperplázia, z ktorej sa vyvinie neinvazívna forma karcinómu označovaná ako karcinóm *in situ*. Najdôležitejším zástupcom a zároveň najbežnejším typom invazívneho karcinómu prsníkov je tzv. invazívny duktálny karcinóm (Gathani a kol., 2005). Ide o heterogénnu skupinu tumorov, ktoré nemožno zaradiť medzi ostatné presne definované histologické typy invazívnych karcinómov prsní-

kov. Z molekulového hľadiska sú karcinómy prsníkov veľmi heterogénnym ochorením, preto sa karcinómy delia do rôznych podskupín. Najpoužívanejšie je delenie na základe expresie steroidných receptorov (ER – estrogénový receptor  $\alpha$ , PR – progesterónový receptor a HER2 – ľudský epidermálny rastový receptor prípadne amplifikácia jeho génu). Na základe morfológických, molekulových a biologických odlišností jednotlivých karcinómov a klinického štádia ochorenia sa v súčasnosti stanovuje prognóza jednotlivých pacientov a ich liečba. Na prvom mieste v liečbe lokalizovaného ochorenia je chirurgické riešenie tumoru, prípadne uzlín.

Druhou najčastejšou formou rakoviny a gynecologickou malignitou u žien mladších ako 50 rokov je **rakovina krčka maternice**. Najčastejšie sa vyskytuje v rozvojových krajinách a je druhou najčastejšou príčinou smrti žien v dôsledku onkologického ochorenia. Najvyššie hodnoty výskytu ochorenia sú zaznamenané v strednej Amerike, v Karibskej oblasti, južnej Amerike. Naopak, najnižší výskyt ochorenia je v južnej a západnej Európe, v Japonsku a Číne. Takmer 30 % zo všetkých rakovinových ochorení je spôsobených infekčnými činiteľmi ako sú baktérie, vírusy a parazity.

**Endometriálne karcinómy** sa objavujú u žien vo veku medzi 55–65 rokov. Známe sú rizikové faktory vzniku týchto nádorov: obezita (zvýšená syntéza estrogénu v tukovom tkanive, nadobličkách a vaječníkoch), diabetes, hypertenzia a neplodnosť (žena, ktorá nerodila a má neovulačné cykly). Karcinómy často vznikajú na podklade atypickej hyperplázie endometria. Nádory môžu rásť exofyticky do dutiny maternice alebo sú infiltrované do steny maternice. Histologicky odpovedajú diferencovaným adenokarcinómom, objavujú sa aj nádory so skvamóznou zložkou. Tie patria k adenoskvamóznym karcinómom. K metastázam dochádza v neskoršom období. Napadnuté bývajú lymfatické uzliny panvy, ale aj vzdialené orgány.

Nádory z povrchového epitelu a strómy sú najpočetnejšou skupinou **nádorov vaječníkov**. Patrí sem celý rad nádorov označovaných ako seróz-

ne, mucinózne, endometrioidné a svetlobunkové. V celej panvovej oblasti je na podbrušnici epitel, ktorý sa môže diferencovať v epitel endocervikálny, endometriálny a tubárny, s možnosťou následnej nádorovej transformácie. Neexistujú príznaky, ktoré by mohli signalizovať počiatočné štádium. Diagnóza sa v 70 % stanoví až v III. alebo IV. klinickom štádiu. Malé percento nádorov býva objavené náhodne pri brušných operáciách alebo z dôvodu akútnej komplikácie nádoru.

V súčasnosti patria medzi najštudovanejšie biomolekuly s potenciálom diagnostického využitia aj pri malígnych ochoreniach žien aj molekuly miRNA (Tab. 2).

**Tab. 2. Prehľad miRNA pri ženských malignitách (Wang a Luo, 2015; Yanokura a kol., 2015)**

	miRNA
<b>Karcinóm prsníkov</b>	miR-21, miR-155, miR-182, miR-10b, miR-27a, miR-9, miR-195, let7-a
<b>Karcinóm endometria</b>	miR-185, miR-106a, miR-181a, miR210, miR-423, miR-103, miR-107, miRlet7c, miR-205, miR-449 and miR-429
<b>Karcinóm vaječníkov</b>	miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a

### Nádory urogenitálneho traktu

Klasifikácia nádorov močového mechúra určuje dve hlavné skupiny – neinvazívnu skupinu papilárnych tumorov a invazívne nádory. Typické papilómy sú vzácne, častejšie sa vyskytujú ako invertovaný papilóm, papilárna urotelová neoplázia s nízkym malígnym potenciálom, neinvazívny papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity a neinvazívny papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity. Asi v 10 % prípadov sa nádor mení na invazívny papilokarcinóm. Rozlíšenie papilómu od karcinómu je v niektorých prípadoch veľmi náročné. Papilárna urotelová neoplázia nízkeho malígneho potenciálu je ochorenie, ktoré môže mať recidívu. Povrchový epitel je hyperplastický a jeho stratifikácia je zachovaná. Papilárny urotelový karcinóm nízkeho stupňa malignity na rozdiel od neoplázie vykazuje zvýšenie vrstvy povrchového epitelu, splývanie papíl a nevýraznú anizokaryózu. Papilárny

urotelový karcinóm vysokého stupňa malignity – vytvárajú sa solídne nádorové ložiská, kde chýba papilárna úprava, stratifikácia epitelu. Objavujú sa početné mitózy a výrazná anizocytóza a anizokarióza. Tieto typy karcinómov sa môžu objavovať aj v obličkovej panvičke. Vyskytujú sa menej často než podobné nádory močového mechúra, tvoria 5–10 % všetkých nádorov obličiek. Aj keď sú liečené nefrektómiou, 5 rokov prežítia približne 50 % pacientov.

**Uroteliálny karcinóm močového mechúra (UBC)** patrí k najčastejšiemu nádorovému ochoreniu močových ciest. Najvyššia incidencia je zaznamenaná v krajinách severnej Ameriky, severnej Afriky a Európy. Najnižšia incidencia je zaznamenaná v krajinách strednej Afriky a na juhovýchode Ázie.

Dôležitú úlohu počas progresie uroteliálneho karcinómu močového mechúra zohrávajú aj molekuly miRNA (Tab. 3). Počas epigenetických zmien alebo defektov biogenézy sa vyskytuje u UBC down-regulácia alebo up-regulácia. Down-regulácia miRNA zahŕňa zastavenie bunkového cyklu, proliferáciu, apoptózu, metastázovanie a rezistenciu voči liekom. Molekuly miRNA sú často spájané s rozsahom a typom tumoru či prežitím pacienta, a preto by v budúcnosti mohli miRNA predstavovať prognostický a diagnostický marker.

**Tab. 3. Prehľad miRNA pri uroteliálnom karcinóme močového mechúra (Enokida a kol., 2016)**

	miRNA
<b>Karcinóm močového mechúra</b>	miR-1, miR-16, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b, miR-29c, miR-30a, miR-34a, miR-99a, miR-100, miR-101, miR-124, miR-125b, miR-128, miR-129, miR-133a, miR-133b, miR-135a, miR-138, miR-143, miR-144-5p/3p, miR-145, miR-186, miR-193a, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-214, miR-218-1, miR-221, miR-320a, miR-320c, miR-449a, miR-485, miR-490, miR-493, miR-497, miR-574, miR-576, miR-590, miR-126, miR-152, miR-182

**Karcinómy ureteru** patria k vzácne sa vyskytujúcim nádorom. **Karcinómy močového mechúra** sa v posledných desaťročiach vyskytujú takmer tak často ako bronchogénne karcinómy. Postihujú



mužov asi trikrát častejšie ako ženy. U fajčiarov je riziko vzniku karcinómu 2–4krát vyššie. Tretím, najčastejším sa vyskytujúcim nádorom mužov, ktorý často vedie k smrti pacientov, je **karcinóm prostaty**. Najčastejšie sa objavuje u mužov vo veku 65–75 rokov. Latentné karcinómy sa vyskytujú asi u 50 % mužov starších ako 80 rokov. Príčiny tak vysokého výskytu karcinómov prostaty nie sú presne známe. Okrem hormonálnych vplyvov hrajú úlohu aj genetické vplyvy a vplyvy prostredia. Hormonálne vplyvy vychádzajú z faktu, že rast nádoru je v niektorých prípadoch potlačený odstránením semenníkov alebo aplikáciou estrogénov.

Epigenetické zmeny prispievajú k iniciácii a progresii tohto ochorenia. V súčasnosti sa intenzívne skúmajú tri typy epigenetických zmien: metylácia DNA, remodelácia chromatinu a regulácia génovej expresie molekulami miRNA (Jerónimo a kol., 2001). Karcinóm prostaty postupnými zmenami v tkanivách zahŕňa stratu expresie ribonukleázy L kódovanej génom **HPC1** (Hereditary Prostate Cancer 1), takisto zmeny týkajúce sa génu pre androgénny receptor (AR) a génu pre **MSR1** (Macrophage Scavenger receptor 1). Hereditárne zmeny majú takisto vplyv v sekvenciách DNA, napríklad mutácia v génoch **BRCA1** a **BRCA2**. Výsledkom je zmena normálneho tkaniva (bez patologických zmien) na tkanivo, ktoré sa označuje ako prostetická intraepiteliálna neoplázia (PIN) (Shand a Gelmann, 2006).

V závislosti od spôsobu vzniku génu **TM-PRSS2-ETS** v léziách typu PIN sú dve rôzne cesty patogenézy karcinómu prostaty (Shah a Chinnaiyan, 2009). K vzniku génu dochádza v high-grade PIN, a to približne u 20 % kar-

cinómov prostaty. Vzniká adrogénny promótor regulovaného génu špecifického pre prostatu – transmembránové proteázy serínového typu 2 (**TM-PRSS2**, lokus 21q22.2) a gén z rodiny transkripčných faktorov vírusu erytroblastosis E26 transformujúci sekvenciu ETS (**ETV1**, lokus 7q21.2 alebo **ERG**, lokus 21q22.3). V tkanive HGPIN, v ktorom došlo ku vzniku fúzneho génu **TM-PRSS2-ETS**, dochádza k zníženej expresii tumor supresorových génov **PTEN** a **NKX3.1** (**NK3 homeobox 1**) a ku zvýšenej expresii onkogénu **c-MYC** (**MYC proto-oncogene**). Takto zmenené tkanivo sa mení na karcinóm prostaty, zvyšuje sa expresia **c-MYC**, znižuje sa expresia **p53** a vzniká pokročilý karcinóm prostaty. Ak dochádza k vzniku metastáz, metastázy si zachovávajú podobný typ fúzie **TM-PRSS2-ETS**. Ak pred vznikom metastáz nedôjde k translokácií a fúzny gén nevzniká, neobjavuje sa ani u metastáz. Neprítomnosť fúzneho génu sa ukazuje ako priaznivý prognostický faktor karcinómu prostaty (Nam a kol., 2007).

Ku genetickým zmenám prispievajú aj epigenetické zmeny, napríklad metylácia DNA. Pri metastatickom karcinóme dochádza ku globalnej hypometylácii cytozínu, ktorá je spojená s chromozomálnou instabilitou a progresiou ochorenia (Jerónimo a kol., 2001). Zvýšená expresia v dôsledku hypometylácie promótoru bola zaznamenaná v génoch **IGF2** (Insulin Like Growth Factor 2), **CAGE** (Cap Analysis Gene Expression), **CYPB1** (Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1), **HPSE** (Heparanase), **WNT5A** (Protein wnt Family Member 5a) a ďalších. Počas patogenézy dochádza k hypermety-

Tab. 4. Prehľad miRNA pri karcinóme prostaty (Kumar a Lupold, 2016)

Karcinóm prostaty	miRNA	
	Znížená expresia	Zvýšená expresia
Tkanivo	miR-100, miR-107, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-130a, miR-133a, miR-133b, miR-143, miR-145, miR-149, miR-150, miR-195, miR-199a	miR-141, miR-148a, miR-15b, miR-17, miR-182, miR-183, miR-18a, miR-191
Sérum	miR-223, miR-24, miR-26b, miR-30c	miR-103, miR-106a, miR-107, miR-141, miR-16, miR-200b, miR-200c

lácii génov zúčastňujúcich sa bunkového cyklu, opráv DNA, hormonálnych odpovedí, apoptózy a k hypermetylácii promótoru niektorých génov kódujúcich miRNA (Tab. 4). Ďalší mechanizmus prispievajúci k deregulácii expzie génov je remodelácia chromatinu a posttranslačné modifikácie histónov.

## ZÁVER

MiRNA sa funkčne podieľajú na regulácii niekoľkých hlavných znakov malígneho nádoru, zasahujú do molekulových procesov nádorových kmeňových buniek a procesu autofágie. Ideálny nádorový biomarker by mal byť produkovaný nádorovými bunkami alebo byť odpoveďou na ich funkcie a nemal by byť prítomný v zdravých tkanivách alebo tkanivách napadnutých benígnym ochorením. Ďalej by mal byť ľahko stanoviteľný v dobre dostupnom biologickom materiáli a mal by korelovať s veľkosťou tumoru, prognózou ochorenia alebo odpoveďou na liečbu. Mnohé z týchto kritérií, v kontexte s doposiaľ realizovanými štúdiami zaoberajúcimi sa miRNA ako potenciálnym nádorovým biomarkerom, predurčujú miRNA ako nový, perspektívny onkologický marker využiteľný nielen v laboratórnej diagnostike onkologických ochorení, ale aj pri liečbe a predovšetkým v prevencii.

*Práca vznikla pri riešení projektov VEGA 1/0372/17 a VEGA 1/0873/16.*

## LITERATÚRA

1. AMBROS, V., BARTEL, B., BARTEL, D. P., 2003: A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9: 277–279.
2. BRASE, J. C., WUTTING, D., KUNER, R., SÜLTMANN, H., 2010: Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol. Cancer*, 9: 306.
3. CARTHEW, R. W., SONTHEIMER, E. J., 2009: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136, 642–655.
4. CORTEZ, M. A., RAMOS, C., FERDIN, J., LOPEZ-BERESTEIN, G., SOOD, A. K., CALIN, G. A., 2011: MicroRNAs

- in body fluids- the mix of hormones and biomarkers. *Nature Rev., Clin. Oncol.*, 8: 467–477.
5. ENOKIDA, H., YOSHINO, H., MATSUSHITA, R., NAKAGAWA, M., 2016: The role of microRNAs in bladder cancer. *Investig. Clin. Urol.*, 57 Suppl 1: S60–S76.
  6. FARAZI, T. A., HOELL, J. I., MOROZOV, P., TUSCHL, T., 2001: MiRNAs in human cancer. *J. Patol.*, 223:102–115.
  7. GATHANI, T., BULL, D., GREEN, J., REEVES, G., BERAL, V., 2005: Breast cancer histological classification: agreement between the Office for National Statistics and the National Health Servis Breast Screening Programme. *Breast Cancer Res.*, 7: 1090–1096.
  8. HANSEN, T. B., KJEMS, J., BRAMSEN, J. B., 2011: Enhancing miRNA annotation confidence in miRBase by continuous cross dataset analysis. *RNA Biol.*, 8: 378–383.
  9. CHAN, E., PADRO, D. E., WEIDHAAS, J. B., 2011: Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends Mol. Med.*, 17: 235–243.
  10. JERÓNIMO, C., BASTIAN, P. J., BJARTELL, A., CARBONE, G. M., CATTO, J., CLARK, S., RUI, H., NELSON, W., SHARIAT, S., 2001: Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur. Urol.*, 60: 753–766.
  11. KIM, V. N., NAM, J. W., 2006: Genomics of microRNA. *Trends Genet.*, 22: 165–173.
  12. KLENER, P., ABRAHÁMOVÁ, J., 2002: Nádory prsu. v **Klen-er P.: Klinická onkológia**, 1. vyd., Praha: Galén, 495–513.
  13. KROL, J., LOEDIGE, I., FLIPOWICZ, W., 2010: The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 11: 597–610.
  14. KUMAR, B., LUPOLD, S., 2016: MicroRNA expression and function in prostate cancer: a review of current knowledge and opportunities for discovery. *Asian J. Androl.*, 18: 559–567.
  15. LEE, R. C., FEINBAUM, R. L., AMBROS, V., 1993: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843–854.
  16. NAM, R. K., SUGAR, L., YANG, W., SRIVASTAVA, S., KLOTZ, L. H., YANG, L. Y., 2007: Expression of the TM-PRSS2: ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 97: 1690–1695.
  17. NEWMAN, M. A., HAMMOND, S. M., 2010: Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev.*, 24: 1086–1092.
  18. OLENA, A. F., PATTON, J. G., 2010: Genomic organization of microRNAs. *J. Cell Physiol.*, 22: 540–545.
  19. REID, G., KIRSCHNER, M. B., VAN ZANDIWIJK, N., 2011: Circulation microRNAs: Association with disease and



- potential use as biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 80: 193–208.
20. REINHART, B. J., SLACK, F. J., BASSON, M., PASQUINELLI, A. E., BETTINGER, J. C., ROUGVIE, A. E., HORVITZ, R., RUVKUN, G., 2000: The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901–906.
21. SHAH, R. B., CHINNAIYAN, A. M., 2009: The discovery of common recurrent transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)-erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS) gene fusions in prostate cancer: significance and clinical implications. *Adv. Anat. Pathol.*, 16: 145–153.
22. SHAND, R. L., GELMANN, E. P., 2006: Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr. Opin. Urol.*, 6, 16: 123–131.
23. WANG, W., LUO, Y. P., 2015: MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 16 (1): 18–31.
24. WINTER, J., DIEDERICHS, S., 2011: MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol. Biol.*, 676: 3–22.
25. WINTER, J., JUNG, S., KELLER, S., GREGORY, R. I., DIEDERICHS, S., 2009: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.*, 11: 228–234.
26. [www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)
27. YANOKURA, M., BANNO, K., IIDA, M., IRIE, H., UMENE, K., MASUDA, K., KOBAYASHI, E. T., AOKI, D., 2015: MicroRNAs in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications. *EXCLI J.*, 14: 190–8.



