

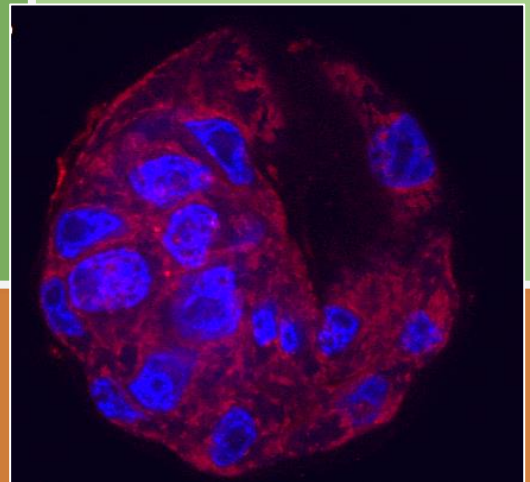
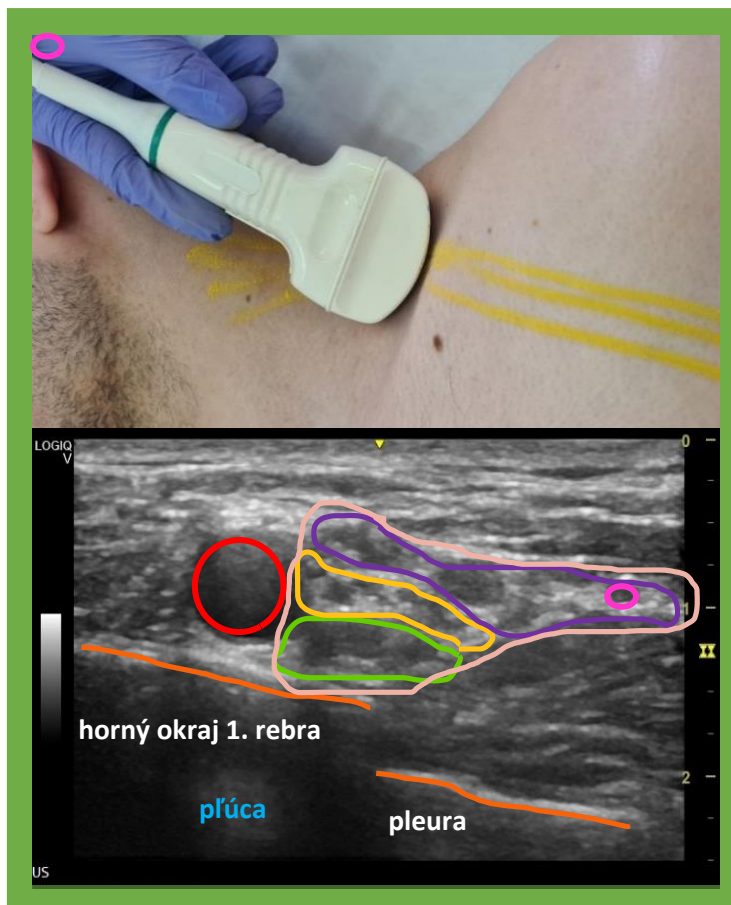
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Lekárska fakulta

Ústav anatómie

Slovenská anatomická spoločnosť

Slovenská lekárska spoločnosť



## 27. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ

*Miesto morfológie v súčasnej medicíne*

Košice, 23. – 24. máj 2024

**Zborník vedeckých prác**

**Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach**  
**Lekárska fakulta**  
**Ústav anatómie**  
Slovenská lekárska spoločnosť  
Slovenská anatomická spoločnosť



**27. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ**  
**Miesto morfológie v súčasnej medicíne**

*Zborník vedeckých prác*

**Adriana Boleková - Natália Hvizdošová (eds.)**

Košice, 23. – 24. máj 2024

## **27. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ**

### **Miesto morfológie v súčasnej medicíne**

*Zborník vedeckých prác*

#### **Zostavovatelia:**

doc. MUDr. Adriana Boleková, PhD.

MVDr. Natália Hvizdošová, PhD.

*Ústav anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

#### **Recenzenti:**

prof. MUDr. Ingrid Hodorová, PhD.

*Ústav anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

doc. MVDr. Květuše Lovásová, PhD.

*Ústav anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

doc. MVDr. Štefan Tóth, PhD.

*Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 - Creative Commons Attribution-NonCommercial-No-derivates 4.0 („Uveďte pôvod – Ne používajte komerčne - Nespracováajte“)



Za odbornú a jazykovú úpravu vedeckých prác zodpovedajú autori. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Dostupné od: 17.05.2024

Umiestnenie: [www.unibook.upjs.sk](http://www.unibook.upjs.sk)

DOI: <https://doi.org/10.33542/KMD-0313-5>

ISBN: 978-80-574-0313-5 (e-publikácia)

# OBSAH

<b>Wi-Fi ŽIARENIE A JEHO VPLYV NA ORGANOGENÉZU</b> V. Almášiová, K. Holovská, V. Karaffová, S. Andrašková .....	7
<b>MORFOGENÉZA SVALNATÉHO ŽALÚDKA 9 a 14 DŇOVÉHO KURACIEHO EMBRYA</b> S. Andrašková, Z. Andrejčáková, V. Almášiová, T. Vince, K. Holovská .....	12
<b>VPLYV METABOLITOV ĽANOVÉHO SEMENA NA PROLIFERÁCIU A APOPTÓZU BUNIEK ENDOMETRIA MYŠÍ</b> D. Babjáková, M. Lecová, K. Rodáková, S. Gancarčíková, D. Sopková, R. Vlčková .....	17
<b>ÚČINOK IONIZUJÚCEHO ŽIARENIA NA NEUROTRANSMITERY V MOZGU STARNÚCICH POTKANOV</b> S. Báľentová, D. Kalenská, P. Muriň, E. Hajtmanová .....	23
<b>KURACIE EMBRYO AKO MODELOVÝ ORGANIZMUS PRE POSÚDENIE EMBRYONALNEJ TOXICITY VČELIEHO JEDU</b> B. Bekešová, M. Polláková, R. Sabo, V. Petrilla, Z. Andrejčáková, R. Vlčková, E. Petrovová, J. Legáth, D. Sopková .....	28
<b>APLIKÁCIA TUBULÁRNEHO VODIČA PRI REGENERÁCII CHVOSTOVÉHO NERVU POTKANA PO TRANSEKCII</b> J. Blaško, M. Mojžíšová, E. Székiová, Z. Michalová, I. Vanický.....	35
<b>VZŤAH PEDAGÓG VERSUS ŠTUDENT V PROCESE UČENIA</b> A. Boleková, I. Hodorová .....	40
<b>KARBONICKÁ ANHYDRÁZA IX A SURVIVIN V KOLOREKTÁLNYCH KARCINÓMOCH</b> V. Cígerová, M. Adamkov, S. Drahošová .....	46
<b>ENTERICKÝ NERVOVÝ SYSTÉM, MORFOLÓGIA, FUNKCIA A KLINICKÝ VÝZNAM</b> M. Danková, P. Gáľfiová, M. Juríková, M. Lorencová, Š. Tóth, Z. Fagová Z., M. Miko .....	53
<b>HODNOTENIE ANGIOGÉNNEHO POTENCIÁLU PÓROVITÉHO BIOMATERIÁLU POMOCOU PREPELIČIEHO EX OVO-CAM MODELU</b> Z. Demčíšáková, Z. Tirpáková, L. Luptáková, J. Hurníková, Ľ. Medvecký, E. Petrovová .....	58
<b>NEURONÁLNA REGULÁCIA NEUROGENÉZY V ČUCHOVEJ NEUROGÉNNEJ OBLASTI POTKANA</b> K. Fabianová, M. Martončíková, I. Vanický, J. Blaško, A. Popovičová, E. Račeková .....	67
<b>NOVÝ BIOCEMENT S PRÍDAVKOM MEDU PRE REGENERATÍVNU MEDICÍNU</b> M. Giretová, Ľ. Medvecký, R. Štulajterová, T. Sopčák, L. Luptáková .....	71
<b>VPLYV MIKONAZOLU NA LYMFOCYTY PERIFÉRNEJ KRVI DOBYTKA A OŠÍPANÝCH</b> B. Holečková, V. Schwarzbacherová, J. Bučan, D. Dolníková, M. Galdíková, J. Halušková .....	77
<b>VPLYV KOLIFORMNÝCH BAKTÉRIÍ NA PROLIFERAČNÚ AKTIVITU A APOPTÓZU SLIZNICE ČREVA</b> M. Holodová, M. Danková, Z. Fagová, K. Čurgali, S. Gancarčíková, Š. Tóth .....	82
<b>FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE HEPATOGENÉZU</b> K. Holovská, S. Andrašková, V. Almášiová .....	88
<b>VPLYV Wi-Fi ŽIARENIE NA VLÁKNA V MEZENCHÝME CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY NA 14. EMBRYONÁLNY DEŇ</b> K. Holovská, S. Andrašková, E. Sesztáková, J. Molnár, V. Almášiová .....	92



<b>EFFEKT OF FORMIC ACID ANTIGEN RETRIEVAL METHOD IN IMMUNO-ISTOCHEMISTRY FOR UNMASKING ALPHA SYNUCLEIN PROTEIN AGGREGATES IN FORMALIN FIXED PARAFFIN EMBEDDED HUMAN TISSUE</b> N. Hryntsova, T. Smolek, N. Zilka .....	97
<b>HISTOLOGICKÁ ANALÝZA NOVOVYTVORENÉHO KOŽNÉHO TKANIVA V TERAPII RÁN</b> F. Humeník, K. Vdoviaková, L. Krešáková, J. Danko, Z. Fagová, Š. Tóth .....	103
<b>ALTERNATÍVNE ZVIERACIE MODELKY VO VÝSKUME VÍRUSOVÝCH VEKTOROV</b> J. Hurníková, Z. Demčišáková, E. Petrovová .....	110
<b>UNILATERÁLNA NEKOMPLETNÁ DUPLIKÁCIA URETERU: KAZUISTIKA</b> N. Hvizdošová, J. Vecanová, I. Hodorová .....	116
<b>REGENERÁCIA DLHÝCH KOSTÍ NA ANIMÁLNOU MODELI OVIEC S POUŽITÍM FOSFOREČNANU VÁPENATÉHO OBOHATENÉHO O SÍRAN VÁPENATÝ</b> S. Ivašková, L. Krešáková, K. Vdoviaková, F. Korim, F. Humeník, E. Medvecký .....	121
<b>ZMIEŠANÝ HEPATOCELULÁRNY CHOLANGIOKARCINÓM – KAZUISTIKA</b> V. Karaffová, E. Hudec, V. Revajová, Z. Ševčíková, V. Almašiová .....	127
<b>VZŤAH NADMERNÉHO PRÍJMU FRUKTÓZY K METABOLICKÝM A KOGNITÍVNYM ZMENÁM</b> D. Kolesár, J. Teslík, I. Hodorová .....	133
<b>POZITÍVNY ÚČINOK VZDIALENÉHO KONDICIONOVANIA NA VEĽKOSŤ INFARKTU A POŠKODENIE PEŤÍC V PRÍTOMNOSTI HYPER-ZÁPALOVEJ REAKCIE</b> J. Končeková, K. Petrová, M. Némethová, M. Bona, P. Bonová .....	139
<b>VYUŽITIE SVINE DOMÁCEJ V REGENERAČNEJ MEDICÍNE DLHÝCH KOSTÍ</b> F. Korim, K. Vdoviaková, S. Ivašková, L. Krešáková, F. Humeník, J. Danko, M. Giretová, E. Medvecký....	144
<b>MORFOLOGICKÁ ANALÝZA MOZGU OBEZNÉHO POTKANA PO PODANÍ SEKRETÓMU KRVNÝCH BUNIEK STIMULOVANÝCH VZDIALENÝM KONDICIONOVANÍM</b> K. Kotorová, J. Končeková, M. Gottlieb, P. Bonová .....	149
<b>ABSENCIA GLUTATIÓNPEROXIDÁZY 5 V OOCYTOCH A PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH U POTKANOV</b> A. Krehel'ová, V. Kovaříková, I. Hodorová, D. Fabian, J. Mihalik .....	154
<b>BIOCEMENT S PRÍDAVKOM KYSELINY FYTOVEJ/FYTÁZY V REGENERAČNOM PROCESE OSTEOCHONDRÁLNYCH DEFEKTOV</b> L. Krešáková, K. Vdoviaková, F. Humeník, S. Ivašková, F. Korim, M. Kadáši, E. Medvecký .....	158
<b>CHORIOALANTOICKÁ MEMBRÁNA - IN VIVO TESTOVANIE BIODOKOMPATIBILITY BIODOKONŠTRUKTOV</b> L. Luptáková, E. Petrovová, Z. Tirpáková .....	164
<b>DETEKCIA SUPEROXIDDIZMUTÁZY V PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH POTKANA</b> J. Mihalik, D. Petrášová, I. Hodorová .....	169
<b>DEZINFEKCIA VAJEČNEJ ŠKRUPINY A JEJ VPLYV NA VÝVIN EMBRYA</b> E. Petrovová, Z. Demčišáková, J. Hurníková, L. Luptáková, B. Kazsmerová .....	173
<b>EX OVO A IN OVO KULTIVÁCIA VTÁČÍCH EMBRYÍ</b> B. Pokorná, S. Štefancová, L. Luptáková .....	179

<b>LASEROM ASISTOVANÉ CHIRURGICKÉ PREREZÁVANIE ZUBOV S PORUCHOU PREREZÁVANIA</b>	
M. Rozprávková, J. Ohlasová, K. Lovásová .....	183
<b>DETEKCIA APOPTOTICKÝCH ZMIEN V BOVINNÝCH LYMFOCYTOCH PO KRÁTKODOBEJ EXPOZÍCII MOSPILANU® 20SP</b>	
V. Schwarzbacherová, B. Holečková, M. Galdíková, J. Halušková, J. Bučan, D. Dolníková .....	187
<b>STIMULÁCIA ANGIOTENZÍNŮVÝCH RECEPTOROV TYPU 2 A JEJ VPLYV NA OBNOVU VASKULATÚRY PO ZÁVAŽNEJ TRAUME MIECHY</b>	
J. Snopková, V. Liptáková, E. Hvozdíková, J. Pavel .....	192
<b>DILATÁCIA A VOLVULUS ŽALÚDKA. NÁHLY ÚHYN FENKY BEZ KLINICKÝCH PRÍZNAKOV</b>	
Z. Ševčíková, B. Lukáč, V. Karaffová, V. Revajová, E. Hudec, R. Szabóová .....	198
<b>HISTOLOGICKÉ A IMUNOHISTOCHEMICKÉ HODNOTENIE REGENERÁCIE KOSTNÉHO TKANIVA POMOCOU HYDROXYAPATITOVEJ KOSTNEJ PLATNIČKY</b>	
V. Šimaiová, J. Teleky .....	203
<b>ADIPOKÍNY U VTÁKOV - TYPY A ÚLOHY VO VTÁČOM ORGANIZME</b>	
S. Štefancová, B. Pokorná, L. Luptáková .....	211
<b>BIOKOMPOZITY S PRÍDAVKOM MEDU PRE REGENERÁCIU KOSTÍ</b>	
R. Štulajterová, Ľ. Medvecký, M. Giretová, T. Sopčák, P. Jevinová .....	215
<b>VLASTNOSTI DISKU V TEMPOROMANDIBULÁRNOM KLBE U OŠÍPANÝCH</b>	
J. Teleky, V. Šimaiová .....	224
<b>PERSPEKTÍVY TECHNOLOGIE ORGÁN NA ČIPE</b>	
Z. Tirpáková, L. Luptáková, E. Petrovová .....	228
<b>VÝSLEDKY VYŠETRENÍ INFERTILNÝCH ŽIEN S PREDPOKLADANOU PATOLÓGIU VAJÍČKOVODOV</b>	
J. Trubianska, M. Kurasov, T. Holan, Š. Polák, L. Guller .....	232
<b>VYUŽITIE ULTRASONOGRAFIE PRI REALIZÁCIÍ INTERVENČNÝCH VÝKONOV NA VYBRANÝCH SVALOCH RAMENA</b>	
M. Vrzgula, L. Josayová, K. Lovásová, I. Hodorová .....	239

# Wi-Fi ŽIARENIE A JEHO VPLYV NA ORGANOGENÉZU

## Wi-Fi RADIATION AND ITS INFLUENCE ON ORGANOGENESIS

**Viera Almášiová**, Katarína Holovská, Viera Karaffová, Sandra Andrašková  
Katedra morfológických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice  
*viera.almasiova@uvlf.sk*

### Súhrn

Technológie fungujúce na princípe bezdrôtového prenosu elektronických dát poskytujú nespočetné množstvo výhod. Na druhej strane ale značne zaťažujú životné prostredie neionizujúcim elektromagnetickým žiarením. Obzvlášť citlivou periódou v živote jedinca voči rozličným environmentálnym noxám je prenatálny vývin, preto cieľom práce bolo sledovať vplyv Wi-Fi žiarenia na formovanie orgánov v tele kuracieho embrya. Wi-Fi žiarenie s frekvenciou 2,4 GHz a nízkou intenzitou  $300 \mu\text{W}/\text{m}^2$ , ktoré nepretržite od 1. do 9. dňa vývinu pôsobilo na kuracie embryo síce výrazne nenarušilo štruktúru vyvíjajúcich sa orgánov, avšak spôsobilo výraznú kongesciu ciev v rôznych parenchymatóznych orgánoch, ako aj vo väzive kože a podkožia, čo poukazuje na jeho potenciálne nepriaznivý vplyv na organogenézu.

**Kľúčové slová:** Wi-Fi, vývoj, kuracie embryo, histologická štruktúra

### Summary

Technologies operating on the principle of wireless transmission of electronic data provide countless advantages. On the other hand, they significantly burden the environment with a non-ionizing electromagnetic radiation. Prenatal development is a particularly sensitive period in life to various environmental noxes, therefore the aim of the work was to observe the effect of Wi-Fi radiation on the formation of organs in the body of a chicken embryo. Wi-Fi radiation at a frequency of 2.4 GHz and a low intensity of  $300 \mu\text{W}/\text{m}^2$ , which was continuously applied to the chicken embryo from the 1<sup>st</sup> to the 9<sup>th</sup> day of development, did not significantly disturb the structure of the developing organs, but caused a significant congestion of blood vessels in parenchymatous organs, as well as connective tissue of the skin and hypodermis, indicating its potentially adverse effect on organogenesis.

**Key words:** Wi-Fi, development, chicken embryo, histological structure

## Úvod

Neodmysliteľnou súčasťou moderného životného štýlu je priestorovo a časovo neobmedzený prístup k elektronickým informáciám. Wi-Fi signál z angl. „Wireless Fidelity – tzv. bezdrôtová vernosť“ umožňuje smartfónom, tabletom, notebookom a iným moderným zariadeniam vysokorýchlostné pripojenie k internetu v určitom obmedzenom priestore. Wi-Fi signál sa šíri prostredníctvom neionizujúceho elektromagnetického žiarenia, a to na dvoch konkrétnych frekvenčných pásmach 2,4 a 5 GHz, čo je vlastne rádiovlnové / mikrovlnné žiarenie (MŽ). Zatiaľ čo pásmo 2,4 GHz ponúka širšie pokrytie signálom, pásmo 5 GHz ponúka vyššiu rýchlosť prenosu dát. Aj keď Wi-Fi popri mobilných a bezdrôtových telefónoch, základňových staniách, radaroch a iných bezdrôtových technológiách prispieva k celkovej expozícii organizmu rádiovlnovému elektromagnetickému žiareniu len relatívne malou mierou, medzi odborníkmi aj laickou verejnosťou vznikajú mnohé otázky o jeho možných nepriaznivých vplyvoch na organizmus, a to obzvlášť v raných štádiách jeho vývinu. V súčasnosti je všeobecne vedecky potvrdené, že MŽ interaguje s biologickými systémami a navodzuje v nich zmeny na netermálnej / biologickej úrovni a pri silných intenzitách, respektíve za určitých špecifických podmienok aj na termálnej úrovni. *In vivo* model kuracieho embrya poskytuje v porovnaní s inými klasickými výskumnými zvieracími modelmi nespočetné množstvo výhod. Je lacný, prístupný, ľahko sa s ním manipuluje, má krátku gestačnú periódu – 21 dní a nevyžaduje legislatívne schvaľovanie. Cieľom našej práce bolo z histologického hľadiska vyhodnotiť vplyv Wi-Fi žiarenia na vývoj kuracieho embrya na 9. embryonálny deň (ED).

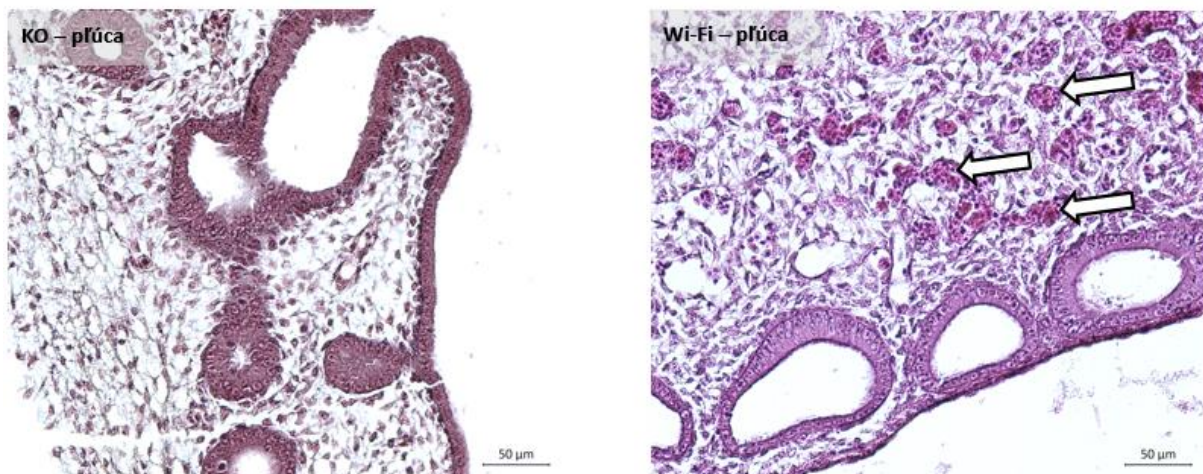
## Materiál a metódy

Oplodnené kuracie vajcia získané z certifikovaného chovu Párovské Háje boli náhodne rozdelené na kontrolnú skupinu (KO, n = 6) a skupinu exponovanú Wi-Fi žiareniu (Wi-Fi, n = 6). Vajcia boli inkubované v umelom inkubátore (River system ET49 automatic) pri štandardných podmienkach (37,5° C a vlhkosti vzduchu 60 %). Wi-Fi skupina bola prostredníctvom antény Mikrotik Metal 52 ac 15s od 1. ED kontinuálne vystavená MŽ (2,4 GHz, 300  $\mu\text{W}/\text{m}^2$ ) po dobu 9 dní. KO skupina bola držaná v inkubátore so špeciálnym odtienením Wi-Fi signálu. Priemerná silová hustota a rovnomernosť distribúcie signálu bola permanentne monitorovaná prístrojom TriField® (USA). Na 9. ED boli z vajec oboch skupín odobrané celé zárodky. Vzorky boli fixované v roztoku mDF (modified Davidson's fluid) a

zaliate do parafínu. 7  $\mu\text{m}$  pozdĺžne rezy embryami boli ofarbené hematoxylín-eozínom (HE) a fotodokumentované svetelným mikroskopom (Zeiss Axio Lab A1 a Axio Cam ERc 5).

## Výsledky

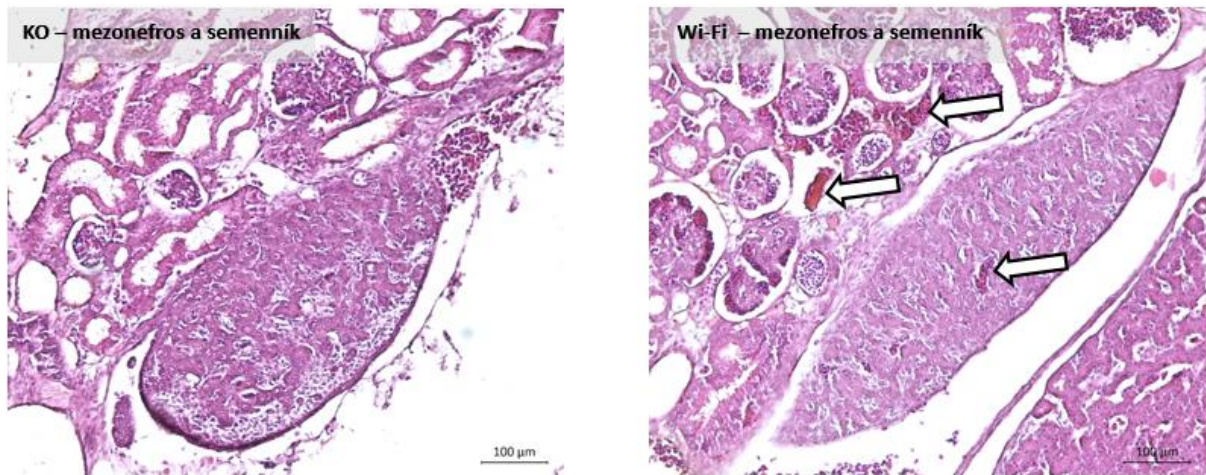
Na 9. ED sme v telách vyvíjajúcich sa kurčiat v rámci obidvoch skupín pozorovali normálny vývoj orgánov. V hlavovej oblasti sa nachádzali už dobre vyvinuté mozgové hemisféry, *myelencephalon*, *metencephalon*, *cerebellum*, *lobus opticus* ako aj už takmer definitívne vyvinuté oko. V telovej dutine sa vyskytovali všetky vnútorné orgány v relatívne vysokom stupni diferenciácie. Srdce s hrubým myokardom malo dobre formované predsieňe a komory oddelené úzkym atrioventrikulárnym kanálom, ako aj výrazný *sinus venosus* a *bulbus arteriosus*. Pľúca v kanalikulárnom štádiu vývoja obsahovali málo diferencované prekursorzy dorzobronchov, ventrobronchov a parabronchov.



**Obr. 1** Mikrofotografie vybraných orgánov 9 dňového kuracieho embrya, HE (šípky – kongescia ciev)

Najväčším orgánom v telovej dutine bola pečeň, v ktorej sa vyskytovali hepatocyty usporiadané do krátkych anastomozujúcich trámčov, ako aj krvné sínusoidy naplnené krvnými elementami. Žľaznatý aj svalnatý žalúdok mal hrubú svalovú stenu a v sliznici žľaznatého žalúdka sa formovali krátke tubulózne žľazy. Jednovrstvový cylindrický epitel sliznice žalúdka, ako aj epitel žalúdočných žliaz produkoval súvislú vrstvičku mucínu, ktorý sa nachádzal v dutinách obidvoch častí žalúdka. Stena pažeráka a čreva bola v tomto období vývinu relatívne málo diferencovaná. V torakolumbárnej oblasti boli obličky mezonefros s veľkými mezonefrickými telieskami, kanálkami a vývodmi. Obličky v štádiu metanefros obsahovali typické sférické

bunkové zoskupenia. V blízkosti mezonefros sa nachádzali základy gonád s pohlavnými povrazcami a diferencujúcimi sa prvopohlavnými bunkami.



**Obr. 2** Mikrofotografie vybraných orgánov 9 dňového kuracieho embrya, HE (šípky – kongescia ciev)

V skupine Wi-Fi sme v parenchýme takmer všetkých vnútorných orgánov, ako aj vo vyvíjajúcom sa väzive kože a podkožia pozorovali kongesciu ciev rôzneho kalibru.

## Diskusia

Neionizujúce MŽ, ku ktorému sa radí aj žiarenie Wi-Fi jednoznačne interaguje so živým organizmom, kde spúšťa rozličné kompenzačné a adaptačné procesy (7, 8). Ak je organizmus vystavený vyšším intenzitám MŽ, dochádza k vibrácii atómov a molekúl v tkanive, čoho následkom je jeho dielektrický ohrev. V reálnych podmienkach sú však omnoho častejšie expozície MŽ nižších intenzít, pri ktorých by k tomuto fenoménu nemalo dochádzať. Interakcia MŽ s biologickými objektami je do veľkej miery závislá od niekoľkých faktorov jednako zo strany biologického objektu – obsah vody v tkanive, prítomnosť väzivového obalu v orgáne, uloženie daného orgánu v tele a pod., ale aj zo strany samotného MŽ – typu, intenzity a vzdialenosti zdroja žiarenia od sledovaného objektu (2, 8). Zamerali sme sa na objasnenie interakcie Wi-Fi radiácie s frekvenciou 2,4 GHz a nízkou intenzitou ( $300 \mu\text{W}/\text{m}^2$ ) s organizmom vyvíjajúceho sa kuracieho embrya, ktoré bolo od začiatku svojho vývinu až do obdobia 9 dní permanentne exponované žiareniu. Aj keď celkový priebeh organogenézy kuracích embryí Wi-Fi skupiny nebol narušený, na úrovni svetelnej mikroskopie sme u Wi-Fi jedincov pozorovali výraznú kongesciu ciev vo viacerých parenchymatóznych orgánoch, ako aj väzive kože a podkožia. Aj napriek intenzite žiarenia, ktorá neprekročila ochranné limity



stanovené pre kontrolované expozície MŽ (6) predpokladáme, že vo vyvíjajúcich sa embryonálnych tkanivách s vysokým obsahom vody došlo k tepelnému efektu s následnou kongesciou ciev a snahe tkaniva zvýšiť odvádzanie naakumulovaného tepla. Tento fenomén je v súlade s našimi predošlými pozorovaniami na semenníkoch dospelých potkanov ovplyvnených MŽ (1), ako aj zisteniami autorov, ktorí opísali podobný efekt v mozgu, oku, slinných žľazách a rovnako aj semenníkoch (3 – 5). Práve vďaka vysokému obsahu vody, hrubému väzivovému obalu a superficiálnemu uloženiu v organizme, sú tieto orgány mimoriadne citlivé voči MŽ a jeho tepelnému vplyvu (2). Ďalším faktorom, ktorý pravdepodobne prispieva ku akumulácii tepla v tele kuracieho embrya je to, že vývin vtáčieho jedinca sa uskutočňuje vo vajci, ktorého škrupina (testa) výrazne zabraňuje odvádzaniu naakumulovaného tepla z organizmu.

## **Záver**

Cieľom práce bolo sledovať vplyv Wi-Fi žiarenia na štruktúru orgánov a tkanív vyvíjajúceho sa kuracieho embrya na 9. inkubačný deň. Aj napriek skutočnosti, že nami použitá intenzita Wi-Fi žiarenia nepresahovala stanovené limity pre kontrolované expozície, v organizme kuracieho embrya s veľkou pravdepodobnosťou došlo k nahromadeniu tepla, čo sa prejavilo kongesciou ciev, teda zapojením termoregulačných mechanizmov za účelom odvádzat' z tkanív nahromadené teplo. Do akej miery sú tieto zmeny závažné z pohľadu ďalšieho vývinu kuracieho embrya, ako aj ich aplikácia do spoločenskej praxe, nám pomôžu objasniť ďalšie štúdie v tejto oblasti.

## **Literatúra**

1. Almasiova V et al. (2017) The thermal effect of 2.45 GHz microwave radiation on rat testes. *Acta Vet Brno* 86: 413-419
2. Banik S, Bandyopadhyay S, Ganguly S (2003) Bioeffects of microwave—a brief review. *Biores Technol* 87: 155-159
3. Bioinitiative (2022) <https://bioinitiative.org/table-of-contents/>
4. D'Andrea JA, Chalfin S (2000) Effects of microwave and millimeter wave radiation on the eye. *Science Ser* 82: 43-54
5. Hao et al. (2015) Effects of microwave radiation on brain energy metabolism and related mechanisms. *Milit Med Res* 2: 4-12
6. ICNIRP (2024) Statement on short wavelength light exposure from indoor artificial sources and human health. *Health Phys* 126: 241-248
7. Pall ML (2018) Wi-Fi is an important threat to human health. *Environ Res* 164: 405-416
8. Prlić I et al. (2022) Wi-Fi technology and human health impact: a brief review of current knowledge. *Arh Hig Rad Tox* 73: 94-106

Práca bola podporená projektom *VEGA č. 1/0036/22*.

# MORFOGENÉZA SVALNATÉHO ŽALÚDKA 9 a 14 -DŇOVÉHO KURACIEHO EMBRYA

## MORPHOGENESIS OF STOMACH OF 9 AND 14- DAY CHICKEN EMBRYO

**Sandra Andrašková<sup>1</sup>**, Viera Almášiová<sup>1</sup>, Tibor Vince<sup>2</sup>, Katarína Holovská<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín, UVLF, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Katedra teoretickej a priemyselnej elektrotechniky, FEI TUKE, Letná 9, Košice

*sandra.andraskova@uvlf.sk*

### **Súhrn**

Vývoj žalúdka kuracieho embrya zahŕňa mnohé morfológické zmeny, ktoré súvisia s funkciou každého segmentu. Táto štúdia popisuje histogézu steny svalnatého žalúdka u 9 a 14 - dňových kuracích embryí (*Gallus gallus*) pomocou svetelnej mikroskopie. Odobratý materiál bol spracovaný rutinnou histologickou technikou, zafarbený hematoxylínom-eozínom na analýzu štruktúry tkaniva a farbením Picrosírius red na identifikáciu kolagénu. Na identifikáciu neutrálnych glykozaminoglykánov sme použili histochemickú techniku PAS. Embryá v týchto štádiách vývoja mali stenu žalúdka zloženú z troch vrstiev: sliznice, svalovej vrstvy a serózy. Zatiaľ čo povrchový epitel žalúdka v oboch vekových kategóriách vylučoval hlien, slizničné tubulárne žľazy ešte neboli vyvinuté.

**Kľúčové slová:** kuracie embryo, žalúdok, morfogéza

### **Summary**

The ontogenesis of the chicken stomach wall involves morphological alterations related to its structure and the function of each segment. The present study describes the histological structure of the gizzard in 9 and 14- days old chicken embryos (*Gallus gallus*) using light microscopy. The collected material was processed by histological routine, stained with hematoxylin-eosin to analyse basic tissue structure and Picrosirius red to identify collagen fibers. We used the PAS histochemical technique to analyse neutral glycosaminoglycans. Embryos at these stages of development have a wall of the gizzard composed of three layers: mucosa, muscularis and serosa. The gizzard tubular glands were still absent at these stages.

**Key words:** chicken embryo, stomach, morphogenesis

## Úvod

Žalúdok kuracích embryí sa začína vyvíjať od tretieho dňa inkubácie. Krátko nato dochádza k jeho rozdeleniu na dve morfológicky odlišné oblasti: žľaznatý žalúdok (proventrikulus) a svalnatý žalúdok. Na 6. embryonálny deň (ED) sú už proventrikulus a svalnatý žalúdok anatomicky diferencované a postupne nadobúdajú charakteristickú histologickú štruktúru (4). Rozdiely súvisia s ich funkciou a fyziologickými požiadavkami. V oboch segmentoch sa nachádza povrchový epitel vylučujúci hlien. Žľazy sa v svalnatom žalúdku tvoria oveľa neskôr ako v proventrikule (1). Žalúdok dospelého jedinca je vysoko svalnatý a je inervovaný Auerbachovým plexom (3).

## Materiál a metódy

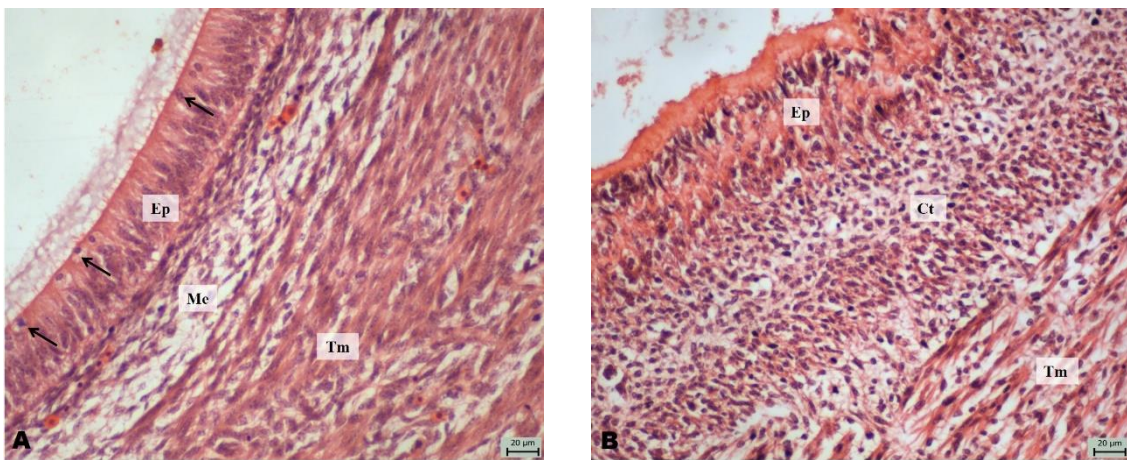
V experimente boli použité oplodnené kuracie vajcia kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) získané z certifikovaného chovu (Párovské Háje, Nitra). Inkubácia sa uskutočnila v automatickom inkubátore pri kontrolovanej teplote (37,5 °C) a vlhkosti (60%). Na 9. a 14. deň inkubácie boli odobraté embryá fixované v mDF médiu (modified Davidson's fluid) a spracované štandardným histologickým postupom pre účely svetelnej mikroskopie. Rezy hrubé 7 µm boli zaliate do paraplastu a ofarbené hematoxyln-eozínom (HE) na analýzu štruktúry tkaniva a špeciálnymi histochemickými technikami ako Picrosírius red (PR) na detekciu kolagénu a periodická kyselina Schiffová (PAS) na analýzu neutrálnych glykozaminoglykánov (GAG). Mikrosnímky boli zhotovené digitálnym fotoaparátom Promicam PRO napojeným na mikroskop Zeiss Primostar.

## Výsledky

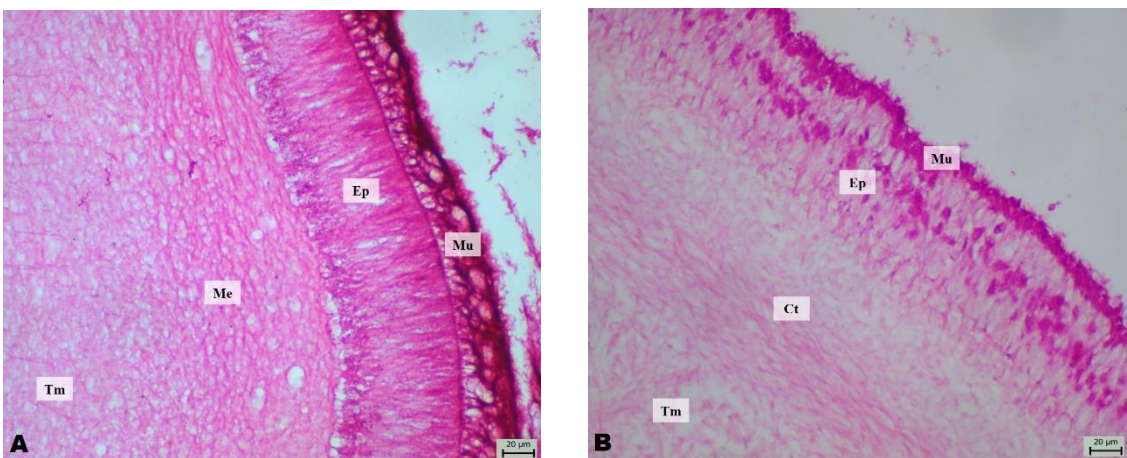
Svalnatý žalúdok mal už na 9. ED jasne diferencované jednotlivé vrstvy steny. Rovnako ako u 14-dňových embryí pozostával z troch vrstiev: sliznice, svalovej vrstvy a serózy. Sliznica bola pokrytá pseudovrstvovým cylindrickým epitelom v oboch vekových kategóriách (Obr.1). Na 9. ED sa epitelové bunky veľmi intenzívne mitoticky delili. Sekrét pokrývajúci povrchový epitel bol bohatý na GAG. Apikálna časť cytoplazmy epitelových buniek vykazovala stredne silnú PAS pozitivitu (obr. 2A). Krycí epitel nasadal na mezenchýmové tkanivo (obr.1). Vrstvu sliznicovej svaloviny sme nepozorovali. Na 9. ED neboli v sliznici prítomné žiadne žľazy. Naopak *tunica muscularis* bola veľmi dobre vyvinutá. Pozostávala z hrubej vrstvy myoblastov

a pozorovali sme v nej začiatok tvorby typickej kolagénovej matrice. Seróza bola v tomto štádiu zastúpená mezenchýmom.

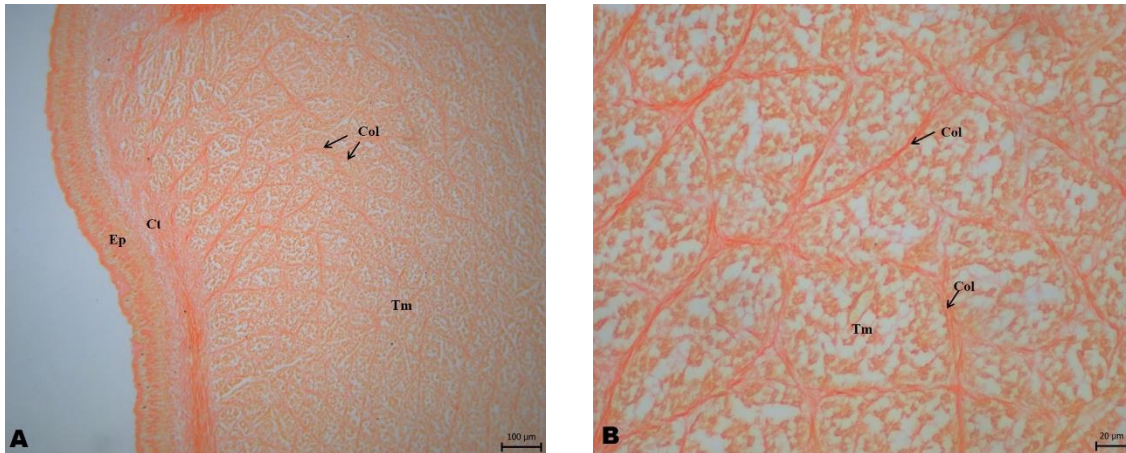
Na 14.ED bol krycí epitel vyšší a bol pokrytý hrubou a súvislou vrstvou sekrétu – budúcou kutikulou (Obr.1B). Bunky krycieho epitelu rovnako ako aj priliehly sekrét vykazovali výraznú PAS pozitivitu (Obr.2B). Vlastná vrstva sliznice tvorila tenkú vrstvu spojivového tkaniva a ešte ani v tomto štádiu sme v nej nepozorovali žiadne žľazy (Obr. 1B). Na 14. ED bola *tunica muscularis* tvorená extrémne výraznou vrstvou hladkosvalových buniek usporiadaných do svalových zväzkov vystužených kolagénovými vláknami v typickom pravidelnom usporiadaní (Obr. 3).



**Obr. 1** Štruktúra sliznice svalnatého žalúdka 9 (A) a 14-dňového kuracieho embrya (B); farbenie HE  
Ep - pseudovrstvový cylindrický epitel; šípka - mitotické delenia; Me - mezenchým; Ct - spojivové tkanivo  
Tm - tunica muscularis



**Obr. 2** Histochemické vlastnosti svalnatého žalúdka 9 (A) a 14-dňového embrya (B); farbenie PAS  
Ep - pseudovrstvový cylindrický epitel; Ct - spojivové tkanivo; Tm - svalová vrstva; Mu - PAS pozitívna hmota



**Obr. 3** Štruktúra steny svalnatého žalúdka (A) a detail tunica muscularis (B) 14-dňového kuracieho embrya; farbenie: Picrosirius Red, Col - kolagénová matrica; Ep - epitel; Ct - spojivé tkanivo; Tm - svalová vrstva

## Diskusia

Vývoj steny žalúdka zahŕňa morfológické zmeny súvisiace so štruktúrou a funkciou každého segmentu. Svalnatý žalúdok bol na 9. ED vývoja kuracieho embrya pokrytý pseudovrstvovým cylindrickým epitelom, ktorý pretrvával aj počas 14. ED. K jeho premene na jednoduchý cylindrický epitel dochádza podľa mnohých autorov na 15. ED (8). Sgambati a kol. (7) vo svojej štúdií uvádzajú nízku PAS pozitivitu povrchového epitelu od 7. do 10. dňa. Od 11. dňa inkubácie sa produkcia sekrétu bohatého na GAG postupne zvyšuje čím chráni žalúdočnú sliznicu už od počiatočných štádií vývoja (5).

Histologické a histochemické charakteristiky svalnatého žalúdka skúmal aj Pinheiro a kol. (6). Epitel sliznice opísal ako pseudovrstvový cylindrický u embryí starých 5 až 15 dní, čo je v súlade s našim pozorovaním. Dezorganizácia epitelu, ktorú sme zaznamenali na niektorých miestach na 14. ED a prítomnosť prázdnych priestorov medzi epitelovými bunkami môže poukazovať na bunkovú proliferáciu a začiatok tvorby žalúdočných tubulóznych žliaz (6). Ventura a kol. (8) pozoroval prvý náznak vývoja žliaz žalúdka taktiež na 14. ED, keď epitel invaginoval do podkladového tkaniva a na 17. ED vytvoril tubulózne žľazy lemované jednou vrstvou kubických buniek. Transformáciu povrchového epitelu na jednoduchý cylindrický typ opisuje taktiež na 17. ED (8).

Naša histologická analýza vývoja svalovej vrstvy žalúdka podporila tvrdenia iných autorov. Podľa Banksa (2) sa od 8. ED fibroblasty v rámci *tunica muscularis* stávajú aktívnymi a začína sa tvoriť kolagénová matrica, ktorá neskôr rozdelí myoblasty do charakteristických zväzkov.

## Záver

Cieľom tejto práce bolo preštudovať histologickú stavbu steny svalnatého žalúdka u 9 a 14 - dňového kuracieho embrya. Pochopenie normálneho vývoja kuracieho embrya je kľúčovým predpokladom pre náš súčasný výskum vplyvu WiFi žiarenia na organogézu.

## Literatúra

1. Aksoy A, Cinar K (2009) Distribution and ontogeny of gastrin- and serotonin-immunoreactive cells in the proventriculus of developing chick, *Gallus gallus domesticus*. *J Vet Sci* 10(1): 9-13
2. Banks W J (1991) *Histologia Veterinária Aplicada*. 2a ed. Rio de Janeiro, Manole. 462-463
3. Bellairs R, Osmond R (2005) *Atlas of chick development*. ISBN 0-12-084791-4.
4. Fukuda K, Yasugi S (2005) The molecular mechanisms of stomach development in vertebrates. *Dev Growth Differ* 47: 375-382
5. Kierszenbaum AL (2008) *Histology and cell biology*. 445-447
6. Pinheiro N, George LL, Mota DL (1989) Histogenesis and histochemistry of the secretion plate: detection of glycans and neutral glycoproteins synthesized by epithelial components of the gizzard mucosa of *Gallus gallus*. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 135(3): 385-95
7. Sgambati E, Bryk SG, Gheri G (1995) Histochemical characterization of the mucins of the epithelial cells in the chick embryo proventriculus. *Ital J Anat Embryol* 100(2): 83-97
8. Ventura A, Do Nascimento AA, Dos Santos MAJ (2013) Histological Description of Morphogenesis of the Gastroesophageal Mucosa of *Gallus Gallus Domesticus*. *Int J Morphol*, 31(4): 1331-1339

Práca bola podporená projektom *VEGA č. 1/0036/22*.



# VPLYV METABOLITOV ĽANOVÉHO SEMENA NA PROLIFERÁCIU A APOPTÓZU BUNIEK ENDOMETRIA MYŠÍ

## THE EFFECT OF FLAXSEED METABOLITES ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE MOUSE ENDOMETRIUM

**Diana Babjáková<sup>1</sup>**, Martina Lecová<sup>1</sup>, Kristína Rodáková<sup>1</sup>, Soňa Gancarčíková<sup>2</sup>,  
Drahomíra Sopková<sup>1</sup>, Radoslava Vlčková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra biológie a fyziológie UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Katedra mikrobiológie a imunológie UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

*diana.stefancova@student.uvlf.sk*

### Súhrn

Omega-3 (n-3) polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK), ako je kyselina eikozapentaénová (EPA) a kyselina dokozahexaénová (DHA) sú spojené s nižším rizikom rakoviny endometria. Enterolaktón (EL) má tiež ochranný účinok pred určitými typmi rakoviny ako je karcinóm prsníka, endometria alebo prostaty. Táto štúdia je zameraná na určenie možného ochranného, antiproliferatívneho a antikarcinogénneho účinku n-3 PNMK (DHA, EPA) a EL na endometrium myší. Rohy materníc myší (n=24) boli odobraté a kultivované v kultivačnom médiu po 24 h inkubácii s prídavkom EL (1 IU/ml), DHA (10 mg/ml) a EPA (10 mg/ml) a bez prídavku (kontrola). Po 24 h inkubácii boli podrobené imunohistochemickej analýze proliferácie (proliferatívny nukleárny antigén; PCNA) a apoptózy (kaspáza 3). Oproti kontrolnej skupine bola expresia PCNA vo všetkých častiach endometria nižšia vo všetkých skupinách (DHA, EPA, EL). Expresia kaspázy 3 bola silnejšia pre DHA a EL vo všetkých častiach endometria, zatiaľ čo v skupine EPA v oblasti strómy bola expresia nevýrazná. Výsledky potvrdili, že n-3 PNMK a EL vykazujú protirakovinový účinok prostredníctvom ich antiproliferatívnych a proapoptotických vlastností v endometriálnych bunkách myší.

**Kľúčové slová:** maternica, proliferácia, apoptóza, n-3 PNMK, enterolaktón

### Summary

Omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are associated with a lower risk of endometrial cancer.

Enterolactone (EL) also has a protective effect against certain types of cancer such as breast, endometrial, or prostate cancer. This study is aimed at determining the possible protective, antiproliferative, and anticarcinogenic effect of n-3 PUFAs (DHA, EPA) and EL on the endometrium of mice. The horns of mouse uteri (n=24) were collected and cultured in a culture medium after 24 h of incubation with the addition of EL (1 IU/ml), DHA (10 mg/ml), and EPA (10 mg/ml) and without addition (control). After 24 h of incubation, they were subjected to immunohistochemical analysis of proliferation (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) and apoptosis (caspase-3). Compared to the control group, PCNA expression in all parts of the endometrium was lower in all groups (DHA, EPA, and EL). The expression of caspase-3 was stronger for DHA and EL in all parts of the endometrium, while in the EPA group, the expression was inconspicuous in the stromal region. The results confirmed that n-3 PUFAs and EL exhibit an anticancer effect through their antiproliferative and proapoptotic properties in mouse endometrial cells.

**Key words:** uterus, proliferation, apoptosis, n-3 PUFA, enterolactone

## Úvod

Kyselina  $\alpha$ -linolénová (ALA) je esenciálna polyenasýtená masťná kyselina (PNMK), ktorú si cicavčí organizmus nevie syntetizovať sám. Prostredníctvom rôznych biosyntetických dráh sa ALA využíva pri syntéze kyseliny dokozahehexaénovej (DHA) a kyseliny eikozapentaénovej (EPA), ktoré sú dôležité pre rast a vývoj organizmu, hlavne mozgu a kože (1). Tieto masťné kyseliny majú kľúčovú úlohu pri regulácii mnohých bunkových funkcií ako napríklad metabolizmus eikozanoidov, bunková signalizácia, génová expresia či inhibícia výskytu a progresie nádorových ochorení (2, 3). Enterolaktón (EL) má podobnú štruktúru ako 17- $\beta$  estradiol a je schopný viazať sa na estrogénové receptory, čo vysvetľuje možnú súvislosť medzi EL a zníženým rizikom hormonálne senzitívnych nádorových ochorení (4, 5). Enterolaktón má antioxidantný účinok a bráni poškodeniu DNA, peroxidácii lipidov pri rakovine a pravdepodobne tiež prispieva k zníženiu hypercholesterolémie, hyperglykémie a aterosklerózy (6). Preto cieľom tejto práce bolo stanovenie možného protektívneho, antiproliferatívneho a antikarcinogénneho účinku n-3 PNMK a EL na endometrium samíc myší.

## Materiál a metódy

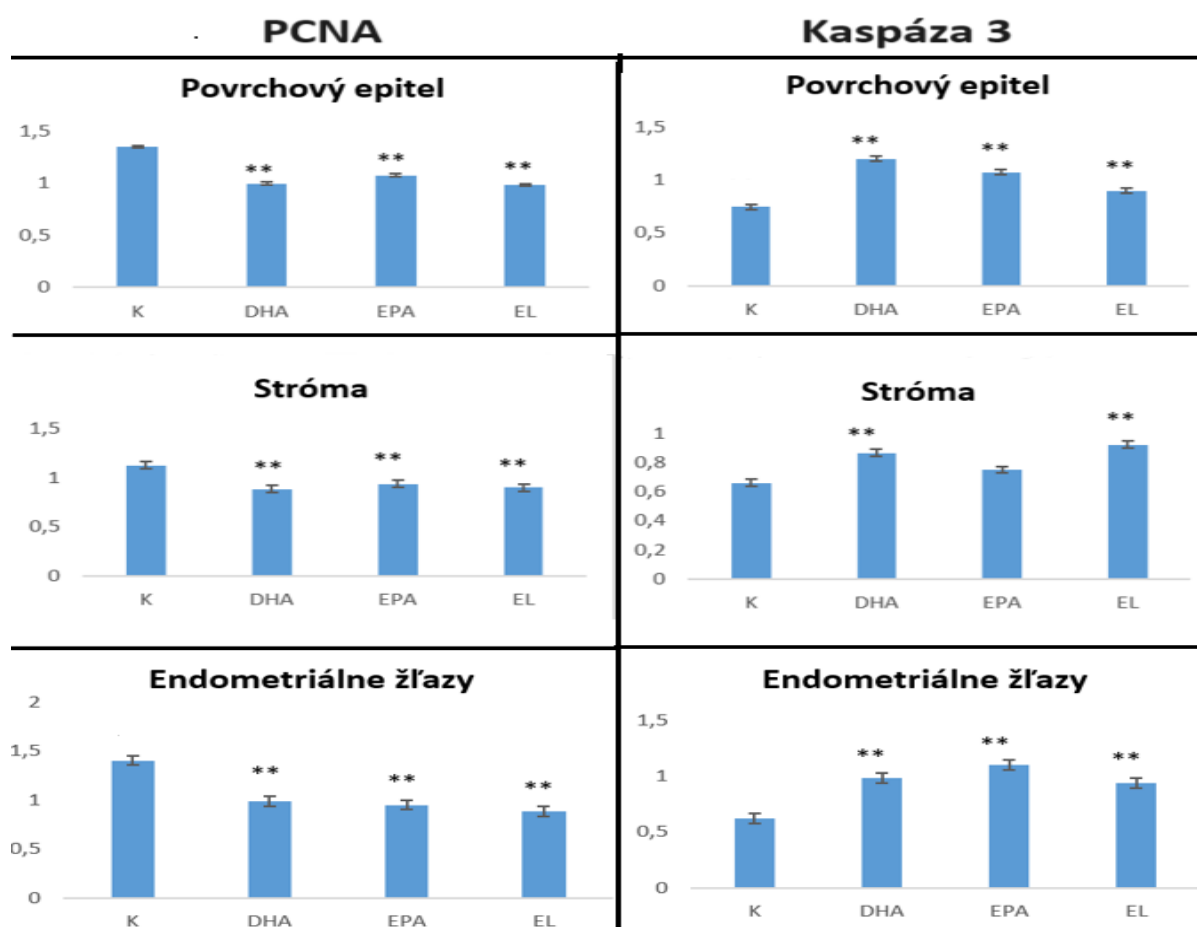
V štúdiu boli použité 6- až 8-týždňové samice BALB/c myší (Velaz s.r.o., ČR; n=12), ktoré

boli humánne usmrtené a boli im odobraté rohy materníc (n=24). Rohy materníc boli do 30 minút od usmrtenia transportované vo fosfátom pufovanom fyziologickom roztoku (PBS) pri 4 °C do laboratória na ich kultiváciu. Rohy maternice (1 roh na jamku) boli umiestnené do sterilnej 24 jamkovej platničky s kultivačným médiom (DMEM/F12 1:1, Sigma; 1 ml) obohateným o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS; Sigma-Aldrich) a 1% antibioticko-antimykotického roztoku (ATB-ATM; Sigma-Aldrich) s následnou inkubáciou 24 hod. pri 37 °C. Následne bolo kultivačné médium nahradené čerstvým (DMEM + 10 % FBS + 1% ATB-ATM) s prídavkom DHA (10 mg/ml), EPA (10 mg/ml) a EL (1 IU/ml) alebo bez akéhokoľvek prídavku (kontrola; K). Po uplynutí ďalšej inkubácie (24 h, 37 °C) boli rohy materníc odobraté, fixované v 4% paraformaldehyde po dobu 24 hodín, spracované bežným histologickým postupom a zaliate do paraplastu. Tenké 3 – 5 µm rezy boli narezané sánkovým mikrotómom (Leica RM2255 microtome, Leica Nemecko). Rezy materníc boli deparafinizované a rehydratované s následným odkrytím väzbových miest, blokovaním aktivity endogénnej peroxidázy a nešpecifického viazania. V ďalšom kroku boli aplikované primárne protilátky anti-PCNA (1:250; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) a anti-kaspáza 3 (1:200; Abcam Limited, UK) s následnou inkubáciou cez noc pri 4°C. Po uplynutí inkubácie boli rezy premyté a aplikovali sa sekundárne protilátky (goat anti-mouse secondary antibodies; Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), ready-to-use, Dánsko), inkubácia 2 hodiny. Farebná reakcia bola navodená diaminobenzidínom (Dako REAL™ DAB+ Chromogen, Dako). Ako kontrastné farbivo bol použitý hematoxylín. Takto zafarbené rezy boli zaliate do Pertexu (Histolab Products AB, Švédsko). Po vysušení boli vyhotovené mikrofotografie zobrazovacou technikou (NIS Elements Br k mikroskopu Nikon Eclipse E200 s digitálnou kamerou ProgResCapture Pro 2.7.7). Intenzita reakcie bola kvantitatívne hodnotená použitím ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Pozitívna hnedá DAB+ reakcia sa hodnotila v sivej škále (grey level, GL) a bola vyjadrená indexom relatívnej optickej denzity (ROD). Výsledky boli štatisticky spracované v programe GraphPad Prism 3 (USA) s uvedením priemeru a štandardnej chyby (Mean±SEM). Štatistická významnosť rozdielu je uvedená na úrovni P<0,05, P<0,01, P<0,001 a zobrazená hviezdičkami.

## Výsledky

Vplyv prídavkov DHA, EPA a EL na prítomnosť markera proliferácie (PCNA – proliferačný nukleárny antigén) a markera apoptózy (kaspáza 3) v bunkách materníc myši kvantitatívne vyjadrený prostredníctvom relatívnej optickej denzity (ROD) je znázornený v Obrázku 1.

Pozitívna imunohistochemická (IHC) reakcia sa prejavila tmavohnedým sfarbením. Marker PCNA bol prítomný v jadrách buniek. Najväčšia expresia PCNA bola prítomná v kontrolnej skupine vo všetkých častiach endometria. Expresia PCNA v skupinách DHA, EPA a EL v oblastiach povrchového epitelu, strómy a endometriálnych žliaz bola výrazne nižšia ( $P < 0,01$ ) v porovnaní s kontrolou. Kaspáza 3 ako marker apoptózy bol prítomný v cytoplazme buniek. Expresia kaspázy 3 bola výrazne silnejšia ( $P < 0,01$ ) pre DHA a EL vo všetkých častiach endometria v porovnaní s kontrolnými maternicami. V EPA skupine v oblasti povrchového epitelu a endometriálnych žliaz bola ROD vyššia ( $P < 0,01$ ), ale v oblasti strómy nesignifikantná.



**Obr. 1** Vplyv DHA, EPA a EL na expresiu PCNA a kaspázy 3 (vyjadrené v ROD) v bunkách endometria myší (PCNA, proliferačný nukleárny antigén; DHA, kyselina dokozahehexaénová; EPA, kyselina eikozapentaénová; EL, enterolaktón; ROD, relatívna optická denzita)

## Diskusia

Rôzne predklinické a epidemiologické štúdie preukázali dôležitosť n-3 PNMK v prevencii nádorových ochorení reagujúcich na hormóny ako je napríklad karcinóm prsníka. Množstvo štúdií, ktoré by preukazovali spojitosť medzi pôsobením n-3 PNMK a rakovinou endometria je

ale obmedzené. Myšacie maternice kultivované s DHA a EPA vykazovali významný pokles v proliferácii buniek a tiež výrazne zvyšovali mieru ich apoptózy. Bolo preukázané, že DHA, v závislosti od dávky a času pôsobenia, inhibovala proliferáciu nádorových buniek endometria, tvorbu kolónií a podporovala apoptózu buniek. Pôsobením n-3 PNMK bol zastavený rast a migrácia nádorových buniek endometria, a tiež bola pozorovaná zvýšená apoptóza rakovinových endometriálnych bunkových línií. Zároveň n-3 PNMK účinne zabránili rastu rakovinových buniek endometria v modeloch xenoštepov (7, 8). Predpokladá sa, že EL chráni pred hormonálne závislými nádorovými ochoreniami kvôli svojmu antiestrogénovému potenciálu (9). Enterolaktón teda môže znížiť vystavenie sa biologicky dostupným estrogénom, a tým znížiť riziko rakoviny endometria. Okrem toho môže EL znížiť riziko rakoviny endometria stimuláciou syntézy globulínu viažuceho pohlavné hormóny, inhibíciou aromatázy a 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy, ako aj antioxidantnými účinkami, indukciou apoptózy a inhibíciou rastu rakovinových buniek (10). Tieto výsledky korelujú s výsledkami tejto štúdie na myšacích materniciach kultivovaných s EL, ktoré vykazovali veľmi podobné účinky ako n-3 PNMK, teda významný pokles v proliferácii buniek a výrazné zvýšenie apoptózy. Štúdia vykonaná na ženách však nepotvrdila, že by bol EL spojený s nižšou incidenciou rakoviny endometria (11). Preto je na mieste vykonať ďalšie štúdie, ktoré by potvrdili alebo vyvrátili antikarcinogénny efekt EL na endometrium maternice.

## Záver

Výsledky našej práce preukázali, že prídavok DHA, EPA a EL potlačili proliferáciu buniek endometria maternice myši. Na druhej strane prídavok týchto aditív podporil apoptózu buniek vo všetkých oblastiach endometria. Jediná výnimka sa vyskytla v EPA skupine v oblasti strómy kedy výsledok bol nesignifikantný. Výsledky potvrdili, že n-3 PUFA a EL vykazujú potenciálne protirakovinové účinky práve prostredníctvom ich antiproliferatívneho a proapoptotického pôsobenia v endometriu maternice.

## Literatúra

1. Yang J, Wen CH, Duan Y et al. (2021) The composition, extraction, analysis, bioactivities, bioavailability and applications in food system of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil: A review. *Trends in Food Science & Technology* 118: 252-260
2. Basset JK, Hodge A M, English D R et al. (2016) Plasma phospholipids fatty acids, dietary fatty acids, and breast cancer risk. *Cancer Causes Control*, 27: 759-773
3. Kimura Y, Kono S, Toyomura K et al. (2007) Meat, fish and fat intake in relation to subsite-specific risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Sci.* 98: 590-597
4. Penttinen P, Jaehrling J, Damdimopoulos AE et al. (2007) Diet-derived polyphenol metabolite enterolactone is a tissue-specific estrogen receptor activator. *Endocrinology* 148: 4875-4886

5. Adolphe, JL, Whiting, SJ, Juurlink, BH et al. (2010) Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br. J. Nutr.* 103: 929-938
6. Prasad K. (2000) Antioxidant activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *Int J Angiol.* 9: 220-225
7. Ma W, Song H, Das S K. et al. (2003) Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100:2963–2968
8. Zheng H, Tang H, Liu M et al. (2014) Inhibition of Endometrial Cancer by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Preclinical Models. *Cancer Prev Res.*7: 824–834
9. Aarestrup J, Kyrø C, Knudsen KEB et al. (2012) Plasma enterolactone and incidence of endometrial cancer in a case-cohort study of Danish women. *British Journal of Nutrition*, 109: 2269-2275
10. Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, et al. (1992) Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 331-337
11. Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, Micheli A, et al. (2006) Circulating enterolactone and risk of endometrial cancer. *Int J Cancer* 119: 2376-2381

Táto práca vznikla za podpory projektov *VEGA 1/0680/22*, *APVV-22-0071* a *APVV-20-0114*.



# ÚČINOK IONIZUJÚCEHO ŽIARENIA NA NEUROTRANSMITERY V MOZGU STARNÚCICH POTKANOV

## THE EFFECT OF IONIZING RADIATION ON NEUROTRANSMITTERS IN THE BRAIN OF AGING RATS

Soňa Báľentová<sup>1</sup>, Dagmar Kalenská<sup>2</sup>, Peter Murín<sup>3</sup>, Eva Hajtmanová<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, Malá Hora 4, Martin

<sup>2</sup>Ústav anatómie JLF UK v Martine, Malá Hora 4, Martin

<sup>3</sup>Onkologické centrum MFN, Kollárova 2, Martin

*sona.balentova@uniba.sk*

### Súhrn

V tejto štúdii sme skúmali vedľajší účinok ionizujúceho žiarenia na mozog po frakcionovanom ožiarení miechy starnúcich potkanov. Dospelým samcom potkanov kmeňa Wistar vo veku 12 mesiacov sme ožiarili miechu celkovou dávkou 24 Gy rozdelenou na 3 frakcie (1 frakcia = 8 Gy) 1-krát týždenne počas 3 týždňov. Zvieratá sme následne nechali prežívať do veku 14 mesiacov. Po skončení experimentu sme pomocou imunofluorescenčného farbenia, konfokálnej mikroskopie a obrazovej analýzy v preparátoch analyzovali zmeny neurotransmiterov v dvoch neurogénnych oblastiach: subventrikulárnej zóne (SVZ) v stene laterálnych komôr a gyrus dentatus (GD) hipokampu. Po ožiarení došlo k výraznému poklesu glutamátergnych neurónov v oboch neurogénnych oblastiach. Pokles mohol byť výsledkom postupne klesajúcej dávky žiarenia a taktiež vplyvu vyššieho veku.

**Kľúčové slová:** mozog potkana, neurogenéza, neurotransmitery

### Summary

In the present study we investigated the bystander effect of ionizing radiation on the brain after fractionated spinal cord irradiation of aged rats. Adult male Wistar rats aged 12 months received fractionated spinal cord irradiation with a total dose of 24 Gy administered in 3 fractions (dose 8 Gy per fraction) once a week for 3 consecutive weeks. We let the animals survive until the age of 14 months. After the end of the experiment we used immunofluorescence staining, confocal microscopy and image analysis in the slides to analyze the changes in neurotransmitters in two neurogenic areas: the subventricular zone (SVZ) in the wall of the

lateral ventricles and the gyrus dentatus (GD) of the hippocampus. After irradiation, there was a significant decrease of glutamatergic neurons in both neurogenic regions. The decrease could be the result of the gradually decreasing dose of radiation, but also the effect of older age.

**Key words:** rat brain, neurogenesis, neurotransmitters

## Úvod

V klinickej rádioterapii sa u pacientov s metastázujúcimi nádormi mozgu a nádormi hlavy a krku najviac používa kraniálne frakcionované ožiarenie. Používanie frakcionovaných dávok žiarenia však z dlhodobého hľadiska vedie k ireverzibilným morfológickým a funkčným zmenám napr. poškodeniu endotelu, narušeniu hematoencefalickej bariéry, zmien v synaptickej plasticite, narušeniu neurotransmisie, aktivácii gliových buniek, apoptóze prekursorov oligodendrocytov a zápalovej odpovedi (1, 2, 3, 4). K najzávažnejším zmenám, ktoré významne znižujú kvalitu života onkologických pacientov patrí zhoršenie kognitívnych funkcií, napr. zmeny verbálnej a priestorovej pamäte, poruchy pozornosti až demencia (5).

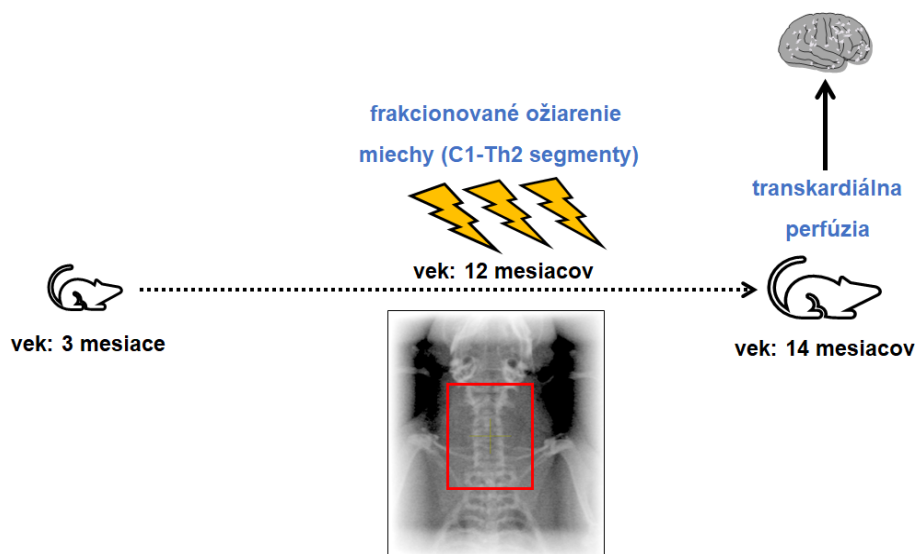
Účinok ionizujúceho žiarenia nie je obmedzený na len tkanivo v bezprostrednej blízkosti cieľových buniek. Bunková toxicita sprostredkovaná cytokínmi a medzibunkovými kontaktami typu nexus môže viesť k poškodeniu bunkových populácií často vzdialených od cieľového ožiareného tkaniva. Tento vedľajší tzv. „bystander“ efekt môže negatívne ovplyvniť nielen ožiarené tkanivo miechy ale aj ďalšie orgány, ako napr. mozog (6).

Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť ako frakcionované ožiarenie miechy potkanov ovplyvní okolité štruktúry a najmä populáciu glutamatergických neurónov a tiež tej skupiny, ktorá má receptory pre glutamát.

## Materiál a metódy

V experimente sme použili staršie dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=20), ktoré mali na začiatku experimentu vek 12 mesiacov (Obr. 1). Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=10) a druhú skupinu (n=10) sme ožarovali frakcionovanou celkovou dávkou (cD=24 Gy, rozdelenou na 3 frakcie, 1 frakcia=8 Gy), 1-krát za týždeň. Na ožarovanie sme použili lineárny urýchľovač Clinac iX (Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) s energiou 6 MeV. Ožarovaný objem predstavoval krčné a časť hrudníkových miechových segmentov (C1-Th2). Po dvoch mesiacoch sme u oboch skupín vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4 % paraformaldehydu. Po dekapitácii a vybratí orgánov sme z mozgových hemisfér narezali sériové, sagitálne kryorezy,

ktoré sme farbili imunofluorescenčne. V preparátoch sme identifikovali marker glutamátergnych neurónov – vezikulárny glutamátový transportér 1 (VGLUT1) a tiež marker neurónov s receptormi pre glutamát – N-metyl-D-aspartát receptor pre glutamát (NMDAR1). Preparáty sme fotili na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Japonsko) a pomocou obrazovej analýzy (program Image J; Bethesda, MD, USA) sme hodnotili počet VGLUT1-imunoreaktívnych (VGLUT1-IR) a NMDAR1-imunoreaktívnych neurónov (NMDAR1-IR) v neurogénnych oblastiach: gyrus dentatus (GD) hipokampu, prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) a následne v jednotlivých oblastiach rostrálnej migračnej dráhy (rostral migratory stream; RMS), t.j. vertikálnom ramene (vr), ohybe a horizontálnom ramene (hr) (celkový počet IR-buniek/cm<sup>2</sup>).