## DEPRENYL POZITÍVNE OVPLYVŇUJE ANTIOXIDAČNÝ STATUS V SEMENNÍKU POTKANA A ZVYŠUJE POČTY SPERMIÍ

HORVÁTHOVÁ, F.<sup>1</sup>, DANIELISOVÁ, V.<sup>2</sup>, MIHALIK, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav anatómie UPJŠ LF, Šrobárova 2, 041 80 Košice

<sup>2</sup>Neurobiologický ústav SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice

frantiska.horvathova@student.upjs.sk

### SÚHRN

Téma neplodných mužov a mužov so zníženou plodnosťou je čoraz aktuálnejšia. Mnoho článkov zameraných na túto problematiku je zameraných na suplementáciu antioxidantmi, pretože sa ukázalo, že jednou z príčin neplodnosti je oxidačný stres. Bolo dokázané, že deprenyl v nízkych dávkach má preukázateľné antioxidačné vlastnosti. Zistili sme, že jeho intraperitoneálna aplikácia v dvoch rôznych dávkach pozitívne ovplyvnila oxidačný status v semenníku potkana. Zatiaľ čo vysoká dávka (HDD, high dose of deprenyl; 0,25 mg/kg/deň) zvýšila aktivitu SOD a CAT, pri nízkej dávke (LDD, low dose of deprenyl, 0,0025mg/kg/deň) došlo okrem k vzostupu antioxidačných enzýmov aj k zvýšeniu počtu spermií oproti kontrolnej skupine o 19%. Deprenyl pozitívne ovplyvňuje antioxidačný status v semenníku potkana a jeho nízka dávka zvyšuje počty spermií.

**Kľúčové slová:** deprenyl, mužská neplodnosť, spermie, MnSOD, CuZnSOD, CAT

### ABSTRACT

Infertility and reduced fertility is one of the topics in recent years. Many articles are focused on antioxidant supplementation. It has been shown that one cause of infertility is oxidative stress. It was proved that low dose administration of deprenyl has antioxidant properties. We observed that the intraperitoneal administration of deprenyl in two different doses has positive influence on the antioxidant status in rat testes. While high dose of deprenyl (HDD, 0,25 mg/kg/day) elevated the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), low dose of deprenyl (LDD, 0,0025 mg/kg/day) increased not only SOD but also sperm count compared to control by 19%.

**Key words:** deprenyl, male infertility, sperm, MnSOD, CyZnSOD, CAT

### ÚVOD

Deprenyl sa využíva v terapii Parkinsonovej choroby, no jeho účinky sú mnohostranné. Je to

látka so širokým spektrom účinku. Ten je však závislý na dávke, druhu zvierat, pohlaví a veku (Kunikowska a kol., 2002). Jeho dlhodobé užívanie zvyšuje hladiny antioxidantných enzýmov superoxid-dizmutázy (SOD) a katalázy (CAT) (Carrillo a kol., 1991), redukuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (Simon a kol., 2005), tiež redukuje produkciu peroxidu vodíka v procese metabolizmu dopamínu (Olanow a kol., 1995) a udržiava integritu mitochondriálnej membrány (Simon a kol., 2005).

Vplyv oxidačného stresu na plodnosť, počet a pohyblivosť spermií je študovanou témou. Jeho negatívny vplyv sa prejavuje zmenami v DNA, zníženou pohyblivosťou a počtom spermií a tiež zníženými oplodňovacími schopnosťami (Hamdy a kol., 2012). Pozitívnu súvislosť medzi zvýšenými hladinami SOD v seminálnej plazme a zvýšeným počtom spermií zistili Shiva a kol. (2011).

Schopnosť deprenylu zvýšiť aktivitu antioxidantných enzýmov sa dokázala v nervovom tkanive a v pečeni. SOD sú enzymatické antioxidanty, ktoré dizmutujú superoxid na peroxid vodíka. Ten je v nasledujúcom kroku premieňaný pomocou CAT na kyslík a vodu. Cieľom tohto experimentu bolo zistiť, či intraperitoneálna aplikácia deprenylu v dvoch rôznych dávkach, vyvolá zmenu v aktivite medeno-zinkovej a mangánovej superoxid-dizmutázy (CuZnSOD a MnSOD) a na ne nadväzujúcu aktivitu CAT v semenníku potkana.

## MATERIÁL A METÓDY

Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 3 mesiacov boli náhodne rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina (C), nízka dávka deprenylu (LDD) a vysoká dávka deprenylu (HDD). Zvieratám bol počas 30 dní intraperitoneálne podávaný deprenyl, LDD (0,0025 mg/kg na deň), HDD (0,25 mg/kg na deň) alebo fyziologický roztok (C, control; kontrolná skupina). Zvieratá boli kŕmené štandardnou diétou v miestnosti s regulovanou teplotou a pravidelným svetelným cyk-

lom (12h/12h). Po ukončení podávania deprenylu boli usmrtené letálnou dávkou tiopentalu (40 mg/kg). Manipulácia a experiment so zvieratami bol schválený Etickou komisiou UPJŠ LF aj ŠVPS SR (Číslo povolenia: Ro-1757/10-221b).

## ODBER A SPRACOVANIE VZORIEK

Tkanivo semenníkov z usmrtených zvierat sa využilo na meranie aktivity SOD a CAT. Aktivity SOD bola meraná pomocou modifikovanej nepriamej spektroskopickéj inhibičnej metódy. Prostredníctvom xantín-xantinoxidázy bol vo vzorke generovaný superoxid, o ktorý súťažili SOD a nitroblutetrazolium (NBT). NBT je superoxidom redukovaný na modrý formazán, ktorého absorbanca bola vyhodnotená pri 560nm. Získané údaje boli zakreslené do grafu ako inhibícia vs. proteínová koncentrácia. Hodnoty SOD enzýmov sú udávané v jednotkách na g proteínu (U/g proteín), pričom jedna jednotka je definovaná ako množstvo, ktoré redukuje absorbanciu o 50%. Aktivita CuZnSOD bola vypočítaná ako rozdiel medzi aktivitou celkovej SOD a aktivitou MnSOD tak, že aktivita CuZnSOD bola inhibovaná prídavkom 2mM kyanidu sodného. Aktivita CAT bola určená spektrofotometrickou metódou podľa Gótha. Supernatant bol inkubovaný s peroxidom vodíka (substrát). Enzymatická reakcia bola zastavená pridaním 32mM molybdátu amónneho. Intenzita vzniknutého žltého komplexu (molybdát amónny – peroxid vodíka) bola meraná pri 405nm. Aktivita CAT je udávaná v jednotkách U/g proteínu.

Prísemenníky po odobratí do predhriateho PBS (pH=7,2) boli prenesené do 1 ml média 199 s Hanksovými soľami a Hepesom (Gibco, 12340-030). Následne boli niekoľkokrát nastrihnuté, čím sa spermie uvoľnili do roztoku. Z neho sme odobrali 50 µl a preniesli do 950 µl fixačného roztoku (riedenie 1:20). Fixačný roztok sme pripravili rozpustením 50 g NaHCO<sub>3</sub> a 10ml 35% formalínu v 1000 ml dH<sub>2</sub>O. Po dokonalom premiešaní sme preniesli po 10 µl pracovného roztoku so spermiami na oba konce Neubauerovej ko-

môrky, kde sme spermie spočítali v 5 štvorcoch ( $V = 4 \text{ nl}$ ,  $S = 0,04 \text{ mm}$ ,  $h = 0,01 \text{ mm}$ ), v mriežke číslo 5. Získané hodnoty boli vynásobené faktorom riedenia 20, čím sme dostali konečný počet spermíí v  $10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

Aktivity enzýmov boli vyhodnotené pomocou testu ANOVA. Vzájomný vzťah medzi aktivitou enzýmov a počtom spermíí bol určený regresnou analýzou.

## VÝSLEDKY

Intraperitoneálna aplikácia deprenylu pozitívne ovplyvnila aktivitu SOD a CAT. Výrazný nárast aktivity CuZnSOD proti kontrole bol zrejмый v oboch experimentálnych skupinách. Merania MnSOD zaznamenali najvyššiu aktivitu pri nízkej dávke, v HDD skupine stúpila MnSOD proti kontrole len nepatrne (Tab. 2). Celková SOD a tiež aktivita CAT zaznamenali zvýšenu

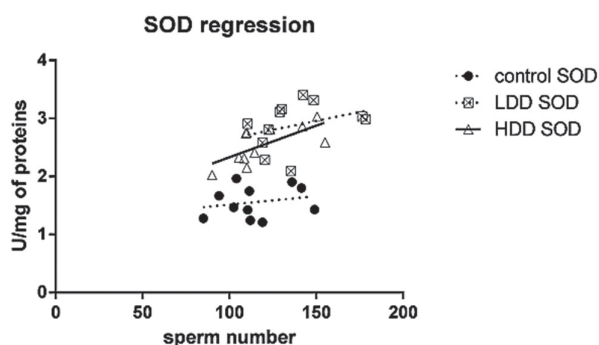
aktivitu v oboch experimentálnych skupinách (Tab. 2).

Počet spermíí stúpil v HDD oproti C len o 3%, avšak po podaní nízkej dávky deprenylu došlo k vzostupu počtu spermíí oproti kontrole až o 19% (Tab. 2).

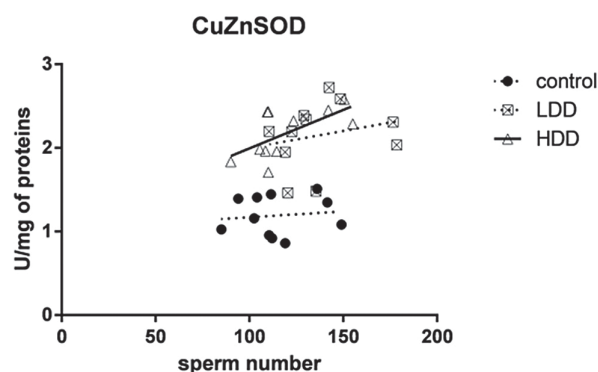
Výsledky regresných analýz naznačujú, že existuje súvislosť medzi aktivitou SOD a počtom spermíí (Tab. 1). S narastajúcou aktivitou SOD stúpil počet spermíí (Obr. 1, 2, 3). Štatistická významnosť bola dosiahnutá pri MnSOD v LDD. Negatívna korelácia medzi CAT a počtom spermíí poukazuje na to, že aktivita CAT na počet spermíí nevyplýva (Obr. 4)

## DISKUSIA

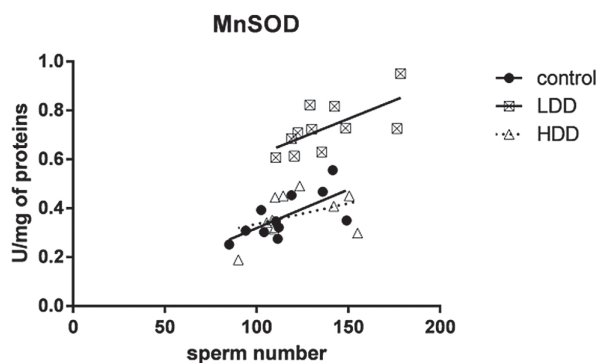
Intraperitoneálna aplikácia deprenylu zvýšila u pokusných zvierat aktivitu antioxidantných enzýmov v semenníkoch. V regresných analýzach



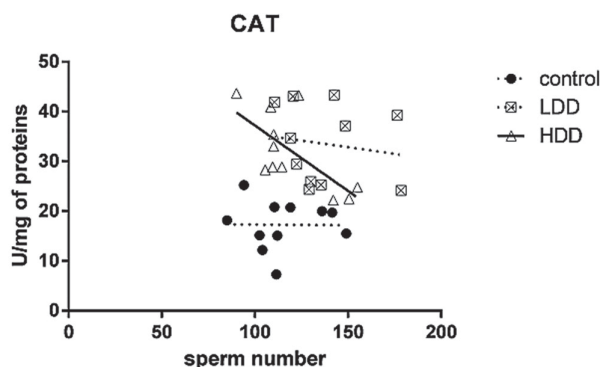
Obr. 1. Regresná analýza celkovej SOD a počtu spermíí



Obr. 2. Regresná analýza CuZnSOD a počtu spermíí



Obr. 2. Regresná analýza MnSOD a počtu spermíí



Obr. 3. Regresná analýza CAT a počtu spermíí

Tab. 1. Hodnoty štatistickej významnosti regresnej analýzy a počtu spermií

	SOD	CuZnSOD	MnSOD	CAT
C	0,5	0,72	0,022	0,9704
LDD	0,3	0,5	0,028	0,6533
HDD	0,02	0,03	0,23	0,0206

Tab. 2. Priemerné hodnoty SOD, CAT a spermií v jednotlivých skupinách

	SOD	CuZnSOD	MnSOD	CAT	Počet spermií v miliónoch
C	1,56 ±0,256	1,19±0,169	0,37±0,088	17,29±4,67	115,135
LDD	2,88±0,394	2,15±0,295	0,73±0,098	33,55±6,51	137,545
HDD	2,55±0,308	2,18±0,222	0,37±0,084	32,01±6,55	119,909
ANOVA	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

sme štatistickú významnosť nedosiahli v CuZn-SOD. CuZnSOD pozostáva z dvoch frakcií, SOD1 a SOD3. SOD1 je cytoplazmatická forma a SOD3 extracelulárna, ktoré sme však v tomto experimente nevedeli rozlíšiť. Významný je poznatok, že aktivitu CuZnSOD v semenníku zvýšili obe dávky deprenylu takmer na rovnakú hodnotu. CuZnSOD tvorí majoritnú zložku meraných SOD enzýmov, preto sa štatistická významnosť nedosiahla ani v celkovej SOD.

Keďže na aktivitu SOD úzko nadväzuje aktivita CAT. Jej nameraná aktivita ako keby kopírovala aktivitu celkovej SOD a bola zvýšená v oboch experimentálnych skupinách. Negatívna korelácia medzi aktivitou CAT a počtom spermií naznačuje, že počet spermií nie je na jej aktivite závislý. Aj keď je kataláza dôležitá v deštrukcii peroxidu vodíka ( $H_2O_2$ ) vytvorenom SOD enzýmami, v semenníku môže byť jej funkcia druhoradá. V degradácii  $H_2O_2$  v semenníku je asi dôležitejšia glutatiónperoxidáza, ktorej aktivita v semenníku je vyššia ako aktivita CAT (Schneider a kol., 2009).

Aktivita MnSOD bola dvojnásobne zvýšená oproti kontrole v nízkej dávke a v tejto dávke sme dosiahli aj najvyšší počet spermií. MnSOD

je dôležitý mitochondriálny enzým. Uvádza sa, že jej zvýšená expresia redukuje chromozómovú nestabilitu (van de Wetering, 2008). Avšak jej nadmieru zvýšená aktivita je spojená s rizikom nadprodukcie  $H_2O_2$ . Ak nedôjde k jeho účinnému odstráneniu, môže redukovať bunkovú proliferáciu a oddaluje vstup buniek do S-fázy (Kim a kol., 2010). Predpokladáme, že hoci došlo k zvýšeniu MnSOD, jej aktivita nepresiahla kritickú hodnotu. Na jednej strane to odôvodňujeme zvýšenou aktivitou CAT a tiež aj tým, že v spermiách, ktorých počet stúpol o 19 %, nedošlo k fragmentácii DNA (Mihalik a kol., 2015).

Nami použitá nízka dávka deprenylu, je niekoľkonásobne nižšia ako maximálna prípustná dávka v terapii Parkinsonovej choroby. Ukázalo sa, že pozitívne ovplyvňuje antioxidačný status v semenníku potkana, čo podporujú aj zvýšené počty spermií, ktoré nevykazovali poškodenie DNA. Tieto výsledky by mohli byť v budúcnosti aplikovane v terapii mužskej neplodnosti, možno aj pri kryoprezervácii spermií. Avšak je nutné dôsledné testovanie na ľudských dobrovoľníkoch, pretože účinnosť deprenylu je závislá na veku, pohlaví jedinca a od samotnej dávky deprenylu.

Práca bola čiastočne finančne podporená (30%) agentúrou Ministerstva školstva SR pre štrukturálne fondy z EÚ pre projekt CEMIO ITMS:26220120058 a čiastočne z grantov VEGA 1/0928/11 a 2/0066/12.

## LITERATÚRA

1. CARRILLO, M. C., KANAI, S., NOKUBO, M., KITANI, K., 1991: (-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci.*, 48 (6): 517–21.
2. HAMDY, A. A. ALY, HESHAM, A., EL-BESHBISHY, ZAINY, M., BANJAR, 2012: Mitochondrial dysfunction induced impairment of spermatogenesis in LPS-treated rats: Modulatory role of lycopene. *European Journal of Pharmacology*, 677, 31–38.
3. KIM, A., JOSEPH, S., KHAN, A., EPSTEIN, C. J., SOBEL, R., HUANG, T. T., 2010: Enhanced expression of mitochondria lsuperoxidedismutase leads to prolonged *in vivo* cell cycle progression and up-regulation of mitochondrial thioredoxin. *FreeRadic. Biol. Med.*, 1501–1512.
4. KUNIKOWSKA, G., GALLAGHER, I., GLOVER, V., CLOW, A., JENNER, P., 2002: Effects of short- and long-term (–)deprenyl administration on mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in rat brain. *Brain Res.*, Oct 25, 953 (1–2): 1–11.
5. MIHALIK, J., MAŠLANKOVÁ, J., SOLÁR, P., HORVÁTHOVÁ, F., HUBKOVÁ, B., ALMÁŠIOVÁ, V., ŠOLTÉS, J., ŠVAŇA, M., RYBÁROVÁ, S., HODOROVÁ, I., 2015: The effect of R(-)-deprenyl administration on reproductive parameters of rat males. *Eur. J. Pharmacol.*, May 5, 754: 148–52.
6. OLANOW, C. W., HAUSER, R. A., GAUGER, L., MALAPIRA, T., KOLLER, W., HUBBLE, J., BUSHENBARK, K., LIL-IENFELD, D., ESTERLITZ J., 1995: The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 38 (5): 771–7.
7. SHIVA, M., GAUTAM, A. K., VERMA, Y., SHIVGOTRA, V., DOSHI, H., KUMAR, S., 2011: Association between sperm quality, oxidative stress and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry*, 319–324.
8. SCHNEIDER, M., FORSTER, H., BOERSMA, A., SEILER, A., WEHNES, H., SINOWATZ, F., NEUMULLER, C., DEUTSCH, M. J., WALCH, A., HRABE DE ANGELIS, M., WURST, W., URSINI, F., ROVERI, A., MALESZEWSKI, M., MAIORINO, M., CONRAD, M., 2009: Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.*, 23: 3233–3242.
9. SIMON, L., SZILÁGYI, G., BORI, Z., TELEK, G., MAGYAR, K., NAGY, Z., 2005: Low dose (–)deprenyl is cytoprotective: it maintains mitochondrial membrane potential and eliminates oxygen radicals. *Life Sci.*, 78 (3): 225–31.
10. VAN DE WETERING, C. I., COLEMAN, M. C., SPITZ, D. R., SMITH, B. J., KNUDSON, C. M., 2008: Manganese superoxidizedismutase gene dosage affects chromosomal instability and tumor onset in a mouse model of T cell lymphoma. *Free Radic. Biol. Med.*, 44, pp. 1677–1686.