**Obr. 1** Schéma experimentálneho dizajnu

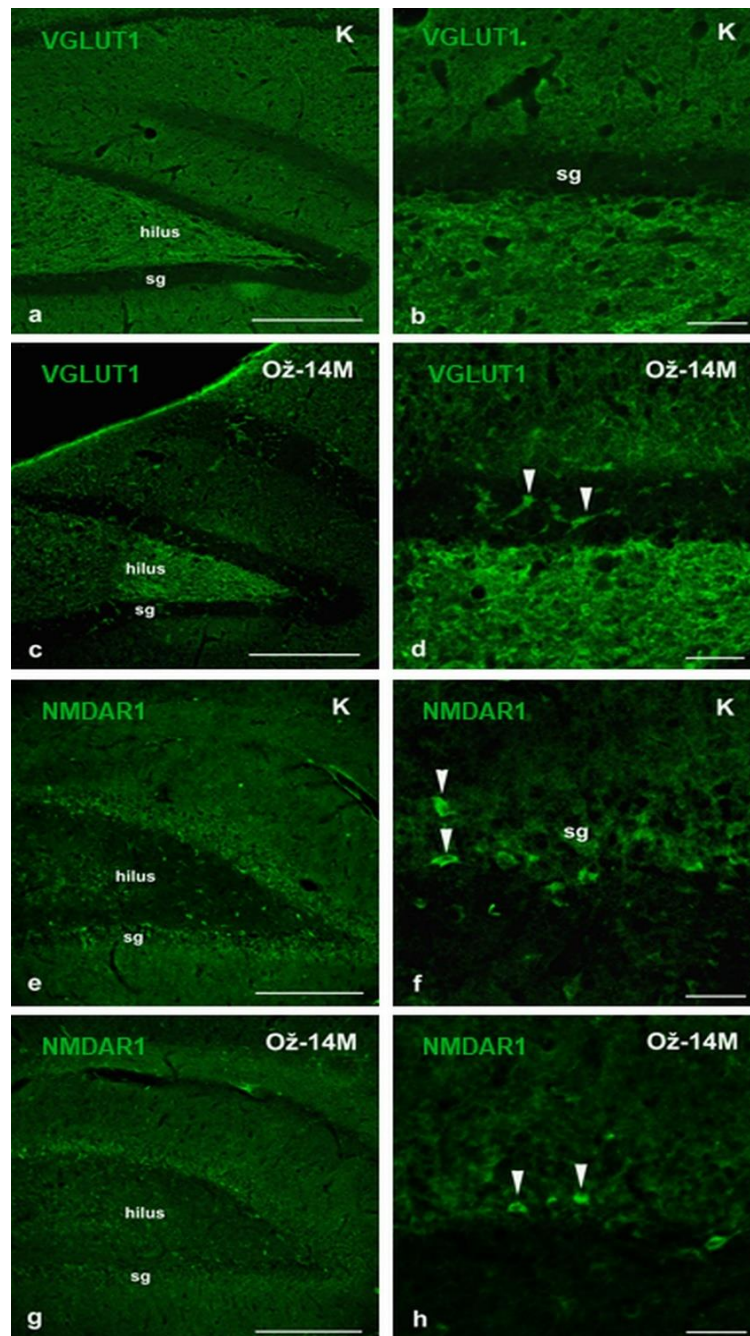
## Výsledky

Hoci údaje získané kvantitatívnou obrazovou analýzou sú momentálne v procese vyhodnocovania, predbežné dáta ukazujú, že dva mesiace po ožiarení (vo veku 14 mes.) nastáva výrazný pokles VGLUT1-IR neurónov najmä v SVZa. V oblasti GD hipokampu dochádza naopak k nárastu. V prípade NMDAR1-IR neurónov nastáva najvýraznejší pokles v GD hipokampu; celkovo sú počty neurónov s receptormi pre glutamát v rámci RMS veľmi nízke v oboch hodnotených skupinách.

## Diskusia

V našich predchádzajúcich štúdiách sme po ožiarení mozgu cD=32 Gy alebo 40 Gy a prežívaním potkanov 9-11 týždňov a 15 týždňov a pomocou *in vivo* zobrazovacích metód identifikovali pokles koncentrácie glutamátu v hipokampe a striate (7, 8). V tejto štúdii sme sa

rozhodli verifikovať získané údaje s výsledkami morfometrickej analýzy preparátov (Obr. 2). Po ožiarení miechy potkanov sme zistili simultánny nárast počtu VGLUT1-IR neurónov a súčasne *in vivo* nárast koncentrácie glutamátu v hipokampe.



**Obr. 2** Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgu kontrolných (K) a ožiarených potkanov vyšetovaných dva mesiace po ožiarení cD=24 Gy vo veku 14 mesiacov (Ož-14M). Imunofluorescenčné farbenie na identifikovanie vezikulárneho glutamátového transportéra (VGLUT1) a N-metyl-D-aspartát receptora pre glutamát v neurónoch (NMDAR1; obidva typy sa vyznačujú zelenou fluorescenciou) v zrnitej vrstve (stratum granulosum; sg) v gyrus dentatus hipokampu. Detail VGLUT1-IR (d) a NMDAR1-IR neurónov (f, h). Mierky: a, c, e, g = 200 $\mu$ m; b, d, f, h = 50 $\mu$ m.

Histologické zmeny v rámci RMS a údaje získané meraním pomocou protónovej magnetickej rezonančnej spektroskopie ( $^1\text{H}$  MRS) v striate a bulbus olfactorius (BO) sme nemohli adekvátne porovnať, keďže sme hodnotili rozdielne oblasti. V predchádzajúcich štúdiách bol po ožiarení identifikovaný nárast glutamátu a NMDAR1 najmä v hypotalame a prefrontálnom kortexe (9). Glutamát reguluje synaptickú plasticitu aktiváciou napr. NMDA receptorov. Zvýšená stimulácia receptorov pre glutamát môže viesť k potencionálnemu poškodeniu neurónov (9). Iné štúdie potvrdili, že zvýšenie glutamátu v prefrontálnom kortexe súvisí s rozvojom kognitívnych dysfunkcií (9). Naše výsledky svedčia o tom, že mierne zmeny v zastúpení glutamatergických neurónov, resp. skupiny s receptormi pre tento excitačný neurotransmitter môžu z dlhodobejšieho hľadiska vyvolať funkčné zmeny v mozgu.

## **Záver**

Porovnaním výsledkov našich štúdií sme dospeli k záveru, že odlišné zmeny môžu byť spôsobené nielen cieľovou ožarovanou oblasťou, veľkosťou frakcie, celkovej dávky a dobou prežívania po žiarení. Svoju úlohu zohral aj vyšší vek potkanov v čase ožarovania. Histopatologické zmeny v mozgu sú zvyčajne úzko spojené s funkčnými zmenami, ktoré sú z klinického hľadiska veľmi závažné. Práve funkčné, kognitívne zmeny u pacientov po rádioterapii primárnych a metastázujúcich nádorov mozgu sú prognosticky nepriaznivé a zhoršujú kvalitu ich života.

## **Literatúra**

1. Kalm M, Fukuda A, Fukuda H et al. (2009) Transient inflammation in neurogenic regions after irradiation of the developing brain. *Radiat Res* 171: 66-76
2. Lumniczky K, Szatmári T, Sáfrány G (2017) Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front Immunol* 8: 347
3. Bálentová S, Hnilicová P, Kalenská D et al. (2017) Effect of whole-brain irradiation on the specific brain regions in a rat model: Metabolic and histopathological changes. *Neurotoxicology* 60: 70-81
4. Machida M, Lonart G, Britten RA (2010) Low (60 cGy) doses of  $(^{56}\text{Fe})$  HZE-particle radiation lead to a persistent reduction in the glutamatergic readily releasable pool in rat hippocampal synaptosomes. *Radiat Res* 174(5): 618-623
5. Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM et al. (2012) Radiation-induced brain injury: A review. *Front Oncol* 2: 73
6. Baskar R, Dai J, Wenlong N. et al. (2014) Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci* 1: 24
7. Bálentová S, Hnilicová P, Kalenská D. et al. (2019) Metabolic and histopathological changes in the brain and plasma of rats exposed to fractionated whole-brain irradiation. *Brain Res* 1708: 146-159
8. Bálentová, S, Hnilicová P, Kalenská D. et al. (2021) Effect of fractionated whole-brain irradiation on brain and plasma in a rat model: Metabolic, volumetric and histopathological changes. *Neurochem Int* 145: 104985
9. Franco-Pérez J, Montes S, Sánchez-Hernández J et al. (2020) Whole-brain irradiation differentially modifies neurotransmitters levels and receptors in the hypothalamus and the prefrontal cortex. *Radiat Oncol* 15(1): 269

# KURACIE EMBRYO AKO MODELOVÝ ORGANIZMUS PRE POSÚDENIE EMBRYONALNEJ TOXICITY VČELIEHO JEDU

## CHICKEN EMBRYO AS A MODEL ORGANISM FOR ASSESSING THE EMBRYONIC TOXICITY OF BEE VENOM

**Barbora Bekešová<sup>1</sup>**, Magdaléna Polláková<sup>1</sup>, Rastislav Sabo<sup>4</sup>, Vladimír Petrilla<sup>1,2</sup>,  
Zuzana Andrejčáková<sup>1</sup>, Radoslava Vlčková<sup>1</sup>, Eva Petrovová<sup>3</sup>, Jaroslav Legáth<sup>4,5</sup>,  
Drahomíra Sopková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Zoologická záhrada Košice, Široká 31, Košice-Kavečany

<sup>3</sup>Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>4</sup>Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>5</sup>Department of Biotechnology and Bioinformatics, Faculty of Chemistry, Rzeszow  
University of Technology, Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów, Poland

*barbora.bekesova@uvlf.sk*

### Súhrn

Včely medonosné (*Apis mellifera*) sú kľúčovým spoločenským hmyzom s veľkým ekonomickým vplyvom ako opel'ovači. Avšak stále viac sa upriamuje pozornosť aj na fyzické charakteristiky včiel, hlavne na ich schopnosť uvoľňovať toxický jed, čo je zaujímavým objektom výskumu. Včelí jed má široké spektrum farmakologických účinkov, vrátane proti nádorových, neuroprotektívnych, či protizápalových vlastností. Kuracie embryá sú dlhodobo využívané ako model výskumu vývojovej biológie. Sú cenovo dostupné a umožňujú sledovať účinky rôznych faktorov na vývoj. Táto štúdia sa zameriava na sledovanie toxických účinkov včelieho jedu na kuracích embryách. Testovali sme rôzne koncentrácie včelieho jedu a zistili, že najvyššia miera úmrtnosti bola pri najvyššej testovanej koncentrácii, s 92,31 % úmrtnosťou. Hodnotu letálnej dávky sme stanovili na 2,12 µg/vajce. Tieto zistenia poukazujú na potenciálne riziko včelieho jedu pre embryonálny vývoj a zdôrazňujú dôležitosť ďalšieho výskumu v tejto oblasti.

**Kľúčové slová:** včela medonosná, včelí jed, kuracie embryo, embryotoxicita, CHEST



## Summary

Honey bees (*Apis mellifera*) are a key social insect with a large economic impact as pollinators. However, the physical characteristics of bees, especially their ability to release toxic venom, are also increasingly attracting attention and are an interesting object of research. Bee venom has a wide range of pharmacological effects, including anticancer, neuroprotective, and anti-inflammatory properties. Chicken embryos have long been used as a model for developmental biology research. They are affordable and allow the effects of various factors on development to be monitored. This study focuses on monitoring the toxic effects of bee venom on chicken embryos. We tested different concentrations of bee venom and found that the highest mortality rate was at the highest concentration tested, with 92.31% mortality. We set the lethal dose value at 2.12 µg/egg. These findings highlight the potential risk of bee venom to embryonic development and emphasize the importance of further research in this area.

**Key words:** Honey bee, bee venom, chicken embryo, embryotoxicity, CHEST

## Úvod

Včely medonosné sú organizovaným spoločenským hmyzom žijúcim v dobre štruktúrovaných kolóniách a ich úloha ako opel'ovačov v poľnohospodárstve je nevyhnutná a má významný dosah na svetové hospodárstvo. V posledných desaťročiach sa tiež venuje zvýšená pozornosť ich ďalším fyzickým charakteristikám, najmä schopnosti uvoľniť toxický jed zo žihadla. Druhy včiel, ktoré zvyčajne spôsobujú otravy u ľudí, sú *Apis mellifera mellifera* (*A. m. mellifera*) a *A. m. ligustica* v Európe a *A. m. scutellata* v Afrike (11).

Včelí jed sa tvorí v jedových žľazách včely a ukladá sa v brušnom jedovom vaku (*Apis mellifera*). Je to bezfarebná kvapalina s horkou chuťou a silnou vôňou, s pH hodnotou medzi 4,5 a 5,5 a špecifickou hmotnosťou 1,13. Táto látka je náchylná na vyparovanie a môže kryštalizovať na vzduchu (12).

Včely patria do radu Hymenoptera, rovnako ako osy, a tak niektoré zlúčeniny, ako sú adrenalín, dopamín, histamín, hyaluronidáza, noradrenalín, fosfolipázy A2 (PLA2s), fosfolipázy B (PLBs) a serotonin sú prítomné i v jede ôs. Len včelí jed však obsahuje apamín, melitín a peptid degradujúci žirne bunky (MCD; 11).

Otrava včelím jedom môže mať, v závislosti od počtu bodnutí za následok mierne až závažné klinické prejavy, ktoré zahŕňajú lokálne zápalové reakcie, alergické prejavy, anafylaktický šok a systémové toxické reakcie. Vek pacienta, hmotnosť, sprievodné ochorenia a lekárska starostlivosť môžu tiež ovplyvniť závažnosť otravy (1).

V priebehu posledných päťdesiatich rokov kuracie embryá zohrali dôležitú úlohu vo výskume základných princípov vývojovej biológie. Ich biologické vlastnosti robia z kuracích embryí dôležitý nástroj pre vedecký výskum, pretože umožňujú sledovať vývoj a účinky rôznych faktorov na tento proces. Sú lacné a ľahko dostupné, čo ich robí preferovaným materiálom pre mnohé štúdie. Mimoriadne vlastnosti kuracích embryí poskytujú výskumníkom sledovať vývoj po aplikácii liečiv a unikátny pohľad na účinky liečiv počas celého embryonálneho vývoja (1). Táto štúdia sa zaoberala monitorovaním a hodnotením potenciálnych toxických účinkov včelieho jedu (*Apis mellifera*) na vývoj kuracieho embrya.

## **Materiál a metodika**

Včelí jed druhu *Apis mellifera* bol získaný z účelového zariadenia pre chov a choroby zveri, rýb a včiel v Rozhanovciach, za použitia zberača včelieho jedu (BeeWhisper 6.2, BG). Tieto prístroje využívajú elektrické podnety na vyvolanie reakcie, ktorá prinúti včelu uvoľniť časť svojho jedu. Počas tohto procesu nedochádza k usmrteniu včiel. Včelí jed sa akumuluje na povrchu týchto zariadení a po odbere sa zoškrabe a prenesie do sterilných nádob na ďalšie spracovanie.

Na skríningový test embryotoxicity sa použilo celkom 65 slepačích vajec (Lohmann Brown) z liahne (Párovské háje, Nitra, Slovensko). Vajíčka boli rovnomerne rozdelené do 4 testovacích skupín a jednej kontrolnej skupiny (n=13 pre každú skupinu).

Oplodnené slepačie vajcia znesené približne v rovnakom čase boli dovezené a uskladnené pri teplote 15 °C až do inkubácie. Pred umiestnením do automatického inkubátora (ET 49, ART 549/A) sa vajcia očistili 70 % etanolom a potom sa inkubovali tupým koncom nahor pri teplote 37,5 °C a 60 % vlhkosti počas 9 dní. Inkubačný stojan zabezpečil, aby sa vajíčka otáčali v pravidelných 3-hodinových intervaloch, čím sa zabránilo priľnutiu embryí k vaječným blanám. Deň, keď boli vajíčka umiestnené do inkubátora, je embryonálny deň nula, označovaný ako ED0 (9). Na ED4 sa vajíčka vybrali z inkubátora a tupý koniec každého vajíčka sa umyl 70 % etanolom. Dezinfikované miesto sa potom prelepilo bielou lepiacou páskou a nožnicami sa vystrihol otvor, ktorý umožnil kontrolu vnútra vajíčka, jeho cievnej siete, prípadne prítomnosť bijúceho srdca. Neoplodnené vajíčka sa v tejto fáze z pokusu vyradili. Pomocou "window technique" sa aplikovalo 100 µl príslušnej koncentrácie jedu (4000; 400; 40; 4 µg/ml) priamo na povrch embryí na vrchnú časť membrány vnútorného obalu (*membrana papyracea*), zatiaľ čo kontrolnej skupine sa aplikovalo rovnaké množstvo (100 µl) sterilného fyziologického roztoku. Po skončení aplikácie sa otvory na vajíčkach hermeticky uzavreli priehľadnou

lepiacou páskou, označili príslušnou koncentráciou použitého jedu a umiestnili späť do inkubátora, kde pokračoval vývoj embryí.

Vzorky sa odoberali na ED9. Z vajíčok sa odstránila lepiaca páska a jednotlivé otvory sa zväčšili natoľko, aby sa dali embryá opatrne vytiahnuť. Každá testovacia skupina vrátane kontrolnej skupiny sa hodnotila samostatne. Sledoval sa počet živých a mŕtvych embryí v každej skupine. Ďalej sa sledovala a zaznamenávala telesná hmotnosť živých embryí, ako aj prípadný výskyt morfológických alterácií. Chirurgicky vypreparované tkanivá embryonálnej pečene a srdca sa zvážili a ich hmotnosť sa tiež zaznamenala.

Embryotoxické účinky včelieho jedu sa štatisticky vyhodnotili pomocou nepárového Studentovho t-testu (GraphPad Prism 5.0 San Diego, USA).

## Výsledky

Hodnotenie embryotoxických účinkov včelieho jedu druhu *Apis mellifera* sa uskutočnilo na 5. deň po aplikácii. V kontrolnej skupine, kde sa na povrch embryí aplikoval sterilný fyziologický roztok, sa nezistili žiadne mŕtve embryá. Z celkového počtu 52 embryí, ktorým bol podaný včelí jed, bolo 20 embryí mŕtvych, z toho 12 (92,31 %) po aplikácii najvyššej koncentrácie jedu (4000 µg/ml; Tab. 1).

**Tab. 1** Účinky jedu *Apis mellifera* na vývoj embryí získaných CHEST testom

<i>Bee venom</i>	<i>Conc.</i> (µg/ml)	<i>N</i>	<i>Live</i> <i>Embryos</i>	<i>Dead</i> <i>embryos</i>	<i>Mortality</i> (%)
<i>None</i> ( <i>Control</i> )	<b>0</b>	13	13	0	0
	<b>4000</b>	13	1	12	92,31
<i>Apis</i>	<b>400</b>	13	9	4	30,77
<i>mellifera</i>	<b>40</b>	13	12	1	7,70
	<b>4</b>	13	10	3	23,08

Na základe vzťahu medzi použitými koncentraciami jedu a následnou mortalitou bola stanovená hodnota letálnej dávky (LD<sub>50</sub>) včelieho jedu na 2,12 µg/vajce.

Celková hmotnosť embryí, ako aj hmotnosť získaných orgánov (srdce a pečeni) sa porovnávala s kontrolnou skupinou na 9. embryonálny deň (Tab. 2).

Po aplikácii rôznych koncentrácií (4000; 400; 40; 4 µg/ml) včelieho jedu *Apis mellifera* sa v porovnaní s kontrolnou skupinou pozorovali prevažne nižšie hmotnosti celých embryí, ale aj

nižšie hmotnosti embryonálnych srdc a pečeni. Výnimkou bola zvýšená hmotnosť celých embryí oproti kontrolnej skupine v testovanej skupine s koncentráciou jedu 40 µg/ml. Signifikantne nižšia hmotnosť,  $P < 0,01$  celých embryí oproti kontrole bola pozorovaná po aplikácii jedu s koncentráciou 400 µg/ml. Rovnako, aj hmotnosť embryonálnych srdc bola v porovnaní s kontrolnou skupinou vo všetkých testovaných skupinách nižšia, pričom štatisticky významná zmena  $P < 0,01$  bola nameraná po administrácii tej istej koncentrácie (400 µg/ml) včelieho jedu. Aj pri vážení embryonálnych pečeni bola po podaní všetkých koncentrácií (4000; 400; 40; 4 µg/ml) včelieho jedu zaznamenaná nižšia hmotnosť v porovnaní s kontrolou. Signifikantná zmena,  $P < 0,05$ , hmotnosti pečene v porovnaní s kontrolou bola aj v tomto prípade zaznamenaná pri koncentrácii 400 µg/ml.

**Tab. 2** Zmeny hmotnosti pozorované v CHEST teste na 9. embryonálny deň po aplikácii jednotlivých koncentrácií včelieho jedu

<i>Bee venom</i>	<i>Conc.</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>Embryo weight</i> <i>(g)</i>	<i>Heart weight</i> <i>(g)</i>	<i>Liver weight</i> <i>(g)</i>
<i>None (Control)</i>	<b>0</b>	1,070 ± 0,050	0,009 ± 0,001	0,011 ± 0,001
<i>Apis mellifera</i>	<b>4000</b>	1,040 ± 0,000	0,008 ± 0,000	0,008 ± 0,000
	<b>400</b>	0,873 ± 0,031**	0,006 ± 0,000**	0,008 ± 0,001*
	<b>40</b>	1,097 ± 0,039	0,008 ± 0,001	0,011 ± 0,001
	<b>4</b>	1,068 ± 0,042	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001

*Poznámka: Štatisticky významné zmeny oproti kontrole sú označené hviezdíčkou (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ).*

## Diskusia

Včelie robotnice produkujú včelí jed, ktorý je známy svojou bohatou zmesou aktívnych zložiek, vrátane peptidov ako melitín, apamín, MCD peptid degranulujúci žirne bunky a adolapín. Okrem toho obsahuje aj enzýmy, ako je fosfolipáza A2 (PLA2) a hyaluronidáza, aminokyseliny a rôzne prechavé zlúčeniny (11, 13). Vďaka týmto aktívnym zložkám má včelí jed množstvo farmakologických účinkov, vrátane protinádorových, neuroprotektívnych, protizápalových, analgetických a tiež schopnosti zlepšovať hojenie rán a ďalšie. V rôznych štúdiách bol hodnotený terapeutický potenciál týchto zložiek pri liečbe zápalových ochorení u ľudí, ako aj ochorení centrálného nervového systému, ako je demencia, Parkinsonova choroba (PD), Alzheimerova choroba (AD) a amyotrofická laterálna skleróza (ALS) a mnohých ďalších, ako sú osteoartritídy, reumatoidné artritídy a podobne. Zaujímavé je, že včelí jed, rovnako ako iné

živočišne jedy, preukázal priaznivý protirakovinový a antivírusový potenciál pri rakovine vaječníkov, prostaty a pri HIV (12, 13).

Kuracie embryá sa dlhé desaťročia považujú za preferovaný experimentálny model embryológov a boli medzi prvými embryami využívanými v experimentálnej teratológii.

Hodnotenie potenciálnych teratogénov a ich vplyvov na vývoj plodu a posúdenie rizika pre ľudí je kľúčovým aspektom v predklinickom výskume. Model kuracieho embrya sa ukázal ako účinný prostriedok na pochopenie embryonálneho vývoja u ľudí vzhľadom na jeho podobnosť s ľudským embryom. Výhody použitia modelov kuracích embryí zahŕňajú ich prístupnosť, efektívnosť z hľadiska nákladov a biologickú relevanciu pre vývoj stavovcov, čo umožňuje efektívne preskúmanie vývojovej toxicity (14).

Veľké úsilie bolo venované charakterizácii a štandardizácii CHEST (4, 5, 6), pretože hlavnou výzvou pri testovaní na vtáčích embryách bola kontrola dodávania testovanej látky do embrya. Tento problém bol minimalizovaný v protokole CHEST, kde sa látky umiestňujú do malých objemov tekutín, ktoré sú priamo v kontakte s embryom. Tento prístup umožňuje sledovať spomalenie rastu, výskyt malformácií a úmrtnosť (14).

V tejto práci sa najvyššia miera úmrtnosti zaznamenala v testovacej skupine po aplikácii jedu včely druhu *A. mellifera* s koncentráciou 4000 µg/ml, kde dosiahla hodnotu 92,31 %.

Na základe korelácie použitých koncentrácií včelieho jedu a následnou mortalitou boli stanovené hodnoty LD<sub>50</sub>, ktoré v prípade tohto jedu boli 2,12 µg/vajce, pričom všeobecne platí, že nižšie hodnoty LD<sub>50</sub> odrážajú vyššiu úroveň toxicity testovaného jedu, a teda vyššiu úroveň embryotoxicity.

Podobnú koreláciu popísali vo svojej práci Petrilla a kol. (11), kedy po aplikácii jedu *B. arietans* zaznamenali na kuracích embryách vyššiu mortalitu a nižšiu hodnotu letálnej dávky (15.48 µg/egg), v porovnaní s jedom *B. parviocula*, kde LD<sub>50</sub> = 53.53 µg/egg.

Existujú štúdie, ktoré sa realizovali na kuracích embryách a ako prvé dokumentovali, že chemické látky vyvolávajú deformácie u mláďat (2, 3). V práci Karnofskyho (7) bol systematicky preskúmaný vplyv rôznych chemických látok na vývoj kurčiat, zameriavajúc sa na ich toxické a teratogénne účinky.

Vďaka rastúcemu počtu štúdií zameraných na orgánovo špecifické teratogény a ďalšie aspekty vývojovej toxicity sa týmto rozvíja komplexnejší pohľad na embryotoxické vlastnosti látok a všeobecné vývojové procesy.

## Záver

Včely medonosné (*Apis mellifera*) sú kľúčoví opel'ovači s významným ekonomickým vplyvom. Ich jed, obsahujúci rôzne účinné látky, má farmakologické účinky. Štúdia sledovala účinky včelieho jedu na kuracie embryá. Testy ukázali vysokú mortalitu pri koncentrácii 4 000 µg/ml, s LD<sub>50</sub> hodnotou 2,12 µg/egg. Tieto zistenia zdôrazňujú potenciálne riziká pre embryá a význam ďalšieho výskumu. Využitie kuracích embryí poskytlo dôležité poznatky o vývoji a toxicite a štandardizované skriningové metódy prispievajú k lepšiemu pochopeniu vývojových procesov.

## Literatúra

1. Acharya, Biswajeet, et al. "Perspectives on Chick Embryo Models in Developmental and Reproductive Toxicity Screening." *Reproductive Toxicology* (2024): 108583
2. Ancel P (1950) La chimioteratogenese chez les vertebres. La chimioteratogenese realisation des monstruosites par des substances chimiques; chez les vertebres. Serialtitle: Encyclopedie scientifique bibliotheque de biologique generale
3. Collins TFX (1987)Teratological Research Using in vitro systems. V. Nonmammalian model systems. *Environmental Health Perspectives* 72, 237-249
4. Jelinek R (1977), The chick embryotoxicity screening test (CHEST). *Methods in Prenatal Toxicology: Evaluation of Embryotoxic Effects in Experimental Animals; Teratotoxicology Workshop, April 1977, Berlin, 381-386*
5. Jelinek R and Peterka M (1981) Morphogenic systems and in vitro techniques in teratology. *Culture Techniques: Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity; 5th Symposium on Prenatal Development, May 1981, Berlin, 553-557*
6. Jelinek R, Peterka M and Rychter Z (1985), Chick embryotoxicity screening test - 130 substances tested. *Indian Journal of Experimental Biology* 23, 588-595
7. Karnofsky DA (1955) The use of the developing chick embryo in pharmacologic reserach. *Stanford Medical Bulletin* 13, 247-259
8. Knight RB et al. "Evaluation of vasoactivity after haemotoxic snake venom administration." *Toxicon* 158 (2019): 69-76
9. Petrilla V et al. "A Comprehensive Study Monitoring the Venom Composition and the Effects of the Venom of the Rare Ethiopian Endemic Snake Species Bitis parviocula." *Toxins* 13.5 (2021): 299
10. Pucca MB et al. "Bee updated: current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy." *Frontiers in immunology* 10 (2019): 2090.
11. Shi P et al. "Pharmacological effects and mechanisms of bee venom and its main components: recent progress and perspective." *Frontiers in Pharmacology* 13 (2022): 1001553.
12. Wehbe R et al. "Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests." *Molecules* 24.16 (2019): 2997
13. [https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/VER3-0/online/DBALM\\_docs/M\\_Chicken%20Embryotoxicity%20Test.pdf](https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/VER3-0/online/DBALM_docs/M_Chicken%20Embryotoxicity%20Test.pdf)

Tento výskum bol podporovaný v rámci grantu APVV-22-0101, VEGA 1/0373/24, KEGA 004UVLF-4/2023.

# APLIKÁCIA TUBULÁRNEHO VODIČA PRI REGENERÁCII CHVOSTOVÉHO NERVU POTKANA PO TRANSEKCII

## APPLICATION OF TUBULAR CONDUIT IN RAT TAIL NERVE REGENERATION AFTER TRANSECTION

Juraj Blaško<sup>1</sup>, Michaela Mojžíšová<sup>2</sup>, Eva Székiová<sup>1</sup>, Zuzana Michalová<sup>1</sup>, Ivo Vanický<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Šoltésovej 4-6, Košice

<sup>2</sup>Prírodovedecká fakulta UPJŠ Košice

*jblasko@saske.sk*

### Súhrn

Poranenie periférneho nervu a následné obmedzenie/strata funkcie patrí vzhľadom k povahe nervového systému už dlhodobo k nie uspokojivo vyriešeným medicínskym problémom. K najzávažnejším formám poškodenia nervu patrí transekcia (neurotméza), kedy dochádza ku kompletnému prerušeniu kontinuity nervu. V niektorých prípadoch môže okrem samotnej transekcii dôjsť aj k strate niektorých segmentov nervu, čo komplikuje následnú chirurgickú intervenciu. V tejto súvislosti sa tubulárne vodiče javia ako potenciálne vhodný nástroj na premostenie prerušených kýpt'ov nervu, pretože môžu okrem fyzickej opory poskytnúť vhodné prostredie pre regeneračné procesy. V našom experimente sme vykonali transekciiu na chvostovom nerve potkana a následne aplikovali tubulárny vodič, ktorým sme prepojili proximálny a distálny kýpet' nervu, pričom kýpte boli vo vodiči umiestnené v rôznych vzdialenostiach. Kvantifikácia regenerovaných axónov po uplynutí doby prežívania ukázala, že chvostový nerv vie v nami použitom tubulárnom vodiči prerásť až 5 mm medzeru medzi kýpt'ami avšak medzeru 10 mm už neprerastie.

**Kľučové slová:** periférny nerv, transekcia, tubulárny vodič, regenerácia

### Summary

Injury to the peripheral nerve and the subsequent limitation/loss of function has long been an unresolved medical issue due to the nature of the nervous system. The most severe forms of nerve damage include transection (neurotmesis), which results in the complete interruption of nerve continuity. In some cases, apart from the transection itself, some nerve segments may

also be lost, complicating subsequent surgical intervention. In this context, tubular conduits appear as a potentially suitable tool for bridging interrupted nerve stumps because they can provide not only physical support but also a favorable environment for regenerative processes. In our experiment, we performed a transection on the rat tail nerve and then applied a tubular conduit that connected the proximal and distal nerve stumps, with the stumps placed period showed that the tail nerve could grow through a gap of up to 5 mm between the stumps in the tubular conduit we used, but it could not bridge a 10 mm gap.

**Key words:** peripheral nerve, transection, tubular conduit, regeneration

## Úvod

Rôzne formy poranení periférnych nervov postihnú v Európe približne 300 tisíc ľudí ročne a aj keď nejde o život ohrozujúce stavy, následky úrazu na kvalitu života sú významné (1). Napriek tomu, že periférny nervový systém má výrazne lepšiu regeneračnú kapacitu ako mozog a miecha, výsledky terapeutických snažení často nie sú uspokojivé. K najzávažnejším formám poškodenia nervu patrí neurotméza, pri ktorej dochádza k úplnému prerušeniu nie len samotných axónov, ale aj nervových obalov. Tento typ poškodenia je preto spojený s najhoršími vyhlídkami na návrat stratenej funkcie. Existuje viacero chirurgických prístupov na docielenie regenerácie prerušenej nervovej dráhy. Využitie tubulárnych vodičov, ktorého podstata spočíva v zavedení prerušených koncov nervu do lúmenu dutej trubice, sa ukazuje ako jeden z najviac perspektívnych postupov, nakoľko tieto vodiče poskytujú priaznivé prostredie pre regeneráciu predovšetkým izoláciou poraneného nervu od okolitého prostredia a zároveň akumuláciou dôležitých podporných faktorov uvoľňovaných zo samotného nervu. Tubulárne vodiče tiež predstavujú fyzickú oporu pre prerastanie a prinášajú možnosť ďalej modifikovať mikroprostredie poškodeného nervu (2). Doposiaľ bolo otestovaných viacero typov vodičov z rôznych materiálov, kde autori pozorovali prerastanie a regeneráciu nervu (3). V našom experimente sme testovali aplikáciu tubulárneho vodiča z materiálu mPES (modifikovaný polyétersulfón), ktorým sme premostili transekový proximálny a distálny kýpeť nervu. Kýpte sme do vodiča umiestnili v rôznych vzdialenostiach čím sme sa pokúsili identifikovať maximálnu možnú medzeru, ktorú ešte regenerujúce axóny v tubulárnom vodiči dokážu prerásť. Po uplynutí doby prežívania sme axóny na rôznych úrovniach nervu kvantifikovali.

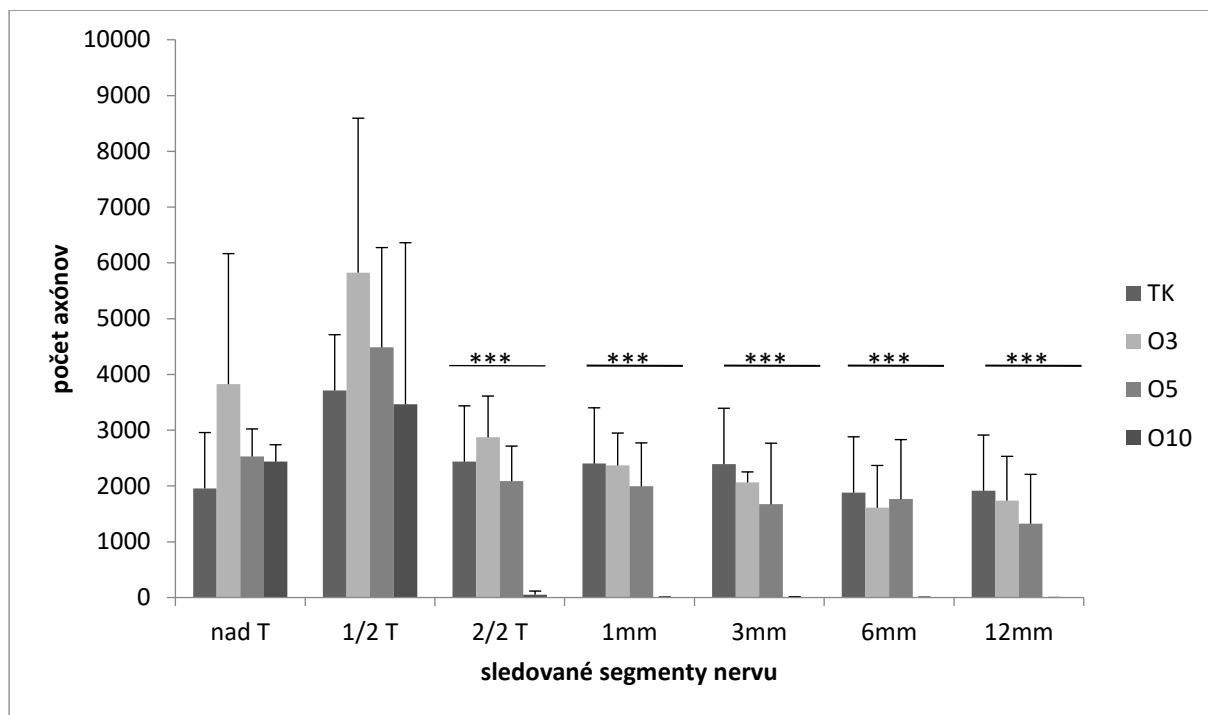


## **Materiál a metódy**

V experimente sme použili 3 mesačné samce potkana z kmeňa *Wistar albino*, rozdelené do skupín (n=5) podľa vzdialenosti transekových kýpt'ov chvostového nervu: tesný kontakt, odstup 3 mm, 5 mm a 10 mm. Zvieratám v celkovej anestéze sme najprv vykonali transekcii ľavého ventrálneho nervu vo vzdialenosti 1,5 cm od bázy chvosta. Proximálny a distálny kýpet' nervu bol následne vložený do tubulárneho vodiča pri dodržaní definovaného odstupu kýpt'ov. Po zašití rany zvieratá prežívali 4 mesiace. Po uplynutí tejto doby, sme nerv aj s vodičom vyizolovali a fixovali v 2,5% roztoku glutaraldehydu. Po zaliatí do albumínového matrixu, sme pripravili 1 mm hrubé bločky nervu v presne definovaných úsekoch: úsek nad miestom transekcii, úsek v prvej polovici vodiča, úsek v druhej polovici vodiča, úseky 1, 3, 6 a 12 mm pod vodičom (spolu 7 bločkov). Pre histologickú vizualizáciu boli tieto bločky najprv osmifikované a následne zaliate do Durcupanu. Z týchto bločkov sme potom vyhotovili 2  $\mu$ m rezy, na ktorých sme pomocou mikroskopu a softwaru ImageJ kvantifikovali regenerujúce axóny.

## **Výsledky**

Axóny sme kvantifikovali vo vopred definovaných úsekoch nervu: úsek nad trubičkou v proximálnom kýpti (nad T), úsek v prvej polovici trubičky (1/2 T), úsek v druhej polovici trubičky (už súčasť distálneho kýpt'a- 1/2 T), úseky 1, 3, 6 a 12 mm pod trubičkou (Graf). Axóny regenerovali v skupinách s tesným kontaktom kýpt'ov a rovnako aj pri odstupoch 3 a 5 mm. U zvierat s odstupom 10 mm bola regenerácia výrazne limitovaná až neprítomná. V žiadnom sledovanom úseku nervu neboli medzi porovnávanými skupinami štatisticky významné rozdiely, okrem skupiny s odstupom 10 mm, kde boli významné rozdiely od segmentu 2/2 T v porovnaní s ostatnými skupinami,  $p < 0,001$  (One-way ANOVA).



**Obr. 1** Kvantifikácia axónov v chvostovom nerve potkana

## Diskusia

Využitie tubulárnych vodičov pri poškodení periférnych nervov, hlavne v prípade že dôjde k strate celých nervových segmentov, predstavuje sľubnú stratégiu v oblasti regeneračnej medicíny. Pri skúmaní účinku nervových tubulárnych vodičov na regeneráciu axónov sa ako experimentálny model zvyčajne využíva sedací nerv potkana (4), ktorý však vzhľadom k svojej obmedzenej dĺžke, umiestneniu a neurologickému dopadu na zviera po chirurgickom zákroku, má svoje limity. Cieľom našej práce bolo na novo zavedenom experimentálnom modeli chvostového nervu potkana preskúmať úspešnosť regenerácie axónov po zavedení vodiča z modifikovaného polyétersulfónu (mPES) a zistiť, aký odstup medzi proximálnym a distálnym kýpt'om po transekcii dokážu regenerujúce axóny prekonať. Zistili sme, že úspešné prerastanie axónov prebehlo ak bol odstup kýpt'ov menší ako 10 mm, pričom úroveň regenerácie sa medzi skupinami s tesným kontaktom kýpt'ov, odstupom 3 a 5 mm nelíšila. Pravdepodobným dôvodom zlyhania regenerácie v skupine s odstupom 10 mm je, že v mieste transekcie sa počas regenerácie nervových kýpt'ov za normálnych podmienok vytvára premostujúca štruktúra, ktorá usmerňuje prerastanie axónov distálnym smerom. Pozostáva z endotelových buniek, ECM a Schwannových buniek usporiadaných vo vnútri bazálnej laminy, ktoré tak vytvárajú Büngnerove pásy (5). Ak táto fáza v určitom kroku zlyhá, regenerujúce axóny nemajú substrát vhodný na rast. Je známe, že existuje určitá limitná

vzdialenosť, ktorú axóny už nedokážu prerásť, v klinických štúdiách sa uvádza dĺžka 3 - 4 cm a u hlodavcov vzdialenosť do 1,5 cm (6). Ako sme ukázali, na nami zavedenom modeli chvostového nervu, predstavuje táto vzdialenosť približne 10 mm. Tieto výsledky predstavujú východisko pre budúce experimenty, v ktorých plánujeme tubulárny vodič osadiť rôznymi podpornými faktormi – bunkami, sekretómom a štepami.

## Literatúra

1. Cinteza D, Persinaru I, Maciuceanu Zarnescu BM, Ionescu D, Lascar I (2015) Peripheral Nerve Regeneration - an Appraisal of the Current Treatment Options. *Maedica (Buchar)* 10(1): 65-8
2. Konofaos P, Ver Halen JP (2013) Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg* 29(3): 149-64
3. Mankavi F, Ibrahim R, Wang H Advances in Biomimetic Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Nanomaterials (Basel)*. (2023) Sep 10;13(18): 2528
4. Fang Z et al. (2020) Enhancement of sciatic nerve regeneration with dual delivery of vascular endothelial growth factor and nerve growth factor genes, *J Nanobiotechnology*, 18(1)
5. Höke A (2006) Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nature Clinical Practise Neurology*, 2(8), 448-454
6. Daly W et al. (2012) A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: Bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery, *Journal of the Royal Society Interface*. Royal Society, 202-221

Práca bola podporená projektami *VEGA2/0109/24* a *VEGA2/0120/23*.

# VZŤAH PEDAGÓG VERSUS ŠTUDENT V PROCESE UČENIA

## THE TEACHER VERSUS STUDENT RELATIONSHIP IN THE LEARNING PROCESS

**Adriana Boleková**, Ingrid Hodorová

Ústav anatómie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice

*adriana.bolekova@upjs.sk*

### Súhrn

Práca sa zaoberá prístupom pedagóga ku študentom vo výučbovom procese na vysokých školách v súčasnosti. Podmienkou pre výučbu na vysokej škole by malo byť ovládanie a rozvoj zručností ako efektívne učiť vysokoškolských študentov. Na Slovensku sa vysokoškolské vzdelávanie opiera aj o klasické učenie, ale vo veľkej miere aj o novodobé metódy výučby, ktoré vyžadujú aktívne zapojenie sa študentov do vzdelávacieho procesu.

**Kľúčové slová:** študent, pedagóg, výučba

### Summary

This work deals with the approach of teacher to students in the teaching process at universities today. A condition for teaching at a university should be the mastery and development of skills how effectively teach university students. In Slovakia, higher education is also based on classical learning, but largely also on modern teaching methods that required the active involvement of students in the educational process.

**Key words:** student, teacher, teaching

### Úvod

Vzdelávacia činnosť je na univerzitách a vysokých školách realizovaná viacerými formami, podiel jednotlivých foriem výučby daného predmetu určuje študijný program (1). Súčasný systém vzdelávania v príprave mladých ľudí na kvalitný profesijný život nie je ideálny. Veľakrát sa študent učí to, čo potrebovať nebude a naopak nedostáva to, čo bude v praxi využívať. Pedagóg by mal mať dostatočné EQ, aby sa dokázal vžiť do pozície študenta. Vysoko vzdelaný učiteľ, ktorý má encyklopedické informácie, ale nemá k študentom a učeniu vzťah,

nie je u študentov kladne hodnotený. Oblúbený pedagóg sa snaží študentom pri učení pomáhať a rozumie sa do ich situácie. Súčasná doba je bohatá na ľahko dostupné informácie, preto je ťažké zaujať študentov, ktorí sú obklopení tými istými informačnými zdrojmi, aké používa aj pedagóg. Petlák (2) vychádza z poznatkov mozgovo-kompatibilného učenia, ktoré kladú dôraz nielen na učenie a pamäť, ale aj na s nimi súvisiace emócie a motiváciu. Formuloval presné požiadavky na učenie: má byť neformálne, zábavné a príjemné, všestranne podporované, zamerané na život a obsah učiva musí byť študentom podaný rôznymi metódami. Študenti nemajú radi, keď pedagóg ignoruje ich otázky alebo nadradene odpovedá, prikazuje namiesto toho, aby ich inšpiroval, namiesto učenia ich poučuje alebo si vynucuje nezaslúženú autoritu.

„Ak učiteľ je pán a svoju autoritu si musí vynútiť,  
takýto učiteľ u študentov nemá žiadnu autoritu,  
takéhoto učiteľa budú študenti nenávidieť,  
a kvôli tomu budú aj jeho predmet z duše nenávidieť,  
kvôli tomu si k jeho predmetu ani len nesadnú,  
kvôli tomu sa to nenaučia,  
kvôli tomu to budú nenávidieť celý život.

Pritom on má len pozitívny úmysel a chce ich len naučiť.“ (3)

### **Všeobecné tipy a postrehy pre pedagógov**

Úlohou pedagóga je objasniť študentovi dôležitosť svojho predmetu, prečo je nutné, aby si študenti dané vedomosti osvojili. Študenti musia vedieť, aký je zmysel učenia sa, preto je nutné zamerať sa na učivo, ktoré má pre študentov význam. Smutné je, že niekedy ani učitelia nevedia, prečo musia študenti niektoré témy preberať. Spätná väzba je dôležitým faktorom učenia, učiteľ má zistiť včas, čo študenti pochopili, či to pochopili správne a čo je potrebné korigovať. Pri zadávaní úloh je vhodné rozdeliť úlohy medzi študentov do jednotlivých skupín, čím sa učia aj spoločnej zodpovednosti pri plnení úloh. Vzájomná spolupráca medzi študentmi ich naučí kooperovať a pomáhať si v zdolávaní výziev. Pri učení sa je vhodné do procesu zapojiť čo najviac zmyslov, študenti získajú priamu skúsenosť zo skutočného sveta, prepájaním zmyslových vnemov – zraku, sluchu, čuchu, dotyku. To, čo si študenti sami vyskúšajú, otestujú, si najlepšie zapamätajú. Učenie sa spojené s pohybom alebo názornou aktívnou činnosťou zvyšuje zapamätanie približne o 68 % (4). Učeniu pomáha aj obohatené prostredie, útulné, čisté, estetické a prakticky zorganizované. Študentom je potrebné poskytnúť na učenie a opakovanie

si dostatok času podľa vlastného tempa. Za efektívne zvládnuté učivo sa považuje také, ktoré študenti dokážu predviesť, použiť v praxi, a aj naučiť iných. Je dôležitý osobitný prístup k študentom, nie ku všetkým rovnako, ale s ohľadom na individuálne štýly učenia sa jednotlivca. Dobrý učiteľ by sa mal snažiť akceptovať ich názory a záujmy, optimálne diferencovať prístupy pre spoločnú prácu. V priebehu výučby na cvičeniach a seminároch má učiteľ vytvárať a udržiavať záujem študentov o tvorivú činnosť, objavovanie a prirodzenú zvedavosť. Podporovať interakčné vzťahy medzi študentmi navzájom. Dovoľiť im, aby interpretovali svoje vedomosti rôznymi spôsobmi vlastnými slovami, s dôrazom na podstatu a správnosť informácií. Naučiť ich spájať nové učivo s predošlými vedomosťami, aj so všetkým súvisiacim, s čím sa už v minulosti stretli. Dávať rôzne príklady, aby študenti videli zmysel a význam vyučovaného obsahu. Pristupovať k učeniu pozitívne, uprednostňovať pozitívne vyjadrovanie s prejavovaním kladných emócií (5).

### **Prednášky a cvičenia**

Na začiatku prednášky alebo cvičenia je vhodné študentov oboznámiť s tým, čo sa bude diať, s čím učivo súvisí, aby vedeli čo a prečo sa majú učiť. Pedagóg nemá byť príliš direktívny. Úvod prednášky je najdôležitejší, študenti sú ešte čerství, dobre si pamätajú, sú zvedaví. Je výhodné upútať pozornosť hneď v úvode, s cieľom udržať si ju čo najdlhšie. Úvodom môže byť: zaujímavý príbeh, rečnícka otázka, citát, obrázok, model, rekvizita, krátke video, ktoré zosilnia porozumenie, vyvolajú zvedavosť a poodhalia myšlienku z nasledovného učiva. Ak učiteľ vedie so študentmi aktívnu komunikáciu počas vysvetľovania, budú motivovaní dávať pozor. Nie je vhodné zahltiť študentov prílišným množstvom nových informácií, pretože študenti potrebujú čas na ich spracovanie. Nakoľko sa mozog nedokáže dlho sústrediť a študenti neudržia pozornosť viac ako 10 – 15 min., je dôležité prednášku prerušovať, odľahčiť ju, vsúvať do nej emocionálne pútavé podnety, ktoré študentov prebudia – príklady, kazuistiky, príbeh, vtíp, čo súvisí s témou. V priebehu prednášky je vhodné niekoľkokrát zopakovať dôležité fakty v intervaloch najmenej 10 minút, aby sa nové vedomosti mohli zapamätať. Zapamätaniu pomáha, aby si študenti písali poznámky, čím si transformujú myšlienky podľa seba a rozmyšľajú. Stačí, aby si zapísali len oporné, heslovité poznámky, tieto ešte v ten deň spracovali, skonfrontovali s informáciami v učebnici. Takto bude mať prednáška, maximálny efekt (2). Cieľom prednášky nie je študenta všetko naučiť, ale usmerniť. Ak prednášajúci nezverejní prezentáciu, študent je nútený zaznamenávať výklad, sústreďí sa na zapisovanie, a tým sa nedokáže sústrediť na pochopenie učiva, pretože sa nedostane do aktívnej interakcie

s učivom. Preto je rozumné, ak študenti majú prezentáciu k dispozícii v predstihu, môžu si ju vytlačiť alebo otvoriť, a zaznačovať si.

Prax je taká, že nie všetci vyučujúci sú ochotní prispôbovať či meniť roky zaužívané metódy výučby (6). Ak učiteľ iba monotónne reprodukuje učivo z prezentácie, nie je to efektívna výučbová metóda. Pri takomto výklade učiva pozeranie sa na písaný text a jeho počúvanie zároveň, pôsobí rušivo a unavujúco, mozog sa dokáže sústrediť buď na čítanie alebo na počúvanie, nie na obe činnosti naraz. Ide o pasívne učenie, kde študent nemá spätnú väzbu o tom, čo sa naučil a preto si učivo nemôže zapamätať. Naopak, aktívnym učením sa študent snaží dostať informácie z pamäte von a zisťuje, koľko toho si dokáže vybaviť. Až keď si učivo vybaví, tak si ho skutočne pamätá (7).

### **Poznámky k prezentáciám**







Multimediálna prezentácia je najčastejšou formou odovzdávania vedomostí vo výučbe. Je efektívna vtedy, keď vhodným spôsobom kombinuje text (písaný resp. hovorený) a grafiku (obrázky, fotografie, animácie alebo videá). Obrázky spracúva mozog 60 tisíc krát rýchlejšie ako písaný text. Jeden obrázok dokáže nahradiť viac než tisíc slov (8). Je teda vhodné využívať grafiku, ktorá ukotví zmysel rozprávania. Vhodnou kombináciou obrázkov, písaných a hovorených textov, sa dá docíliť vysoká miera pozornosti študenta, ktorý tak dokáže vnemy dekódovať a zapamätať si. Podľa Mayerových princípov multimediálnej prezentácie je vhodné používať obrázky a hovorené slová, mozog totiž pracuje súčasne so slovom a obrazom. Študent si zapamätá o 65 % viac, keď sú v prezentácii obrázky. Obrázky a súvisiaci text majú byť blízko seba. Stačí jednoduchá, výstižná prezentácia bez „prešperkovanvej“ grafiky a nadbytočných informácií slúžiacich na zaplnenie priestoru. Grafika sa má využívať premyslene na zvýšenie pozornosti, a nie na jej odvádzanie od učenia (9). Aj voľba písma ovplyvňuje kvalitu prezentácie. Stačí kombinovať iba 2 typy kontrastných písmen (10).

### **Všímajte si študenta**







Ak sa študent pri skúšaní pozerá „do prázdna“, v jeho mozgu prebieha spomínanie, vyvolávanie obrazu z pamäti. Takáto disociácia od prítomnosti je prirodzený prejav fungovania mozgu. Pri tomto rozpomätávaní sa študent nemôže súčasne sústrediť na dianie pred ním a pritom rozmýšľať. Preto od neho nie je správne požadovať, aby sa díval učiteľovi do očí, keď odpovedá, pôsobí to na neho rušivo a bráni v procese spomínania. Pri rozpomínaní môže byť postavenie očí študenta rôzne, a je možné z neho odvodiť tzv. očný kľúč, vyčítať z neho, ako



človek myslí (11). Ak sa študent pozerá hore, predstavuje si obrazy, ak sa pozerá do strán predstavuje si zvuky, ak pozerá dolu je v emočnom svete. Mali by ste spozornieť, ak sa študent pozerá dole (pravák doprava, ľavák doľava), vtedy je v strese a niekedy v takom stave ani nedokáže premýšľať.

Očné kľúče pre <b>praváka</b> , ak sa pozerá:			
doľava hore zrakové spomienky		doprava hore zrakové myšlienky	
doľava nabok sluchové spomienky		doprava nabok sluchové myšlienky	
doľava dole vnútorný monológ		doprava dole pocity, <b>stres</b>	

**Obr. 1** Očné kľúče pre praváka (dívate sa na praváka)

Očné kľúče pre <b>ľaváka</b> , ak sa pozerá:			
doľava hore zrakové myšlienky		doprava hore zrakové spomienky	
doľava nabok sluchové myšlienky		doprava nabok sluchové spomienky	
doľava dole pocity, <b>stres</b>		doprava dole vnútorný monológ	

**Obr. 2** Očné kľúče pre ľaváka (dívate sa na ľaváka)

Ak sa študent pozerá hore alebo nabok, pokúša sa spomenúť si. Nie je to však žiadna istota, že sa mu to aj podarí, len sa tým zvýši pravdepodobnosť spomenutia. Ak nie sú vedomosti dobre uložené, nemôžu sa ani vyvolať (vybaviť).

## Záver

Efektívnosť učenia je podporená mnohými mozgovo-kompatibilnými faktormi. Preto sa aj učiteľ má snažiť o dobré vzťahy so študentami, vytvárať prijateľné pravidlá, rozumnú komunikáciu, podporu a vyhovujúce prostredie. Obojstranná dôvera a uznanie sú dôležitými podpornými faktormi v procese učenia. Učiteľ má zameriavať pozornosť na silné stránky študentov a podporovať ich. Je nutné rešpektovať rôzne štýly učenia sa, každý mozog jedinečný, a teda sa študenti neučia rovnakým spôsobom. Na slovenských vysokých školách

monologická forma vzdelávania prestáva byť dominantnou. Technológie súčasnej doby ponúkajú množstvo spôsobov, učiť interaktívne. Vo veľkej miere to závisí od prípravy, motivácie a možností pedagógov prispôbovať svoju výučbu potrebám študentov. Multimediálne technológie umožňujú aktívne učenie v motivujúcom prostredí, účasť viacerých zmyslov na prijímaní a zapamätaní informácií (12).

## Literatúra

1. <https://intranet.upjs.sk/op/op.Public.php?documentid=8539> (28.04.2024)
2. Petlák E a kol. (2009) Vyučovanie - mozog - žiak. Iris, Bratislava
3. Hlinka M (2011) Poraz školu! - 11 trikov ako sa učiť menej. Zrýchlené učenie v kocke. e-book
4. Palmárová V (2008) Teórie učenia a ich aplikácia v e-podpore vyučovania. ISKI, UKF, Nitra
5. Vasiľová M a kol. (2013) Inovatívne univerzitné vzdelávanie. Ekonóm, Bratislava
6. Medina J (2012) Pravidla mozku - Nejnovější vědecké poznatky pro úspěch v práci, doma i ve škole. Bizbooks, Brno
7. Kohut J (2016) Jak se efektivně učit nejen do školy. eBoooks.cz
8. <https://citaty-slavnych.sk/autori/konfucius/> (26.04.2024)
9. Mayer RE (2014) Cognitive Theory of Multimedia Learning - The Cambridge handbook of multimedia learning. Cambridge University Press, New York
10. Hrkal M (2018) Odprezentuj - Průvodce přípravou prezentace. BizBooks, Brno
11. Palmárová V (2008) Teórie učenia a ich aplikácia v e-podpore vyučovania. ISKI, UKF, Nitra
12. Činka L (2012) Ovládněte svůj mozek. BizBooks, Brno

Práca bola podporená grantom *KEGA č. 006UPJS-4-2024*.

# KARBONICKÁ ANHYDRÁZA IX A SURVIVIN V KOLOREKTÁLNYCH KARCINÓMOCH

## CARBONIC ANHYDRASE IX AND SURVIVIN IN COLORECTAL CANCER

Veronika Cígerová<sup>1</sup>, Marian Adamkov<sup>1</sup>, Slávka Drahošová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, Malá hora 4, Martin

<sup>2</sup>Altium International s.r.o., Na Jetelce 69/2, 190 00 Praha 9, ČR

*veronika.cigerova@uniba.sk*

### Súhrn

Biomarkery zohrávajú dôležitú úlohu pri detekcii a následnej liečbe pacientov s kolorektálnym karcinómom (CRC). Hypoxiou-indukovaná karbonická anhydráza IX (CA IX) a anti-apoptotický proteín survivin vykazujú v CRC abnormálnu expresiu, ktorá je spojená so zlou prognózou. Predkladaná štúdia bola zameraná na hodnotenie imunohistochemickej expresie a významu CA IX a survivinu v 111 prípadoch CRC a ich korelácii s klinicko-morfologickými parametrami. Pozitivitu CA IX sme zaznamenali v 75,7% prípadov CRC. Štatistická analýza nepotvrdila žiadne významné asociácie medzi CA IX a klinicko-morfologickými parametrami. Survivin bol exprimovaný v 65,8% prípadov CRC. Zistili sme významné vzťahy medzi vekom pacientov a intenzitou imunoreakcie, medzi gradom a subcelulárnou lokalizáciou a percentom pozitívnych buniek a medzi lokalizáciou lézie a subcelulárnou lokalizáciou. Štatistickou analýzou sme nepotvrdili významnú koreláciu medzi študovanými proteínmi. Na základe našich výsledkov sa domnievame, že každý hodnotený proteín má potenciál slúžiť ako prognostický marker pri analýze CRC.

**Kľúčové slová:** karbonická anhydráza IX, survivin, kolorektálny karcinóm, imunohistochemia

### Summary

Biomarkers play an important role in the detection and treatment of patients with colorectal cancer (CRC). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX (CA IX) and the anti-apoptotic protein survivin show abnormal expression in CRC, which is associated with poor prognosis. The presented study was aimed to evaluate the immunohistochemical expression and

significance of CA IX and survivin in 111 cases of CRC and their correlation with clinico-morphological parameters. CA IX positivity was observed in 75.7% of CRC cases. Statistical analysis did not confirm any significant associations between CA IX and clinico-morphological parameters. Survivin was expressed in 65.8% of CRC cases. We found significant associations between the age of the patients and the intensity of the immunoreaction, between the grade and subcellular localization and the number of positive cells, and between the lesion site and subcellular localization. Statistical analysis did not confirm a significant correlation between the studied proteins. Based on our results, we believe that each evaluated protein has the potential to serve as a prognostic marker in the analysis of CRC.

**Key words:** carbonic anhydrase IX, survivin, colorectal cancer, immunohistochemistry

## Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) je celosvetovo tretie najbežnejšie nádorové ochorenie u mužov a druhé u žien. Z klinického aj patologického hľadiska sa vyznačuje značnou heterogenitou. CRC môže byť asymptomatický až do pokročilých štádií, preto dôležitú úlohu zohráva jeho včasná detekcia. Vedci preto hľadajú špecifické biomarkery alebo potenciálne prognostické faktory, ktoré by sa dali uplatniť pri diagnostike a monitorovaní liečby pacientov s CRC a ovplyvniť charakter nádorovej bunky (5, 11, 20).

Typickým faktorom definujúcim mikroprostredie solídnych nádorov je hypoxia, teda nedostatočné zásobením kyslíkom, ktorá je považovaná za indikátor zlej prognózy. Detekcia hypoxie v tumoroch je nevyhnutným predpokladom pre voľbu správneho terapeutického prístupu. Medzi najviac hypoxiou-indukované proteíny patrí karbonická anhydráza IX (CA IX), ktorej expresia sa javí ako potenciálny prognostický biomarker CRC. Hlavnou úlohou CA IX je udržiavanie intracelulárnej pH homeostázy spojenej s acidifikáciou extracelulárneho prostredia. CA IX teda predstavuje faktor prežívania, ktorý ochraňuje nádorové bunky pred fyziologickými stresmi. Imunohistochemická detekcia tohto proteínu môže poskytnúť nielen informácie o prítomnosti intratumorovej hypoxie, ale aj prognóze nádorového ochorenia. Preto objasnenie úlohy CA IX by mohlo viesť k novým kľúčovým poznatkom a tiež k inovatívnym terapeutickým stratégiám (15, 18, 21).

Survivin je členom rodiny anti-apoptotických proteínov IAP (z angl. inhibitor of apoptosis proteins), ktoré sa podieľajú na negatívnej regulácii apoptózy (inhibujú aktiváciu kaspáz) a na kontrole bunkového cyklu. Zohráva tiež úlohu v určitých fyziologických procesoch ako aj patologických javoch (napr. karcinogéza). Survivin je exprimovaný v mnohých nádorových

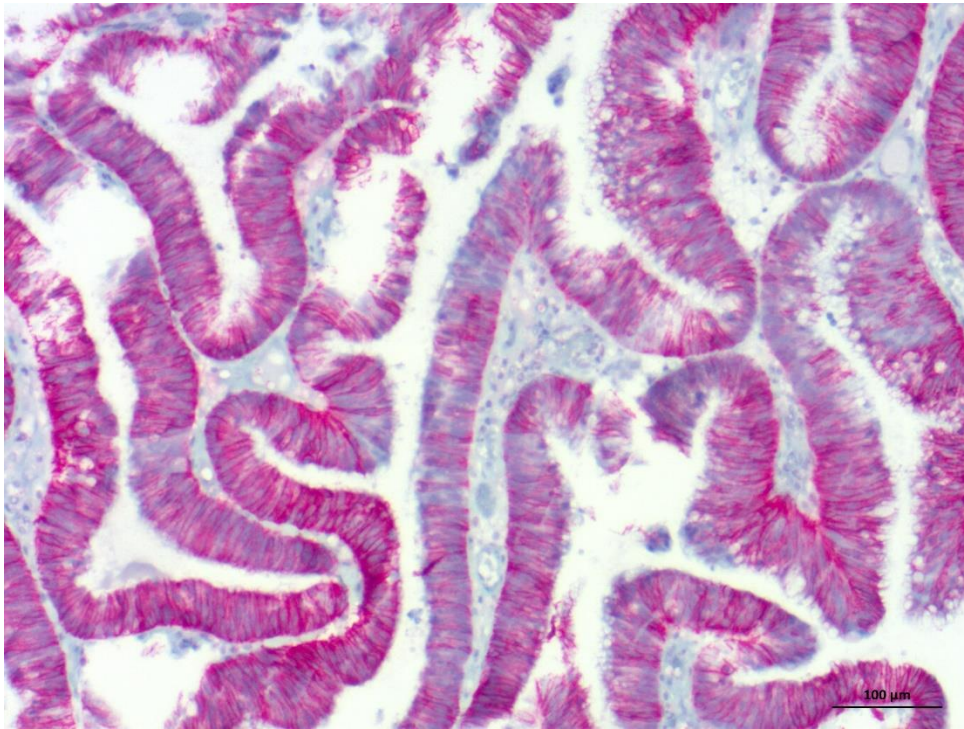
ochoreniach ako je napr. nemalobunkový karcinóm pľúc, karcinóm žalúdka, prsníka, pečene, CRC atď. Zvýšená expresia tohto proteínu je spojená so zlou prognózou, agresívnejším stupňom ochorenia a rezistenciou na chemoterapiu. Imunoreakciu survivinu je možné detegovať v jadre (regulácia bunkového cyklu) a cytoplazme (inhibícia apoptózy). Do cytoplazmy sa môže dostať buď po uvoľnení z mitochondrií vplyvom cytotoxického stimulu alebo aktívnym nukleárnym transportom (9, 10, 23).

## **Materiál a metódy**

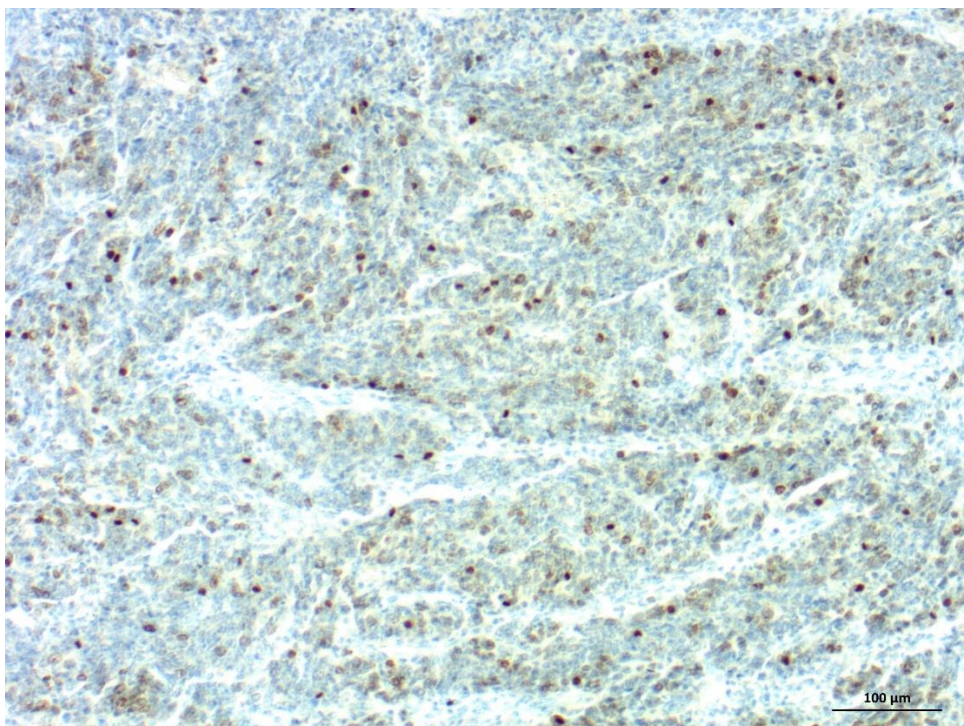
Imunohistochemicky sme vyšetrili parafínový materiál zo 111 vzoriek CRC ktoré pochádzali z diagnosticky uzavretých prípadov. Z každej vzorky boli pripravené 4  $\mu\text{m}$  hrubé rezy na imunohistochemické reakcie na dôkaz CA IX a survivinu s použitím automatu Ventana Benchmark Ultra (Roche). Monoklonálna protilátka proti CA IX (klon: H-11; Zeta corporation) bola riedená v pomere 1:300 a proti survivinu (klon: 12C4; Dako, Dánsko) v pomere 1:50. Reakcia bola pri CA IX vizualizovaná Fast Red chromogénom (Roche) a pri survivine DAB chromogénom (Roche). V analyzovanom súbore CRC boli hodnotené nasledovné klinicko-morfologické charakteristiky: vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia. Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili percento pozitívnych buniek, subcelulárnu lokalizáciu a intenzitu imunoreakcie. Štatistické hodnotenie bolo realizované pomocou testu Chi-square ( $\chi^2$ ) v softvéri R (verzia 3.2.3). Výsledky s p-hodnotou pod 0,05 boli považované za štatisticky významné.

## **Výsledky**

CA IX bola exprimovaná v 84/111 (75,7%) prípadoch CRC. Pozitívne prípady vykazovali prevažne silnú membránovú expresiu (Obr.1). Chi kvadrát test nepotvrdil žiadne významné asociácie medzi klinicko-morfologickými charakteristikami CRC (vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia) a parametrami expresie CA IX. Survivin bol exprimovaný v 73/111 (65,8%) prípadoch CRC. Dominovala stredne silná jadrová pozitivita (Obr. 2). Chi kvadrát testom boli preukázané významné asociácie medzi intenzitou imunoreakcie a vekom pacientov, medzi stupňom malignity (grade) a subcelulárnou lokalizáciou survivinu a percentom survivin-pozitívnych buniek a medzi lokalizáciou lézie a subcelulárnou lokalizáciou survivinu ( $p < 0,05$ ). Štatistickou analýzou sme nezistili významnú koreláciu medzi expresiou CA IX a survivinom ( $p > 0,05$ ).



**Obr. 1** Silná membránová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz CA IX.



**Obr. 2** Stredne silná jadrová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz survivinu.



## Diskusia

CRC predstavuje nádorové ochorenie, ktoré môže byť asymptomatické až do pokročilých štádií, preto dôležitú úlohu zohráva včasná detekcia. Medzi perspektívne prognostické markery CRC patrí hypoxiou-indukovaná CA IX, ktorá sa spája so zlou prognózou (15). V našej skupine 111 kolorektálnych karcinómov sme zaznamenali expresiu CA IX v 75,7% prípadoch. Saarnio a kol. (16) ako prví študovali expresiu CA IX v CRC a zistili, že 76% prípadov bolo pozitívnych. Ďalší autori tiež zaznamenali nadmernú expresiu tohto proteínu v CRC (4, 8). Väčšina našich prípadov vykazovala silnú intenzitu imunoreakcie, čo je v súlade s ďalšími prácami (8, 16). Silná intenzita expresie CA IX môže súvisieť s vysokou akumuláciou tohto proteínu v bunkách CRC. V našej práci sme nezaznamenali žiadne významné vzťahy medzi expresiou CA IX a klinicko-morfologickými parametrami CRC. Naše výsledky sa zhodujú s ďalšími štúdiami (17, 22). V práci Clevena a kol. (4) bola preukázaná významná korelácia medzi expresiou CA IX a TNM stagingom, pričom expresia bola znížená v pokročilejších štádiách CRC. Ho a Coomber (7) pozorovali, že vek je významne asociovaný s vysokou expresiou CA IX. Výsledky z literatúry sú značne heterogénne, čo môže súvisieť s použitím odlišnej metodiky a klasifikačných systémov v štúdiách.