## VPLYV ANTIOXIDANTOV NA MUŽSKÉ REPRODUKČNÉ PARAMETRE

### INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON MALE REPRODUCTIVE PARAMETERS

HORVÁTHOVÁ, F., MATÉFFY, S.  
Ústav anatómie UPJŠ LF, Šrobárova 2, 041 80 Košice

#### SÚHRN

Oxidačný stres v mužskom reprodukčnom systéme spôsobuje poškodenie bunkových membrán a integritu DNA. Obvykle sú mechanizmu tvorby a eliminácie reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v rovnováhe. Jej narušenie môže viesť u mužov až k neplodnosti. Je dokázané, že ROS sú jednou z príčin neplodnosti. V snahe znížiť oxidačný stres v mužskom pohlavnom systéme sa využívali mnohé látky s antioxidantnými vlastnosťami. Mnohé z týchto látok sú známe, dlho využívané, často sú používané aj výťažky z rastlín. Menej často nachádzame informácie o novosyntetizovaných látkach, pretože testovanie je časovo a finančne náročné. Článok prináša prehľad látok, ktoré zvýšili hladiny antioxidantných enzýmov a zlepšili reprodukčné parametre v mužskom pohlavnom systéme.

**Kľúčové slová:** neplodnosť, antioxidanty, reaktívne formy kyslíka, spermie

#### SUMMARY

Oxidative stress in the male reproductive system causes damage to cell membranes and can destroy DNA integrity. Usually, there is equilibrium between the formation and scavenging of reactive oxygen species (ROS). The disruption of this mechanism can cause infertility. There is evidence that ROS belong to factors causing infertility. In order to reduce oxidative stress in the male reproductive system many substances with antioxidant properties has been used. Many of these substances are long known and lot of are plant extracts. Information of newly synthesized substances are less often because testing is time- and costly consuming. This article provides an overview of substances that increase levels of antioxidant enzymes and improve reproductive parameters in the male reproductive system.

**Key words:** infertility, antioxidants, reactive oxygen species, spermatozoa

Oxidačný stres je jedným z faktorov v etiológii mužskej neplodnosti. Je dôsledkom nerovnováhy medzi tvorbou a elimináciou reaktívnych foriem kyslíka. Reaktívne formy kyslíka (ROS, reactive oxygen species) sú vedľajším produktom fyziologických procesov a bunkového metabolizmu. Hoci ich nadprodukcia je spájaná s bunkovým poškodením, ich prítomnosť v bunke je dôležitá, pretože plnia funkciu sekundárnych poslov. Preto sa aj v semene udržiavajú nízke hladiny oxidačného stresu, aby sa zabezpečila normálna bunková signalizácia (Ford, 2004).

Nadmerná produkcia ROS môže pôsobiť škodlivo. ROS indukujú lipidovú peroxidáciu, DNA fragmentáciu, narušujú motilitu spermií a môžu narušiť normálny embryonálny vývin (Aitken, De Iuliis, 2007; Aitken, Baker, 2006; Sikka, 2001; Hales a kol., 2005). Na úrovni semenníkov sú schopné narušiť germinálny epitel, potrebný na diferenciáciu spermií a steroidogénnu aktivitu Leydigových buniek (Hales a kol., 2005; Naughton a kol., 2001). Súčasné štúdie poukázali na súvislosť medzi neplodnosťou a zvýšenými hladinami ROS (Tremellen, 2008; Rajesh Kumar a kol., 2002). Hoci je oxidačný stres jedným z faktorov neplodnosti, jeho príčinný mechanizmus zostáva nejasný. Môže k nemu prispievať nadmerný účinok fyzikálnych, chemických a patologických vplyvov. Klinický obraz je veľmi komplexný. Oxidačné poškodenie každého jedinca je výsledkom vplyvu vonkajšieho prostredia (fajčenie, chemoterapia, rádiácia), prítomnosti patologických faktorov (infekcie, diabetes), genetických faktorov, vplyvu xenobiotík, narušenia endokrinného prostredia... (Aitken a kol., 1989; Marchlewicz a kol., 2007).

U mnohých neplodných mužov boli namerané zvýšené hladiny ROS. Prvotne sa predpokladalo, že je to spôsobené ich nadprodukciami. Výskumy však naznačujú, že pravdepodobnou príčinou je znížená aktivita antioxidantov (Zini a kol., 1993). Zvýšiť hladiny antioxidantov sa pokúšali mnohé štúdie, využívajúc látky s preukázaným antioxidantným účinkom. Medzi najstaršie a najčastejšie používané patria vitamín C a E, glutatión, karnitín, lycopén, koenzým Q10.

Postupne sa začali využívať výťažky rôznych rastlín, či už domácich alebo známych z tradičnej medicíny rôznych svetových oblastí (černuška, goji, ženšen a iné). Využívať sa môžu aj liečivá, ktorých primárne určenie bolo v terapii iných chorôb, napr. deprenyl, ktorý sa využíva hlavne v terapii Parkinsonovej choroby, ale jeho podanie u potkanov zvýšilo počet spermií (Mihalik a kol., 2015). Nakoniec sú k dispozícii aj novosyntetizované látky (Fertilix).

### **Najznámejšie používané antioxidanty**

**Vitamín C**, kyselina L-askorbová, je jedným z najviac známych a využívaných antioxidantov. Antioxidačné vlastnosti vitamínu C ochraňujú ľudské spermie pred poškodením vyvolaným endogénnou oxidáciou DNA. Jeho koncentrácia v seminálnej plazme je desaťkrát vyššia ako v krvnom sére. Je zaujímavé, že vitamín C pôsobí v nízkych dávkach ako antioxidant a vo veľmi vysokých dávkach pôsobí ako oxidant (Wayner a kol., 1986). Zvýšený príjem vitamínu C bol sprevádzaný zvýšeným počtom spermií, zlepšenou motilitou a životaschopnosťou (Eskenazi a kol., 2005; Dawson a kol., 1987). Rovnaký účinok malo podávanie vitamínu C aj u fajčiarov (Dawson a kol., 1992). Pri leukocytospermii (zvýšený počet leukocytov v ejakuláte nad  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) koncentrácia vitamínu C v seminálnej plazme výrazne klesá. Pri nedostatku vitamínu C sa zvyšuje zastúpenie abnormálnej fragmentácie DNA v spermiách (Song a kol. 2006).

Pri analyzovaní ejakulátu sa sledovali aj stravovacie návyky mužov. Výsledky ukázali, že muži, ktorí prijímajú stravu s vyšším obsahom antioxidantov, medzi nimi aj vitamín E, majú lepšie výsledné charakteristiky ejakulátu. Vitamín E sa spája s lepšou motilitou spermií a ich vyššími počtami (Eskenazi a kol., 2005). U mužov s vysokými koncentraciami ROS v ejakuláte, podávanie vitamínu E zvýšilo jeho sérovú koncentráciu a zlepšilo oplodňovaciu funkciu spermií (Kessopoulou a kol., 1995). Vitamín E tiež znižuje hladiny lipidovej peroxidácie u spermií (Geva a kol., 1996).

**Vitamín C a E** pôsobia v ochrane proti ROS

ako synergisti. Ich kombinácia u mužov s nevyvetlenou neplodnosťou a zvýšenou fragmentáciou DNA znížila počty spermíí s fragmentovanou DNA a zvýšila percento úspešných oplodnení (Greco a kol., 2005).

**Glutatión**, GSH, je dôležitý antioxidant. Nachádza sa v seminálnej plazme, kde pôsobí proti oxidačnému stresu, ktorý môže poškodiť spermie. GSH je aktívny predovšetkým pri zápaloch. U pacientov s chronickými zápalmi pohlavného ústrojenstva zvýšil motilitu spermíí a zlepšil ich morfológiu. GSH nepôsobí priamo na spermie, ale jeho účinok je založený na zmene prostredia, v ktorom sa spermie nachádzajú (Lenzi a kol., 1993).

**Karnitín** sa v poslednej dobe používa ako stravovací doplnok pri chudnutí a športovaní. Je v pozitívnej korelácii s motilitou, vitalitou a koncentráciou spermíí (Tang a kol., 2008). Využitie karnitínu ako antioxidantu sa testovalo na ľuďoch aj zvieratách. Niektoré experimenty vykazovali úspešnosť, iné zase nie. Ako účinný antioxidant sa karnitín ukázal pri pacientoch s prostatovezikulo-epidimitídou a leukocytospermiou, ale len vtedy, ak boli pacienti predtým liečení pomocou protizápalových liečiv (Vicari et al., 2002). Či je karnitín skutočne účinný antioxidant, sa nedá s určitosťou potvrdiť, pretože mnohé štúdie nemali kontrolnú skupinu. V iných experimentoch pôsobil pozitívne na kvalitu semena, ale ako antioxidant bol neúčinný (Lenzi a kol., 2003).

**Koenzým Q10**, tiež ubichinon, je súčasťou dýchacieho reťazca. Ako antioxidant pôsobí v samotných mitochondriách a bunkových membránach. Jeho nedostatok v organizme spôsobí nižší počet spermíí a zároveň vzostup spermíí s abnormálnou morfológiou (Balercia a kol., 2004). Koenzým Q10 sa ukázal byť aj účinný pri *in vitro* fertilizácii, po jeho dlhodobom podávaní sa zvýšil počet oplodnení (Lewin, Lavon, 1997).

Jeden z najúčinnějších antioxidantov je **melatonín**. Redukuje oxidačný stres v semenniku vyvolaný etanolom, indometacínom, radiáciou, cisplatinou. *In vitro* štúdie poukázali na to, že melatonín a jeho prekurzor, N-acetyl-serotonín, by mohli inhibovať lipidovú peroxidáciu v testiku-

lárnych mikrozómoch a mitochondriách (Othman a kol., 2001; Gavazza, Catala, 2004). Ochranu pred cyklofosfamidom, adriamycínom a ožiarením sprostredkovalo podávanie **kyseliny lipoovej** (Prahalathan a kol., 2005; Selvakumar a kol., 2004; Manda a kol., 2007).

### Výťažky z rastlín

Testovanie účinkov výťažkov z rastlín je novodobým trendom v širokom spektre medicínskeho výskumu.

**Lykopen**, červené farbivo, prírodný karotenoid a antioxidant je prítomný v paradajkách, vodnom melóne, šípkach. Je schopný zvrátiť oxidačné poškodenie v semenníku vyvolané cyklosporínom a cisplatinou (Turk a kol., 2007; Atesahin a kol., 2006).

**Betakarotén**, ktorý je všeobecne známou rastlinnou zložkou, znižuje oxidačný stres po kadmiu, potláča lipidovú peroxidáciu a obnovuje hladiny superoxid dizmutáz, glutatión S-transferáz a glutatiónu na fyziologické hladiny (El-Misiry, Shalaby, 2000).

**Výťažok z goji**, *Lycium barbarum*, ochraňuje spermie pred oxidačným stresom vyvolaným teplom a potláča poškodenie DNA vyvolané peroxidom vodíka (Mallick a kol., 2007).

Rastlina, ktorá sa aj na našom území využívala v tradičnej medicíne, je **černuška**, *Nigella sativa*. Aplikovala sa pri chorobách dýchacích ciest a tráviaceho ústrojenstva, pri poruchách obličiek a pečene, tiež pri reumatizme (Ahmed a kol., 2013). Predpokladá sa, že zložkou s antioxidantnými vlastnosťami, ktorá vplýva na reprodukčné parametre, je tymochinón. U potkanov podávanie černušky zvýšilo počty spermíí a ich motilitu, zvýšilo počet Leydigových buniek. Černuška pravdepodobne podporuje aj sekréciu testosterónu a FSH, čím pôsobí na zvýšenie počtu spermíí (Mohammad a kol., 2009; Parandin a kol., 2012).

**Ženšen indický**, *Withania somnifer*, sa využíva v tradičnej indickej medicíne. Jeho podávanie znížilo hladiny oxidantov, zvýšilo hladiny antioxidantov a vitamínov A, C a E v seminálnej plazme. Taktiež pôsobí priaznivo na hladiny tes-

tosterónu, luteinizačného hormónu a folikuli stimulujúceho hormónu (Shahin a kol., 2009).

Pri oxidačnom strese následkom diabetu pomohol extrakt z banánovníka, tamarindu indickeho, klinčekovca jambolanového a *Coccinia indica* (Mallick a kol., 2007). Podávanie lecitínu ochránilo spermie pred oxidačným stresom indukovaným chronickým príjmom etanolu (Maneesh a kol., 2005). Podávanie antioxidantov, ako je resveratrol (výťažok z červeného hrozna) a kakao, zlepšilo testikulárne funkcie zdravých zvierat (Juan a kol., 2005; Orozco a kol., 2003).

### Novosyntetizované látky

Od roku 2009 je na austrálskom trhu dostupná látka **Menevit** (Bayer Australia, Pymble, New South Wales, Australia). Toto liečivo preukázateľne zvýšilo počet oplodnení u ľudí z 16% na 38%, ak sa jednalo o prirodzené počatie. Pri umelom oplodnení sa jeho účinnosť nepreukázala (Tremellen a kol., 2009).

Informácie o potencionálnom antioxidantnom účinku novosyntetizovaných látok v experimentálnej fáze vývoja je pomerne málo. Jeden z najnovších antioxidantov, zatiaľ testovaný na zvieratách, je **Fertilix**. Bol vyvinutý vedcami zo skupiny CelloXess (LLC, Medicinal Chemistry, Princeton). Testovania prebiehali v laboratóriách vo Francúzsku a Španielsku. U testovaných myší Fertilix znížil defragmentáciu DNA. U myší po skrotálnom tepelnom šoku obnovil počty oplodnení takmer na normálne hodnoty. Zaujímavé je, že tieto výsledky boli dosiahnuté už po 2 týždňoch podávania (Moazamian a kol., 2015; Gharagozloo a kol., 2014).

Mnohé štúdie nedokázali pozitívny vplyv antioxidantov potvrdiť, v iných bol zjavný. Nie je presne známe, prečo sa u niektorých nedostavil očakávaný kladný účinok. Môže to byť spôsobené nevhodnou dávkou, kombináciou, dĺžkou podávania. Testovanie nových antioxidantov je komplikované a ako úspešný sa v priemere ukáže jeden z piatich.

## LITERATÚRA

1. AHMAD, A., HUSAIN, A., MUJEEB, M., KHAN S. A., NAJMI, A. K., SIDDIQUE, N. A., DAMANHOURI, Z. A., ANWAR, F., 2013: A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, ISSN 22211691, 3 (5), 337–352. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60075-1.
2. AITKEN, R. J., BAKER, M. A., 2006: Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, ISSN 03037207, 250 (1–2), 66–69 DOI: 10.1016/j.mce.2005.12.026.
3. AITKEN, R. J., DE IULIIS, G. N., 2007: Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online*. ISSN 14726483, 14 (6), 727–733 DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60676-1.
4. AITKEN, R. J., CLARKSON, J. S., FISHEL, S., 1989: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.*, ISSN: 1529-7268, 40: 183–97
5. ATEŞŞAHİN, A., KARAHAN, İ., TÜRK, G., GÜR, S., YILMAZ, S., ÇERİBAŞI, A. O., 2006: Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, ISSN 08906238, 21 (1), 42–47. DOI: 10.1016/j.reprotox.2005.05.003.
6. BALERCIA, G., 2004: Coenzyme q10 supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertility and Sterility*, ISSN 00150282, 81 (1), 93–98. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.05.009.
7. COMHAIRE, F., 2010: The role of food supplementation in the treatment of the infertile couple and for assisted reproduction. *Andrologia*, ISSN 03034569, 42 (5), 331–340. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2009.01025.x.
8. DAWSON, B., HARRIS, W. A., RANKIN, W. E., CHARPENTIER, L. A., MCGANITY, W. J., 1987: Effect of Ascorbic Acid on Male Fertility. *Annals of the New York Academy of Sciences*, ISSN 0077-8923, 498(1 Third Confere), 312–323. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb23770.x.
9. EL-MISSIRY, M. A., SHALABY, F., 2000: Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, ISSN: 1099-0461, 14:238–243.
10. ESKENAZI, B., 2004: Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, ISSN 1460-2350, 20 (4), 1006–1012 [cit. 2016-04-21]. DOI: 10.1093/humrep/deh725.