Významnou vlastnosťou nádorových buniek je odolnosť voči bunkovej smrti – apoptóze (15). Medzi anti-apoptotické proteíny patrí aj survivin, ktorý je exprimovaný vo väčšine nádorov, vrátane CRC (6). V našom súbore CRC bol survivin exprimovaný v 65,8% prípadov. Podobnú expresiu ako v našej štúdii zaznamenali aj iní autori (1, 12, 14). V pozitívnych prípadoch sme zistili prevažne jadrovú lokalizáciu imunoreakcie, ale aj kombinovanú jadrovú a cytoplazmovú, pričom intenzita bola prevažne stredná. Väčšina štúdií (2, 3, 13) dokazuje, že jadrová expresia koreluje so zlou prognózou, zatiaľ čo cytoplazmová je indikátor dobrej prognózy. Predpokladá sa, že jadrový survivin kontroluje bunkové delenie, zatiaľ čo cytoplazmový survivin funguje ako cytoprotektívne činidlo. Tieto zistenia naznačujú, že rozdielna lokalizácia survivinu môže indikovať rôzne proteínové funkcie a ovplyvniť prognózu pacienta. Lokalizácia expresie survivinu je teda asociovaná s prognózou nádorového ochorenia (23). Ďalej sme zistili významné asociácie medzi vyšším vekom pacientov a strednou intenzitou imunoreakcie, medzi vysokým gradingom a jadrovou lokalizáciou expresie a vysokým percentom pozitívnych buniek a tiež medzi lokalizáciou lézie (proximálna časť hrubého čreva) a jadrovou lokalizáciou sledovaného proteínu. Rovnaké výsledky prezentovali aj Hernandez a kol. (6) ktorí zistili, že expresia survivinu sa zvyšuje so zhoršujúcim sa stupňom nádoru (grade). Väčšina autorov (12, 14, 24) popisuje významné korelácie so stagom (stage D) a metastatickým postihnutím

lymfatických uzlín. Expresia survivinu je spájaná so zvýšenou agresivitou a zníženým prežívaním pacientov. Preto terapeutické ovplyvnenie survivinu by mohlo byť prospešné v liečbe CRC (1).

Na regulácii expresie survivinu by sa podľa niektorých štúdií mohol podieľať aj hypoxiou indukovaný faktor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), ktorý je asociovaný s CA IX (25). V našej práci sme korelovali expresiu survivinu s CA IX. Signifikantnú koreláciu sme však nezistili. Ani súčasné práce tento vzťah zatiaľ nepreskúmali. V literatúre pozorovali vzájomnú koreláciu survivinu a CA IX iba Stewart a kol. (19) v nemalobunkovom karcinóme pľúc, avšak významnú koreláciu rovnako ako v našom prípade nepotvrdili.

## Záver

V nami hodnotenom súbore sme zistili expresiu proteínu CA IX takmer v 72% prípadov CRC. Väčšina prípadov vykazovala silnú membránovú pozitivitu. Štatistickou analýzou sme nepozorovali žiadne významné asociácie medzi expresiou CA IX a klinicko-morfologickými parametrami CRC. Na základe vysokej expresie a vlastností CA IX a pri zhodnutí príslušnej literatúry môžeme skonštatovať, že môže predstavovať nezávislý negatívny prognostický marker CRC. Pri hodnotení anti-apoptického proteínu survivinu sme zistili prevažne jadrovú, ale aj kombinovanú (jadrovú a cytoplazmovú) lokalizáciu imunoreakcie. Štatistickou analýzou sme zistili významné asociácie medzi vyšším vekom pacientov a strednou intenzitou imunoreakcie a medzi vysokým gradom a jadrovou lokalizáciou expresie a vysokým percentom survivin-pozitívnych buniek. Týmito výsledkami sa prikláňame k názoru, že pozitívna reakcia na survivin v jadre by mohla byť zlým prognostickým markerom CRC.

## Literatúra

1. Abd El-Hameed A (2005) Survivin expression in colorectal adenocarcinoma using tissue microarray. *J Egypt Natl Canc Inst* 17: 42-50
2. Adamkov M, Výbohová D, Tupá V et al. (2015) Expression and significance of survivin in colorectal high grade and low grade adenomas. *Acta Histochem* 117: 590 -594
3. Brennan DJ, Rexhepaj E, O'brien SL et al. (2008) Altered cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin is a prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14: 2681-2689
4. Cleven AH, Van Engeland M, Wouters BG et al. (2007) Stromal expression of hypoxia regulated proteins is an adverse prognostic factor in colorectal carcinomas. *Cell Oncol* 29: 229-240
5. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M (2015) Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *BioMed Res Int* 14
6. Hernandez JM, Farma JM, Coppola D et al. (2011) Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 10: 188-193
7. Ho N, Coomber BL (2016) Hexokinase II expression is correlated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Treat Commun* 6: 11-16
8. Hong YS, Cho HJ, Kim SY (2009) Carbonic anhydrase 9 is a predictive marker of survival benefit from lower dose of bevacizumab in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 9: 1-9



9. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD (2015) Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 141: 389-397
10. Krieg A, Werner Ta, Verde Pe et al. (2013) Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 8
11. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M et al. (2016) Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol* 22: 1745-1755
12. Na W, Jang SM, Jun YJ et al. (2009) Clinicopathologic significance of survivin expression in colorectal adenocarcinoma. *Basic Appl Pathol* 2: 94-100
13. Oh JW, Yang WI, Lee MJ et al. (2009) The prognostic significance of survivin expression in breast cancer. *J Breast Cancer* 12: 285-294
14. Ou YR, Jing GY, Wu Q et al. (2015) Expression of Tcf-4, MMP7 and Survivin in Colorectal Cancer and Its Clinical Significance. *J Sichuan Univ* 46: 554-559
15. Pastoreková S (2009) Molekulárna biológia rakoviny. VEDA & CVTI
16. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK et al. (1998) Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 153: 279-285
17. Saka B, Ekinci O, Dursun A et al. (2017) Clinicopathologic and prognostic significance of immunohistochemical expression of HIF-1 $\alpha$ , CXCR4 and CA9 in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract*, 213: 783-792
18. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M (2014) Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front Physiol* 4: 1-14
19. Stewart DJ, Nunez MI, Behrens C et al. (2014) Membrane carbonic anhydrase IX expression and relapse risk in resected stage I-II non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 9: 675-684
20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209-249
21. Takáčová M, Pastoreková S (2015) Nádorová hypoxia – molekulárne mechanizmy a klinický význam. *Klin Onkol* 28: 183-190
22. Viikilä P, Kivelä AJ, Mustonen H et al. (2016) Carbonic anhydrase enzymes II, VII, IX and XII in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 22: 8168-8177
23. Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waško R et al. (2012) Survivin-prognostic tumor biomarker in human neoplasms-review. *Ginekol Pol* 83: 537-540
24. Wang H, Jin S, Lu H et al. (2017) Expression of survivin, MUC2 and MUC5 in colorectal cancer and their association with clinicopathological characteristics. *Oncol Lett* 14: 1011-1016
25. Wu XY, Fu ZX, Wang XH (2010) Effect of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  on Survivin in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 3: 409-415

Práca bola financovaná z grantu VEGA 1/0129/16 a UK/98/2016.

# ENTERICKÝ NERVOVÝ SYSTÉM, MORFOLÓGIA, FUNKCIA A KLINICKÝ VÝZNAM

## ENTERIC NERVOUS SYSTEM, MORPHOLOGY, FUNCTION AND CLINICAL SIGNIFICANCE

Marianna Danková<sup>1</sup>, **Paulína Gálfiová**<sup>1</sup>, Miroslava Juríková<sup>1</sup>, Mária Lorencová<sup>1</sup>,  
Štefan Tóth<sup>2</sup>, Fagová Zuzana<sup>2</sup>, Miko Michal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav histológie a embryológie LFUK v Bratislave, Sasinkova 4, Bratislava

<sup>2</sup>Ústav histológie a embryológie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice

*paulina.galfiova@fmed.uniba.sk*

### Súhrn

Enterický nervový systém (ENS), sa považuje za samostatnú vetvu autonómneho nervového systému. ENS je lokalizovaný v orgánoch gastrointestinálneho traktu po celej jeho dĺžke ako rad vzájomne prepojených gangliových spletí. V tejto štúdii sme stručne zhrnuli hlavné charakteristiky v distribúcii štruktúr ENS v stene tenkého čreva. Dospeli sme k záveru, že je potrebné vyplniť túto "informačnú medzeru", čo zároveň môže pomôcť otvoriť nové „okno“ pre ďalší výskum v tejto oblasti. Dúfame, že informácie v tejto práci poslúžia ako podnet pre ďalšie štúdie zamerané nielen na morfológiu ENS, ale aj na štúdium ich fyziológie v čreve za patologických podmienok.

**Kľúčové slová:** enterický nervový systém, gastrointestinálny trakt, tenké črevo

### Summary

The enteric nervous system (ENS) is considered a separate part of the autonomic nervous system. The ENS is localized in the organs of the gastrointestinal tract along its length as a series of interconnected ganglionic plexuses. In this study, we have briefly summarised the main characteristics of the distribution of ENS structures in the wall of the small intestine. We conclude that there is a need to fill this "information gap", which may also help to open a new window for further research in this area. We hope that the information in this work will serve as a stimulus for further studies focusing not only on the morphology of ENS, but also on the study of their physiology in the intestine under pathological conditions.

**Key words:** enteric nervous system, gastrointestinal tract, small intestine

## Úvod

Gastrointestinálny trakt (GI) je inervovaný hustou sieťou nervových buniek, ktorá spolu s podpornými enterickými gliovými bunkami tvoria ENS. Táto sieť neurónov je usporiadaná v samostatných komplexoch, do dvoch hlavných spleťí - plexov. Jedným z nich je submukózný plexus (SP), ktorý sa delí na vnútorný submukózný (Meissnerov) plexus (MP), uložený pod vrstvou *lamina muscularis mucosae* a vonkajší plexus, ktorý nalieha v tesnej blízkosti na vrstvy hladkej svaloviny, *tunica muscularis*. Druhým je myenterický (Auerbachov) plexus, ktorý sa nachádza medzi podvrstvami svaloviny *tunica muscularis externa* steny čreva (1). Štruktúry ENS vývojovo pochádzajúce z neurálnej lišty predstavujú heterogénnu populáciu buniek, ktorá sa postupne s pribúdajúcim vekom mení, a tak sa vývoj ENS nezastaví narodením jedinca (2, 3, 4). V postnatálnom období ENS podlieha vnútorným aj vonkajším vplyvom (5). ENS komunikuje s centrálnym nervovým systémom prostredníctvom vagových parasympatických aj sympatických nervových dráh, pričom je uľahčená vagová aferentná signalizácia ENS svalových vrstiev a sliznice (6). ENS môže tak autonómne ovplyvňovať fyziológiu a funkciu celého gastrointestinálneho traktu. V ENS sa nachádzajú populácie neurónov, ktoré možno klasifikovať na základe ich funkcie a morfológie. Patria sem vnútorné senzorické neuróny, motorické neuróny (svalové, sekretomotorické a sekretomotorické/vazodilatácie) a enterické interneuróny, ktoré spoločne regulujú kľúčové funkcie GI traktu vrátane činnosti svaloviny čreva, peristaltiky a sekretomotorickej a vazomotorickej kontroly (7). Druhým typom buniek, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou ENS sú enterické gliové bunky, ktoré sa výrazne podieľajú na vyživovacej funkcii neurónov a podľa nových štúdií sa táto ich jednoduchá vyživovacia funkcia rozšírila aj o významnú úlohu regulácie zápalových procesov v čreve (8). Enterické gliové bunky v čreve predstavujú morfológický a funkčný ekvivalent astrocytov v centrálnom nervovom systéme. Podtypy enterických neurónov a enterické gliové bunky navzájom komunikujú.

## Materiál a metódy

Na morfológický obraz, detekciu a zastúpenie jednotlivých typov buniek je veľmi prospešná imunohistochemia. Ako už názov napovedá, imunohistochemia využíva kombináciu poznatkov z histológie, histochemie a imunológie. Výsledná technika je mocným nástrojom, ktorý nielenže umožňuje zistiť, či sú v danej bunke prítomné konkrétne antigény, ale umožňuje tiež

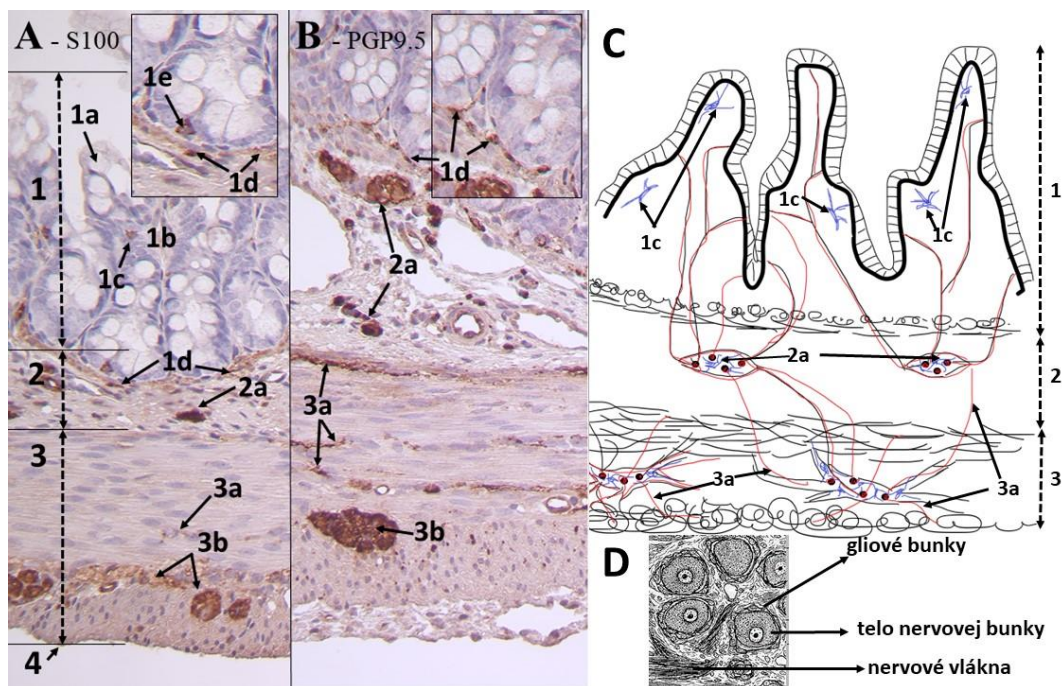
identifikovať mikroskopické (bunkové) umiestnenie a tým celkovú topografiu antigénu. Tieto schopnosti umožňujú identifikovať líniu bunkových populácií, čo je dôležité pri konfrontácii s bežnými základnými histologickými metódami. Táto technika je tiež užitočná pri definovaní odlišných populácií buniek v rámci tej istej línie a definovaní funkčných rozdielov. Okrem toho táto technika zachováva histologickú architektúru a umožňuje potvrdiť, že pozitívne bunky sú príslušné sledované a detailne analyzované bunky (9).

## **Výsledky a diskusia**

Enterické gliové bunky sú fenotypovo opísané ako bunky nepravidelného, hviezdicovitého tvaru, ktoré exprimujú špecifické neurogliové markery, ako napríklad S100-proteín viažuci vápnik (8), zatiaľ čo neuróny sú charakterizované ako tzv. dendritické neuróny s výraznou expresiou markerov PGP9.5 a synaptofyzínu. Na rozdiel od ostatných autonómnych vegetatívnych ganglií, kde sa bežne nachádzajú fibroblasty, makrofágy, mastocyty, kolagénové vlákna, cievy a chromafinné bunky, v enterických gangliách tieto štruktúry nie sú prítomné. Enterickým gangliám chýba aj tzv. perineurálne puzdro spojivového tkaniva a súvislý plášť satelitových buniek (10).

Enterické neuróny v SP a MP sú obklopené výlučne štruktúrami neuropilu v podobe črevných gliových buniek, ktoré sú imunohistochemicky pozitívne na S100 a výbežkami susedných nervových buniek, v ktorých sa zistila pozitivita na pan-neuronálny marker PGP9.5 (Obr. 1). Enterické neuróny tenkého čreva vykazujú imunopozitivitu aj na synaptofyzín (10). Zatiaľ čo enterické nervové bunky sú lokalizované predovšetkým v gangliách, enterické gliové bunky sú prítomné nielen v gangliách, kde tesne obklopujú telá neurónov, ale aj v blízkosti nervových vlákien oboch plexov a tiež aj v sliznici črevných klkov, kde zvyčajne nadväzujú úzke kontakty s vrstvou epitelových buniek (11).

Výbežky enterických gliových buniek sa často nachádzajú medzi myofibroblastami a bazálnou membránou epitelu sliznice v bezprostrednej blízkosti bázy jednotlivých Lieberkhünových krýpt. Enterické gliové bunky vysielajú dlhé, rozvetvené výbežky, z ktorých niektoré sa dotýkajú buniek sliznice, zatiaľ čo iné sa dotýkajú priamo krvných alebo lymfatických kapilár a majú tak významnú úlohu pri vytváraní difúznej bariéry okolo kapilár obklopujúcich gangliá podobnej hematoencefalickej bariére (12). Tieto viacsmerne interakcie zvyšujú možnosť, že enterické gliové bunky sliznice ovplyvňujú prenos a integráciu informácií medzi týmito štruktúrami (13).



**Obr. 1** Reprezentatívne mikrofotografie steny tenkého čreva a schémy. 1-tunica mucosa, 2-tela submucosa, 3-tunica muscularis externa, 4-tunica serosa. **A: Imunopozitivita S100.** 1a- epitel, 1b-lamina propria mucosae, 1c-pozitívne gliové bunky v lamina propria mucosae, 1d-pozitívne pretiahnuté fibrózne výbežky gliových buniek nachádzajúce sa v tesnej blízkosti epitelu hneď vedľa lamina muscularis mucosae, 1e - pozitívne enteroendokrinné bunky, 2a - silne pozitívne gliové bunky SP, 3a – tunica muscularis externa so sieťou nervových vlákien a terminálnych nervových zakončení, 3b - silne pozitívna cytoplazma buniek MP, 4a - mezotel viscerálnej pobrušnice. **B: Imunopozitivita PGP9.5.** 1d-pozitívne dlhé, vláknité štruktúry nachádzajúce sa v tesnej blízkosti epitelu vedľa lamina muscularis mucosae, 2a-pozitívne štruktúry SP, 3a-pozitívne nervové vlákna v tunica muscularis externa, 3b- silne pozitívne nervové bunky MP. **C: Schematicky znázornené rozloženie a celková mikroarchitektúra nervových a gliových buniek a ich výbežkov v rámci ENS.** 1c – gliové bunky s výbežkami v lamina propria mucosae, 2a – gliové bunky SP, 3a – nervové bunky ganglia so sieťou nervových vlákien a terminálnych nervových zakončení. **D: Schematické znázornenie ENS - detail.**

Rôzne zápalové ochorenia čreva spôsobujú významné zmeny motility, sekrécie a percepcie (14). Vzájomné pôsobenie medzi bunkami ENS a samotným zápalom príp. zápalovým ložiskom poukazuje na existenciu úzkych interakcií medzi ENS a črevnými imunitnými bunkami. V tomto scenári zohrávajú bunky ENS dôležitú úlohu pri črevnej priepustnosti, pretože extrémne prípady zápalu a nekrózy sa vyskytujú pri absencii funkcie gliových buniek. Pacienti s chronickým zápalovým ochorením čreva (IBD) vykazujú rôznu úroveň črevného zápalu a u niektorých pacientov s ťažkým syndrómom dráždivého čreva (IBS) sa uvádza črevná ganglionitída. Zvýšená črevná priepustnosť je zjavná u pacientov s Crohnovou chorobou, nekrotizujúcou enterokolitídou, diabetes mellitus a IBS. To je v súlade so skutočnosťou, že

symptómy IBS sú častejšie u pacientov s IBD ako v bežnej populácii. Celkovo sa zdá, že enterické gliové bunky sú potrebné na udržanie štrukturálnej a funkčnej integrity ENS, ako aj slizničnej bariéry.

Je tu vysoká pravdepodobnosť, že multifunkčné enterické neuróny spolupracujú s gliovými bunkami ENS, makrofágmi, intersticiálnymi bunkami a enteroendokrinnými bunkami, ktoré integrujú celý rad signálov, aby iniciovali výstupy, ktoré sú presne regulované v priestore a čase na kontrolu trávenia a črevnej homeostázy (15). Preto je veľmi dôležité do budúcnosti sa zaoberať štúdiom týchto procesov a možnosťami ich modifikácie v prospech zlepšenia života pacientov s rôznymi zápalovými ochoreniami tenkého čreva.

## Literatúra:

1. Furness JB (2006) The enteric nervous system. Blackwell Publishing Oxford , ISBN:9781405133760
2. Johnson LR, Barrett K, Ghishan FK, Merchant JL, Said HM, Wood JD (2006) Development of the enteric nervous system. *Physiol Gastrointest Tract* 1(4): 499-521
3. Faure C, Chalazonitis A, Rheume C (2007) Gangliogenesis in the enteric nervous system: roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Dev Dyn* 236: 44-59
4. Foong J, Nguyen T, Furness J, Bornstein J, Young H (2012) Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J Physiol* 590: 2375-2390
5. Gershon M (2012) The play is still being written on opening day: postnatal maturation of enteric neurons may provide an opening for early life mischief. *J Physiol* 590: 2185-2186
6. Holst MC, Kelly JB, Powley TL (1997) Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 381: 81-100
7. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho H. (2014) The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. *AEMB*, 817: 39-71
8. Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Turco F, Steardo L, Cuomo R (2011) S100B protein in the gut: The evidence for enteroglial sustained intestinal inflammation. *World J Gastroenterol* 17(10): 1261-1266
9. Hawes H, Shi SR, Dabbs DJ, Taylor CR, Cote RJ (2009) Immunohistochemistry. *Modern Surg Path* 1:48-70
10. Danková M, Tóth Š, Holodová M, Fagová Z, Čurgali K, Mechírová E, Mareta M, Nemcová R, Gancarčíková S, Polák Š (2022) Immunohistochemical visualisation of the enteric nervous system architecture in the germ-free piglets. *J Molec Histol* 53(4): 773-780
11. Rühl A (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 17: 777-790
12. Nezami BG, Srinivasan S (2010) Enteric Nervous System in the Small Intestine: Pathophysiology and Clinical Implications. *Curr Gastroenterol Rep* 12(5): 358-365
13. Bohórquez DV, Samsa LA, Roholt A, Medicetty S, Chandra R, Liddle RA (2014) An Enteroendocrine Cell – Enteric Glia Connection Revealed by 3D Electron Microscopy. *Plos one* 9(2): 89881
14. Keohane J, O'Mahony C, O'Mahony L (2010) Irritable bowel syndrome-type symptoms in patients with inflammatory bowel disease: a real association or reflection of occult inflammation? *Am J Gastroenterol* 105(8): 1788-1794
15. Sharkey KA, Mawe GM (2023) The enteric nervous system. *Physiol Rew* 103(2): 1487-1564

# HODNOTENIE ANGIOGÉNNÉHO POTENCIÁLU PÓROVITÉHO BIOMATERIÁLU POMOCOU PREPELIČIEHO *EX OVO*-CAM MODELU

## EVALUATION OF ANGIOGENIC POTENTIAL OF POROUS BIOMATERIAL BY *EX OVO*-QUAIL CAM MODEL

Zuzana Demčišáková<sup>1</sup>, Zuzana Tirpáková<sup>2</sup>, Lenka Luptáková<sup>2</sup>, Júlia Hurníková<sup>1</sup>,  
Lubomír Medvecký<sup>1,3</sup>, Eva Petrovová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Katedra biológie a fyziológie UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>3</sup>Ústav materiálového výskumu SAV, Watsonova 47, Košice

*zuzana.demcisakova@uvlf.sk*

### Súhrn

V posledných rokoch sa používanie modelu chorioalantoickej membrány (CAM) stáva integrálnou súčasťou procesu testovania biokompatibility pri vývoji inovatívnych materiálov určených pre regeneračné stratégie a aplikácie tkanivového inžinierstva. V predkladanej štúdií sme použili CAM model na hodnotenie angiogénneho potenciálu acelulárneho materiálu na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu (PHB/CHIT) určeného pre klinické použitie v oblasti regenerácie defektov tvrdých tkanív, v závislosti od prídania rastového faktora (VEGF-A), fyziologického roztoku (PHY) a endogénneho inhibítora angiogenézy (angiostatín). Na 6. embryonálny deň bol testovaný materiál implantovaný na CAM samostatne alebo s prídavkom VEGF-A, PHY a angiostatínu. Prítomnosť krvných ciev v póroch implantátu a v okolitej CAM bola analyzovaná 72 hodín od implantácie materiálu. Morfológická analýza potvrdila angiogénny potenciál neošetreného materiálu bez potreby stimulácie angiogenézy pro-angiogénnym faktorom VEGF-A. Najnižší angiogénny potenciál bol pozorovaný v materiáli po pridaní angiostatínu. Dospeli sme k záveru, že PHB/CHIT má silný endogénny angiogénny potenciál a mohol by byť sľubným materiálom pri liečbe defektov tvrdých tkanív.

**Kľúčové slová:** angiogenéza, biokompatibilita, chorioalantoická membrána, regeneračná medicína, vtáče embryo

## Summary

In recent years, the use of the chorioallantoic membrane (CAM) model has become an integral part of the biocompatibility testing process in the development of innovative materials for regenerative strategies and tissue engineering applications. In the present study, we used the CAM model to evaluate the angiogenic potential of an acellular material based on polyhydroxybutyrate and chitosan (PHB/CHIT) intended for clinical use in the field of regeneration of hard tissue defects, depending on the addition of growth factor (VEGF-A), physiological solution (PHY) and an endogenous angiogenesis inhibitor (angiostatin). On the 6th embryonic day, the tested material was implanted on the CAM alone or with the addition of VEGF-A, PHY and angiostatin. The presence of blood vessels in the pores of the implant and in the surrounding CAM was analysed 72 hours after implantation of the material. Morphological analysis confirmed the angiogenic potential of the untreated material without the need to stimulate angiogenesis by adding the pro-angiogenic factor VEGF-A. The lowest angiogenic potential was observed in the material after the addition of angiostatin. We concluded that PHB/CHIT has a strong endogenous angiogenic potential and could be a promising material in the treatment of hard tissue defects.

**Key words:** angiogenesis, biocompatibility, chorioallantoic membrane, regenerative medicine, avian embryo

## Úvod

Vtáčia chorioalantoická membrána (CAM) je extraembryonálna membrána, ktorá vzniká fúziou dvoch extraembryonálnych membrán, chorionu a alantoisu, na štvrtý deň embryonálneho vývinu (ED4) (4). Predstavuje primárny respiračný a exkretčný orgán vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya, ktorý sa v priebehu embryonálneho vývinu podieľa na transporte sodíka a chloridu z alantoisu, transporte vápnika z vaječnej škrupiny do embryonálnej vaskulatúry, udržiava homeostázu, formuje stenu alantoisového vaku, a podieľa sa na spätnej resorpcii vody a iónov z alantoisu (12). Z hľadiska histologickej štruktúry je tvorená tromi vrstvami, a to vrstvou chorionu, mezenchýmu a alantoisu. Vrstva chorionu je tvorená epitelovými bunkami ektodermálneho pôvodu priliehajúcimi na vnútornú podškrupinovú membránu. Strednú vrstvu tvorí vysokovaskularizované tkanivo mezenchýmu, ktoré vzniká fúziou mezodermálnych vrstiev chorionu a alantoisu. Alantois, derivát endodermy, je tvorený vrstvou skvamózných, fibroblastom podobných buniek, a je lokalizovaný najhlbšie v CAM (7, 8, 15). CAM reprezentuje alternatívny animálny model, ktorý predstavuje



medzistupeň medzi jednoduchým *in vitro* a komplexným *in vivo* modelovým systémom, ktorého použitie na experimentálne účely je v súlade s princípmi 3R (3). Uplatnenie nachádza najmä v oblasti bioinžinierstva, v štúdiu tkanivových transplantátov, nádorovej biológie a genomiky (5). V rámci štúdie sme hodnotili angiogénnu odpoveď CAM prepeličieho embrya po implantovaní acelulárneho materiálu na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu, určeného pre klinické použitie v oblasti regenerácie tvrdých tkanív, ako nevyhnutného predpokladu stanovenia biologickej kompatibility.

## **Materiál a metódy**

Polyhydroxybutyrát-chitosanový kompozit (PHB/CHIT) bol pripravený podľa metódy Medvecký a kol. (10). Na posúdenie biokompatibility a angiogénneho potenciálu testovaného materiálu na CAM sme použili modifikovanú metódu podľa Ribatti a kol. (13). Oplodnené vajcia prepelice japonskej (*Coturnix coturnix japonica*, n = 158) boli získané a transportované z farmy Malá Ida (Košice, Slovensko). Následne boli umiestnené za štandardných inkubačných podmienok ( $38,2 \pm 0,5$  °C, 58 % relatívna vlhkosť) do liahne s núteným obehom a konštantnou vlhkosťou vzduchu. Po 56. hodinách od začiatku inkubácie boli vajcia z liahne vybrané, otvorené a embryá vyklopené do sterilných 6-jamkových kultivačných platní (TPP, Švajčiarsko) technikou *ex ovo*. Vyklopené prepeličie embryá sme následne vrátili späť do liahne, kde boli inkubované za konštantných inkubačných podmienok ( $38,2 \pm 0,5$  °C, 60 % relatívna vlhkosť) až do dňa implantácie materiálu. Na ED6 bol testovaný materiál (PHB/CHIT, 2x2x1 mm) implantovaný na povrch CAM samostatne/alebo vopred ošetrovaný vo fyziologickom roztoku (PHB/CHIT+PHY, Sodium Chloride 0,9 %), s prídavkom rastového faktora VEGF-A (PHB/CHIT+VEGF-A, aplikačná dávka 25 ng/mL PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a inhibítora angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN, 47 µg/mL PBS, Human Angiostatin, Prolytix, Burlington, VT, USA). Testované materiály sme vyšetrovali vo vzťahu biokompatibility k okolitým cievam CAM na ED9. Hodnotená bola vaskularizácia CAM v okolí implantovaného biomateriálu a vaskulárny index, teda rozdiel medzi počtom krvných ciev prítomných v okolí implantovaného PHB/CHIT v deň implantácie a počtom krvných ciev vrastajúcich do PHB/CHIT po 72. hodinách od implantácie. Fotodokumentácia ciev chorioalantoickej membrány bola získaná použitím stereomikroskopu Olympus SZ61 (Tokio, Japonsko) a digitálnej kamery PROMICAM 3 (Praha, Česká republika). Morfometrickú analýzu histologických rezov sme vykonali s použitím svetelného mikroskopu Olympus CX43 (Tokio, Japonsko) s digitálnou kamerou PROMICAM 3-5CP+ (Praha, Česká republika).

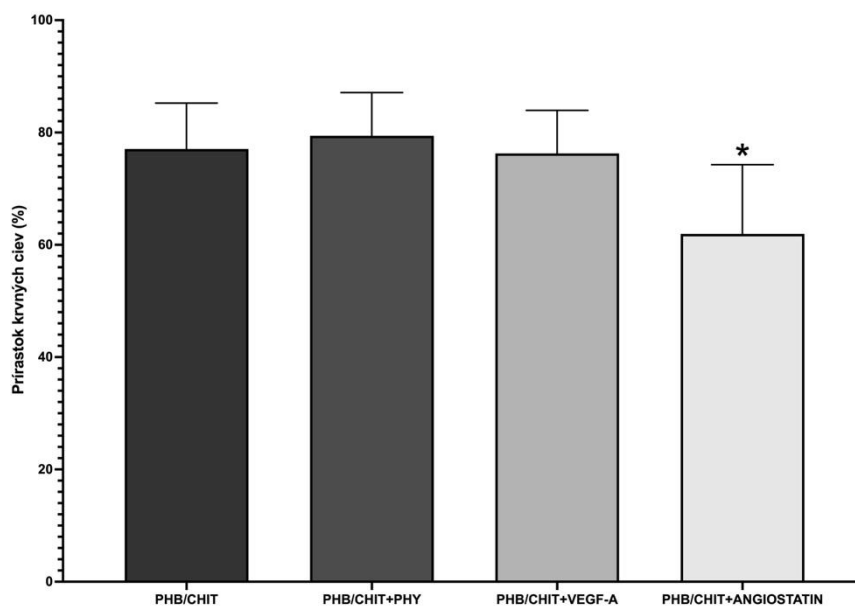
V parafínových rezoch (7  $\mu\text{m}$ ) ofarbených metódou hematoxylín-eozín/Alcianová modrá sme hodnotili počet ciev CAM vrastajúcich do biomateriálu, resp. prítomných v okolí implantovaného biomateriálu. Získané údaje sme štatisticky analyzovali pomocou štatistického programu GraphPad Prism 10 (jednocestná ANOVA, Šidákov test). Výsledky sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SD (štandardná odchýlka) z troch nezávislých experimentov. Hodnoty  $p < 0,001$  boli považované za štatisticky významné.

## Výsledky

Biokompatibilitu testovaného acelulárneho biomateriálu sme hodnotili na základe jeho *in vivo* angiogénnej aktivity pomocou CAM modelu prepeličieho embrya. Hodnotenie *in vivo* angiogénnej aktivity testovaného PHB/CHIT s použitím vaskulárneho indexu ukázalo vyšší angiogénny potenciál v materiáli ošetrenom fyziologickým roztokom (PHB/CHIT+PHY,  $79,42 \pm 7,69$  %) v porovnaní s PHB/CHIT+VEGF-A ( $76,27 \pm 7,68$  %) a neošetreným PHB/CHIT ( $77,05 \pm 8,20$  %). Signifikantne nižší prírastok v počte novovytvorených krvných ciev v okolí PHB/CHIT bol pozorovaný po jeho ošetrení endogénnym inhibítorom angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN,  $61,95 \pm 12,33$  %; Tab. 1 a Graf 1).

Materiál	Vaskulárny index [%]
PHB/CHIT	$77,05 \pm 8,20$
PHB/CHIT+PHY	$79,42 \pm 7,69$
PHB/CHIT+VEGF-A	$76,27 \pm 7,68$
PHB/CHIT+ANGIOSTATIN	$61,95 \pm 12,33$

**Tab. 1** Vaskulárny index vyjadrený ako rozdiel medzi počtom krvných ciev v okolí materiálu v čase aplikácie (ED6) a 72 hodín od implantácie PHB/CHIT (ED9). Výsledky sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SD z troch nezávislých experimentov; biologické replikáty: PHB/CHIT:  $n = 40$ , PHB/CHIT+PHY:  $n = 40$ , PHB/CHIT+VEGF-A:  $n = 40$ , PHB/CHIT+ANGIOSTATIN:  $n = 38$ , technické replikáty: 2 obrázky pre každý biologický replikát. PHB/CHIT: neošetrený materiál; PHB/CHIT+PHY: materiál ošetrený vo fyziologickom roztoku; PHB/CHIT+VEGF-A: materiál ošetrený s vaskulárnym endotelovým rastovým faktorom A; PHB/CHIT+ANGIOSTATIN: materiál ošetrený s inhibítorom angiogenézy.



**Graf 1** Angiogénny potenciál PHB/CHIT hodnotený vaskulárnym indexom. \*  $p < 0,001$ .

Morfometrická analýza počtu krvných ciev detegovaných v okolí implantovaného materiálu, resp. priamo vrastajúcich do materiálu, nepreukázala signifikantne významné rozdiely v počte krvných ciev v neošetrenom PHB/CHIT ( $43,06 \pm 5,96$ ) v porovnaní s materiálom, ktorý bol ošetrený pridaním pro-angiogénneho faktora VEGF-A (PHB/CHIT+VEGF-A,  $43,83 \pm 6,12$ ) a PHY ( $39,11 \pm 2,08$ ). Najnižší angiogénny potenciál bol pozorovaný v materiáli po pridaní endogénneho inhibítora angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN,  $31,61 \pm 4,98$ ; Tab. 2 a Graf 2).