11. FORD, W.C.L., 2004: Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 10 (5), 387–399. DOI: 10.1093/humup/dmh034. ISSN 1355-4786.
12. GAVAZZA, M., CATALÁ, A., 2003: Melatonin preserves arachidonic and docosapentaenoic acids during ascorbate-Fe<sup>2+</sup> peroxidation of rat testis microsomes and mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. ISSN 13572725, 35 (3), 359–366. DOI: 10.1016/S1357-2725(02)00256-X.
13. GEVA, E., BARTOOV, B., ZABLUDOVSKY, N., LESSING, J.B., LERNER-GEVA, L., AMIT, A., 1996: The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an *in vitro* fertilization program. *Fertility and Sterility*. ISSN 00150282, 66, 430–434.
14. GHARAGOZLOO, P., A. GUTIÉRREZ-ADÁN, A. CHAMPROUX, et al., 2016: A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Human Reproduction*, ISSN 0268-1161, 31(2), 252–262. DOI: 10.1093/humrep/dev302.
15. GRECO, E., 2005: ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction*, ISSN 0268-1161, 20 (9), 2590-2594. DOI: 10.1093/humrep/dei091.
16. GRECO, E., 2005: Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *Journal of Andrology*. ISSN 0196-3635, 26 (3), 349–353. DOI: 10.2164/jandrol.04146.
17. HALES, D.B., ALLEN, J.A., SHANKARA, T., JANUS, P., BUCK, P., DIEMER, T., HELD HALES, K., 2005: Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, ISSN 1749-6632, 1061: 120–134. DOI: 10.1196/annals.1336.014.
18. KESSOPOULOU, E., POWERS, H.J., SHARMA, K.K., PEARSON, M.J., RUSSELL, J.M., COOKE, I.D., BARRATT, C.L., 1995: A double-blind randomized placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive species associated male infertility. *Fertility and Sterility*, ISSN 00150282, 64, 825–831.
19. LENZI, A., CULASSO, F., GANDINI, L., LOMBARDO, F., DONDERO, F., 1993: Placebo-controlled, double blind, crossover trial of glutathione therapy in male infertility. *Human Reproduction*, ISSN 0268-1161, 1657–1662.
20. LENZI, A., LOMBARDO, F., SGRÒ, P., SALACONE, P., CAPONECCHIA, L., DONDERO, F., GANDINI, L., 2003: Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertility and Sterility*. ISSN 00150282, 79 (2), 292–300. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)04679-4.
21. LEWIN, A., LAVON, H., 1997: The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Molecular Aspects of Medicine*. ISSN 00982997, 18, 213–219. DOI: 10.1016/S0098-2997(97)00036-8.
22. MALLICK, C., MANDAL, S., BARIK, B., et al., 2007: Protection of testicular dysfunctions by MTEC, a formulated herbal drug, in streptozotocin induced diabetic rat. *Biol. Pharm. Bull.*, ISSN: 0918-6158, 30:84–90.
23. MANDA, K., UENO, M., MORITAKE, T., ANZAI, K., 2007: Alpha-lipoic acid attenuates x-irradiation-induced oxidative stress in mice. *Cell. Biol. Toxicol.*, ISSN 1573-6822, 23: 129–137
24. MANEESH, M., JAYALEKSHMI, H., DUTTA, S., CHAKRABARTI, A., VASUDEVAN, D.M., 2005: Effect of exogenous lecithin on ethanol-induced testicular injuries in Wistar rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, ISSN 0019-5499, 49: 297–304.
25. MARCHLEWICZ, M., WISZNIEWSKA, B., GONET, B., BARANOWSKA-BOSIACKA, I., SAFRANOW, K., KOLASA A., et al., 2007: Increased lipid peroxidation and ascorbic acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals*, ISSN 1572-8773, 20: 13–9.
26. MIHALIK, J., MAŠLANKOVÁ, J., SOLÁR, P., HORVÁTHOVÁ, F., 2015: The effect of R(-)-deprenyl administration on reproductive parameters of rat males. *European Journal of Pharmacology*. ISSN 00142999, 754, 148–152. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.02.030.
27. MOAZAMIAN, R., POLHEMUS, A., CONNAUGHTON, H., FRASER, B., WHITING, S., GHARAGOZLOO, P., AITKEN, R.J., 2015: Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Molecular Human Reproduction*, ISSN 1360-9947, 21 (6), 502–515. DOI: 10.1093/molehr/gav014.
28. MOHAMMAD, M. A., MOHAMAD M. M. J., DRADKA, H., 2009: Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on spermatogenesis and fertility of male albino rats. *Res. J. Med. Med. Sci.*, ISSN 2320-6012, 4 (2), pp. 386–390.
29. OTHMAN, A. I., EL-MISSIRY, M. A., AME, M. A., 2013: The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats. *Redox Report*, ISSN: 1351-0002, 6 (3), 173–177.
30. PARANDIN, R., YOUSOFVAND, N., GHORBANI, R., 2012: The enhancing effects of alcoholic extract of *Nigella sativa*

- seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, ISSN: 1680-6433, 10 (4), 355–362.
31. PRAHALATHAN, CH., SELVAKUMAR, E., VARALAKSHMI, P., 2005: Lipoic acid ameliorates adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reproductive Toxicology*, ISSN 08906238, 20 (1), 111–116. DOI: 10.1016/j.reprotox.2004.12.005.
  32. RAJESH KUMAR, T.K., DORESWAMY, B., SHRILATHA, MURALIDHARA, 2002: Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, ISSN 13835718, 513 (1–2), 103–111. DOI: 10.1016/S1383-5718(01)00300-X.
  33. ROSS, C.A., MORRISS, M., KHAIRY, Y., KHALAF, P., BRAUDE, A., COOMARASAMY, T., EL-TOUKHY, 2010: A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, ISSN 14726483, 20 (6), 711–723, DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.03.008.
  34. SELVAKUMAR, E., PRAHALATHAN, CH., MYTHILI, Y., VARALAKSHMI, P., 2004: Protective effect of dl- $\alpha$ -lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. *Reproductive Toxicology*, ISSN 08906238, 19(2), 163–167. DOI: 10.1016/j.reprotox.2004.06.015.
  35. SHAHIN, A.Y.M., ISMAIL, A., SHAABAN, O.M., 2009: Supplementation of clomiphene citrate cycles with Cimicifuga racemosa or ethinyl oestradiol – a randomized trial. *Reproductive BioMedicine Online*, ISSN 14726483, 19 (4), 501–507. DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.06.007.
  36. SIKKA, S., 2001: Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Current Medicinal Chemistry* ISSN 09298673, 8 (7), 851–862. DOI: 10.2174/0929867013373039.
  37. SONG, G.J., NORKUS, E.P., LEWIS, V., 2006: Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *International Journal of Andrology*, ISSN 0105-6263, 29 (6), 569–575. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2006.00700.x.
  38. TANG, L.F., JIANG, H., SHANG, X.J., ZHAO, L.M., BAI, Q., HONG, K., LIU, D.F., LIU, J.M., YUAN, R.P., CHEN, Q., MA, L.L., 2008: Seminal plasma levocarnitine significantly correlated with semen quality. *Zhonghua Nan Ke Xue*, ISSN 10093591, 14, 704–708.
  39. THÉRON, P., AUGER, J., LEGRAND, A., JOUANNET, P., 1996: A-tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction*, ISSN 1360-9947, 2 (10), 739–744. DOI: 10.1093/molehr/2.10.739..
  40. TREMELLEN, K., 2008: Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, ISSN 1355-4786, 14 (3), 243–258. DOI: 10.1093/humupd/dmn004.
  41. TREMELLEN, K., MIARI, G., FROILAND, D., THOMPSON, J., 2007: A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, ISSN 0004-8666, 47 (3), 216–221. DOI: 10.1111/j.1479-828X.2007.00723.x.
  42. TÜRK, G., ATEŞŞAHİN, A., SÖNMEZ, M., YÜCE, A., ÇERİBAŞI, A.O., 2007: Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology*, ISSN 0093691, 67 (4), 778–785. DOI: 10.1016/j.theriogenol.2006.10.013.
  43. VICARI, E., LA VIGNERA, S., CALOGERO, A.E., 2002: Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculopididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with non-steroidal anti-inflammatory compounds. *Fertility and Sterility*, ISSN 00150282, 78(6), 1203–1208. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)04350-9.
  44. WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., 1986: The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochimica et Biophysica Acta*, ISSN 03044165, 884 (1), 119–123. DOI: 10.1016/0304-4165(86)90234-5.
  45. ZINI, A., LAMIRANDE, E., GAGNON, C., 1993: Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. ISSN 0105-6263, 16 (3), 183–188. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1993.tb01177.x.





## BIOCHEMICKÉ MARKERY OSTEOMYELITÍD SÁNKY A ČELUSTE

KLABNÍK T.<sup>1</sup>, BOLERÁZSKA B.<sup>2</sup>, STUPÁK, M.<sup>2</sup>, RABAJDOVÁ M.<sup>2</sup>, TOMEČKOVÁ V.<sup>2</sup>  
VELIKÁ B.<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>I. stomatologická klinika UNLP KE a LF UPJŠ  
Oddelenie ústnej, čelustnej a tvárovej chirurgie, Tr. SNP I, Košice  
<sup>2</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Tr. SNP 1, Košice

\*email: beata.velika@upjs.sk

### SÚHRN

Osteomyelitída čeluste a sánky je závažné kostné ochorenie. Zahŕňa spektrum porúch, ktoré sú definované hlavne na základe klinického, rádiologického, histopatologického a etiológického nálezu. S ohľadom na potenciálne funkčné a estetické následky je dôležitá včasná diagnóza osteomyelitídy, ktorá umožňuje vytvoriť vhodný podklad pre primeranú liečbu. Zobrazovacie metódy pomáhajú k presnému hodnoteniu zápalových zmien kostí a mäkkých tkanív pre skoré potvrdenie diagnózy, na presné určenie rozsahu ochorenia a rozpoznanie potenciálnych komplikácií alebo tendencie chronicity. Okrem zobrazovacích metód sú dôležité výsledky biochemických vyšetrení, ktoré napomáhajú k zlepšeniu samotnej diagnostiky. Osteomyelitída čeluste a sánky predstavuje veľkú výzvu pre medicínu orofaciálnej oblasti.

**Kľúčové slová:** Osteomyelitída, kostná remodelácia, markery

### SUMMARY

Osteomyelitis of the jaw and mandible is considered as serious bone disease. It includes a spectrum of disorders, defined mostly due to clinical, radiological, histopathological and etiological findings. With the respect to the potentially functional and aesthetic consequences is important early diagnosis of osteomyelitis, which allows to create a suitable basis for the treatment. Imaging techniques help to exact evaluation of inflammatory changes in bone and soft tissues and in early diagnosis confirmation, to exact determination of the disease extension and in detection of potential complications or chronicity trends. Instead of imaging methods are important the results of biochemical tests are important, and could help in diagnosis improvement. Osteomyelitis of the jaw and mandible is a great challenge for medicine in orofacial region.

**Key words:** Osteomyelitis, bone remodeling, markers

## ÚVOD

Osteomyelitída čelustí je veľmi unikátne ochorenie tvárových kostí, ktoré napriek pokrokom v diagnostike a novým terapeutickým postupom predstavuje veľkú výzvu pre dentálnu medicínu, ako aj pre liečeného pacienta. Osteomyelitída čeluste a sánky patria k infekčným ochoreniam, ktoré sú často spojené s komplikovaným priebehom. Niekedy sú nutné rozsiahle operácie, ktoré vedú k znetvoreniu tváre s následkom straty postihnutých kostí a zubov, prípadne aj k vzniku sprievodného zjazvenia (Baltensperger, 2009). Primárne je vznik tohto ochorenia spájaný s infekciou spôsobenou mikroorganizmami. Ochorenie môže vzniknúť tiež po komplikáciách pri zubných extrakciách, pri nedostatočnej liečbe zlomeniny v tvárovej oblasti a/alebo po ožarovaní čeluste (Koorbusch a kol., 1992). Aj napriek všetkým výhodám spojeným s pokrokom medicíny a zubného lekárstva, problémy so zvyšujúcim sa podielom mikroorganizmov odolných voči bežne používaným antibiotikám, väčší počet pacientov liečených steroidmi a ďalšími imunokompromitujúcimi liekmi, ako aj rastúci výskyt ochorení napr. AIDS a diabetes, vedie k vzniku nových problémov pri liečbe osteomyelitídy a k nárastu prípadov pacientov zle reagujúcich na štandardnú liečbu. Osteomyelitída preto predstavuje veľkú výzvu pre medicínu orofaciálnej oblasti. Aj na základe vyššie spomenutých faktorov sa venuje zvýšená pozornosť právečasnej diagnostike osteomyelitíd.

Osteomyelitídy môžeme rozdeliť do dvoch základných skupín a to na akútnu a chronickú (Arunkumar a kol., 2011). Väčšina prípadov akútnej osteomyelitídy je diagnostikovaných ľahko podľa klinického obrazu, priebehu ochorenia a vyhodnotením nálezov diagnostických zobrazovacích metód. Pri akútnom priebehu ochorenia dochádza k nekróze a deštrukcii kosti. V klinickom obraze pacientov je možné pozorovať opuch ďasien, príslušnej časti tváre, silné bolesti, horúčku až triašku. V niektorých prípadoch je pozorovaná kývavosť a uvoľňovanie zubov súvisiacich s infekciou zubov. Naproti tomu klinic-

ký obraz a priebeh chronickej osteomyelitídy sa často diagnostikuje ťažšie, pretože chýba predisponujúca udalosť, ako napríklad stomatochirurgický zákrok alebo infikovaný zub. Pri podozrení treba venovať viac pozornosti anamnéze pacienta. Vzhľadom na nešpecifické klinické príznaky, ktoré nevykazujú jasné známky infekcie, ako sú tvorba hnisu alebo fistúl, mení sa zoznam diferenciálne diagnosticky významných stavov v porovnaní s akútnou a sekundárne chronickou osteomyelitídou (Topazian, 1994; Makek, 1983).

### **Biochemické markery v diagnostike osteomyelitíd**

Osteomyelitídy vo všeobecnosti súvisia s remodeláciou kostného tkaniva. V zdravých kostiach existuje rovnováha medzi metabolizmom osteoblastov a osteoklastov. Avšak pri degradácii kostného tkaniva prevyšuje funkcia osteoklastov. Vzniká tak mnoho degradačných produktov kostnej matrix, ktoré sa uvoľňujú do krvi. Biochemický monitoring kostného metabolizmu je závislý na meraní aktivity enzýmov a koncentrácie proteínov uvoľňovaných počas kostnej formácie. Taktiež závisí na degradačných produktoch, tvorených počas kostnej resorpcie. Momentálne je známa široká škála biochemických markerov, ktoré zabezpečujú špecifické a citlivé posúdenie stupňa resorpcie a formácie kostí. Keďže jednotlivé markery zachytávajú rôzne fázy kostnej remodelačnej aktivity, paralelné určovanie viacerých markerov, najmä však kombinácia markerov osteoformácie a osteoresorpcie najlepšie odráža charakter kostnej remodelácie.

Osteonekróza čeluste bolo pozorovaná aj ako nežiadúci účinok liečby bisfosfonátmi u pacientov so zhubnými nádormi (najčastejšie karcinóm prsníka, prostaty, pľúc) (Nekulová a kol., 2008). V súvislosti so systémovou liečbou bisfosfonátmi bola prvýkrát popísaná v roku 2003 Marxom najskôr len v súvislosti s intravenóznymi preparátmi, no neskôr v roku 2005 a 2007 bol tento nežiadúci účinok pripísaný bisfosfonátom pri preorálnom užití (Marx, 2003; Marx a kol. 2005). Vyšetrenie markerov kostnej remodelácie je dôležité v diagnostike a pri sledovaní efektu te-

rapie zhubných nádorov, pretože kostné metastázy bývajú veľmi častou komplikáciou pacientov zo zhubnými nádormi, a sú príčinou častej morbidity a mortality.

## MARKERY REMODELÁCIE KOSTNÉHO TKANIVA

Biochemické markery umožňujú špecifické a citlivé posúdenie rýchlosti tvorby a resorpcie kosti. K markerom tohto typu patrí kostná alkalická fosfatáza (B-ALP), osteokalcín, P1NP (N-terminálny propeptid prokolagénu typ 1), P1CP (C-N-terminálny propeptid prokolagénu typ 1), C-terminálny telopeptid (CTX), N-terminálny telopeptid (NTx), matrix metaloproteinázy (MMPs), reaktany akútnej fázy.

**Kostná alkalická fosfatáza (B-ALP Bone Specific Alkaline Phosphatase)** je vhodný marker kostnej remodelácie pri rôznych kostných ochoreniach a osteoporóze, slúži na stanovenie aktivity osteoklastov. Pri osteoporóze sa jej celková aktivita zvyšuje len málokedy a ani v týchto prípadoch nemožno vylúčiť, že zvýšená enzýmová aktivita odráža zvýšenú aktivitu pečeneového izoenzýmu. Ľudské sérum obsahuje rôzne izoenzýmy alkalické fosfatázy: kostný, pečeneový, intestinálny a počas gravidity aj placentárny. Intestinálnu a placentárnu formu možno oddeliť relatívne ľahko, väčší problém spôsobuje odlišenie kostného a pečeneového izoenzýmu. Tieto dva izoenzýmy sú produktami jedného génu a líšia sa len posttranslačnou modifikáciou. Aktivita kostného izoenzýmu po liečbe bifosfonátmi a estrogénmi po 1-2 mesiacoch klesá. Odporúča sa aj na sledovanie fluoridovej terapie, kde sa však naopak pri úspešnej terapii jej aktivita zvyšuje (Stančíková a kol., 1997).

**Osteokalcín (kostný Gla proteín, BGP, Bone Gla Protein)**, najhojnejšie zastúpený nekolagénový kostný proteín, predstavuje viac ako 20 % nekolagénových proteínov kostí. Je to malý, 49 aminokyselín obsahujúci  $\gamma$ -karboxyglutamá-

ový proteín o veľkosti 5–8 kDa exprimovaný prevažne osteoblastmi. Považovaný je za biomarker kostnej remodelácie a kostnej premeny, je špecifický pre kostnú a dentálnu hmotu. Bolo preukázané, že sérové hladiny osteokalcínu korelujú s hustotou mineralizácie kostnej hmoty a že osteokalcín je jedným z markerov rizika vzniku zlomeniny bedrového kĺbu. Aj napriek dôležitej úlohe osteokalcínu v kostnom metabolizme a dôkazu genetickej asociácie v ľudskej populácii, efekt polymorfizmu v génoch osteokalcínu na hladinu osteokalcínu v sére, hustoty kostnej hmoty a riziko vzniku fraktúry, sa nedokázalo úplne presne objasniť napriek intenzívnemu výskumu (Ling a kol., 2015). Sérový osteokalcín koreluje s rastom skeletu v období puberty, zvyšuje sa pri rozličných poruchách kostného metabolizmu spojených so zvýšeným kostným obratom, napr. pri primárnej a sekundárnej hypertyreóze, hyperparatyreóze a akromegálii, a pri niektorých formách osteoporózy (Delmas, 1990).

### P1NP (N-terminálny propeptid prokolagénu typu I) a P1CP (C-terminálny propeptid prokolagénu typu I)

Prokolagén I je syntetizovaný fibroblastami a osteoblastami, obsahuje N-(amino) a i C-(karboxy) terminálnu časť molekuly. Obidva tieto propeptidy vznikajú účinkom špecifických proteínáz v procese tvorby kolagénu z prokolagénu, ktorý je začlenený do kostnej hmoty (Nekulová a kol. 2008). Práve P1NP patrí k najefektívnejším markerom kostnej formácie a je využívaný na monitorovanie účinku antiresorpčnej terapie a terapie kostnej formácie. Jeho koncentrácia je priamo úmerná množstvu kolagénu, ktorý je produkovaný osteoblastami, a zvyšuje sa u pacientov s rôznymi ochoreniami kostí, pre ktoré je charakteristická práve zvýšená aktivita osteoblastov (Pagana, Pagana, 2010).

Degradáciou kostného kolagénu účinkom zmiešaných kyslých a neutrálnych proteáz vznikajú amino- a karboxyterminálne telopeptidy CTx (C-terminálny telopeptid) a NTx (N-terminálny telopeptid). Obidva telopeptidy slúžia na monitoring terapeutického odpovede u pacien-

tov s metabolickou poruchou kostí, na predikciu hustoty kostného tkaniva, k predikcii terapeutickej odozvy ešte pred začatím antiresorpčnej liečby a k detekcii kostných metastáz u pacientov s rôznymi malignitami.

**CTx (C-Terminal Telopeptide, carboxy-terminal collagen crosslinks)** sérový CTx peptid je významný marker funkcie osteoklastov. Vzniká pri degradácii kolagénu, ktorý tvorí viac ako 90% organickej hmoty kosti. Počas fyziologického kostného metabolizmu je zrelý kolagén I degradovaný na malé fragmenty, ktoré sú odvádzané krvou a vylučované obličkami. Patrí k významným markerom kostnej resorpcie (Rosen a kol., 2000). Existujú dve hlavné cesty kostnej resorpcie, prvá je sprostredkovaná katepsínom K a uplatňuje sa počas fyziologickej resorpcie kosti, druhá súvisí s patológiami, a je sprostredkovaná pomocou matrix metaloproteinázy 9 (MMP 9) (Kozumi a kol., 2003). Pacienti s ochoreniami, pri ktorých je zvýšená kostná remodelácia, napr. Pagetova choroba a osteoporóza majú zvýšené hladiny sérového CTx peptidu (Marx a kol. 2007).

**NTx (N-Terminal Telopeptide, amino-terminal collagen crosslinks)** patrí k senzitivným a špecifickým indikátorom kostnej resorpcie. Je vylučovaný do moču ako produkt štiepenia kostného kolagénu. Môže byť využitý pre diagnostické informácie o metabolickom ochorení kostí a pre sledovanie antiresorpčnej terapie (Xue a kol., 1999). Hladiny NTx možno merať v moči (uNTX) alebo v krvnom sére (sérový NTX) (Clemens a kol., 1997).

**Matrix metaloproteinázy (MMPs)** tvoria skupinu enzýmov, ktorá reguluje osteogenézu, remodeláciu kostného tkaniva počas embryogenézy, adolescencie a hojenia kostného tkaniva. MMPs, vrátane MMP-1, -2, -3, -9, and -13, sú sekretované mezenchymálnymi bunkami strómy a osteoklastov (Montes a kol., 2010). MMP-1 (kolagenáza I), je syntetizovaná bunkami mezenchymálneho pôvodu, ako sú napríklad osteoblastom podobné bunky. MMP-8 (Kolagenáza II) je

syntetizovaná primárne neutrofilmi a MMP-13 (kolagenáza III) je vylučovaná chondrocytmi, synoviálnymi fibroblastmi a osteoblastmi. MMP-9 je zinok -dependentná endopeptidáza, hlavnou úlohou je degradácia a remodelácia extracelulárnej matrix. Je dôležitá v metabolických procesoch súvisiacich s premenou extracelulárnej matrix, napr. pri rakovine, osteoporóze alebo pri fibróze. Medzi aktivátory MMP-9 patria: MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-13, katepsín G a urokináza/plazmín. Spomedzi spomenutých je najdôležitejší aktivátor MMP-3. Keďže MMP-9 vyžaduje aktiváciu v extracelulárnom priestore, je identifikovanie molekulárneho kontextu, ktorý môže aktivovať MMP-9 dôležité. MMP-9 je asociovaný so stratou kostnej matrix a participuje pri katabolizme kosti.

#### **Reaktanty akútnej fázy (Proteíny akútnej fázy, PAF; acute phase reactants, APR's)**

V neposlednom rade k dôležitým vyšetrovaným markerom patria aj hladiny reaktantov akútnej fázy. Zmenené hodnoty PAF sa tradične využívajú ako nešpecifické diagnostické indikátory poškodenia a zápalu. PAF predstavujú heterogénnou skupinu plazmatických proteínov, ktorých koncentrácia sa počas akútnej fázy znižuje (tzv. **negatívne reaktanty akútnej fázy** – albumín, pre-albumín, tranferín, apo AI, apo AII,  $\alpha$ 2-HS glykoproteín, inter- $\alpha$ -trypsinový inhibítor, glykoproteín bohatý na histidín), alebo naopak zvyšuje (tzv. **pozitívne reaktanty akutej fázy** – sérový amyloid A, a u človeka najmä C-reaktívny proteín). Syntézu PAF regulujú zápalové mediátory. K regulačným faktory so stimulačným účinkom patria: TNF, IL-1, IL-6, IL-11, IFN- $\gamma$ , LIF (leukemický inhibičný faktor), OSM (onkostatín M), CNTF (ciliárny neurotropný faktor), TGF- $\beta$  a glukokortikoidy (Jain a kol., 2011; Bernadič a kol., 2004).

Aj dozrievanie a proliferácia osteoklastov je pod kontrolou veľkého počtu cytokínov, ktoré daný proces stimulujú (interleukíny: IL-1, IL-6, IL-11, IL-17; tumor nekrotizujúci factor TNF- $\alpha$  a TNF- $\beta$  (tumor necrosis factor  $\alpha$  a  $\beta$ )) alebo cytokíny inhibičné (interleukíny: IL-4, IL-10, IL-



18; transformujúci rastový faktor TGF  $\beta$  (factor transforming growth  $\beta$ )). IL-1 a IL-6 indukujú aktiváciu, diferenciáciu a priťahovanie osteoklastov spúšťaním resorbcie, IL-10 (protizápalový cytokín) je dôležitý endogénny supresor infekciou-stimulovanej kostnej resorbcie *in vivo*. Účinok spočíva v tom, že prekursorové bunky vytvárajú makrofágy namiesto osteoklastov.

## ZÁVER

Výsledky biochemických vyšetrení významne prispievajú k diagnostike osteomyelitíd. Diagnostická a prognostická hodnota biochemických markerov by sa mali vždy hodnotiť spolu s výsledkami ďalších laboratórnych testov, zobrazovacích metód, denzitometrického vyšetrenia alebo s výsledkami vyšetrenia kostnej biopsie, aby bola možná včasná diagnostika patologických stavov a následne ich terapia v oblasti sánky a čeluste.

Hlavným cieľom liečby osteomyelitídy je eliminácia, alebo aspoň zlepšenie príznakov. V závislosti od príznakov (okrem chirurgie) je k dispozícii aj niekoľko konzervatívnych spôsobov liečby. Aj keď sa choroba nemusí vyliečiť, každá zmena opačným smerom alebo zníženie intenzity ochorenia by malo byť považované za úspech.

## LITERATÚRA

1. BALTENSPERGER, M. M., EYRICH, G. K., 2009: *Osteomyelitis of the Jaws, 2009*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1–315. ISBN 9783540287643.
2. KOORBUSCH, G. F., FOTOS, P., GOLL, K. T., 1992: Retrospective assessment of osteomyelitis: Etiology, demographics, risk factors, and management in 35 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 74: 149–54.
3. ARUNKUMAR, J. S., NAIK, A. S., PRASAD, K. C., SANTHOSH, S. G., 2011: Role of nasal endoscopy in chronic osteomyelitis of maxilla and zygoma: a case report. *Case Reports in Medicine*, 2011; 2011: 802964.
4. TOPAZIAN, R. G., 1994: Osteomyelitis of the jaws. In TOPAZIAN, R. G., GOLDBERG, M. H. (Eds.): *Oral and Maxillofacial Infections*. W. B. Saunders, Philadelphia, 251–288.
5. MAKEK, M., 1983: *Clinical Pathology of Fibro-osteocemental Lesions in the Craniofacial and Jawbones*. Basel, New York, Karger, pp. 26–27.
6. NEKULOVÁ, M., DUBSKÁ, L., PETRÁKOVÁ, K., ŠIMÍČKOVÁ, M., BRANČÍKOVÁ, D., PECEN, L., PILNÝ, R., VALÍK, D., 2008: Kostní markery u nemocných s karcinomem prsu – C-Telopeptid kolagenu typu I (ICTP) jako marker monitorování kostních metastáz a efektu terapie bisfosfonáty. *Klin. Biochem. Metab.*, 16: 183–188.
7. MARX, R. E., 2003: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 61: 1115–1117.
8. MARX, R. E., SAWATARI, Y., FORTIN, M., BROUMAND, V., 2005: Bisphosphonate- Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 63: 1567–1575.
9. STANČÍKOVÁ, M., IŠTOK, R., MASARYK, P., LETKOVSKÁ, A., ROVENSKÝ, J., 1997: Laboratorne vyšetrovacie metódy kostného metabolizmu. *Časopis pre otázky pohybového ústrojenstva a spojiva*, ročník IX: číslo 1: 1–10.
10. LING, Y., GAO, X., LIN, H., MA, H., PAN, B., GAO, J., 2015: A common polymorphism rs1800247 in osteocalcin gene was associated with serum osteocalcin levels, bone mineral density, and fracture: the Shanghai Changfeng Study. *Osteoporos Int.*, 10.1007/s00198-015-3244-5, Online ISSN 1433-2965.
11. DELMAS, P. D., 1990: Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic disease. *Endocrin Metab. Clin. North Am.*, 19 (1): 1–18.
12. PAGANA, K. D., PAGANA, T., 2010: *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference*. Elsevier Health Sciences, 10th edition, 1152 s., ISBN: 978-0-323-07405-6.
13. ROSEN, H. N., MOSES, A. C., GARBER, J., ILOPUTAIFE, I. D., ROSS, D. S., LEE, S. L., GREENSPAN, S. L., 2000: Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif. Tissue Int.*, 66 (2): 100–103.
14. KOIZUMI, M., TAKAHASI, S., OGATA, E. 2003: Comparison of serum bone resorption markers in the diagnosis of skeletal metastasis. *Anticancer Res.*, 23: 4095–4099.
15. MARX, R. E., CILLO, J. E., ULLOA, J. J., 2007: Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 65 (12): 2397–2410.
16. XUE, Y., JIA, W., ZHANG, H., DONG, J., CLEMENS, J. D., TIAN, X. 1999: Urinary cross-linked N-telopeptides of type

- I collagen and bone metabolic diseases. *Chin. Med. J. (Engl)*. 112(2):149-152.
17. CLEMENS, J.D., HERRICK, M.V., SINGER, F.R., EYRE, D.R., 1997: Evidence that serum NTx (collagen-type I N-te-lopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin Chem.*, 43 (11): 2058–2063.
18. MONTES, A.H., VALLE-GARAY, E., ALVAREZ, V., PEV-IDA, M., PÉREZ, E.G., PAZ, J., MEANA, A., ASENSI, V., 2010: A Functional polymorphism in MMP1 could influence osteomyelitis development. *J. of Bone and Mineral Res.*, 25 (4): 912–919.
19. JAIN, S., GAUTAM, V., NASEEM, S., 2011: Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 3: 118–127.
20. BERNADIČ, M., HULÍN, I., UHLIAR, R., ŠTVRTINOVÁ, V., FERENČÍK, M., 2004: *Regulované zvýšenie telesnej teploty a patofyziológia bolesti*. Bratislava, Faber, 78 s., ISBN 80-89019-14-5.





Laboratórna Diagnostika, XXII, 1, 2017: 46—53

## IMUNOMODULAČNÝ ÚČINOK *LACTOBACILLUS PLANTARUM* LS/07 IN VITRO A IN VIVO

ŠTOFILOVÁ, J.<sup>1</sup>, SALAJ, R.<sup>1</sup>, LANGERHOLC, T.<sup>2</sup>, ŠOLTÉSOVÁ, A.<sup>1</sup>, STROJNÝ, L.<sup>1</sup>, BOMBA, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta, Univerzita P.J. Šafárika v Košiciach, Košice  
Slovensko

<sup>2</sup>Ústav mikrobiológie, biochémie, molekulárnej biológie a biotechnológií  
Fakulta poľnohospodárstva a prírodných vied, Univerzita v Maribore, Maribor  
Slovinsko

### SÚHRN

V práci sme sledovali schopnosť probiotického kmeňa *Lactobacillus plantarum* LS/07 stimulovať produkciu cytokínov v kultúre imunitných buniek a v bunkovom modeli tráviaceho traktu *in vitro*. *In vivo* sme overovali jeho účinnosť voči experimentálne navodenej kolitíde u potkanov. *L. plantarum* LS/07 stimuloval produkciu cytokínov TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1 v oboch testovaných *in vitro* modeloch, ale rozdielnym spôsobom. Zaznamenali sme protektívny účinok *L. plantarum* pri DSS vyvolanej kolitíde u potkanov, ktorý sa prejavil zmiernením príznakov ochorenia a poškodenia sliznice hrubého čreva a signifikantnou stimuláciou imunosupresívneho cytokínu IL-10 v intestinálnej sliznici. Tento protektívny účinok koreloval so schopnosťou *L. plantarum* stimulovať produkciu IL-10 v intestinálnom *in vitro* modeli.

**Kľúčové slová:** *Lactobacillus plantarum*, cytokíny, *in vitro*, kolitída

### SUMMARY

The study was focused on the ability of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 to stimulate cytokine production in the culture of immune cells and in the cell model of the gastrointestinal tract *in vitro*. Subsequently the effect of the strain was evaluated in the experimentally induced colitis in rats. *L. plantarum* LS/07 stimulated the production of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in the both *in vitro* cell models but in different way. We recorded the protective effect of *L. plantarum* against DSS-induced colitis in rats by alleviating symptoms of disease, restoring the damaged colonic mucosa and by significant stimulation of immunosuppressive cytokine IL-10 in the intestinal mucosa. This protective effect correlated with the ability of *L. plantarum* to stimulate the production of IL-10 in the intestinal *in vitro* model.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*, cytokines, *in vitro*, colitis

## ÚVOD

Patogenéza nešpecifických zápalových ochorení čreva (inflammatory bowel disease, IBD) nie je úplne objasnená, aj keď je zrejmé, že chronicky a znova sa opakujúci zápal je výsledkom dysregulovanej, aberantnej imunitnej odpovede na prítomnú črevnú mikroflóru u ľudí s geneticou predispozíciou. Neadekvátne imunitná odpoveď je sprostredkovaná cytokínmi, ktoré majú dôležitú úlohu v iniciácii, stimulácii, progresii, ale aj inhibícii IBD. Uvádza sa, že u pacientov s IBD je narušená a rovnováha medzi pro- a proti-zápalovými cytokínmi. Pre sliznicu hrubého čreva IBD pacientov je charakteristická zvýšená expresia pro-zápalových cytokínov IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 [1]. Sekrécia uvedených cytokínov, ako aj ďalších pro-zápalových mediátorov, je vyvolaná aktiváciou nukleárneho transkripčného faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Viaceré štúdie na animálnych modeloch kolitídy potvrdili, že ovplyvnenie aktivity vybraných cytokínov resp. ich transkripčného faktora, môže predstavovať účinnú formu terapie IBD [2, 3]. V poslednej dekáde narastá počet prác testujúcich účinnosť probiotických mikroorganizmov pri liečbe IBD, ktoré sa vyznačujú nielen schopnosťou upravovať dysbiotickú črevnú mikroflóru, ale disponujú značným imunomodulačným potenciálom [4, 5]. Pôsobenie probiotík na imunitný systém je druhovo resp. kmeňovo špecifické, a preto nie je prekvapujúce, že niektoré kmene sú pri terapii IBD efektívnejšie a niektoré nemajú žiadny efekt [6, 7]. Na základe uvedených poznatkov vyvstáva nevyhnutnosť testovať každý probiotický kmeň a nie je možné generalizovať účinok jedného kmeňa na všetky probiotiká. Najčastejšie sa imunomodulačná aktivita probiotík testuje v zjednodušenej *in vitro* kultúre imunitných buniek, avšak v tráviacom trakte prichádzajú baktérie primárne do kontaktu s epitelovými bunkami sliznice, ktoré následne ovplyvňujú zložky slizničného imunitného systému. Preto *in vitro* cytokínový profil stimulovaný probiotikom nemusí korelovať s jeho *in vivo* účinnosťou. Napriek uvedeným limitáciám, niekoľko štúdií potvrdilo protektívny účinok voči

experimentálne vyvolanej kolitíde u tých probiotických kmeňov, ktoré sa vyznačovali signifikantnou stimuláciou IL-10 v porovnaní s IL-12 alebo TNF- $\alpha$  v kultúre periférnych mononukleárných buniek [8, 9]. Na základe uvedených poznatkov sme testovali schopnosť kmeňa *Lactobacillus plantarum* LS/07 stimulovať produkciu cytokínov *in vitro* a *in vivo* na modeli experimentálne vyvolanej kolitídy u potkanov.