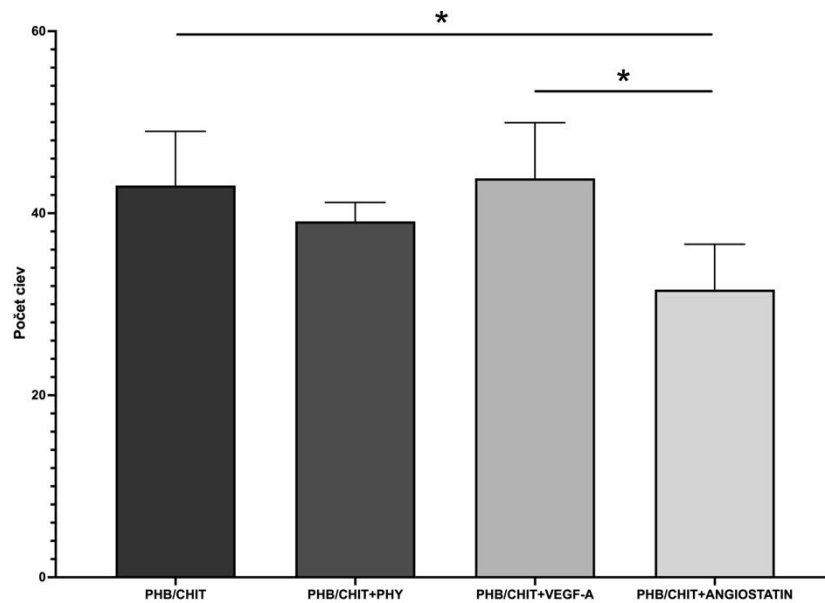
<b>Materiál</b>	<b>Počet ciev</b>
PHB/CHIT	$43,06 \pm 5,96$
PHB/CHIT+PHY	$39,11 \pm 2,08$
PHB/CHIT+VEGF-A	$43,83 \pm 6,12$
PHB/CHIT+ANGIOSTATIN	$31,61 \pm 4,98$

**Tab. 2** Počet krvných ciev v okolí PHB/CHIT 72 hodín po implantácii (ED9). Výsledky sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SD z troch nezávislých experimentov; biologické replikáty:  $n = 6$ , technické replikáty:  $n = 120$ .

PHB/CHIT: neošetrený materiál; PHB/CHIT+PHY: materiál ošetrený vo fyziologickom roztoku;

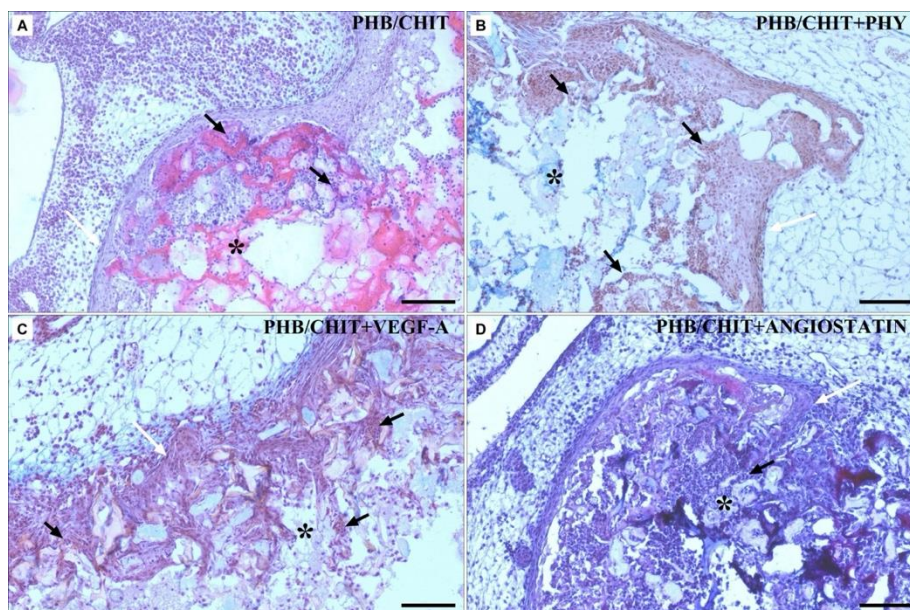
PHB/CHIT+VEGF-A: materiál ošetrený s vaskulárnym endotelovým rastovým faktorom A;

PHB/CHIT+ANGIOSTATIN: materiál ošetrený s inhibítorm angiogenézy.



**Graf 2** Morfometrická analýza počtu krvných ciev v okolí implantátu hodnotená na ED9. \*  $p < 0,001$ .

Histologickou analýzou angiogénnej odpovede CAM na implantovaný PHB/CHIT (Obr. 1) sme detegovali prítomnosť epitelových buniek ektodermu CAM v blízkosti materiálu.



**Obr. 1** Histologické hodnotenie angiogénnej odpovede tkaniva CAM 72 hodín od aplikácie PHB/CHIT (A) PHB/CHIT+PHY (B), PHB/CHIT+VEGF-A (C) a PHB/CHIT+ANGIOSTATIN (D); PHB/CHIT (\*) implantovaný na povrch prepeličej CAM; krvné cievy CAM vrastajúce do materiálu (čierna šípka); potvrdenie prítomnosti vrastania novovytvoreného tkaniva CAM do implantátov (biela šípka) farbenie: H-E/Alcianová modrá; mierka: 100  $\mu\text{m}$  (biologické replikáty: 6 vzoriek na skupinu, technické replikáty: 60 na skupinu).

Pozorovaná bola inkorporácia mikroklkov tkaniva CAM do materiálu, čo naznačuje dobrú biokompatibilitu a bioaktivitu testovaného materiálu so živým tkanivom.

Materiál ošetrený pridaním endogénneho inhibítora angiogenézy vykazoval morfológické odlišnosti okolitého CAM tkaniva, prejavujúcich sa predovšetkým v počte novovytvorených krvných ciev.

## Diskusia

Chorioalantoická membrána vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya predstavuje v súčasnosti ľahko dostupný a cenovo efektívny alternatívny modelový systém, ktorý je vďaka rozsiahlej vaskularizácii vhodné použiť nielen ako experimentálny model na štúdium angiogenézy, ale aj na predklinické testovanie biokompatibility a funkčnosti materiálov (1, 6). Umožňuje rýchly dôkaz prerastania krvných ciev do materiálu pred jeho testovaním v podmienkach *in vivo* na zvieratách, a hodnotí tak jeho regeneračnú schopnosť z hľadiska angiogenézy a biokompatibility (9). Biokompatibilitu testovaného acelulárneho PHB/CHIT sme posudzovali na základe hodnotenia *in vivo* angiogénnej aktivity PHB/CHIT pomocou CAM modelu prepelice japonskej, v závislosti od ošetrenia materiálu fyziologickým roztokom, pridaním pro-angiogénneho rastového faktora VEGF-A a endogénneho inhibítora angiogenézy. Angiogénna aktivita s využitím konvenčne používaného kuracieho CAM modelu bola skúmaná ako odpoveď na rôzne biologické aj nebiologické materiály (napr. celulóza, fibrín, kolagén a želatína; 16), rastové faktory (napr. VEGF-A, VEGF-C, FGF-2), cytokíny, hormóny, lieky, tkanivové extrakty (9) a polymérne nosiče (viskózna a želatínová špongia, agaróza a polyakrylamidový gél; 11). CAM model, ako *in ovo* metóda na hodnotenie tkanivovej odpovede, bol použitý pri testovaní biomateriálov na báze kolagénu, poly-2-hydroxyetylmetakrylátového polyméru, polykaprolaktónu, matricových hydrogélů a bioaktívneho skla (2). Materiály sa líšia schopnosťou ovplyvniť angiogénnu odpoveď CAM predovšetkým na základe rozličnej povrchovej aktivity, ako aj odlišných fyzikálno-chemických charakteristík. Niektoré materiály (homogénne) pôsobia angiogénne, a teda podporujú tvorbu nových krvných ciev, iné (nehomogénne) môžu pôsobiť antiangiogénne. Antiangiogénny účinok sa prejaví inhibíciou vzniku, resp. rastu nových krvných ciev (16). Z dôležitých chemických charakteristík ovplyvňujúcich biokompatibilitu a angiogénny potenciál testovaného materiálu, je rozhodujúca jeho pórovitosť. Veľkosť pórov materiálu ovplyvňuje mobilitu a diferenciáciu buniek, čím priamo vplýva jeho vaskularizáciu. Nízka pórovitosť a malý priemer pórov (menej ako 26  $\mu\text{m}$ ) pôsobia na bunkovú penetráciu negatívne. Vysoká

pórovitosť materiálu (96 %) a stredná veľkosť pórov (26-28  $\mu\text{m}$ ) rast tkaniva a krvných ciev podporuje (14). Testovaný acelulárny PHB/CHIT sa vyznačoval vysokou pórovitosťou, pričom 90 % všetkých pórov dosahovalo priemer menej ako 100  $\mu\text{m}$ , a len 5 % pórov malo priemer väčší ako 200  $\mu\text{m}$  (2).

## Záver

Vtáacie embryo predstavuje v súčasnej dobe ľahko dostupný a cenovo efektívny modelový systém. V rámci štúdie sme overili využiteľnosť modelu prepeličej CAM ako alternatívy ku konvenčne používanému modelu kuracej CAM pre posúdenie biokompatibility acelulárneho pórovitého PHB/CHIT kompozitu, určeného pre klinické využitie v oblasti regenerácie tvrdých tkanív. Pri posudzovaní biokompatibility sme vychádzali z ukazovateľa, ktorým bol angiogénny potenciál testovaného materiálu. Najvyšší angiogénny potenciál sme pozorovali v materiáli, ktorý bol ošetrovaný fyziologickým roztokom, čím sa zmenou veľkosti pórov vytvorili vhodné podmienky pre vrastanie ciev. Sledovali sme reakciu tkaniva CAM v okolí implantovaného materiálu, ako aj prítomnosť novovytvorených krvných ciev vo vnútri kompozitu, ako znaku biokompatibility a bioaktivity materiálu. Detekcia zmien v procese angiogenézy robí z tohto modelu vhodný modelový systém pre rýchly skrining biokompatibility materiálov špeciálne navrhnutých pre oblasť tkanivového inžinierstva pred ich použitím na vyšších stavovcoch ako experimentálnych zvieratách.

## Literatúra

1. Baiguera S, Macchiarini P, Ribatti D (2012) Chorioallantoic membrane for In vivo investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100: 1425-1434
2. Giretová M et al. (2019) Polyhydroxybutyrate/Chitosan 3D Scaffolds Promote In Vitro and In Vivo Chondrogenesis. *Appl Biochem Biotech* 189: 556-575
3. Chen L, Wang S, Feng Y, Zhang J, Du Y, Zhang J, Ongeval CHV, Ni Y, Li Y (2021) Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research. *Cells* 10: 463
4. Kundekova B, Macajova M, Meta M, Cavarga I, Bilcik B (2021) Chorioallantoic membrane models of various avian species: differences and applications. *Biology* 10: 301
5. Liu M, Xie S, Zhou J (2018) Use of animal models for the imaging and quantification of angiogenesis. *Experimental Animals* 67: 1-6
6. Maina JN (2017) Structure and Function of the Shell and the Chorioallantoic Membrane of the Avian Egg: Embryonic Respiration. Springer International Publishing, New York
7. Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V (2016) Dynamics of the developing chick chorioallantoic membrane assessed by stereology, allometry, immunohistochemistry and molecular analysis. *Plos One* 11/4: e0152821
8. Maksimov VF, Korostyshevskaya IM, Kurganov SA (2006) Functional morphology of chorioallantoic vascular network in chicken. *Bull Exp Biol Med* 142: 367-371
9. Mangir N, Dikici S, Claeysens F, MacNeil S (2019) Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. *ASC Biomater Sci Eng* 5: 3190-3200

10. Medvecký Ľ et al. (2013) Properties and in vitro characterization of polyhydroxybutyrate–chitosan scaffolds prepared by modified precipitation method. *J Mater Sci: Mater Med* 25: 777789
11. Oates MR et al. (2007) The angiogenic potential of three-dimensional open porous synthetic matrix materials. *Biomaterials* 28: 36793686
12. Ribatti D (2017) The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol* 70: 97-101
13. Ribatti D et al. (2006) The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc* 1: 85-91
14. Samourides A, Browning L, Hearnden V, Chen B (2020) The effect of porous structure on the cell proliferation, tissue ingrowth and angiogenic properties of poly(glycerol sebacate urethane) scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 108: 110384
15. Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F (2002) The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 62: 273-282
16. Zwaldo-Klarwasser G et al. (2001) The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J Mater Sci: Mater Med* 12: 195-199

Publikácia vznikla za finančnej podpory projektov *APVV-20-0073*, *VEGA 1/0074/24* a *IGA UVLF 14/2023* „Štúdium angiogénnej odpovede ciev chorioalantoickej membrány vtáčieho embrya vo vzťahu k vybraným inovatívnym biomateriálom určených pre regeneračnú medicínu“.

# NEURONÁLNA REGULÁCIA NEUROGENÉZY V ČUCHOVEJ NEUROGÉNNEJ OBLASTI POTKANA

## NEURONAL REGULATION OF NEUROGENESIS IN THE RAT OLFACTORY NEUROGENIC REGION.

**Kamila Fabianová**, Marcela Martončíková, Ivo Vanický, Juraj Blaško,  
Alexandra Popovičová, Enikő Račeková  
Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Šoltésovej 4, Košice  
*fabianova@saske.sk*

### Súhrn

Regulačné mechanizmy postnatálnej neurogenézy v subventrikulárnej zóne (SVZ) a rostrálnej migračnej dráhe (RMS) nie sú stále objasnené. Nedávne dôkazy naznačujú, že neurogenéza by mohla byť regulovaná neurónmi umiestnenými priamo v týchto oblastiach. V SVZ/RMS boli identifikované dve bunkové populácie zrelých neurónov. Aby sme otestovali hypotézu, že zrelé neuróny SVZ/RMS posielajú svoje axóny do striata, podali sme do tejto cieľovej štruktúry mozgu retrográdny fluorescenčný značkovač Fluoro-Gold (F-G). Na overenie identity zrelých neurónov sme použili dvojité imunofluorescenčné značenie. Mikroskopická analýza odhalila prítomnosť F-G podaného do striata v bunkách rôznych častí SVZ/RMS, čo naznačuje existenciu neurónového okruhu, v ktorom sú zapojené zrelé neuróny SVZ/RMS.

**Kľúčové slová:** postnatálna neurogenéza, Fluoro-Gold, nitrergické bunky

### Summary

Regulatory mechanisms of postnatal neurogenesis in the subventricular zone (SVZ) and the rostral migratory stream (RMS) are still not fully understood. Recent evidence suggests that neurogenesis could be regulated by neurons located directly in these regions. In the SVZ/RMS two cell populations of mature neurons have been identified. To test the hypothesis that mature neurons of the SVZ/RMS send their axons into the striatum, we injected this target brain structure with retrograde fluorescent tracer Fluoro-Gold (F-G). To verify the identity of mature neurons double immunofluorescent labeling was used. Microscopic analysis revealed the presence of F-G, administered into the striatum, in cells of different parts of the SVZ/RMS,



indicating the existence of a neuronal circuit in which NO producing and SCGN expressing neurons are involved.

**Key words:** postnatal neurogenesis, Fluoro-Gold, nitrenergic cells

## Úvod

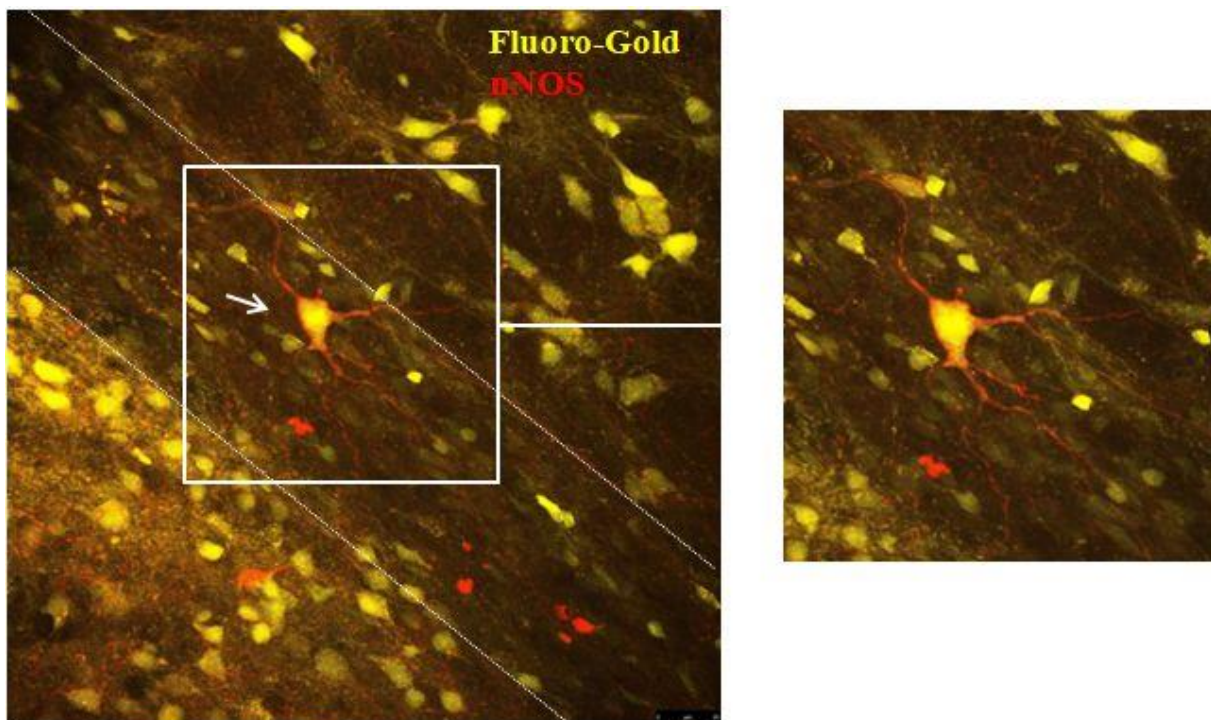
Postnatálna neurogenéza v čuchovej neurogénnej oblasti, teda v oblasti tvorenej subventrikulárnou zónou (SVZ)-rostrálnou migračnou dráhou (RMS)- čuchovým bulbom (BO) je komplexný proces, ktorý zahŕňa rôzne fázy neuronálnej maturácie vrátane proliferácie progenitorov, diferenciácie, migrácie a integrácie novovzniknutých buniek do nervových okruhov. Napriek intenzívnemu výskumu, regulačné mechanizmy neurogenézy v SVZ-RMS-BO ostávajú stále nedostatočne vysvetlené. Najnovšie zistenia poukazujú na to, že neurogenéza v dospelosti by mohla byť regulovaná neurónmi nachádzajúcimi sa priamo v neurogénnej oblasti, pričom neurónové okruhy, do ktorých sú zapojené neboli doposiaľ identifikované (1, 2, 3). V predošlých experimentoch sme zistili, že SVZ/RMS obsahuje populáciu buniek produkujúcich NO, ktoré vykazujú morfológické charakteristiky zrelých neurónov (4, 5). Neskôr sme dokázali pomocou imunohistochemického značenia, že zrelé nitrenergické neuróny vytvárajú synaptické spojenia, čo poukazuje na ich zapojenie v existujúcich neurónových okruhoch (1). Cieľom našej práce bolo zmapovať projekcie zrelých neurónov nachádzajúcich sa v SVZ/RMS dospelého potkana.

## Materiál a metódy

V experimente sme použili dospelé samce potkanov kmeňa Wistar albino (n=12). Na zisťovanie prepojenia zrelých neurónov SVZ/RMS s okolitými mozgovými štruktúrami sme pomocou stereotaktického aparátu potkanom anestetizovaným Isofluranom podali retrográdny fluorescenčný značkovač F-G do striata v koordinátach (ML-1,4 mm; AP-1,8 mm; DV-5,5 mm). Pomocou Hamiltonovej striekačky sme tenkou sklenenou kapilárou, napojenou na striekačku, podali 0,7  $\mu$ l 2,5% F-G unilaterálne do oblasti striata nachádzajúcej sa v blízkosti RMS. Po podaní značkovača zvieratá prežívali 5 dní. Následne boli zvieratá transkardiálne prepláchnuté fyziologickým roztokom a 4% paraformaldehydrom. Mozog bol nakrájaný sagitálne na 30  $\mu$ m rezy. Na overenie identity nitrenergických neurónov sme použili imunofluorescenčné značenie pomocou protilátky anti-nNOS (neurónová izoforma syntetázy oxidu dusnatého) a protilátky anti-SCGN. Rezy sme analyzovali v konfokálnom mikroskope.

## Výsledky a diskusia

RMS dospelých potkanov vyzerá ako pruh buniek v tvare písmena „L“, ktorý sa tiahne od SVZ laterálnej komory až po BO. V kaudo-rostrálnom smere sú ľahko odlišiteľné jednotlivé anatomické časti RMS: vertikálne rameno, ohyb a horizontálne rameno. Už skôr sme dokázali, že neuróny produkujúce NO sa nachádzajú hlavne v kaudálnej časti RMS, t.j. v časti priamo vychádzajúcej zo SVZ a pokračujúcej medzi striatom a corpus callosum, nazývanej vertikálne rameno RMS (1). Po podaní F-G do striata, analýza v konfokálnom mikroskope potvrdila prítomnosť F-G pozitívnych buniek v SVZ aj v rôznych častiach RMS (Obr. 1). Pomocou imunohistochemického značenia anti-nNOS a anti-SCGN sme F-G označené bunky v SVZ, vo vertikálnom ramene a v ohybe RMS identifikovali ako nitregické neuróny (Obr. 1), alebo SCGN-produkujúce neuróny. V SVZ/RMS sa nachádzali aj F-G pozitívne bunky, ktoré neboli ani nNOS pozitívne, ani SCGN pozitívne, a teda predpokladáme, že v SVZ/RMS sa nachádza aj iná populácia neurónov, ktorá je prepojená so striatom.



**Obr. 1** Mikrofotografia sagitálneho rezu mozgu potkana spracovaného imunohistochemickou metódou pomocou protilátky nNOS. Na mikrofotografii z konfokálneho mikroskopu je znázornená kolokalizácia nNOS značenia (nitregické neuróny, červené) so značením Fluoro-Gold (žlté) v neurónoch vertikálneho ramena RMS (označené šípkou). RMS je vyznačené bodkovanými líniami.

## Záver

Naše výsledky o prepojení zrelých neurónov SVZ a RMS so štruktúrou striata naznačujú existenciu nervového okruhu, ktorý môže byť zapojený do regulácie neurogenézy.

## Literatúra

1. Blaško J, Fabianová K, Martončíková M, Sopková D, Račeková E (2013) Immunohistochemical evidence for the presence of the synaptic connections of nitregic neurons in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol* 33: 753-757
2. Hanics J, Szodorai E, Tortoriello G, Malenczyk K, Keimpema E, Lubec G, Hevesi Z, Lutz MI, Kozsurek M, Puskár Z, Tóth ZE, Wagner L, Kovács GG, Hökfelt TGM, Harkany T, Alpár A (2017) Secretagogin-dependent matrix metalloprotease-2 release from neurons regulates neuroblasts migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 2006-2015
3. Paez-Gonzales P, Asrican B, Rodriguez E, Kuo CT (2014) Identification of distinct ChAT+ neurons and activitydependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat Neurosci* 17: 934-942
4. Račeková E, Orendáčová J, Martončíková M, Vanický I (2003) NADPH-diaphorase positivity in the rostral migratory stream of the developing rat. *Dev Brain Res* 146: 131-134
5. Račeková E, Martončíková M, Mitrušková B, Čížková D, Orendáčová J (2005) Age-related changes of NADPH-diaphorase positivity in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol* 25: 1093-1105

Grantová podpora *VEGA 2/0119/22* a *APVV-19-0279*.

# NOVÝ BIOCEMENT S PRÍDAVKOM MEDU PRE REGENERATÍVNU MEDICÍNU

## NOVEL BIOCEMENT WITH HONEY ADDITION FOR REGENERATIVE MEDICINE

Mária Giretová<sup>1</sup>, Ľubomír Medvecký<sup>1</sup>, Radoslava Štulajterová<sup>1</sup>, Tibor Sopčák<sup>1</sup>,  
Lenka Luptáková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav materiálového výskumu SAV v.v.i., Watsonova 47, Košice

<sup>2</sup>Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

*mgiretova@saske.sk*

### Súhrn

Nové biocementy na báze práškovej zmesi fosforečnan vápenatý/monetit (TTCPM) S prídavkom medu boli pripravené zmiešaním práškovej a medovej tekutej zložky v necytotoxickkej koncentrácii medu. Zmes cementového prášku sa úplne premenila na nanohydroxyapatit s deficitom vápnika po 24 hodinách tuhnutia v simulovanej telesnej tekutine. Pevnosť medovo-cementových kompozitov v tlaku bola znížená s obsahom medu v cemente. Testovanie cytotoxicity in vitro potvrdilo necytotoxický charakter extraktov z kompozitného biocementu a pridanie medu podporovalo aktivitu alkalickéj fosfatázy (ALP), tvorbu vápnikových depozitov a upreguláciu osteogénnych génov (osteopontín, osteokalcín a osteonektín) mezenchymovými kmeňovými bunkami, čo dokazuje pozitívny synergický účinok medu a kalcium fosfátov na bioaktivitu cementov, ktoré by mohli byť sľubnými terapeutickými kandidátmi na opravu kostných defektov.

**Kľúčové slová:** monetit, med, osteoblasty, mezenchymové kmeňové bunky

### Summary

New biocements based on a powdered mixture of calcium phosphate/monetite (TTCPM) with the addition of honey were prepared by mixing the powder and honey liquid components in a non-cytotoxic concentration of honey. The cement powder mixture was completely transformed into calcium-deficient nanohydroxyapatite after 24 hours of hardening in simulated body fluid. The compressive strength of honey-cements was reduced with the content of honey in the

cement. In vitro cytotoxicity testing confirmed the non-cytotoxic nature of biocements extracts, and the addition of honey promoted alkaline phosphatase activity, calcium deposit formation, and upregulation of osteogenic genes (osteopontin, osteocalcin, and osteonectin) by mesenchymal stem cells, demonstrating the positive synergistic effect of honey and CPC on the bioactivity of cements that could be promising therapeutic candidates for bone defect repair.

**Key words:** monetite, honey, osteoblasts, mesenchymal stem cells

## Úvod

Veľké kostné defekty nepodliehajú spontánnej oprave reparačnými mechanizmami organizmu a potrebujú pomoc zvonku vo forme štepov alebo skafoldov s príslušnými biologickými a mechanickými vlastnosťami (najlepšie doplnené o bunky a rastové faktory) (1,2). Kalciumfosfátové cementy (CPC) patria do významnej triedy biomateriálov, ktoré sa vyznačujú vynikajúcou biokompatibilitou a osteokonduktivitou, necytotoxicitou a bioresorpciou, čo ich predurčuje na možné využitie v ľudskom organizme na opravu a náhradu kostí (3).

Včelí med je jednou z najkomplexnejších prírodných potravín a obsahuje viac ako 200 látok; jeho zloženie závisí od jeho botanického a geografického pôvodu (4). Med stimuluje hojenie rán a popálenín a je účinný aj pri liečbe infikovaných rán (5).

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť vlastnosti nového kompozitného cementu na báze TTCP/monetit cementu s prídavkom medu, kde fosforečnany vápenaté podporujú bioaktivitu buniek prostredníctvom vápnikových a fosforečnanových iónov a na druhej strane med môže ovplyvniť správanie buniek z hľadiska ich osteogénnej aktivity, ako aj antibakteriálnych a antioxidantných vlastností cementu vďaka prítomnosti špecifických zložiek medu, ako sú polyfenoly a flavonoidy. Vplyv prídavku medu (dva druhy medu) na proces tuhnutia, in vitro cytotoxicitu cementov a osteogénnu aktivitu buniek kultivovaných v cementových extraktach bol stanovený.

## Materiál a metódy

### Príprava cementových pást

Kvapalnou zložkou na prípravu cementových pást bol 2% roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (analytická kvalita, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko), v tomto roztoku boli rozpustené aj medy. Dva druhy lekárskeho medu, ktoré boli vybrané na použitie v našej štúdiu, boli med na báze manuky (Activon®, Advancis medical, Nottinghamshire, Spojené kráľovstvo) a med (Vivamel®, Tosama, Domžale, Slovinsko). Obsahy dvoch druhov medu v tekutej zložke boli 5 % (w/v);

pomer prášku ku kvapaline (P/L) bol 2. Cementy pripravené s 5 % (w/v) medu v tekutej zložke boli označené ako M5, V5 kde M predstavuje (Activon) a V (Vivamel).

### **In vitro testovanie cytotoxicity**

Stanovenie **dlhodobej cytotoxicity** cementovo-medových pást sa uskutočnilo po 7 a 14 dňoch kultivácie mezenchýmových kmeňových buniek (MSC) izolovaných z kostnej drene potkanov. Na dlhodobé testovanie cytotoxicity extraktov sa použilo 0,1 g cementu/ml média. Cementové pasty boli namočené v kompletnom osteogénnom diferenciačnom kultivačnom médiu s osteogénnymi suplementami v inkubátore pri 37 °C počas 24 hodín.  $2,0 \times 10^4$  potkaních MSC (pasáž 3) sa naočkovalo sa do každej jamky 48-jamkovej platne a kultivovalo do monovrstvy buniek pri 37 °C, 95 % vlhkosti a 5 % CO<sub>2</sub> v inkubátore počas 24 hodín. Následne sa kultivačné médium v jamkách nahradilo 400 µl pripraveného príslušného extraktu (0,1 g/ml) počas 14 dní. Bunky v jamkách s kompletným kultivačným médiom bez extraktu sa považovali za negatívnu kontrolu (NC).

**ALP (alkalická fosfatáza) aktivita** osteoblasticky diferencovaných potkaních MSC (po 7 a 14 dňoch kultivácie) bola stanovená z bunkových lyzátov po lýze roztokom obsahujúcim 0,1 % Triton X-100. Aktivita ALP bola vyjadrená v mikromóloch p-nitrofenolu produkovaného za 1 minútu na mikrogram proteínov. Obsah proteínu v lyzátoch bol stanovený pomocou Bradfordovej metódy.

**Farbenie vápenatých usadenín** produkovaných diferencovanými osteoblastmi alizarínovou červenou sa uskutočnilo po tom, čo sa extrakty podrobili kultivácii s MSC potkanov počas 14 dní. Depozity boli zafarbené farbiacim roztokom Alizarin red S a pozorované svetelným mikroskopom (Leica DM IL LED, Heerbrugg, Švajčiarsko).

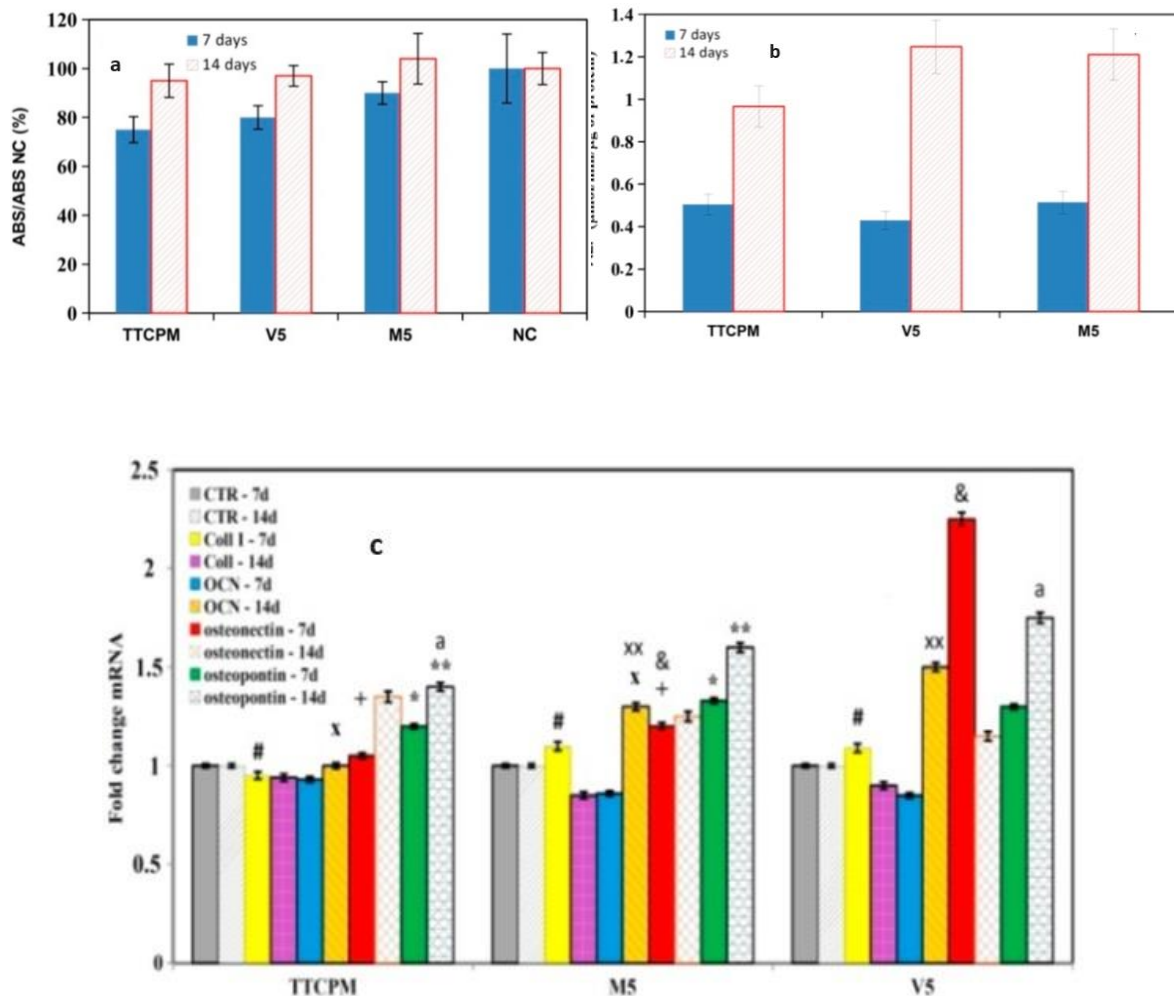
### **Analýza expresie osteogénnych génov v diferencovaných potkaních MSC**

Génová expresia sa analyzovala podľa metódy uvedenej v (6). Kvantifikácia požadovaných génov vo vzorkách cDNA sa uskutočnila s použitím primérov pre nasledujúce gény: potkaní  $\beta$ -aktín, potkaní kolagén typu I, potkaní osteokalcín, potkaní osteopontín a potkaní osteonektín.

## **Výsledky**

Pri dlhodobej kultivácii potkaních MSC v extraktoch, sme pozorovali silný nárast proliferácie buniek s časom kultivácie v cementových extraktoch, čo potvrdilo necytotoxický charakter extraktov (Obr. 1a). ALP aktivita MSC kultivovaných v cementových extraktoch stúpala s

časom kultivácie a jej hodnoty boli cca. dvojnásobné až trojnásobné pre bunky kultivované v extraktoch TTCPM, V5 a M5 (Obr. 1b). Zvýšenie osteogénneho potenciálu MSC počas kultivácie v oboch extraktoch z med-biocementu indikovalo upreguláciu osteogénnych génov ako osteokalcín (OCN) a osteopontín (OP) po 14 dňoch a upreguláciu génov osteonektínu (ON) po 7 dňoch kultivácie v medovo-cementových extraktoch (Obr. 1c) v porovnaní s bunkami kultivovanými v extrakte TTCPM. Farbenie alizarínovou červenou potvrdilo schopnosť diferencovaných potkaních MSC produkovať depozity vápnika (Obr. 1d).





**Obr. 1** a) proliferácia potkaních MSC počas 7 a 14. dní kultivácie v med-biocementových extraktoch; b) ALP aktivita osteogénne diferencovaných buniek v extraktoch po 7. a 14. dňoch kultivácie; c) expresia osteogénnych génov diferencovaných potkaních MSC po 7. a 14. dňoch kultivácie v extraktoch; d) dôkaz produkcie depozitov vápnika diferencovanými MSC po 14. dňoch kultivácie v extraktoch

## Diskusia

V literatúre neexistujú prakticky žiadne informácie o vplyve medu na materiálové charakteristiky alebo vlastnosti CPC, ako aj na správanie sa osteoblastických buniek in vitro po pridaní medu do CPC. Medy obsahujú vysokú koncentráciu cukrov (fruktózy a glukózy), pričom podiel iných účinných látok (bielkoviny, polyfenoly, flavonoidy) neprekročil desatiny hmotn. %. Je zrejmé, že mikroštruktúra med-biocementových kompozitov môže byť ovplyvnená vyššie uvedenými zlúčeninami.