## MATERIÁL A METÓDY

### *In vitro* stimulácia cytokínov kmeňom *Lactobacillus plantarum* LS/07

Bunkové línie H4-1 (humánne epitelové bunky tenkého čreva) a TLT (humánna monocytovo/makrofágová línia izolovaná z krvi) boli poskytnuté prof. Cencič (Univerzita v Maribore, Slovinsko). Bunky boli kultivované v obohatenom DMEM médiu (Sigma-Aldrich) suplementovanom s 5% fetálnym boviným sérom, L-glutamínom a antibiotikami (penicilín, streptomycín) v štandardných podmienkach pri 5% CO<sub>2</sub>, 37°C a 95% vlhkosti. Na dosiahnutie polarizovaného epitelového monolayeru bola H4-1 bunková línia nasadená v koncentrácii 2×10<sup>5</sup> buniek.ml<sup>-1</sup> média na membrány inzertov Transwell systému (0,4 μm veľkosť pórov; Corning, USA) a vložená do 12 jamkovej platničky. Po 13–14 dňoch nepretržitej kultivácie s pravidelnou výmenou média v apikálnom aj bazálnom kompartmente Transwell systému sa bunky plne diferencovali a vytvorili súvislý monolayer. Funkčná polarita monolayeru H4-1 buniek bola vyhodnotená meraním transepitelovej rezistencie (TEER) pomocou Millicell-ERS volt-ohmmetra. Bunky pripravené na experiment dosahovali minimálnu hodnotu TEER 680 Ω.cm<sup>-2</sup>. TLT bunky boli nasadené v koncentrácii 3×10<sup>5</sup> buniek.ml<sup>-1</sup> média do 12 jamkových platničiek a inkubované 1–2 dni, aby vytvorili súvislý monolayer. *In vitro* model črevnej sliznice bol vytvorený prenesením kompletne diferencovaných H4-1 monolayerov rastúcich na membráne inzertov do 12 jamkovej platničky so súvislými monolayermi TLT buniek.

Nočná kultúra *L. plantarum* LS/07 [10] rastúca v MRS bujóne bola scentrifugovaná, 2× premytá v PBS (pH 7,2–7,4) a následne rozsuspendovaná v DMEM médiu bez antibiotík a nariedená na koncentráciu  $10^6$  CFU.ml<sup>-1</sup> média. *L. plantarum* ( $10^6$  CFU.ml<sup>-1</sup>) alebo lipopolysacharid (LPS) z enteropatogénnej *Escherichia coli* (10 µg.ml<sup>-1</sup>, *E. coli* serotyp O111:B4, pozitívna kontrola) boli pridané do apikálnej časti modelu a boli kokultivované 24 hod pri 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Ako negatívna kontrola bolo použité DMEM médium. Po 24 hod inkubácii bolo z bazolaterálnej časti odobrané médium, scentrifugované (2400 rpm, 10 min) a supernatant bol uskladnený pri –80°C až do stanovenia cytokínov. Koncentrácie cytokínov IL-1β, IL-10, TNF-α a TGF-β1 v zozbieraných supernatantoch boli stanovené ELISA metódou s využitím komerčne dostupných ELISA kitov podľa návodu odporúčaného výrobcom (USCN Life Science Inc., USA).

### **In vivo experiment na modeli kolitídy**

Experiment bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (Ro-1136/14-221). V experimente boli použité samce (n = 24) potkanov kmeňa *Sprague Dawley* vo veku 7 týždňov. Zvieratá boli chované v konvenčných podmienkach Centrálného zvieratníka Lekárskej fakulty UPJŠ (SK PC4013). Potkany boli kŕmené konvenčným laboratórnym krmivom (Miško, SR) a mali prístup ku krmivu a vode *ad libitum*. Zdravotný stav, váha, spotreba krmiva a vody bola monitorovaná denne. Potkany boli náhodne rozdelené do troch experimentálnych skupín po 8 zvierat v každej skupine: (1) negatívna kontrola (NK) bez aplikácie dextran sulfátu sodného (DSS); (2) pozitívna kontrola (PK) 7-dňová aplikácia DSS v pitnej vode; (3) probiotická skupina (Pro) 7-dňová aplikácia DSS v pitnej vode a denne podávané mlieko s kmeňom *L. plantarum*. Na vyvolanie akútneho zápalu hrubého čreva sme použili dextran sulfát sodný (MW ~ 40 000) (TdB Consultancy, Švédsko). 5% roztok DSS bol počas 7 dní podávaný zvieratám v PK a Pro skupine v pitnej vode. 7 dní pred podaním DSS a následne aj v priebehu podávania

DSS bolo zvieratám v probiotickej skupine denne podávané odstredenú mlieko s nočnou kultúrou *Lactobacillus plantarum* (približne  $10^9$  CFU.ml<sup>-1</sup> MRS bujónu/zviera). Po 14 dňoch bol zvieratám v celkovej anestézii odobratý biologický materiál na histologické a imunologické vyšetrenia. Na vyhodnotenie stupňa a rozsahu prítomného zápalu v hrubom čreve bol použitý index aktivity ochorenia (disease activity index, DAI) publikovaný autormi Vasina kol. [11]. Kritéria DAI zahŕňali meranie dĺžky hrubého čreva od anusu po začiatok céka, váhu kolónu, konzistenciu a sfarbenie stolice a makroskopické zmeny hrubého čreva s rozsahom skóre 0–14. Všetky parametre boli hodnotené od začiatku podávania DSS až do konca experimentu (8.–14. deň). Prítomnosť histopatologických zmien v tkanive hrubého čreva bola vyhodnotená na histologických rezoch farbených hematoxylín/eozínom a Alcianovou modrou (detekcia pohárikovitých buniek) podľa štandardných histologických protokolov. Koncentráciu cytokínov IL-6, IL-10, TNF-α a transkripčného faktora NF-κB sme stanovili v jejunálnej sliznici, ktorá bola spracovaná podľa metódy popísanej Doligalskou a kol. [12], ELISA metódou s využitím komerčných ELISA kitov podľa inštrukcií výrobcu (Rat IL-6 Platinum ELISA, Rat IL-10 Platinum ELISA (Rat IL-6 kit, Rat IL-10 kit – eBioscience; Rat TNF-α kit RayBiotech, Inc., NF-κB p65 kit Elabscience Biotechnology). Konečná koncentrácia cytokínov a NF-κB bola prerátaná na 1 gram vlhkej sliznice.

### **ŠTATISTICKÉ HODNOTENIE**

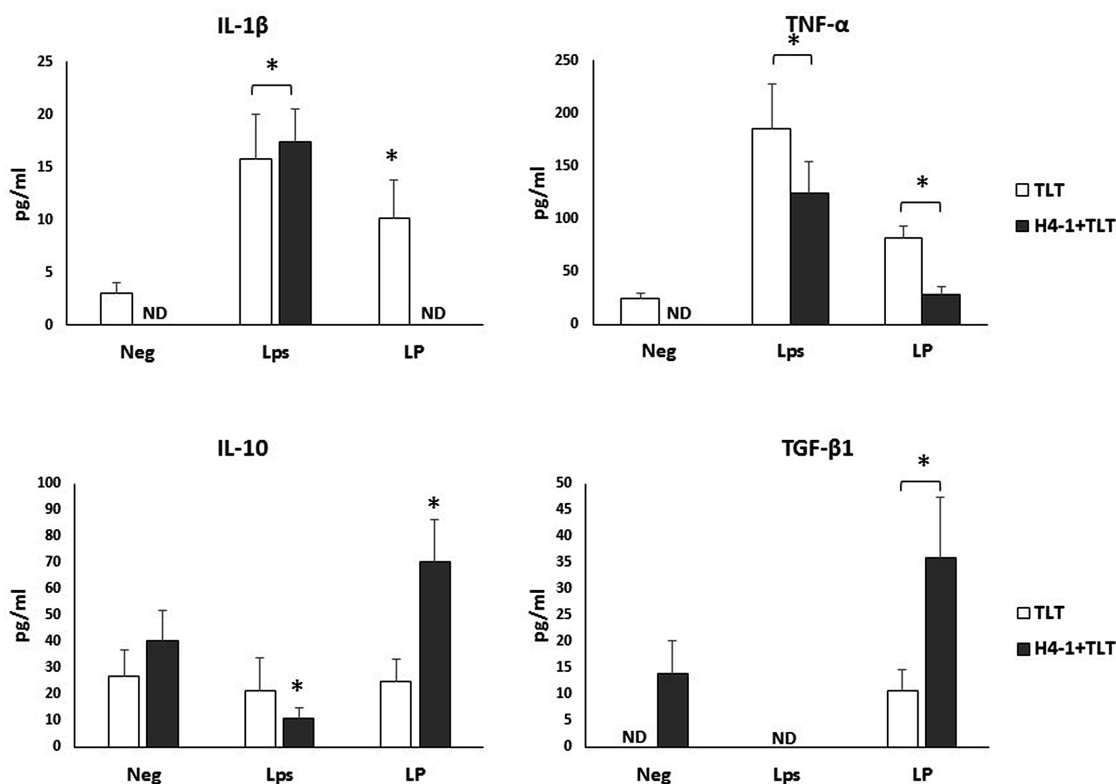
Výsledky v tabulkách a grafoch sú vyjadrené ako priemerná hodnota so smerodajnou odchýlkou ( $X \pm SD$ ). Na stanovenie štatistickej významnosti všetkých meraných parametrov sme použili štatistický test jednosmerná ANOVA a Tukeyho post-hoc test (MINITAB Release 11, 1996).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V experimente sme sledovali schopnosť kmeňa *Lactobacillus plantarum* LS/07 stimulovať produkciu cytokínov *in vitro* a následne sme testovali jeho účinok pri kolitíde vyvolanej podávaním dextran sulfátu sodného.

Výsledky viacerých štúdií dokumentujú schopnosť probiotických baktérií mliečneho kvasenia stimulovať produkciu cytokínov v *in vitro* kultúrach periférnych mononukleárných buniek, dendritických a epitelových buniek [8, 13–15]. V uvedených štúdiách sa uvádza, že vo všeobecnosti, laktobacily stimulujú v kultúre imunitných buniek predovšetkým pro-zápalové cytokíny IL-12 a TNF- $\alpha$ , ale proti-zápalový IL-10 len minimálne. Zároveň štúdie potvrdili, že cytokínový profil sa líši v závislosti od použitého druhu alebo

kmeňa laktobacilov, ako aj typu buniek. V súlade s týmto tvrdením sme nezaznamenali pri priamej stimulácii imunitných buniek kmeňom *L. plantarum* sekreciu IL-10, ale signifikantnú stimuláciu TNF- $\alpha$  v porovnaní s nestimulovanými bunkami (Obr. 1). V *in vivo* podmienkach tráviaceho traktu, nedochádza k priamemu kontaktu baktérií s imunitnými bunkami, s výnimkou dendritických buniek, ale signalizácia nastáva prostredníctvom enterocytov väzbou na receptory rozpoznávajúce molekulárne vzory mikroorganizmov, ako sú napr. Toll-like receptory. Navyše, imunomodulačná aktivita baktérií v čreve môže byť ovplyvnená interakciami s prítomnými bunkami ako uvádzajú Tiittanen kol. [16]. Na základe uvedených skutočností sme testovali aj produkciu cytokínov imunitnými bunkami indukovanú nepriamo prostredníctvom enterocytov stimulo-



Obr. 1. Účinok *Lactobacillus plantarum* LS/07 na produkciu cytokínov TLT bunkami stimulovanými priamo alebo nepriamo prostredníctvom enterocytov H4-1

Hodnoty sú uvedené ako priemer 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SD. Štatisticky vyhodnotené pomocou ANOVA a Tukeyho post-hoc testu, pričom \* – znázorňuje štatisticky signifikantný rozdiel v porovnaní s nestimulovanými bunkami (Neg) ( $p < 0,05$ ). Neg – nestimulované bunky, Lps – bunky stimulované s  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  lipopolysacharidu z *E. coli*, LP – bunky stimulované s  $10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$  of *Lactobacillus plantarum* LS/07; TLT – monocytovo/makrofágová humánna línia; H4-1 – humánna intestinálna epitelová línia

vaných *L. plantarum* v tzv. 3D funkčnom intestinálnom modeli [17]. V uvedenom modeli sme zaznamenali signifikantnú stimuláciu proti-zápalových cytokínov IL-10 aj TGF- $\beta$  v porovnaní s nestimulovanou kontrolou, ale kmeň minimálne ovplyvnil koncentráciu pro-zápalových cytokínov IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  (Obr. 1).

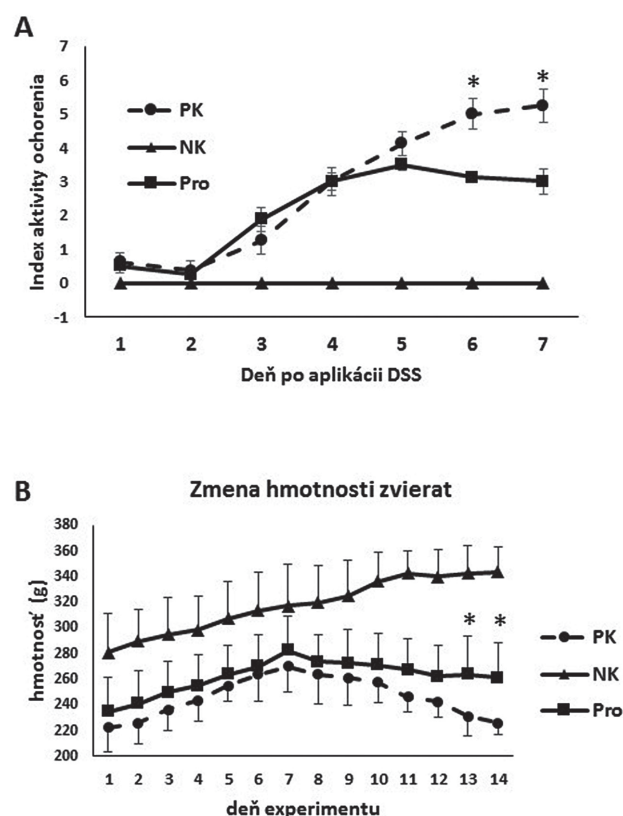
Baeuerlein kol. [18] uvádzajú, že len Gram-negatívne baktérie, vyznačujúce sa prítomnosťou lipopolysacharidu sú schopné stimulovať trans-epiteliálnu produkciu pro-zápalových cytokínov IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 a IFN- $\gamma$  v kultúre periférnych mononukleárných buniek (PBMC). Iná štúdia uvádza, že leukocyty stimulované prostredníctvom diferencovaných Caco-2 epitelových buniek vystavených pôsobeniu nepatogénneho kmeňa *E. coli* K12 produkovali cytokíny TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-10 v menšej miere než, keď boli priamo vystavené pôsobeniu baktérií [19].

Pro-zápalové cytokíny, ako IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ , podporujú patologický zápalový proces pri nešpecifických črevných zápalových ochoreniach a majú dôležitú úlohu v regulácii bariérovej funkcie črevného epitelu [20]. Dôležitú úlohu v patogenéze IBD zohráva tiež imunosupresívny cytokín IL-10, ako dokumentujú štúdie na IL-10-knock-out myšiach, u ktorých dochádza k spontánnemu vzniku kolitídy, ale podanie IL-10 prejavy ochorenia zmierňuje [21]. Nízke koncentrácie IL-10 sú charakteristické pre tkanivo sliznice čreva pacientov s ulceróznou kolitídou aj Crohnovou chorobou [22]. Cílená modulácia cytokínov v súčasnosti predstavuje jednu z testovaných foriem terapie IBD, ktorá ale nie vždy prináša žiadúci efekt [23]. Keďže probiotiká ovplyvňujú nie len kompozíciu črevnej mikrobioty, ale disponujú aj imunomodulačným potenciálom (vrátane vplyvu na sekréciu cytokínov), v budúcnosti sa môžu stať účinným alternatívnym alebo adjuvantným spôsobom terapie IBD. Výhodou probiotík je aj ich biologická dostupnosť priamo v tráviacom trakte a ich komplexný účinok na slizničný imunitný systém, ktorý zahŕňa moduláciu viacerých signálnych molekúl a molekulárnych dráh [24].

Predchádzajúce štúdie poukázali na protek-

tívny účinok probiotík voči experimentálne navodenej kolitíde u hlodavcov, ale tento efekt bol preukázateľný len pri kmeňoch, ktoré sa vyznačovali signifikantnou stimuláciou IL-10 v kultúre PBMC [8]. Na modeli DSS indukovanej kolitídy u potkanov sme overili efekt kmeňa *L. plantarum* LS/07, ktorý stimuloval IL-10, ale len pri ko-kultivácii imunitných buniek s enterocytmí. Preventívny účinok probiotika sme vyhodnotili na základe jeho schopnosti zmierňovať príznaky ochorenia, ktoré sa prejavili na hmotnosti zvierat (Obr. 2B) a priebehu ochorenia hodnoteného pomocou DAI (Obr. 2A).

Zároveň sme histologicky pozorovali zmiernenie patologických zmien v hrubom čreve vyvolaných podávaním DSS. Napriek prítomným infiltrátom zápalových buniek v tunica mucosae a submucosae a ojedinele sa vyskytujúcim kryp-



Obr. 2: Účinok *Lactobacillus plantarum* LS/07 na priebeh ochorenia (A) a zmeny hmotnosti (B) po aplikácii DSS

Hodnoty sú uvedené ako priemer ( $n=8$ )  $\pm$  SD. Štatisticky vyhodnotený pomocou ANOVA a Tukeyho post-hoc testu, pričom \* - označuje štatisticky signifikantný rozdiel v porovnaní s PK skupinou ( $p<0,05$ ). NK - negatívna kontrola; PK - pozitívna kontrola, aplikácia DSS; Pro - podávaný *Lactobacillus plantarum* LS/07 + aplikácia DSS



toovým abscesom, malo podávanie *L. plantarum* protektívny účinok voči deplécii pohárikovitých buniek. Pohárikovité bunky sú dôležité z hľadiska sekrécie mucínu, ktorý vytvára bariéru na povrchu sliznice a tým zabraňuje vstupu črevných baktérii a progresu IBD. Vplyv na črevnú bariéru a produkciu mucínu súvisiacu so zmiernením priebehu IBD u myší bol potvrdený aj pre iné probiotické kmene (*L. acidophilus*, *B. lactis*, *L. plantarum*, *B. breve*) [25].

Podávanie probiotík pri IBD vedie k zníženej expresii pro-zápalových cytokínov TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , ale aj iNOS a inhibícii aktivity matrix-metaloproteináz v zápalom aktivovanej sliznici. Jedným z imunopresívnych mechanizmov, ktorým probiotické baktérie inhibujú zápal je inhibícia NF- $\kappa$ B signálnej dráhy [24]. Inhibičný účinok na produkciu/expresiu cytokínov IL-6, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , ako aj ich transkripčného faktora NF- $\kappa$ B bol potvrdený pre viaceré probiotické kmene testované na hlodavcoch aj v klinických štúdiách [6, 26]. V našom experimente sme v súlade s vyššie uvedenými poznatkami zaznamenali po aplikácii DSS v PK skupine signifikantne zvýšenú koncentráciu pro-zápalových cytokínov IL-6, a TNF- $\alpha$  a NF- $\kappa$ B p65. V skupine zvierat suplementovaných probiotikom sme síce namerali znížené hodnoty sledovaných pro-zápalových mediátorov (NF- $\kappa$ B p65, IL-6, TNF- $\alpha$ ), ale nie štatisticky významne v porovnaní s PK skupinou (Tabuľka 1).

Naopak *L. plantarum* signifikantne stimuloval produkciu IL-10 v sliznici jejuna. Keďže

sme v experimente nepotvrdili inhibičný účinok *L.51plantarum* na NF- $\kappa$ B signálnu dráhu, predpokladáme, že tento kmeň môže zmierňovať zápalový proces vyvolaný DSS nepriamo, ovplyvnením diferenciacie regulačných T buniek, ktoré produkujú regulačné cytokíny IL-10 a TGF- $\beta$ . Takýto protizápalový mechanizmus zahŕňajúci stimuláciu IL-10 asociovanú s nárastom počtu CD4+Foxp3+ buniek v zápalových oblastiach čreva u zvierat s kolitídou bol potvrdený pre *Lactobacillus reuteri* a *L. acidophilus* [27, 28]. Carol a kol. [29] uvádzajú aj ďalší možný proti-zápalový mechanizmus pôsobenia laktobacilov, popísaný u pacientov s Crohnovou chorobou, a to prostredníctvom schopnosti podporovať apoptózu intraepitelových T-lymfocytov.

## ZÁVER

Na základe výsledkov uvedených experimentov sme zaznamenali protektívny účinok *L. plantarum* pri experimentálne vyvolanej kolitíde u potkanov, ktorý koreloval so schopnosťou probiotika stimulovať produkciu imunopresívneho cytokínu IL-10 v intestinálnom *in vitro* modeli. *In vivo* sme nepotvrdili inhibičný účinok testovaného kmeňa na NF- $\kappa$ B signálnu dráhu. Predpokladáme, že tento kmeň zmierňuje experimentálne vyvolaný zápal iným mechanizmom a v organizme jeho protektívny účinok voči zápalovým ochoreniam zahŕňa kombináciu pozitívnych účinkov, ako je inhibícia rastu patogénov

Tab. 1. Kncentrácia cytokínov a transkripčného faktora NF- $\kappa$ B v sliznici jejuna

	NK	PK	Pro
IL-6 [ng.g <sup>-1</sup> ]	564,69±228,36*	1047,84±152,22	878,09±179,60
TNF- $\alpha$ [ng.g <sup>-1</sup> ]	462,28±195,16*	845,35±194,96	734,38±221,48
IL-10 [ng.g <sup>-1</sup> ]	684,55±175,92*	331,25±154,60	580,99±200,29*
NF- $\kappa$ B [pg.g <sup>-1</sup> ]	68,91±9,07*	111,35±18,04	92,36±26,73

Hodnoty sú uvedené ako priemer (n=8)  $\pm$  SD. Štatisticky vyhodnotené pomocou ANOVA a Tukeyho post-hoc testu, pričom \* – označuje štatisticky signifikantný rozdiel v porovnaní s PK skupinou (p < 0,05); NK – negatívna kontrola; PK – pozitívna kontrola, aplikácia DSS; Pro – podávaný *Lactobacillus plantarum* LS/07 + aplikácia DSS



[30], obnova črevnej bariéry a regulácia sekrécie cytokínov. Napriek tomu, že výsledky animálnych a štúdií naznačujú, že určité probiotické laktobacily majú preventívny aj terapeutický účinok pri IBD, ich úspešná aplikácia v klinických štúdiách v budúcnosti závisí od lepšieho objasnenia mechanizmov molekulárneho pôsobenia v gastrointestinálnom trakte pre každý testovaný kmeň.

## POĎAKOVANIE

*Experimenty boli realizované a finančne podporené Nadáciou SPP – štipendijný program Hlavička 2012/2013 a projektami VEGA 1/0896/15 a 4/GSD/2012.*

## LITERATÚRA

1. RODA, G., et al., 2011: Cytokine networks in ulcerative colitis. *Ulcers*, Article ID 391787.
2. FITZPATRICK, L.R., 2012: Novel Pharmacological Approaches for Inflammatory Bowel Disease: Targeting Key Intracellular Pathways and the IL-23/IL-17 Axis. *Int. J. Inflamm.*, Article ID 389404, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/389404>.
3. NEURATH, M.F., 2014: Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 14 (5): 329–342.
4. HORMÄNNSPERGER, G., HALLER, D., 2010: Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int. J. Med. Microbiol.*, 300 (1): 63–73.
5. HEDIN, C., et al., 2007: Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *P. Nutr. Soc.*, 66 (3): 307–315.
6. HEGAZY, S.K., EL-BEDEWY, M., 2010: Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B activation in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.*, 16 (33): 4145–4151.
7. ZHOU, F.X., et al., 2012: *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS colitis by interfering with inflammatory responses. *World J. Gastroenterol.*, 18 (19): 2344–2356.
8. FOLIGNE, B., et al., 2007: Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.*, 13 (2): 236–243.
9. WELLS, J.M. 2011: Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell. Fact*, 10 (Suppl.1): 1–17.
10. STROJNÝ, L., et al., 2011: Effects of a probiotic in combination with prebiotics on intestinal lactobacilli and coliforms and activities of bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine exposed rats. *Czech J. Anim. Sci.*, 56 (3): 99–106.
11. VASINA, V., et al., 2010: Non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC attenuates DSS-induced colitis in rats. *World J. Gastroenterol.*, 16 (29): 3642–3650.
12. DOLIGALSKA, M., et al., 2006: The role of TGF- $\beta$  in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunol.*, 28 (8): 387–395.
13. HABIL, N., et al., 2011: Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Beneficial microbes*, 2 (4): 283–293.
14. ASHRAF, R., et al., 2014: Effect of cell-surface components and metabolites of lactic acid bacteria and probiotic organisms on cytokine production and induction of CD25 expression in human peripheral mononuclear cells. *J. Dair Sci.*, 97 (5): 2542–2558.
15. DONG, H., et al., 2010: Selective effect of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clin. Exp. Immunol.*, 161: 378–388.
16. TIITTANEN, M., et al., 2013: Interaction with Intestinal Epithelial Cells Promotes an Immunosuppressive Phenotype in *Lactobacillus casei*. *Plos One*, 8 (11), Article e78420.
17. CENCIČ, A., LANGERHOLC, T., 2010: Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology – A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 141(Suppl.): 4–14.
18. BAEUERLEIN, A., et al., 2009: Transepithelial activation of human leukocytes by probiotics and commensal bacteria: role of *Enterobacteriaceae* – type endotoxin. *Microbiol. Immunol.*, 53 (4): 241–250.
19. PARLESÁK, A., et al., 2004: Modulation of cytokine release by differentiated Caco-2 cells in compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand. J. Immunol.*, 60: 477–485.
20. BAMIAS, G., et al., 2012: New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*, 59 (3): 451–459.
21. HANAUER, S.B., 2006: Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis.*, 12 (5): 3–9.
22. SANCHEZ-MUÑOZ, F., et al., 2008: Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 14 (27): 4280–4288.
23. PERRIER, C., RUTGEERS, P., 2011: Cytokine blockade in

- Inflammatory Bowel Disease. *Immunotherapy*, 3 (11): 1341–1352.
24. VAN BAARLEN, P., et al., 2013: Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol.*, 34 (5): 208–215.
25. TOUMI, R., et al., 2013: Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis. *Immunopharm Immunot.*, 35 (3): 403–409.
26. LEE, H. S., et al., 2008: Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int. Immunopharmacol.*, 8 (4): 574–580.
27. MOHAMADZADEH, M., et al., 2011: Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *P. Natl. Acad. Sci.*, 108 (Suppl. 1): 4623–4630.
28. KWON, H. K., et al., 2010: Generation of regulatory dendritic cells and CD4+ Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *P. Natl. Acad. Sci.*, 107 (5): 2159–2164.
29. CAROL, M., et al., 2006: Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. *J. Leukocyte Biol.*, 79 (5): 917–922.
30. HIJOVÁ, E., et al., 2015: Preventive use of *Lactobacillus plantarum* LS/07 and inulin to relieve symptoms of acute colitis. *Acta Biochim. Pol.*, 62 (3): 553–557



## VYUŽITIE PROTEOMICKEJ ANALÝZY LEUKOCYTOV V ONKOLÓGII

VIŠČOROVÁ, Z.<sup>\*1,2</sup>, SABO, J.<sup>1</sup>, ANDRAŠINA, I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF

<sup>2</sup>Východoslovenský onkologický ústav a.s.

\*e-mail: zuzana.viscorova@gmail.com

### SÚHRN

Karcinóm prsníka je najčastejší malígny nádor postihujúci ženskú populáciu. Napriek zavedeniu mamografického skríningu ostáva včasná diagnostika tohto onkologického ochorenia naďalej závažným medicínskym problémom. Proteomická analýza leukocytov prispieva k identifikácii jednotlivých komponentov signálnych dráh malígnej transformácie buniek. Proteomická analýza je sľubným nástrojom predikcie klinického priebehu malígneho ochorenia ako aj odpovede na onkologickú liečbu.

**klúčové slová:** proteóm, leukocyty, karcinóm prsníka

### SUMMARY

**Breast cancer is the most frequent malignant tumor in women. Early diagnose of this oncological disease is, despite of mammography screening, severe medical problem. Proteomics of white blood cells explores and**

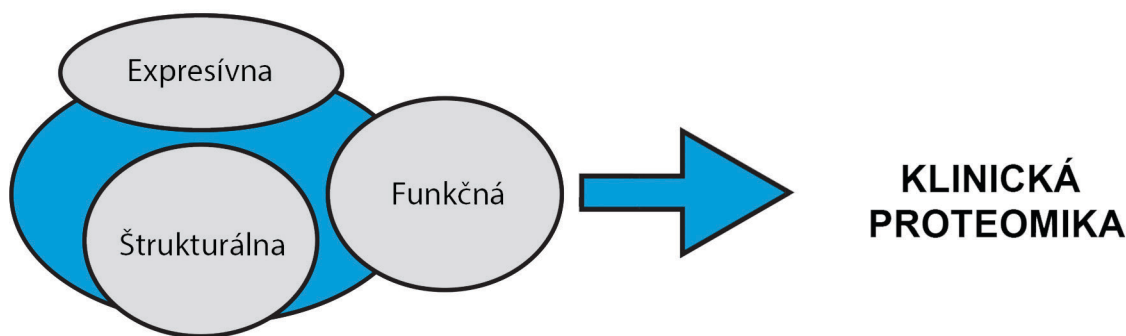
**elucidates the components of signal pathways in malignant transformation of the cell. Proteomic analysis has become a promising tool in predicting the clinical course of malignant disease and the response to antineoplastic therapy.**

**Key words:** proteome, white blood cells, breast cancer

### ÚVOD

V roku 1994 v Siene zadefinoval austrálsky vedec Marc Wilkins prvýkrát proteóm ako kompletný proteínový komplement bunky alebo organizmu, ktorý je exprimovaný genómom bunky alebo organizmu (Wilkins, 1996). Dlhá cesta od genomiky, transkriptomiky, proteomiky k metabolomike priniesla unikátny náhľad na proteín. V jednom okamihu ten istý proteín môže existovať vo viacerých izoformách a mení sa jeho expresia vplyvom času a priestoru v rámci jedinej bunky (Tabuľka 1).

Proteomika je vedecká disciplína, ktorá analyzuje proteóm tkanív, telových tekutín a krvi.



Obr. 1. Vzájomné prepojenie jednotlivých podskupín proteomiky

Tab. 1. Rozdiely medzi genómom a proteómom (upravené podľa Lundlanda, 2004)

Genóm	Proteóm
statický, nemeniaci sa časom	dynamický, meniaci sa časom
zmapovaných 25 000 génov	proteóm nie je zmapovaný
analýza 1 genómu	zložitá analýza – komplexnosť proteómu
PCR amplifikácia genómu	neexistuje PCR ekvivalent pre proteín

Jej výzvou sú kombinácie kódujúcich polymorfizmov a posttranslačných modifikácií jediného proteínu. Cieľom proteomického výskumu je hľadanie proteínov, určovanie ich štruktúry a rozdielov v ich expresii pri jednotlivých procesoch či vplyvoch prostredia a sledovanie nespočetných proteínových interakcií. Prináša globálny pohľad na bunkový metabolizmus. Užšiu špecifikáciu umožňuje jej súčasné delenie - štrukturálna, funkčná, expresívna (Obr. 1).

## NAJČASTEJŠIE METÓDY VYUŽÍVANÉ V PROTEOMIKE

Významný pokrok v oblasti rozvoja proteomických technológií priniesol široké spektrum separačných a identifikačných metód. Hmotnostná spektrometria je kľúčovou modernou metódou, ktorá umožňuje identifikáciu proteínov. Je nepostrádateľným analytickým nástrojom biochémie, farmakológie a medicíny.

## 2D-elektroforéza

Pomocou 2D elektroforézy separujeme proteíny na gélovej matrici na základe ich molekulovej hmotnosti a izoelektrického bodu (pI). Proteíny migrujú ku katóde alebo anóde podľa svojho náboja a zastavia sa v mieste gélu kde pH dosahuje ich pI. V druhom rozmere prebieha potom SDS elektroforéza a proteíny sa delia na základe rôznej molekulovej hmotnosti. Elektrické pole sa aplikuje kolmo a proteíny sa pohybujú v polyakrylamidovom géli zhora nadol. Posttranslačnou modifikáciou proteínov dochádza k zmene ich náboja a molekulovej hmotnosti. Výhodou 2D elektroforézy je detekcia aj takto zmenených proteínov (Rabiloud, Lelong, 2011).

## Chromatografické separačné metódy

Princípom týchto metód je rozdelenie látok na základe ich mobilnej a stacionárnej fázy. Pri použitej stacionárnej fáze delíme chromatografiu na papierovú, na tenkej vrstve alebo stĺpcovú. Na základe mobilnej fázy ju delíme na kvapalinovú a plynovú.

### Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia (LC, Liquid Chromatography) je fyzikálna separačná metóda prebiehajúca v kvapalnej fáze. Skúmaná vzorka je separovaná na jej základné zložky rozdelením medzi mobilnú (prúdiaca kvapalina) a stacionárnu fázu (kolóna naplnená sorbentom). K separácii zložiek zmesi dochádza na základe rôznych vlastností (polarita, náboj, veľkosť). Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC,

High Performance Liquid Chromatography) je moderná forma kvapalinovej chromatografie, používajúca kolóny naplnené drobnými časticami, cez ktoré je mobilná fáza pumpovaná pod vysokým tlakom. Afinita molekuly voči stacionárnej fáze spôsobuje spomalenie jej pohybu. Molekuly skúmanej vzorky sa pohybujú rôzne rýchlo. Zložky vzorky preto opúšťajú kolónu chromatografického systému v rôznom čase, čím dôjde k ich rozdeleniu a umožneniu ich detekcie. Prostredníctvom tejto metódy vieme kvalitatívne a kvantitatívne stanoviť stovky proteínov (Dong, 2006).

### **Hmotnostná spektrometria**

Hmotnostný spektrometer produkuje prúd iónov vzorky, ktoré separuje podľa pomeru hmotnosti a náboja. Klasický hmotnostný spektrometer pozostáva z ionizačného zdroja, hmotnostného analyzátora a detektora. Samotný postup analýzy vzorky (separácie proteínov) pozostáva z troch základných krokov: príprava vzorky, ionizácia vzorky, hmotnostná analýza.

V súčasnosti najčastejšie používanými metódami je ionizácia elektrosprejom (ESI, Electrospray Ionization) a laserová desorpcia/ionizácia za prítomnosti matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization).

#### **ESI**

Ionizácia elektrosprejom spočíva v kombinácii vysokého napätia, teploty, sušiacého plynu s výsledným nabitým prúdom iónov. Roztok obsahujúci analyzovanú vzorku je pri výstupe z kapiláry dispergovaný elektrosprejom na jemný aerosól kvapôčok do vákuovej trubice. Vplyvom vysokého napätia elektrického poľa nesú jednotlivé kvapôčky náboj. Táto mäkká ionizačná technika analyzuje biomolekuly na úrovni pikomólov  $10^{12}$  a femtomólov  $10^{15}$ , pri proteomickej analýze je dokonca citlivá na atómy  $10^{18}$  (Trauger, 2002).

#### **MALDI**

Laserová desorpcia/ionizácia za prítomnosti matrice uľahčujúcej desorpciu (MALDI). Princí-

pom MALDI je nanosenie zmesi peptidov spolu s vhodnou matricou na vzorkovaciu platničku. Následne po zaschnutí je platnička vsunutá do ionizačného poľa hmotnostného spektrometra. Peptidy vo vzorke získavajú ionizáciu krátkym pulzom laserového lúča a prítomná matrica ich chráni pred deštrukciou (Trauger, 2002). Následná analýza peptidov v podobe molekulových iónov prebieha v hmotnostných analyzátoroch. Pred vstupom do analyzátora sú ióny urýchlené a dopadajú na detektor. Doba letu iónu závisí na pomere hmotnosti a náboja a umožňuje zistenie molekulovej hmotnosti peptidov, identifikáciu proteínov pomocou počítačových softvérov, rôznych algoritmov (napr. MASCOT, EASYPROT) a proteomických databáz (napr. TREMBL).

### **Hmotnostné analyzátory**

Medzi najčastejšie používané hmotnostné analyzátory v proteomike patria: hmotnostný spektrometer zložený z analyzátora doby letu (TOF, Time of Flight) a analyzátor s iónovou pascou (IT, Ion Trap).

Kvadrupólový hmotnostný spektrometer (QTOF, Quadrupole Time of Flight) je štandardne zložený zo 4 (v najnovších zariadeniach z 8) proti sebe stojacich tyčí na ktoré je aplikovaná kombinácia jednosmerného a striedavého napätia. Ióny v elektrostatickom poli vstupujú do kvadrupólu a oscilujú. Len ióny s efektívnou hmotnosťou prejdú analyzátorom v určitom momente (Wysocki a kol., 2005).

Časovo preletový analyzátor (TOF) meria prelet iónov do detektora po akcelerácii. Iónové zrkadlo kompenzuje počiatočnú variabilitu kinetickej energie iónov s rovnakým pomerom  $m/Q$ .

Hmotnostná analýza pomocou iónovej pasce zbiera ióny do evakuovanej dutiny a potom sú selektívne vypúšťané podľa určitej hmotnosti. Priamo v iónovej pasci dochádza k mnohonásobnej fragmentácii iónov. Zdrojom ionizácie IT a TOF je najčastejšie elektrosprejová ionizácia (Aebersold, Mann, 2003).



## PROTEOMICKÁ ANALÝZA LEUKOCYTOV

Aktivácia leukocytov má kľúčové postavenie pri vzniku a priebehu ochorenia. Mediátormi zápalových a nádorových procesov sú zväčša proteíny. Korelácia transkriptómu mRNA a expresia proteínov je nepostačujúca (de Hoog, Mann, 2004). Zachytenie zmien na signálnych dráhach a identifikovanie potenciálnych prekanceróz je hlavnou úlohou proteomiky v onkológii, ktorá vyústi v cieleňú prevenciu a predikciu onkologickej diagnózy. Ideálom klinickej proteomiky je nájdenie špecifického proteínu pre každé ochorenie.

Analýza proteómu leukocytov periférnej krvi predstavuje minimálne invazívnu a vysokoinformatívnu metódu. Prináša benefit nielen nových diagnostických markerov, ale môže byť v budúcnosti prediktívnym markerom individuálnych nežiadúcich účinkov onkologickej liečby.

### **Proteóm polymorfonukleárných leukocytov periférnej krvi zdravého jedinca**

V štúdií Stein a kol. (2013) izolovali polymorfonukleárne leukocyty z periférnej krvi zdravých jedincov. V svojej štúdií porovnávali proteomickú analýzu s porovnaním izoelectrickej fokusácie proteínov mimo gélu (OG-IEF, Off-Gel Isoelectric Focusing) a pH reverzno-fázovou chromatografiou (Hp-RP, High pH Reversed Phase Chromatography). Pomocou OG-IEF bolo zistených v prienikoch 1477 priekazných proteínov. Hp-RP metódou bolo detekovaných o 17% viac proteínov – 1711. Hp-RP technika prináša uniformnú peptidovú distribúciu a väčšie rozlíšenie proteínov. Kombinácia Hp-RP a OG-IEF frakcionácie umožňuje získanie väčšieho spektra proteínov a prináša sľubnú cestu tzv. shotgun proteomiky (Stein a kol., 2013).

### **Proteomika leukocytov v onkológii**

Krokom k bližšiemu pochopeniu nádorovej invázie a metastatickému potenciálu je štúdium motility buniek v rámci interakcií s imunitným systémom, ktoré zahŕňa reorganizáciu aktíno-

vého cytoskeletu, reguláciu lokálnej adhézie, kontrolu membránových proteínov procesu endocytózy a epiteliálneho mezenchymálneho prechodu. Odpoveďou sú zmeny signálnych dráh evokované humorálnymi faktormi – cytokínmi, chemokínmi či rastovými faktormi. Práve architektúra mikrofilamentálnej siete proteínov je jedným z významných momentov bunkovej proliferácie, diferenciácie, interakcie, motility a migrácie. Zložky tejto siete sú prepojené navzájom vo všetkých štádiách tumorigenézy od prekanceróz až po metastatickú diseminovanú fázu ochorenia. Imunitný systém zdravého jedinca potláča patologické informácie vedúce k zmene 3D štruktúry a/alebo nerovnováhy aktínových filament a subcelulárnych štruktúr. Stúpajúci metastázujúci potenciál buniek bol asociovaný s poklesom aktínu a slabšie organizovaným aktínovým skeletom (Jiang, Enomoto, Takahashi, 2009).

### **Proteomika leukocytov pri karcinóme prsníka**

Karcinóm prsníka je najčastejšie diagnostikovaný zhubný nádor postihujúci ženskú populáciu. V štúdií Yeghiazaryana a kol. (2007) analyzovali proteíny cirkulujúcich leukocytov pred biopsiou, pred chirurgickým odstránením tumoru, pred rádioterapiou 14 Gy, 30 Gy (Gray) a pred konečnou rádioterapiou 60 Gy. Použitou metódou bola 2D gélová elektroforéza, maticou asistovaná laserová ionizácia (MALDI-TOF), kvantifikácia pomocou Western blot. Sledovali zmeny hladín expresie proteínov cirkulujúcich leukocytov vplyvom radiačného žiarenia. Výsledok štúdie poukázal na extenzívne individuálne zmeny vplyvom chirurgickej intervencie a rádioterapie. Individuálne zmeny hladín expresie proteínov môžu byť nástrojom toxikoproteomiky. Naznačili kľúčovú regulačnú úlohu thioredoxínu, mohutné ovplyvnenie detoxikačnej kaskády voľných radikálov, superoxid dismutázy 2 (SOD-2) a katalázy (Yeghiazaryan a kol., 2007). Detekcia liekmi indukovanej toxicity rozvíja nový odbor – toxikoproteomiku.

V jednej z najnovších štúdií boli analyzované proteíny plazmy u 87 pacientok s karcinómom

prsníka v klinickom štádiu IIIA a IIIB po chemoterapii doxorubicínom. Vzorky periférnej krvi boli odobraté po diagnóze, pred zahájením onkologickej liečby, ihneď po infúzii doxorubicínu a po prvom cykle chemoterapie. Vzorky boli spracované LC-MS a ESI proteomickou analýzou. Bola zistená znížená expresia 80 proteínov, ktoré zohrávajú úlohu pri zápalovom procese. Dominantné boli proteíny akútnej zápalovej odpovede (napr. TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor alpha), rastový faktor (TGF- $\beta$ 1, Transforming growth factor beta-1), interleukíny (napr. IL-1 $\beta$ , IL-12), clusterin, a gelsolin (Panis, 2015).

Pri karcinóme prsníka nastávajú zmeny expresie tiež profilínu, ktorý je jedným z najdôležitejších mediátorov signálnej transdukcie a aktínového cytoskeletu. Profilín ako pozitívny efektor polymerizácie aktínu mobilizuje T-lymfocyty. Pri translácii signálov do migrujúcich buniek zohráva dôležitú úlohu akumulácia profilínu. Minimálna zmena koncentrácie profilínu vedie k zníženiu kvality filopodií a zmene migračného potenciálu buniek. Profilín-dependentné zmeny cirkulujúcich leukocytov u pacientok s karcinómom prsníka zohrávajú úlohu v tumorigenéze. Zvýšenie expresie profilínu by mohlo

byť ďalšou liečebnou stratégiou ako dostať pod kontrolu metastatický potenciál pri karcinóme prsníka (Janke a kol., 2000; Wang a kol., 2002; Wittenmayer a kol., 2004; Roy a kol., 2004).

V štúdiu Brauna a kol. (2009) izolovali leukocyty u 12 pacientok (6 s karcinómom prsníka a 6 kontrolných zdravých žien). Identifikovali proteíny, ktoré rozdelili do niekoľkých všeobecných skupín (Tabuľka 2). Najsignifikantnejšie rozdiely expresie proteínov medzi pacientkami s karcinómom prsníka a žien bez tumoru boli práve zo skupiny mikrofilamentálnej siete. Detekovali zníženie expresie calgranulínu, RhoA, profilínu a aktínu.

Calgranulíny patria do skupiny S100 proteínov viažucich vápnik. Mnoho z nich je kódovaných zhlukom génov epidermálnej diferenciácie chromozómu 1q21. Práve táto oblasť je často reorganizovaná u malígnych tumorov (Itou a kol., 2002). Zmeny expresie calgranulínu A a B boli detekované u karcinómu prsníka, adenokarcinómu žalúdka, pažeráka, malobunkového karcinómu a adenokarcinómu pľúc, B-bunkového lymfómu. Výskum ukázal, že zmeny expresie calgranulínov priamo súvisia so zvýšenou aktiváciou imunitného systému, mobilizáciou a in-

**Tab. 2. Skupiny proteínov periférnych leukocytov u pacientok s karcinómom prsníka (upravené podľa Braun a kol., 2009)**

Skupiny proteínov	Detegované látky proteínovej povahy	Funkcie
1. skupina	fibrinogén, vimentín, plastín, tropomyozín, aktín, tubulín, keratín, profilín, vinculín, twinfilín, calgranulín, RhoA, LyGDI, GDI2	Proteíny mikrofilamentálnej siete migrácie buniek
2. skupina	mitochondriálna ATP-syntáza, cytochrom b, pyruvátkináza, karboanhydráza, fosfoglycerát kináza a mutáza, mitochondriálna-NADH-ubichinón oxidoreduktáza, triázafosfátizomeráza, laktátdehydrogenáza	Proteíny energetického metabolizmu a transportu
3. skupina	anexíny, chloridový intracelulárny kanálový proteín 1)	Proteíny Ca <sup>2+</sup> dependentnej membrány a signalizácie
4. skupina	14-3-3 proteín, heat-shock proteíny, endoplasmín, katalázy, peroxidoxín, glutation S-transferáza, purín nukleozid-fosforyláza, alpha-1-antitrypsín, kyselina delta-aminolevulinová	Proteíny stresovej odpovede, antioxidačnej obrany a detoxikácie
5. skupina	mitochondriálny elongačný faktor Tu, proteín disulfid-izomeráza, cytosol aminopeptidáza, peptidyl-prolyl cis-trans isomeráza, aktívator proteazómu	Proteíny regulácie syntézy a modifikácie enzýmov
6. skupina	matrix-metalloproteináza-9	Modifikačné tkanivové enzýmy

filtráciou do periférnych tkanív (Kurata a kol., 2005). Zvýšenú hladinu expresie calgranulínu B priamo potencuje stúpajúci zápalový potenciál a priamo súvisí aj so stupňom diferenciácie nádoru. Pri nízko diferencovanom invazívnom adenokarcinóme prsníka je mnohonásobne vyššia expresia S100A9 (Arai a kol., 2004).

### Vplyv oxidačného stresu

Zmena proteómu odráža individuálny vplyv oxidačného stresu na energetický metabolizmus, DNA reparáciu a smrť buniek (Golubnitschaja, 2007). Vplyvom oxidačného stresu dochádza k zmene imunopeptidómu buniek. Indukuje zápalové mikroprostredie, odstraňuje nutrienty, vedie k poklesu syntézy proteínov a stimuluje degradáciu proteómu imunocytov (Granados a kol., 2009, Caron a kol., 2011).

Pri ireverzibilnom zásahu dôjde k neadekvátnej imunologickej odpovedi, narušeniu bunkovej smrti a nekontrolovateľnej proliferácii. Cytotoxicita využívaných chemoterapeutík doxorubicínu a cyklofosfamidu ovplyvňuje všetky štádia karcinómu prsníka. Analýzy genotoxicity periférnych leukocytov u pacientok s karcinóm prsníka poukazujú na individuálnu obranyschopnosť a rozdielny antioxidálny status pred chemoterapiou, počas liečby a po jej ukončení. V priebehu liečby stúpa genotoxické poškodenie čo vedie k záverom potreby individualizácie liečby na redukovanie nežiaducich účinkov a zvýšenie kvality života (Gomes a kol., 2015). Úspešnejšia liečba vyžaduje molekulárny prístup k signálnym dráham leukocytov.

### Chaperóny

Súčasťou proteínových signálnych dráh sú chaperóny. Bránia bunku proti denaturačným účinkom stresových faktorov, regulujú degradáciu cytoplazmatických proteínov, spolupodieľajú sa na antioxidatívnej metabolickej ochrane, regulujú reorganizáciu filament a apoptózu. Väčšina solídnych nádorov má v čase diagnózy už potrebnú genetickú diverzitu na vznik rezistencie voči terapii zameranej na jeden molekulárny cieľ (Kitano, 2003). Multichaperónový systém

Hsp90 akumuluje polymorfne varianty génov v kľúčových signálnych dráhach bez zmeny fenotypu. Zaisťuje prežitie bunky i pri extrémnom množstve mutácii. Inaktiváciou Hsp90 neutralizujúcou protilátkou alebo pôsobením inhibítorov bolo pozorované zníženie aktivity matrixovej metaloproteinázy 2 a nádorovej invázie (Eustace a kol., 2004; Workman, 2004; Necker, 2007).

### ZÁVER

Proteomika predstavuje unikátny náhľad na kompletný proteínový komplement organizmu v kontexte času a priestoru. Pomocou modernej hmotnostnej spektrometrie je možné analyzovať jednotlivé proteíny buniek, telových tekutín a tkaniva. Leukocyty predstavujú mobilnú jednotku imunitného systému a ich proteíny odrážajú zmeny na úrovni signálnych dráh pri karcinogéze. Proteomická analýza leukocytov periférnej krvi pri karcinóme prsníka zachytáva množstvo proteínov, ktoré môžeme zaradiť medzi potenciálne diagnostické a/alebo prediktívne markery individuálnych nežiaducich účinkov a predstavuje sľubný smer výskumu včasnej diagnostiky a vysokocielenej efektívnejšej liečbe.

### LITERATÚRA

1. AEBERSOLD, R. MANN, M., 2003: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, Vol. 422, p. 198–207.
2. ARAI, K. et al., 2004: S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumour differentiation. *Eur. J. Cancer*, Vol. 40, p. 1179–1187.
3. BRAUN, M., 2009: Down-regulation of microfilament network-associated proteins in leukocytes of breast cancer patients: potential application to predictive diagnosis. *Cancer Genomics Proteomics*, Vol. 6, p. 31–40.
4. CARON, E. et al., 2011: The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol. Syst. Biol.*, Vol. 7, p. 533.
5. DE HOOG, C.L. MANN, M., 2004: ANU. Proteomics. *Rev. Genomics Hum. Genet.*, Vol. 5, p. 267–293.

6. DONG, M. W., 2006: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey, Wiley. 286 s. ISBN 0-471-72789-X.
7. GOLUBNITSCHAJA, O., 2007: Cell cycle checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, cancer, and neurodegenerative diseases. *Amino Acids*, Vol. 32, p. 359–371.
8. GOMEZ, A. L. J. et al., 2015: Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 11.
9. GRANADOS, D. P. et al., 2009: ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.*, Vol. 10, p. 10.
10. ITOU, H. et al., 2002: The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca (2+)-dependent regulator protein in inflammatory process. *J. Mol. Biol.*, Vol. 316, p. 265–276.
11. JANKE, J. et al., 2000: Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J. Exp. Med.*, Vol. 191, p. 1675–1686.
12. JIANG, P. E. NOMOTO, A. TAKAHASHI, M., 2009: Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Letters*, Vol. 284, is. 2, p. 122–130.
13. KITANO, H., 2003: Cancer robustness: tumour tactics. *Nature*, Vol. 426, p. 125.
14. KURATA, Y. et al., 2005: Inflammatory cells in the formation of tumor-related sarcoid reactions, *Hum. Pathol.*, Vol. 36, p. 546–554.
15. LUNDBLAD, R. L., 2006: *The Evolution from Protein to Protein Chemistry to Proteomics*. New York: CRC Press, 289 p. ISBN 0-8493-9678-6.
16. NECKERS, L., 2007: Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J. Biosci.*, Vol. 32, p. 517–30.
17. PANIS, C. et al., 2015: Early downregulation of acute phase proteins after doxorubicin exposition in patients with breast cancer. *Tumor Biol.*, p. 1–9.
18. RABILLOUD, T. LELONG, C., 2011: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*, Vol. 74, iss. 10, p. 1829–1841.
19. ROY, P. JACOBSON, K., 2004: Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, Vol. 57, p. 84–95.
20. STEIN, R. D. et al., 2013: High pH reversed-phase chromatography as a superior fractionation scheme compared to off-gel isoelectric focusing for complex proteome analysis. *Proteomics*, Vol. 13, p. 2956–2966.
21. TRAUGER, S. WEBB, W. SIUZDAK, G., 2002: Peptide and protein analysis in mass spectrometry. *Journal of Spectroscopy*, Vol. 16, is. 1, p. 15–28.
22. WANG, W. et al., 2002: Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.*, Vol. 62, p. 6278–6288.
23. WYSOCKI, V. H. et al., 2005: Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*, Vol. 35, p. 211–222.
24. WILKINS, M. R. et al., 1996: From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology*, Vol. 14, No. 1, p. 61–65.
25. WITTENMAYER, N. et al., 2004: Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 15, p. 1600–1608.
26. WORKMAN, P., 2004: Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol. Med.*, Vol. 10 p. 47–51.
27. YEGHIAZARYAN, K. et al., 2007: Irradiated Breast Cancer Patients Demonstrate Subgroup-specific Regularities in Protein Expression Patterns of Circulating Leukocytes. *Cancer Genomic & Proteomics*, Vol. 4, p. 411–418.