Testovanie cytotoxicity in vitro jasne preukázalo necytotoxický charakter extraktov a podporu proliferácie diferencovaných MSC v extraktoch. Okrem toho bola aktivita ALP a tvorba usadenín vápnika bunkami vyššia v medovo-cementových extraktoch ako v TTCPM extrakte. Diferenciácia MSC do kostného typu buniek sa overila analýzou expresie osteogénnych génov MSC kultivovaných v medovo-cementových extraktoch, pričom po 14 dňoch bola pozorovaná nadmerná expresia génov OP a OCN a nadmerná expresia ON v extrakte V5 po 7 dňoch kultivácie. Osteonektín je produkovaný aktívnymi osteoblastmi (7). OP zvyšuje mineralizáciu extracelulárnej matrice a vhodnú osteointegráciu nového kostného tkaniva so zrelou kosťou a podporuje aktivitu osteoklastov počas resorpcie biocementu (8, 9).

Osteokalcín je najhojnejší nekolagénový proteín v kosti (10). Čo sa týka osteogénnych vlastností medu, ukázalo sa, že flavóny a flavonoidy v mede majú dobrý osteogénny potenciál, podporujúci osteogénnu diferenciáciu mezenchymových kmeňových buniek a urýchľujú hojenie zlomenín kostí (11, 12).



## Záver

Pripravené boli biocementy na báze práškovej zmesi fosforečnanu vápenatého a monetitu s prídavkom medu a vplyv medu na výsledné vlastnosti biocementu bol vyhodnotený. In vitro testovanie cytotoxicity pomocou metabolického MTS testu stanovilo necytotoxický charakter medovo-cementových extraktov V5 a M5, ako aj zvýšenie ALP aktivity a produkciu depozitov vápnika kmeňovými bunkami v extraktoch. Osteogénna génová expresia MSC kultivovaných v medovo-cementových extraktoch potvrdila nadmernú expresiu OP, OCN a ON génov. Naším budúcim cieľom bude testovanie medovo-cementových kompozitov na zvieracích in vivo modeloch; naše predbežné in vitro analýzy potvrdzujú možné budúce použitie biokompozitu v oblasti regenerácie kostných defektov.

## Literatúra

1. Kageyama T, Akieda H, Sonoyama Y, Sato K, Yoshikawa H, Isono H, Hirota M, Kitajima H, Chun JS, Maruo S (2023) Bone beads enveloped with vascular endothelial cells for bone regenerative medicine. *Acta Biomater* 165: 168-179
2. Wei S, Wang Y, Sun Y, Gong L, Dai X, Meng H, Xu W, Ma J, Hu Q, Ma X (2023) Biodegradable silk fibroin scaffold doped with mineralized collagen induces bone regeneration in rat cranial defects. *Int J Biol Macromol* 235: 123861
3. Carey LE, Xu HHK, Simon CG, Takagi S, Chow LC (2005) Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. *Biomaterials* 26: 5002-5014
4. Valverde S, Ares AM, Elmore JS, Bernal J (2022) Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chem* 387: 132920
5. Abd-El Aal AM, El-Hadidy MR, El-Mashad NB, El-Sebaie AH (2007) Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Ann Burn Fire Disasters* 20: 83-88
6. Medvecky L, Giretova M, Stulajterova R, Luptakova L, Sopcak T, Girman V (2022) Osteogenic potential and properties of injectable silk fibroin/tetracalcium phosphate/monetite composite powder biocement systems. *J Biomed Mat Res* 110: 668-678
7. Bondarenko A, Angrisani N, Meyer-Lindenberg A, Seitz JM, Waizy H, Reifenrath J (2014) Magnesium-based bone implants: Immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression. *J Biomed Mater Res Part A* 102: 1449-1457
8. McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT (2011) Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs* 194, 313-319
9. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99-105
10. Komori T (2020) Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle. *Int J Mol Sci* 21: 7513
11. Pan FF, Shao J, Shi CJ, Li ZP, Fu WM, Zhang JF (2021) Apigenin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and accelerates bone fracture healing via activating Wnt/b-catenin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320: 760-771
12. Huo JF, Zhang ML, Wang XX, Zou DH (2021) Chrysin induces osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res* 400: 112466

Táto práca bola podporená projektom *APVV 20-0184* a projektom *VEGA 2/0032/23*.

# VPLYV MIKONAZOLU NA LYMFOCYTY PERIFÉRNEJ KRVI DOBYTKA A OŠÍPANÝCH

## EFFECT OF MICONAZOLE ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF CATTLE AND PIGS

**Beáta Holečková**, Viera Schwarzbacherová, Jaroslav Bučan, Dagmara Dolníková,

Martina Galdíková, Jana Halušková

Katedra biológie a fyziológie, UVLF, Komenského 73, Košice

*beata.holeckova@uvlf.sk*

### **Súhrn**

Mikonazol je azolové antimykotikum ktoré sa vo veterinárnej medicíne sa používa na lokálnu liečbu dermatofytóz u spoločenských a hospodárskych zvierat. Prostredníctvom cytogenetickej analýzy sme sledovali potenciálny genotoxický účinok vybraných koncentrácií mikonazolu ( $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na chromozómy kultivovaných buniek periférnej krvi hovädzieho dobytku a ošípaných. V bunkách oboch druhov zvierat sme zaznamenali štatisticky významný nárast percenta zlomov ( $p < 0,05$ ) len po pôsobení  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , čo naznačuje klastogénny efekt tejto dávky mikonazolu.

**Kľúčové slová:** mikonazol, genotoxicita, lymfocyty, dobytok, ošípané

### **Summary**

Miconazole is an azole antifungal that is used in veterinary medicine for the local treatment of dermatophytoses in pets and farm animals. Through cytogenetic analysis, we monitored the potential genotoxic effect of selected miconazole concentrations ( $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) on the chromosomes of cultured peripheral blood cells of cattle and pigs. In the cells of both species of animals, we noted a statistically significant increase in the percentage of breaks ( $p < 0.05$ ) after only the exposure to  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , which indicates the clastogenic effect of this dose of miconazole.

**Key words:** miconazole, genotoxicity, lymphocytes, cattle, sheep

## Úvod

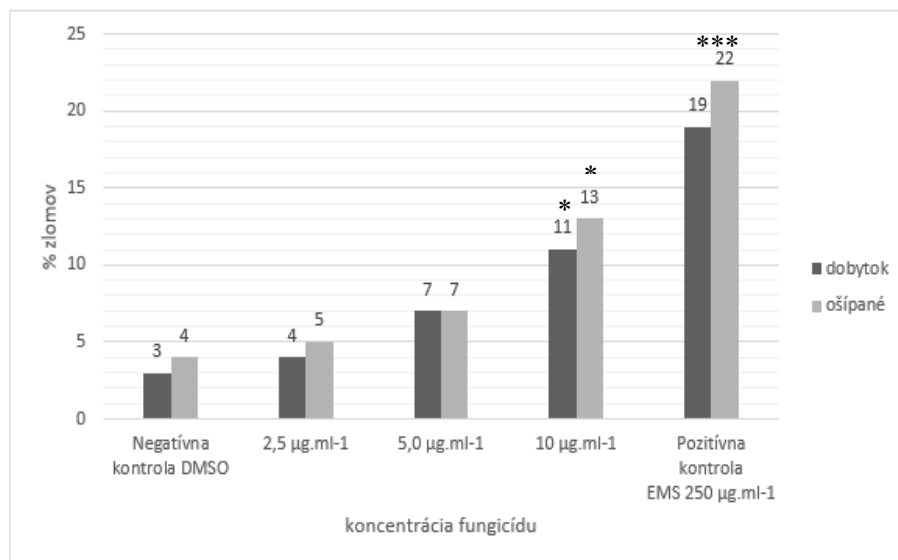
Mikonazol patrí medzi azolové antimykotiká s fungistatickým, resp. fungicídny účinkom. Je to syntetický derivát imidazolu, s rýchlym fungicídny účinkom proti širokému spektru kvasiniek a dermatofytov. Vo veterinárnej medicíne sa používa na lokálnu liečbu dermatofytóz spoločenských a hospodárskych zvierat. Mechanizmus účinku azolov spočíva v poškodzovaní organizmov húb tým, že interferujú s biosyntézou ergosterolu (1). Dochádza k inhibícii fungálneho cytochrómu P450 (14 $\alpha$ -steroldemetyláza) zodpovedného za premenu lanosterolu na 14 $\alpha$ -demetyl lanosterol v biosyntetickej dráhe ergosterolu, čo vedie k narušeniu bunkovej steny rastúcej huby a ku jej smrti (2). Kobayashi a kol. (3) opísali ďalší antifungálny mechanizmus mikonazolu: akumulácia liečivom indukovaných reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v organizme huby vedie k oxidačnému poškodeniu a bunkovej smrti. Apoptóza indukovaná ROS je pravdepodobne základom fungicídnej aktivity mikonazolu, zatiaľ čo iné azoly sú skôr fungistatické (1). Genotoxické účinky mikonazolu sú relatívne málo preštudované; autori Hassan a Hassan (4) zistili, že mikonazol indukoval v dávkovej závislosti štatisticky významné zvýšenie aberácií chromozómov v kostnej dreni a v primárnych spermatocytoch myši. Tieto výsledky naznačili možný genotoxický potenciál mikonazolu. Cieľom našej práce bolo sledovanie účinku vybraných koncentrácií fungicídu mikonazolu (2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na genetický materiál kultivovaných buniek periférnej krvi hovädzieho dobytká (prežúvavce; zvieratá so zloženým žalúdkom) a ošípaných (monogastričné zvieratá) prostredníctvom cytogenetickej analýzy – *in vitro* testu aberácií chromozómov (5).

## Materiál a metódy

Krv bola sterilne odobratá od zdravých donorov (z *vena jugularis* hovädzieho dobytká a z orbitálneho sínusu mladých ošípaných) a následne kultivovaná v médiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) podľa štandardného protokolu (5). 24 h pred ukončením kultivácie bol ku kultúram buniek pridaný mikonazol (CAS 22832-87-7) vo vybraných troch dávkach 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , zistených vyhodnotením znižovania mitotického indexu (MI) v 1000 bunkách pre sadu viacerých testovaných koncentrácií. Kolchicín pridaný 90 min. pred ukončením kultivácie umožnil zastavenie delenia buniek v štádiu metafáz. Metafázy (100 metafáz/koncentrácia) boli hodnotené na prítomnosť chromatidových (CB) a chromozómových zlomov (IB) a výmen (CE, IE) pomocou svetelného mikroskopu (Nikon). Vypočítané percentá indukovaných zlomov boli štatisticky spracované  $\chi$ -kvadrát testom

## Výsledky a diskusia

Každá z troch aplikovaných koncentrácií spôsobila nárast percenta zlomov v lymfocytoch oboch druhov zvierat v porovnaní s negatívnou kontrolou. Štatisticky významný nárast aberácií chromozómov ( $p < 0,05$ ) sme však zaznamenali len pri koncentrácii  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  v kultivovaných bunkách dobytká a podobne aj v bunkách ošípaných (Graf 1).



**Graf 1** Porovnanie klastogénneho efektu (% zlomov) indukovaného mikonazolom v kultivovaných lymfocytoch hovädzieho dobytká a ošípaných.

\* štatistická významnosť  $p < 0,05$ ; \*\* štatistická významnosť  $p < 0,01$ ;

\*\*\* štatistická významnosť  $p < 0,001$ ; Chi-kvadrát test.

Lymfocyty, ako kľúčové zložky imunitného systému, sú využívané ako indikátory na testovanie genotoxicity, lebo zastávajú ústrednú úlohu v obranných mechanizmoch organizmu a sú relatívne citlivé na poškodenie DNA vyvolané genotoxickými látkami. Akákoľvek zmena ich funkčnosti alebo množstva môže mať významné dôsledky na celkové zdravie a môže viesť k zvýšenej náchylnosti zvierat k chorobám. Testovanie genotoxicity pomáha posúdiť potenciálne riziká spojené s používaním liečiv, ako je mikonazol, čo je prospešné nielen pre zdravie a dobré životné podmienky zvierat, ale aj pre ľudské zdravie poskytovaním poznatkov o potenciálnych ekologických rizikách spojených s používaním liečiv a ich následným vylučovaním do životného prostredia a vznikom rezíduí týchto látok. V súčasnej dobe je pomerne málo vedeckých prác zaoberajúcich sa genotoxicitou mikonazolu u hospodárskych zvierat, ale skúmali sa antimykotiká – azolové fungicídy chemicky podobné mikonazolu. Potenciálnymi genotoxickými/cytotoxickými účinkami fungicídu na báze

epoxikonazolu/fenpropimorfu sa zaoberali Drážovská a kol. (6). V kultivovaných lymfocytoch hovädzieho dobytku autori nepozorovali žiadne štatisticky významné zvýšenie poškodenia DNA, no zaznamenali zjavný cytotoxický účinok prezentovaný ako zníženie mitotických a proliferačných indexov po vystavení lymfocytov hovädzieho dobytku fungicídu počas 24 a 48 hodín v koncentráciách v rozmedzí od 3 do 15  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ). Šiviková a kol. (7) skúmali potenciál indukcie poškodenia chromozómov a/alebo kinetiky bunkového cyklu po expozícii kultivovaných periférnych lymfocytoch hovädzieho dobytku epoxikonazolom. Nebol zaznamenaný žiadny genotoxický účinok a/alebo klastogénne/aneugénne účinky fungicídu, avšak autori zistili, že epoxikonazol má schopnosť významne ovplyvňovať kinetiku bunkového cyklu a indukovať apoptózu. Podobne ako v našej práci pozorovali Yüzbaşıoğlu a kol. (8) pomocou testu chromozómových aberácií humánných lymfocytov genotoxický efekt flukonazolu – azolového fungicídu. Autori popisujú klastogénny a aneugénny efekt flukonazolu pomocou *in vitro* testu chromozómových aberácií pričom zaznamenali výrazné zvýšenie frekvencie chromozómových aberácií v závislosti od dávky fungicídu v porovnaní s negatívnou kontrolou. El-Shershaby a kol. (9) potvrdili genotoxický účinok azolového antimykotika itrakonazolu u gravidných myší v rôznych fázach gravidity prostredníctvom významného zvýšenia parametrov kométového testu, percenta fragmentovanej DNA meranej difenylamínovým testom a vyhodnotením fragmentov DNA na agarózovom géli zo vzoriek pečene. Vzhľadom ku mikonazolu boli jeho potenciálne genotoxické vlastnosti študované v bunkách kostnej drene myší a v primárnych spermatocytoch (4) sledovaním schopnosti mikonazolu indukovať chromozómové aberácie (gapy, zlomy, delécie a centrické fúzie). Intraperitoneálne podávanie tohto fungicídu vyvolalo štatisticky významný nárast chromozómových aberácií v závislosti od dávky fungicídu. Autori uviedli, že mikonazol má genotoxický účinok na somatické a zárodočné bunky myší.

## **Záver**

Testovanie genotoxicity pomáha posúdiť potenciálne riziká spojené s používaním rôznych chemických látok vrátane liečiv, čo je prospešné nielen pre zdravie a dobré životné podmienky zvierat, ale aj pre ľudské zdravie. V práci sme hodnotili genotoxický účinok mikonazolu, azolového antimykotika, ktoré je vo veterinárnej medicíne používané pri terapii dermatofytóz. Pomocou cytogenetických metód sme pozorovali pôsobenie fungicídu v lymfocytoch periférnej krvi dobytku a ošípaných. Podľa odporúčania OECD smerníc pre testovanie chemických látok (1) sme si zvolili *in vitro* test aberácií chromozómov. Vplyv mikonazolu sme

sledovali po 24 h pôsobení troch koncentrácií v kultúrach buniek hovädzieho dobytku a ošípaných ( $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V metafázach lymfocytov dobytku a ošípaných sme zaznamenali klastogénny efekt mikonazolu v podobe štatisticky významného zvýšenia percenta zlomov chromozómov po jeho pôsobení v dávke  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). Predbežné výsledky naznačujú potrebu rozsiahlejšieho štúdia účinkov mikonazolu na genetický materiál lymfocytov periférnej krvi hospodárskych zvierat.

## Literatúra

1. Regidor PA et al. (2023) Miconazole for the treatment of vulvovaginal candidiasis. In vitro, in vivo and clinical results. *J. Obstet Gynecol* 43: 2195001
2. Tiboni GM, Marotta F, Castiglione AP (2008) Teratogenic effects in mouse fetuses subjected to concurrent in-utero exposure to miconazole and metronidazole. *Reprod Toxicol* 26: 254-261
3. Kobayashi D et al. (2002) Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. *AAC* 46: 3113-3117
4. Hassan N, Hassan A (1999) Miconazole genotoxicity in mice. *J Appl Toxicol* 17: 313-319.
5. OECD 2016. OECD guideline for the testing of chemicals. Test guideline 487: in vitro mammalian cell micronucleus test.
6. Drážovská M et al. (2016) Evaluation of potential genotoxic/cytotoxic effects induced by epoxiconazole and fenpropimorph-based fungicide in bovine lymphocytes in vitro. *J Environ Sci Health B* 51, 769-776.
7. Šiviková K et al. (2018) Potential chromosome damage, cell-cycle kinetics/and apoptosis induced by epoxiconazole in bovine peripheral lymphocytes in vitro. *Chemosphere* 193, 82-88.
8. Yüzbaşıoğlu D et al. (2008) Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro. *MRGTEM* 649, 155-160.
9. El-Shershaby AF et al. (2015) Biomonitoring of the Genotoxic and Hepatotoxic Effects and Oxidative Stress Potentials of Itraconazole in Pregnant Rats. *Birth Defects Res B* 104, 55-64.

Práca vznikla na základe podpory *VEGA 1/0166/21* a *KEGA 008UVLF-4/2023*.

# VPLYV KOLIFORMNÝCH BAKTÉRIÍ NA PROLIFERAČNÚ AKTIVITU A APOPTÓZU SLIZNICE ČREVA

## THE EFFECT OF COLIFORM BACTERIA ON THE PROLIFERATION ACTIVITY AND APOPTOSIS OF THE INTESTINAL MUCOSA

**Monika Holodová<sup>1</sup>**, Marianna Danková<sup>2</sup>, Zuzana Fagová<sup>1</sup>, Kristína Čurgali<sup>1</sup>,  
Soňa Gancarčíková<sup>3</sup>, Štefan Tóth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, Košice

<sup>2</sup>Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, Bratislava

<sup>3</sup>Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Komenského 73, Košice

*monika.holodova@upjs.sk*

### Súhrn

Baktérie *Escherichia coli* (*E. coli*) sú tyčinkovité gramnegatívne baktérie patriace do čeľade *Enterobacteriaceae*. Prirodzene sú súčasťou črevnej mikroflóry teplokrvných živočíchov, ale zároveň sú častou príčinou gastroenteritíd u zvierat a človeka (11). Infekcia enterotoxigénnymi *E. coli* (ETEC) je príčinou hnačiek u detí a dospelých ľudí. Ich patogenita spočíva v ich schopnosti kolonizovať tenké črevo a následne produkovať enterotoxíny (11, 12). Naopak, enteroinvazívne *E. coli* (EIEC) osídľujú hrubé črevo, kde prenikajú do buniek epitelu, v ktorých sa množia a následne ich môžu deštruovať (12). Ďalšími patogénnymi kmeňmi sú enteroagregatívne *E. coli* (EAEC) a enterohemoragické *E. coli* (EHEC). Celosvetovo sú prasiatka vo vedeckom výskume používané ako vhodný model pre objasnenie patogenézy mnohých chorôb, ale tiež slúžia na vývoj nových terapií, či preventívnych opatrení. Črevná mikroflóra, gastrointestinálna anatómia a fyziológia je veľmi podobná u ľudí a prasiatok. Zaradenie gnotobiotických prasiatok do výskumu, zlepšilo pochopenie patofyziológie mnohých gastrointestinálnych ochorení, ktoré majú celosvetovo vplyv na ľudské zdravie.

**Kľúčové slová:** gastrointestinálny trakt, apoptóza, proliferácia, *E. coli*

### Summary

*Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria are rod-like gramnegative bacteria from family

*Enterobacteriaceae*. Naturally, *E. coli* occur in intestinal microbiota of homeothermic animals. On the other hand, they cause gastroenteritis in animals and humans (11). Infection caused by enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) is often resulting in diarrhoea of children and adults. Their pathogenic potential is based on colonisation of the small intestine and enterotoxins production (11, 12). On contrary, enteroinvasive *E. coli* (EIEC) colonize large intestine, penetrate epithelial cells, multiply and consequently destroy epithelium (12). Other pathogenic strains are enteroaggregative (EAEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli*. Piglets are commonly used in research as appropriate experimental model for studying of diseases, but also to discover new therapeutic approaches or preventive precautions. Intestinal microbiota, gastrointestinal anatomy and physiology are very similar in piglets and humans. Germfree piglets implementation to research improved understanding of pathophysiology of numerous gastrointestinal diseases, which influence human health world-wide.

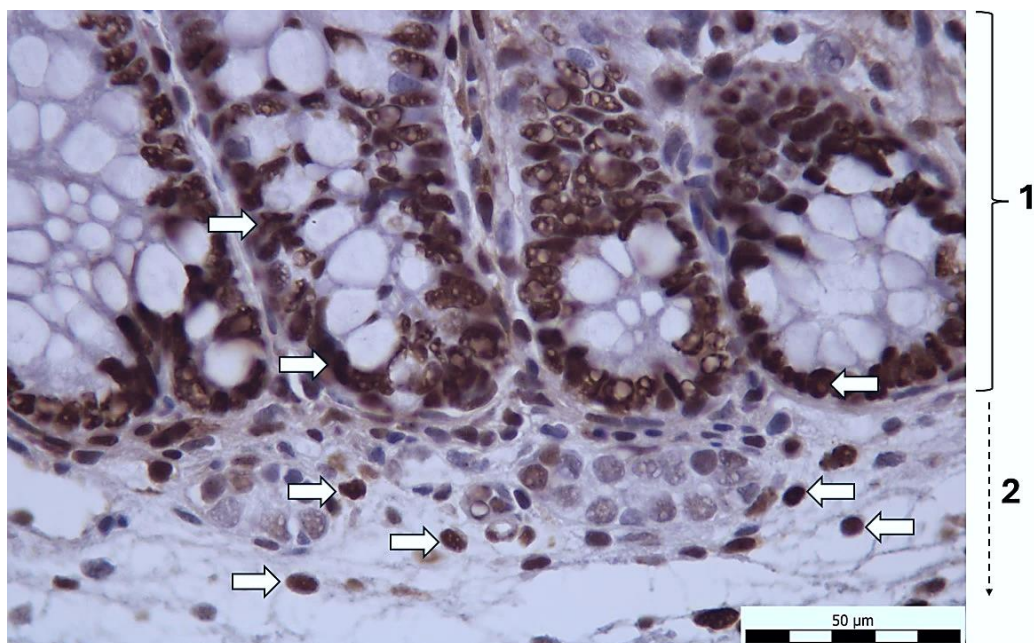
**Key words:** gastrointestinal tract, apoptosis, proliferation, *E. coli*

## Úvod

### **Proliferačná aktivita črevnej sliznice**

Črevný epitel svojou špecializovanou architektúrou predstavuje dôležitú dynamickú bariéru, ktorá za fyziologických podmienok udržiava a reguluje príjem živín a vody (9). Na udržaní tejto funkcie majú veľký vplyv funkčné medzibunkové spojenia a celková regenerácia epitelu. Bunky črevného epitelu vykazujú najvyššiu regeneračnú schopnosť zo všetkých epitelov. Doba regenerácie črevného epitelu u jednodňových prasiatok trvá až 7-10 dní v porovnaní s 3 - týždňovými prasiatkami, u ktorých k úplnej obnove črevného epitelu dochádza už v priebehu 2-3 dní (3). Tento časový rozdiel pravdepodobne prispieva k zvýšenej náchylnosti na infekčné enteritídy (6). Proliferačia črevného epitelu zohráva významnú úlohu pre správne osídľovanie gastrointestinálneho traktu (GIT) mikroorganizmami, čo je spojené so značnými metabolickými nárokmi (7). Rýchlosť regenerácie enterocytov v povrchovom epiteli čreva závisí od prítomnosti komenzálnej mikroflóry a od prítomnosti a rozsahu zápalových procesov. Shirkey a kol. (13) zistili, že proliferácia črevného epitelu je výrazne závislá aj na type baktérií, ktoré črevo kolonizujú.





**Obr. 1** Reprezentatívna mikrofotografia imunohistochemického dôkazu proliferačnej aktivity markerom MCM2 v sliznici hrubého čreva gnotobiotických prasiat po infekcii koliformnými baktériami: **1**-sliznica hrubého čreva s črevnými kryptami na pozdĺžnom reze, **2**-prilľahné riedke kolagénové väzivo črevnej sliznice s prítomnosťou ciev, **šípky** – pozitívne bunkové jadrá (tmavo-hnedé zafarbenie chromogénom - diaminobenzidínom) deliacich sa epitelových ako aj väzivových buniek (1000x, anti-MCM2 + bunkové jadrá dofarbené Mayerovým hematoxylínom).

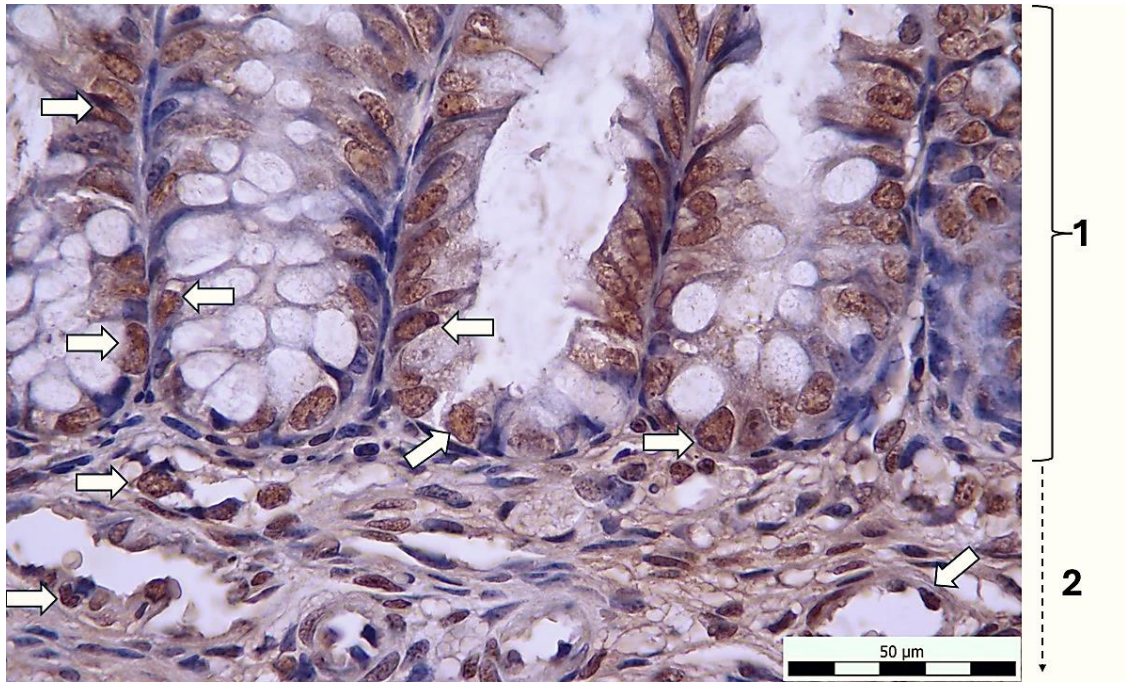
### Účasť apoptózy v črevnej sliznici

Zavedením modelu gnotobiotických zvierat do experimentov, boli detailnejšie analyzované vplyvy mikroorganizmov na morfológiu črevných klkov, vrátane dĺžky klkov a hĺbku črevných krýpt u gnotobiotických prasiatok (16). Autori pripisujú tieto rozdiely v účasti apoptózy a intenzity proliferačnej aktivity. Proces apoptózy črevného epitelu vyvolaný baktériami môže byť spustený dvoma spôsobmi. **Indukcia resp. iniciačná fáza** je prvý spôsob apoptózy. Tento spôsob bunkovej smrti môže mať intracelulárny alebo extracelulárny pôvod. Vnútorými spúšťačmi apoptózy sú toxické látky, nedostatok živín, poškodenie DNA, vedľajšie produkty bunkového metabolizmu ako je amoniak (15), sírovodík (10) a dekonjugované žlčové kyseliny (8). Medzi vonkajšie faktory, ktoré sú iniciátormi bunkovej smrti radíme napr. exogénny oxidačný stres, excitačné toxíny, trofické faktory, cytokíny TNF- $\alpha$  a FASL, vírusové infekcie, kortikosteroidy, ale taktiež niektoré chemické a farmakologické látky. **Druhý spôsob je nepriamy**, ako odpoveď zápalovej reakcie. Receptory dôležité pre reguláciu apoptózy sa nachádzajú v enterocytoch črevného epitelu (14). Hlavným mimobunkovým aktivátorom extracelulárnej (tzv. receptorovej) aktivácie apoptózy je cytokín produkovaný makrofágmi

v dôsledku ich aktivácie - TNF (tumor nekrotický faktor). V súčasnosti je známych viac ako 30 rozdielnych TNF receptorov. Delia sa na dva typy: typ I s obsahom intracelulárnej domény smrti (DD) v cytoplazme a typ II bez DD. Pre iniciáciu apoptózy bunky je potrebná väzba troch ligandov, ktoré indukujú trimerizáciu receptorovej molekuly (2). Apoptóza iniciovaná intracelulárnymi alebo extracelulárnymi podnetmi začína aktiváciou centrálnych efektorov apoptózy, ktorými sú **kaspázy** (17). Kaspázy patria do rodiny aspartát-špecifických cysteinových proteáz, ktorých aktivácia vedie k spusteniu kaskády apoptotickej bunkovej smrti. V bunkách sa kaspázy nachádzajú v neaktívnej forme. Ich aktivácia nastáva dvojakým spôsobom, a to väzbou na Apaf-1 proteín (aktivačný faktor-1 apoptickej proteázy), alebo proteolytickým štiepením inou aktívnou kaspázou. Inhibítormi kaspáz sú antiapoptické proteíny (IAP). Známych je osem IAP, z ktorých je najviac preštudovaný survivín. IAP pôsobia ako negatívne regulátory apoptózy. Apoptotické zmeny na úrovni bunkového jadra môžu byť spôsobené deaktiváciou enzýmov zodpovedných za opravu jadrovej DNA, deaktiváciou enzýmov zodpovedných za bunkovú replikáciu a v dôsledku štiepenia štrukturálnych jadrových proteínov a fragmentáciou DNA.

### **Vplyv koliformných baktérií na apoptotickú bunkovú smrť**

Infekcie *E. coli* (ETEC) zvyšujú permeabilitu črevného epitelu, spôsobujú hyperpláziu črevných krýpt a vyvolávajú nadmernú apoptózu epitelových buniek čreva vplyvom uvoľňovania toxínov alebo iných virulentných faktorov (18, 19, 21). V predchádzajúcich štúdiách autori potvrdili, že *E. coli* vplývajú na apoptózu epitelových črevných buniek, ktorá je spojená s aktiváciou kaspázy-3 a kaspázy-8, čo vedie k dysfunkcii črevnej bariéry a k pretrvávajúcej symptomatickej hnačke (20). Podobne aj Edelblum a kol. (1) a Günther a kol. (4) uskutočnili experiment za použitia inokulácie *E. coli* ETEC F4, pri ktorom bolo zistené, že spomínané baktérie indukujú apoptotickú bunkovú smrť črevných buniek vplyvom aktivácie výkonných kaspáz, čo spôsobuje zvýšenú permeabilitu sliznice čreva a dysfunkciu slizničnej bariéry, čoho výsledkom je pretrvávajúca enteritída a hnačka.



**Obr. 2** Reprezentatívna mikrofotografia dôkazu apoptotickej bunkovej smrti kolorimetrickou metódou *In Situ* TUNEL v sliznici hrubého čreva gnotobiotických prasiat po infekcii koliformnými baktériami: **1**-črevné krypty/žľazy v sliznici na pozdĺžnom reze, **2**-priliehajúce riedke kolagénové väzivo črevnej sliznice s prítomnosťou ciev, **šípky** – TUNEL-pozitívne bunkové jadrá apoptotických buniek (hnedé zafarbenie chromogénom - diaminobenzidínom) v epiteli ako aj väzive a v endotelových bunkách ciev (1000x, *In Situ* TUNEL + bunkové jadrá dofarbené Mayerovým hematoxylínom).

## Záver

Procesy odumierania a regenerácie epitelových a väzivových buniek predstavujú konštantnú súčasť biológie črevnej sliznice. Tieto procesy sú mimoriadne dynamické a ich celková intenzita sa môže meniť za fyziologických a výraznejšie za rôznych patologických podmienok. Cieľovou štruktúrou mnohých patogénnych mikroorganizmov vyvolávajúcich gastroenteritídy je črevná sliznica. Pričom cieľom patogénov, vrátane koliformných baktérií, je modulovať až blokovat' jej primárnu bariérovú funkciu. Rôzne moderné imunohistochemické metódy vyšetrenia proliferačnej aktivity ako aj intenzity apoptotickej bunkovej smrti pomocou vhodných markerov predstavujú dôležitú súčasť komplexnej analýzy črevnej sliznice ale aj diagnostiky rôznych ochorení, ktoré ovplyvňujú morfológicko-funkčnú integritu črevnej sliznice. V algoritme imunohistochemickej analýzy je pritom veľmi dôležitá: 1. správna kombinácia relevantných markerov a taktiež 2. zaradenie viacerých markerov, ktoré majú jednoznačne potenciál detegovať a potvrdiť prítomnosť predpokladaných špecifických

procesov proliferácie a apoptózy vzhľadom na druhovú a tkanivovú špecificitu a vysokú senzitivitu.

## Literatúra

1. Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T et al. (2006) Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 12(5): 413-424
2. Fickova M, Nagy M (2007) Apoptóza – programovaná bunková smrť a rastinné metabolity. *Chem Listy* 101: 131-137
3. Gelberg HB (2014) Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicol Pathol* 42: 54-66
4. Günther C, Neumann H, Neurath MF et al. (2013) Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* 62(7): 1062-1071
5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.834598> (25. 3. 2022)
6. Kim M, Ashida H, Ogawa M et al. (2010) Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe* 8(1): 20-35
7. Le Floc’h N, Seve B (2000) Protein and amino acid metabolism in the intestine of the pig: From digestion to appearance in the portal vein. *Prod. Anim* 13:303–314
8. Leschelle X, Robert V, Delpal S et al. (2002) Isolation of pig colonic crypts for cytotoxic assay of luminal compounds: Effects of hydrogen sulfide, ammonia and deoxycholic acid. *Cell Biol Toxicol* 18: 193-203
9. Oswald IP (2006) Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet Res* 37: 359-368
10. Roediger W, Babidge W (1997) Human colonocyte detoxification. *Gut* 41: 731-734
11. Rowe B (1979) The role of *Escherichia coli* in diarrhoea. *Clin Gastroenterol* 8: 625-44
12. Sack RB (1980) Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. *J Infect Dis* 142:279-86
13. Shirkey TW, Siggers RH, Goldade BG et al. (2006) Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp Biol Med* 231: 1333-1345
14. Strater J, Moller P (2000) Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine. *Epithelial Transp Barrier Funct* 915: 162-170
15. Suzuki H, Yanaka A, Shibahara T et al. (2002) Ammonia induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: 986-995
16. Thompson G, Trexler P (1971) Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* 12: 230-235
17. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies inside. *Veda* 281: 1312-1316
18. Tsai PY, Zhang B, He W et al. (2017) IL-22 upregulates epithelial Claudin-2 to drive diarrhea and enteric pathogen clearance. *Cell Host Microbe* 21: 671-681
19. Wang JH, Peng Y, Yang LL et al. (2011) *Escherichia coli* induces apoptosis in human monocytic U937 cells through the Fas/FasL signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 358(1): 95-104
20. Xia Y, Bin P, Liu S et al. (2018) Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection promotes apoptosis in piglets. *Microb Pathog* 125: 290-294
21. Zhou C, Liu Z, Jiang J et al. (2012) Differential gene expression profiling of porcine epithelial cells infected with three enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 13: 330

Práca bola finančne podporená grantovým projektom *KEGA 008UPJŠ-4/2024*.

# FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE HEPATOGENÉZU

## FACTORS INFLUENCING HEPATOGENESIS

**Katarína Holovská**, Sandra Andrašková, Viera Almášiová

Katedra morfológických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

*katarina.holovska@uvlf.sk*

### Súhrn

Vývoj pečene je spojený s vývojom predného čreva. Postupne, ako sa formuje hlavový a chvostový záhyb embrya, vytvára sa aj primitívne črevo. Skladá sa z predného, stredného a zadného oddielu. Stredné črevo je spočiatku široko otvorené do dutiny žltkového vaku, ale neskôr sa tento spoj výrazne zúži. Z entodermy predného čreva sa vyvíja hltan, pažerák, žalúdok, časť dvanástnika, pečeň, pankreas a žlčník. Akonáhle sa z entodermy predného čreva vytvorí pečeňový divertikul, hepatoblasty sa delaminujú a prestupujú mezenchýmom *septum transversum*. Bunky embryonálnej pečene sa musia postupne zorganizovať tak, aby sa vytvorila charakteristická štruktúra, ktorá je kľúčová pre normálnu funkciu pečene. Zahŕňa to množstvo procesov ako je diferenciácia parenchýmových a neparenchýmových buniek, organizácia väziva a extracelulárneho matrixu, vývoj žľčových ciest, dozrievanie sínusových kapilár, artérií a vén a následná polarizácia hepatocytov.

**Kľúčové slová:** hepatogéza, entoderma, hepatoblasty

### Summary

The development of the liver is closely related to the development of the foregut. Gradually, as the cranial and caudal folds are formed, the foregut, midgut and hindgut are also formed. The midgut is initially wide opening into the cavity of the yolk sac, but later this junction narrows. The foregut gives rise to the pharynx, esophagus, stomach, part of the duodenum, liver, pancreas, and gallbladder. When a hepatic diverticulum is formed from the entoderm of the foregut, the hepatoblasts delaminate and permeate the mesenchyme of the *septum transversum*. Cells in the embryonic liver must gradually organise to form a characteristic structure that is crucial for normal liver function. It includes a number of processes, such as differentiation of parenchymal and non-parenchymal cells, organisation of the stroma and extracellular matrix,

development of bile ducts, maturation of the sinusoids, arteries, and veins, and subsequent polarisation of hepatocytes.

**Key words:** hepatogenesis, endoderm, hepatoblasts

## Úvod

Vývoj pečene je spojený s vývojom predného čreva. Počas gastrulácie entoderma žltkového vaku vytvorí dutú štruktúru, označenú ako primitívne črevo. Formovaním hlavového a chvostového záhybu sa postupne vytvorí predné, stredné a zadné črevo. Následne ventrálna stena entodermy predného čreva, ktorá je umiestená v blízkosti vyvíjajúceho sa srdca, je stimulovaná k hepatogéze (6, 8, 20).

Vývoj pečene bol sledovaný hlavne na myšacích a potkaních embryách. U myšacích embryí hepatogéza začína okolo 8. – 9. embryonálneho dňa (ED) v štádiu 7. somitov, vytvorením pečeneového divertikula, z ktorého sa na 9. ED v štádiu 10 až 12 somitov vytvorí pečeneový púčik (14, 18). Pečeneový púčik je tvorený jednou vrstvou cylindrických entodermálnych buniek predného čreva, ktorá sa následne mení na pseudovrstvový epitel, ktorý je tvorený hepatoblastami (2). Proliferujúce bunky sú v skorom štádiu vývoja oddelené bazálnou membránou od okolitého mezenchýmu *septum transversum* (3, 11). Bazálna membrána je bohatá na laminín a iné zložky extracelulárnej matrix (ECM), ako je nidogén, kolagén typu IV, fibronektín a proteoglykán obsahujúci heparánsulfát (17). Následnou rozsiahlou proliferáciou hepatoblastov, bunky pečeneového púčika narušia bazálnu membránu a prerastajú do mezenchýmu *septum transversum* (8, 11). Analýzy hepatoblastov poukázali, že ide o bipotentné bunky, ktoré sa v závislosti od signalizačných dráh diferencujú na hepatocyty alebo cholangiocyty (4, 20). U myši pred 12. ED sú hepatoblasty v štádiu nediferencovaných bipotentných buniek (11). Majú nepravidelný tvar, veľký nukleocytoplazmatický pomer a relatívne málo organel v porovnaní so zrelými hepatocytmi (9, 11). U potkanov bolo pozorované, že bunky na 12. – 14. ED majú podlhovastý tvar, okolo 18. ED sa menia na sférické a tesne pred narodením, na 20. ED sa stávajú polygonálnymi (21). Elektrónová mikroskopia odhalila v cytoplazme hepatoblastov u potkanov na 12. ED nárast granulovaného endoplazmatického retikula a Golgiho systému, čo poukazuje na začiatok syntézy proteínov. Ukladanie glykogénu a prítomnosť peroxizómov bolo pozorované až po 18. ED (9, 11). Diferenciácia hepatoblastov na hepatocyty je veľmi zložitý proces, ktorý trvá niekoľko dní. Vyžaduje si interakciu medzi bunkami, ECM a rôznymi látkami, ktoré sú vylučované endotelovými bunkami, Kupfferovými bunkami, a hviezdicovými bunkami (12).



LeDouarin (8) sledoval hepatogézu u kuracieho embrya a rozdelil tento proces do dvoch krokov. V prvom kroku (v štádiu 5-7 somitov) nastali zmeny v entoderme na ventrálnom povrchu steny predného čreva. Vytvoril sa hepatálny základ, ktorý rástol ventrálne a jeho bunky ležali v tesnej blízkosti základu srdca, ktoré bolo obklopené mezenchýmom *septum transversum*. Hepatokardiálna mezoderma indukovala diferenciaciu entodermálnych buniek, avšak táto indukcia nestačila na diferenciaciu hepatoblastov na hepatocyty (5, 8). V ďalšom kroku (v štádiu 20-22 somitov) bola potrebná druhá stimulácia mezenchýmom *septum transversum*. Tá bola nevyhnutná na podporu proliferácie a na úplnú diferenciaciu hepatocytov (8). Štúdie ukázali, že táto druhá stimulácia sa neobmedzila len na mezenchým *septum transversum*, ale bola pozorovaná aj u akéhokoľvek mezenchýmu, ktorý vznikol z laterálnej splanchnickej mezodermy. Avšak mezenchým, ktorý nevznikol z laterálnej mezodermy, nebol schopný inidukovať vývoj pečene (8).

*Septum transversum* dáva základ vzniku epikardu srdca a tiež bránice. Okrem toho má dôležitú úlohu pri kontrole diferencie hepatocytov a iniciuje rast pečenevého tkaniva. Ďalšie štúdie poukázali, že mezenchým *septum transversum* produkuje fibroblastový rastový faktor (FGF), ako aj kostný morfogenetický proteín (BMP). FGF a BMP pôsobia na ventrálnu entodermu predného čreva a riadia začiatok hepatogézy (1). FGF indukuje skorý nástup hepatogézy (7), kým BMP je rozhodujúci pre rast hepatoblastov (13). Niektoré signály kontrolujú diferenciaciu buniek, iné kontrolujú rast pečene (19). U potkana medzi 13. ED a 20. ED bolo pozorované, že objem pečene sa zväčší až 84-krát (21). Jedna z dráh, ktorá riadi proliferáciu fetálnej pečene, zahŕňa hepatocytový rastový faktor (HGF). Ide o silný mitogén, ktorý tiež ovplyvňuje bunkovú migráciu (3).

Ako už bolo spomenuté, medzi bunky, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri migrácii hepatoblastov patria endotelové bunky pečenevých sínusoíd (11). Bolo pozorované, že hepatálny divertikul je veľmi skoro obklopený angioblastmi, alebo endotelovými bunkami, ktoré ho oddelia od mezenchýmu *septum transversum* (20). Shalaby a kol. (15, 16) sledovali vplyv endotelových buniek na hepatogézu u myší. Na 8. ED boli endotelové bunky identifikované medzi hepatálnym základom a *septum transversum*. Štúdia na myších embryách, ktorým chýbali endotelové bunky odhalila, že hoci došlo k iniciácii vývoja pečene (vyvinul sa hepatálny divertikul), jeho ďalší vývoj bol zastavený (10). Tieto výsledky poukázali na to, že vývoj ciev prebieha súčasne s vývojom hepatoblastov a súčasne endotelové bunky majú dôležitú úlohu pri kontrole rastu hepatálneho divertikula.

Počas embryonálneho vývoja sa štruktúra fetálnej pečene dramaticky mení. Zahŕňa to množstvo procesov ako je diferenciácia parenchýmových a neparenchýmové buniek, organizácia väziva a extracelulárneho matrixu, vývoj žlčových ciest, dozrievanie sínusových kapilár, artérií a vén a následná polarizácia hepatocytov. Okrem toho pečeň zohráva dôležitú úlohu v extramedulárnej hemopoéze. Bunky, ktoré ju tvoria sa vyvíjajú z rôznych tkanív. Napriek svojmu odlišnému embryonálnemu pôvodu má zrelá pečeň vysoko organizovanú štruktúru, ktorá je rozhodujúca pre jej funkciu.

## Literatúra

1. Barron M, Gao M, Lough J (2000) Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev Dyn* 218: 383-393
2. Bort R, Signore M, Tremblay K et al. (2006) Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 290: 44-56
3. Duncan SA (2003) Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev* 120: 19-33
4. Farhan F, Trivedi M, Di Wu P et al. (2023) Extracellular matrix modulates the spatial hepatic features in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res Ther* 14: 1-21
5. Fukuda-Taira S (1981) Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol* 63: 111-125
6. Gualdi R, Bossard P, Zheng M et al. (1996) Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10: 1670-1682
7. Jung J, Zheng, M, Goldfarb M et al. (1999) Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284: 1998-2003
8. LeDouarin NM (1975) An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 53: 427-455
9. Luzzatto AC (1981) Hepatocyte differentiation during early fetal development in the rat. *Cell Tissue Res* 215: 133-142
10. Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J et al. (2001) Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294: 559-563
11. Medlock ES, Haar JL (1983) The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat Rec* 207: 31-41
12. Nguyen TV, Ukairo O, Khetani SR, et al. (2015) Establishment of a hepatocyte-kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug Metab Dispos* 43: 774-85
13. Rossi JM, Dunn RN, Hogan BLM et al (2001) Distinct mesodermal signals, including BMPs from septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15: 1-12
14. Severn CB (1971) A morphological study of the development of the human liver. I. Development of the hepatic diverticulum. *Am J Anat* 131: 133-158
15. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP et al. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66
16. Shalaby F, Ho J, Stanford WL et al. (1997) A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981-990
17. Shiojiri N, Sugiyama Y (2004) Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology* 40: 346-355
18. Soares-da-Silva F, Peixoto M, Cumano A et al. (2020) Crosstalk Between the Hepatic and Hematopoietic Systems During Embryonic Development. *Front Cell Dev Biol*. 8: 1-20
19. Zaret K (1998) Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* 8: 526-531
20. Zhao R, Duncan SA (2005) Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41: 956-967
21. Vassy J, Kraemer M, Chalumeau MT et al. (1988) Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Differ* 24: 9-24

Práca bola podporená projektom *VEGA* č. *1/0036/22*.



**VPLYV Wi-Fi ŽIARENIE NA VLÁKNA V MEZENCHÝME  
CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY  
NA 14. EMBRYONÁLNY DEŇ**

**EFFECT OF Wi-Fi RADIATION ON THE FIBRE COMPONENTS IN THE  
MESENCHYME OF THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE ON  
EMBRYONIC DAY 14**

**Katarína Holovská<sup>1</sup>, Sandra Andrašková<sup>1</sup>, Edina Sesztáková<sup>2</sup>, Ján Molnár<sup>3</sup>,  
Viera Almášiová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat UVLF v Košiciach, Komenského 73,  
Košice

<sup>3</sup>Katedra teoretickej a priemyselnej elektrotechniky, FEI TUKE v Košiciach, Letná 9, Košice  
*katarina.holovska@uvlf.sk*

## **Súhrn**

Cieľom tejto štúdie bolo sledovať vplyv Wi-Fi žiarenia na štruktúru chorioalantoickej membrány (CAM) na 14. embryonálny deň (ED). Kuracie embryá v experimentálnej skupine boli od 1. ED vystavené neionizujúcemu elektromagnetickému žiareniu s frekvenciou 2,4 GHz 24 h denne, po dobu 14 dní. Následne boli vzorky CAM z kontrolnej a experimentálnej skupiny spracované a ofarbené špeciálnymi farbivami metódami na dôkaz kolagénových, retikulárnych a elastických vlákien. V kontrolnej, ako aj v experimentálnej skupine boli pozorované všetky typy vlákien. Avšak v experimentálnej skupine sme pozorovali, že intenzita farbenia elastických a retikulárnych vlákien bola mierne znížená.

**Kľúčové slová:** Wi-Fi, chorioalantoická membrána, mezenchým

## **Summary**

The aim of this study was to observe the effect of Wi-Fi radiation on the structure of the chorioallantoic membrane (CAM) on embryonic day 14. We observed that the structure of CAM in the experimental group was not significantly changed. Using special staining histological methods, we identified the presence of collagen, elastic, and reticular fibres in the

control and experimental groups. Collagen fibers were stained intensively in both groups, and their distribution was relatively constant. Elastic and reticular fibres in the experimental group were well-defined, but less stained than in the control group.

**Key words:** Wi-Fi, chorioallantoic membrane, mesenchyme

## Úvod

V súčasnej dobe sú ľudia vo veľkej miere neustále vystavení neionizujúcemu elektromagnetickým žiareniu (NEMŽ). Zdrojom nízkofrekvenčného magnetického poľa sú napr. elektrické vedenia, elektrické spotrebiče a transformátory. Zdrojom vysokofrekvenčného magnetického poľa sú bezdrôtové siete, mobilné veže a iné bezdrôtové zariadenia, ako sú mobilné telefóny či Wi-Fi (6). Mnohé epidemiologické štúdie poukázali na fakt, že NEMŽ má biologický účinok na tkanivá a orgány (3, 6). Môže narušiť fyziologickú rovnováhu v organizme, zvýšiť množstvo voľných radikálov, čo následne môže viesť k poruche proliferácie a diferenciácie buniek a poškodeniu DNA (5). V našej práci sme sledovali účinok NEMŽ na väzivovú zložku (mezenchým) v chorioalantoickej membráne. Mezenchým patrí medzi embryonálne väzivá. Tvoria ho bunky a extracelulárny matrix (ECM). ECM sa skladá hlavne z vody, proteínov a polysacharidov. K najviac zastúpeným makromolekulám patria glykozaminoglykány a proteoglykány, kolagény, nekolagénne glykoproteíny a elastín (9). Cieľom tejto práce bolo sledovať účinok NEMŽ, ktorého zdrojom je Wi-Fi, na zloženie a distribúciu vláknitej zložky v CAM na 14. embryonálny deň.

## Materiál a metódy

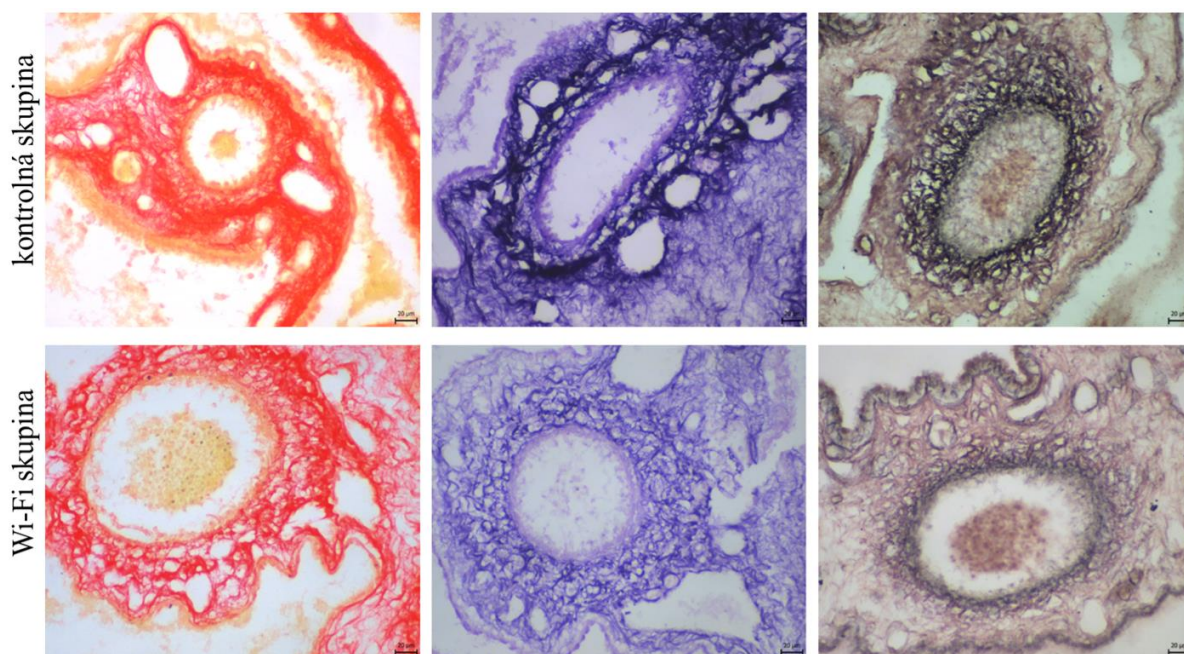
V pokuse boli použité oplodnené kuracie vajcia z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra), ktoré boli náhodne rozdelené do dvoch skupín – kontrolnej (n = 6) a experimentálnej (Wi-Fi, n = 6). Vajcia boli inkubované v inkubátore (River system ET49 automatic) pri štandardných inkubačných podmienkach (37,5 °C a vlhkosti vzduchu 60 %). Wi-Fi skupina bola prostredníctvom antény (Mikrotik Metal 52 ac 15s) od 1. ED kontinuálne vystavená neionizujúcemu elektromagnetickému žiareniu (2,4GHz, 300  $\mu\text{W}/\text{m}^2$ ) po dobu 14. dní. Kontrolná skupina bola držaná v inkubátore so špeciálnym odtienením Wi-Fi signálu. Priemerná silová hustota a rovnomernosť distribúcie signálu bola monitorovaná prístrojom TriField® (USA). Na 14. ED boli vzorky chorioalantoických membrán odobrané a fixované v mDF (Modified Davidson's fluid) a zaliate do parafínu. Následne 5-10  $\mu\text{m}$  rezy boli ofarbené metódami hematoxylín-eozín, pikrosíriusová červená na detekciu kolagénu, rezorcín-fuchsin

na detekciu elastických vlákien. Na detekciu retikulárnych vlákien bola vykonaná impregnácia soľami striebra. Vzorky boli následne fotodokumentované pomocou mikroskopu Olympus CX 43 (Olympus, Japonsko) a kamery Promicra (Promicra, Česká republika).

## Výsledky

Na 14. ED bolo väzivo v kontrolnej skupine CAM bohaté na bunky aj vlákna. Vo väzive sme pozorovali veľmi dobre vyvinuté krvné a lymfatické cievy, ktorých stena bola hrubá a pozostávala z endotelu a niekoľkých vrstiev hladkosvalových buniek. Lymfatické cievy sa vyskytovali najmä v blízkosti veľkých krvných ciev. Mali široký, nepravidelný lúmen vystlaný tenkým endotelom. Pomocou špeciálnych farbiacich metód sme identifikovali prítomnosť všetkých typov vlákien. Kolagénové, elastické a retikulárne vlákna sa najintenzívnejšie farbili v stene veľkých ciev, ako aj pod epitelom alantoisu.

V skupine Wi-Fi bola štruktúra CAM porovnateľná s kontrolnou skupinou. Pomocou špeciálnych farbiacich metód sme pozorovali rozdiely v intenzite farbenia jednotlivých vlákien. Kým intenzita farbenia kolagénových vlákien v stene veľkých ciev bola porovnateľná s kontrolnou skupinou, intenzita farbenia elastických a retikulárnych vlákien bola vo Wi-Fi skupine mierne znížená oproti kontrolnej skupine (Obr. 1).



**Obr. 1** Mikrofotografie CAM kuracieho embrya na 14. ED.

A: pikrosíriusová červená; B: rezorcín-fuchsín; C: impregnácia soľami striebra.

Mierky 20  $\mu$ m.

## **Diskusia**

Živé organizmy sú vystavené prirodzenému NEMŽ, ktorého zdrojom je samotná planéta (magnetické pole 0,02-0,07 mT). Avšak v 20. storočí začali rapídne pribúdať nové zdroje umelého NEMŽ, ktorého intenzita neustále narastá (8). Vo všeobecnosti platí, že najviac sa na NEMŽ podieľajú tie bezdrôtové energetické zariadenia, ktoré majú široký rozsah výkonu a frekvencie. Medzi ne patria antény, Wi-Fi zariadenia, smartfóny, Bluetooth a iné (7). NEMŽ má na organizmus tepelný a netepelný účinok, čo môže viesť k narušeniu fyziologickej rovnováhy v tkanivách a orgánoch (5).

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv Wi-Fi žiarenia na štruktúru väzivovej zložky-mezenchýmu CAM u kuracieho embrya na 14. ED. Mezenchým pozostáva z buniek a ECM. Zloženie ECM je veľmi variabilné (11) a závislé od štádia vývoja daného jedinca, počas ktorého dochádza k jeho intenzívnej remodelácii a modifikácii (9). ECM predstavuje komplexnú sieť proteínov a sacharidov. Jeho dôležitými zložkami sú fibronektín, kolagén, elastín, glykozaminoglykány a rôzne glykoproteíny. ECM má mnoho funkcií. Je nevyhnutný pre štrukturálnu integritu tkanív, reguluje proliferáciu a diferenciáciu buniek, ako aj samotnú morfogenézu (4, 10). Špecifické zložky ECM dodávajú tkanivám a orgánom odolnosť, ale aj potrebnú elasticitu (1). Zastúpenie vlákien v orgánoch sa intenzívne sleduje hlavne pri rôznych patologických stavoch. Málo sa však vie o ich výskyte a usporiadaní v tele embryí a plodov a o ich funkcii pri vývoji jednotlivých orgánov (1). Keďže vyvíjajúci sa organizmus je citlivý na vplyv rôznych faktorov, zaujímalo nás, ako ovplyvní Wi-Fi žiarenie s frekvenciou 2,4 GHz štruktúru CAM. Z našich pozorovaní vyplýva, že nami sledované NEMŽ nespôsobilo výrazné morfológické zmeny v štruktúre CAM. Avšak vplyvom NEMŽ nastali zmeny v zastúpení vláknitej zložky. Došlo k miernemu zníženiu intenzity farbenia elastických a retikulárnych vlákien v stene ciev, kým zmeny v zastúpení kolagénových vlákien neboli pozorované. V predchádzajúcich experimentoch sme sledovali účinok Wi-Fi žiarenia s frekvenciou 2,4 GHz na žltkový vak. Dané žiarenie nespôsobilo žiadne výrazné morfológické zmeny v štruktúre žltkového vaku. Došlo však k výraznému zvýšeniu intenzity farbenia kolagénu v okolí krvných ciev (2).

## **Záver**

Ako vyplýva z našich výsledkov, Wi-Fi žiarenie s frekvenciou 2,4 GHz nespôsobilo výrazné morfológické zmeny v štruktúre CAM na 14. ED. Avšak pomocou špeciálnych farbiacich metód sme identifikovali zmeny v intenzite farbenia elastických a retikulárnych vlákien. Nami

pozorované zmeny neboli síce výrazné, ale upozorňujú na možné riziko, ktoré je spojené s každodenným a neustálym vystavením organizmu vplyvu NEMŽ.

## Literatúra

1. Fairbairn S, Gilbert R, Ojakian G et al. (1985) The extracellular matrix of normal chick embryo fibroblasts: its effect on transformed chick fibroblasts and its proteolytic degradation by the transformants. *J Cell Biol* 5: 1790-1798
2. Holovská K, Andrašková S, Molnár J et al. (2023) Vplyv WiFi žiarenia na štruktúru žltkového vaku kuracieho embrya na 9. deň inkubácie. 26. Košický morfológický deň: Zborník vedeckých prác. Košice: UPJŠ v Košiciach, 2023. 47-51
3. Kashani Z, Pakzad R, Fakari F et al. (2023) Electromagnetic fields exposure on fetal and childhood abnormalities: Systematic review and meta-analysis. *Open Medicine* 18: 1-24
4. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 88: 473-485
5. Lai H, Singh NP (2004) Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect* 112: 687-94
6. Li DK, Chen H, Ferber JR (2017) Exposure to Magnetic Field Non-Ionizing Radiation and the Risk of Miscarriage: A Prospective Cohort Study *Sci Rep* 7: 1-8
7. Razek A (2023) Assessment and Categorization of Biological Effects and Atypical Symptoms Owing to Exposure to RF Fields from Wireless Energy Devices *Appl Sci* 13: 1–20
8. Saliev T, Begimbetova D, Masoud AR et al. (2019) Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 141: 25-36
9. Szabó A, Rupp PA, Rongish BJ et al. (2011) Extracellular matrix fluctuations during early embryogenesis. *Phys Biol* 8: 1-21
10. Terry AH, Culp LA. (1974) Substrate-attached glycoproteins from normal and virus-transformed cells. *Biochemistry*. 13: 414-425
11. Zagris N (2001) Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron* 32: 427-438

Práca bola podporená projektom *VEGA* č. *1/0036/22*.

# EFFEKT OF FORMIC ACID ANTIGEN RETRIEVAL METHOD IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR UNMASKING ALPHA SYNUCLEIN PROTEIN AGGREGATES IN FORMALIN FIXED PARAFFIN EMBEDDED HUMAN TISSUE

Nataliia Hryntsova<sup>1,2</sup>, Tomas Smolek<sup>1,3</sup>, Norbert Zilka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, Bratislava

<sup>2</sup>Morphology Department, Sumy State University, Medical Institute, Rymsky Korsakov 2, Sumy 40007, Ukraine

<sup>3</sup>Neuroimmunology Institute, non-profit organization, Dvořakovo nábřeží 10, Bratislava  
*natalia.hryntsova@gmail.com, natalia.hryntsova@savba.sk*

## Abstract

Immunohistochemistry (IHC) is still important method of postmortem diagnostic process in human neurodegenerative diseases including synucleinopathies. The typical histopathological feature of common synucleinopathies like Lewy body dementia (LBD), Parkinson's disease (PD) and Multiple System Atrophy (MSA) are presence of  $\alpha$ -synuclein protein aggregates. The IHC staining protocols so far applied to study  $\alpha$ -synuclein protein aggregates accumulation in human tissue have been inconsistent with varying use of heat and formic acid (FA) for antigen retrieval. Many studies showed that heat-induced antigen (epitope) retrieval (HIER) technologies have led to dramatic improvements in our ability to detect antigens in formalin fixed, archival tissues. But less is known about beneficial effect of using different concentration of formic acid (FA) for detection of  $\alpha$ -synuclein inclusions in human formalin fixed paraffine embedded tissue (FFPE). In the present work, we optimized the staining protocol for  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in paraffin-embedded sections in relation to combination of heat and FA using 2 different concentration of FA (80% and 90 %) to detect accumulated  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in MSA tissue sample. Results showed that FA is essential for the staining of highly aggregated  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in human tissue. Furthermore, the applied lower concentration of FA significantly reduces risk of mechanical damage and other artefacts appearing in preparations and still remains quality of IHC staining. This approach can have positive effect on analysis and diagnostic process in post-mortem FFPE human brain tissue.

**Key words:** imunohistochemistry, antigen retrieval, formic acid, synucleinopathies

## **Introduction**

Immunohistochemistry is a powerful technique that is used in many areas of pathology research, including the study of neurodegeneration on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (6). Aggregation of misfolded proteins or peptides is a common feature of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, prion, and other diseases (5). One of the first sequential steps in immunohistochemistry is antigen unmasking (7). Protocols for the diagnosis of neurodegenerative diseases at this stage of immunohistochemistry most often use a combination of chemical and physical methods (denaturing treatment with formic acid and heat-induced antigen retrieval using a pressure cooker) (3). The use of formic acid significantly increased the antigenicity of all  $\alpha$ -Syn antibodies tested (8). According to IHC protocols for the diagnosis of  $\alpha$ -synucleinopathies, there is various information on the use of formic acid, such as its different percentage in the solution and the exposure time. This is due to the fact that in Parkinson's disease (PD) and other  $\alpha$ -synucleinopathies,  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -Syn) aggregates form a variety of conformational and truncated variants (8).  $\alpha$ -synucleinopathies exhibit significant clinical and pathological heterogeneity (4).

James A. Wiseman reports the use of incubating sections in 99% formic acid for 4 minutes to detect  $\alpha$ -synuclein (8). Thomas G. Beach et al provide information on the use of 80%, 88%, 98%, and 100% FA for the detection of  $\alpha$ -synuclein in paraffin-embedded patient brain samples (1). According to the Immunohistochemistry Protocol for Paraffin-Embedded Sections (Biolegend), for the detection of  $\alpha$ -synuclein using anti- $\alpha$ -Synuclein antibody (clone 4D6) on formalin-fixed paraffin-embedded Parkinson's disease human brain tissue, incubation with 88% formic acid for 20 minutes was used at room temperature.

However, in practice, the use of aggressive solutions of formic acid (98%, 99%, 100%) and long incubation times do not always have a positive effect on the quality of histological preparations after immunohistochemistry and, accordingly, the subsequent diagnosis of neurodegenerative pathology. Therefore, the purpose of this study was to find the optimal concentration and time of incubation of brain sections in formic acid for the diagnosis of  $\alpha$ -synucleinopathies.

## Material and methods

Tissue sections (8  $\mu\text{m}$ ), mounted on paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded glass slides, were subjected to a standard dewaxing procedure. Epitope extraction was performed using a combination of chemical and physical methods:

1. Denaturing treatment with formic acid according to 3 options: incubating sections in 98% formic acid for 1 minute (group No. 1); 80% for 15 minutes (group No. 2) and 90% for 15 minutes (group No. 3) at room temperature, followed by washing the slides in Tris-HCL buffer (pH 7.6) ( $2 \times 5$  min).

2. Heat-induced secondary epitope retrieval was performed using a pressure cooker: by heating the slides in antigen unmasking solution buffer (H-3300, Vector) in a pressure cooker (2100 Antigen Retriever, Aptum Biologics Ltd.) at  $121^\circ\text{C}$  for 20 min. The sections were cooled for 2 h 10 min, then the slides were washed in Tris-HCL buffer (pH 7.6) ( $2 \times 5$  min).

Then, endogenous peroxidase was sequentially blocked in 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 50 mM Tris-HCl (20 min), blocking nonspecific background staining (APTUM for 20 minutes). Sections were incubated with primary antibody 4D6 (1:500) overnight at  $4^\circ\text{C}$  in humidified chambers. A-Mouse secondary antibodies (1:200) were incubated on sections for 1 hour in humidified chambers at room temperature. VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Biotinylated Target Detection System, Peroxidase (Standard) (PK-6100) and Vector VIP Substrate Kit Peroxidase Detection System, 1 min. 30 seconds were used. The sections were counterstained with a solution of Methyl green (Vector) under the conditions of a Binder thermostat ( $t=65^\circ\text{C}$ ), dehydrated and mounted in Entellan mounting medium, Merck 1.07961.0100.

Detection of alpha-synuclein was performed on histological sections from 16 areas of the brain of a patient with a clinical diagnosis of "MSA" (frontal cortex, temporal cortex, cingulate gyrus, parietal cortex, pre- and postcentral gyrus, occipital cortex, anterior and posterior hippocampus, basal forebrain, striatum, thalamus, midbrain, pons, medulla oblongata, vermis, cerebellum) for differential diagnosis of pathology. The severity of inclusion body pathology associated with PD was assessed semi quantitatively (– = absent or indistinguishable, + = mild, ++ = moderate, +++ = severe) (2). Microscopic analysis and photo documentation were carried out using a Leica DM 500 light microscope with x4, x10, x40 lenses, eyepieces No. 7 and 10.

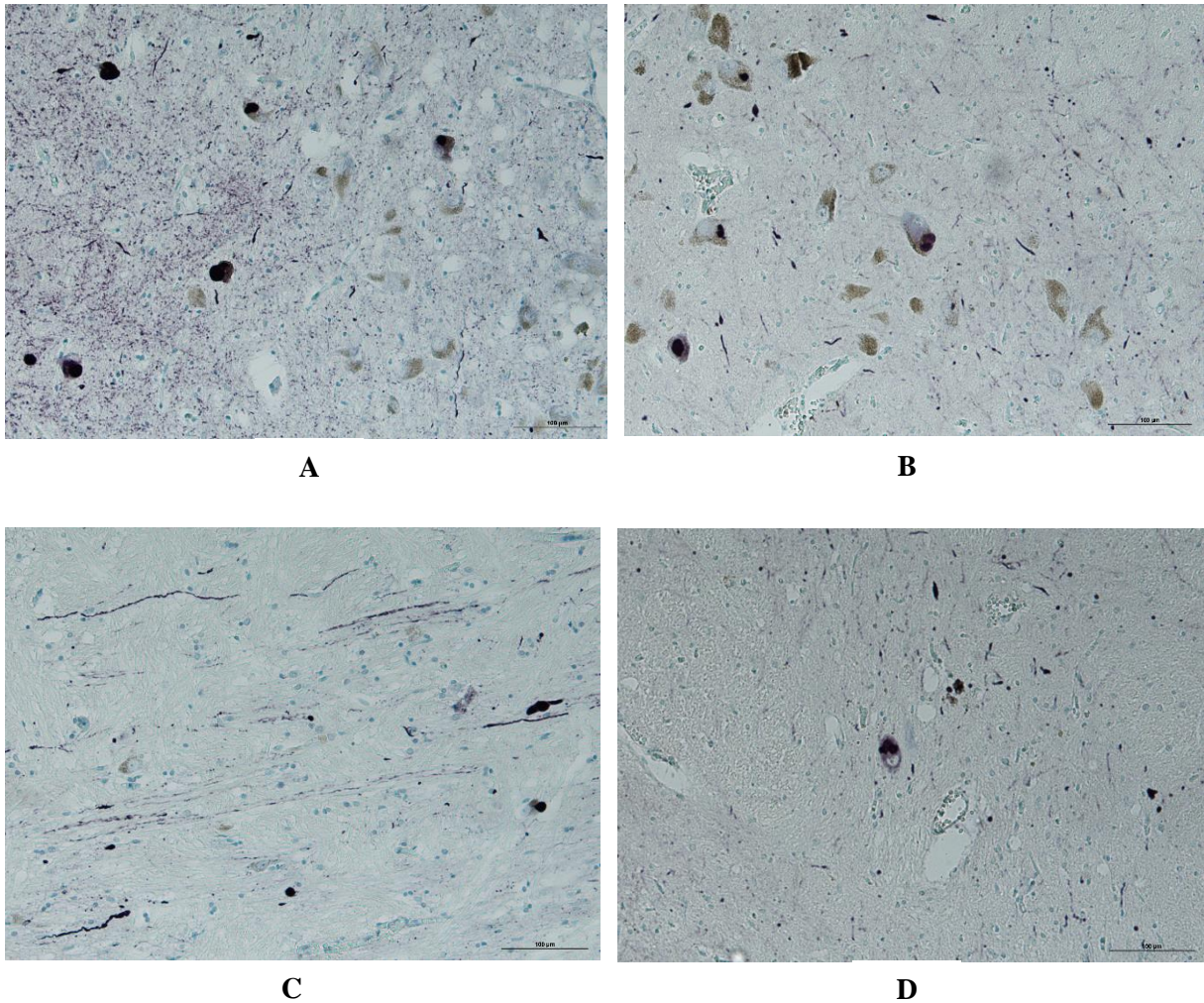


## Results

We studied 3 groups of histological preparations (1-3) from 16 brain regions from one patient with a clinical diagnosis of “MSA” (Multiple system atrophy) using quantitative Braak analysis (2) to measure the distribution of  $\alpha$ -Syn aggregates in different brain regions. After incubation of histological sections of group No. 1 in 98% formic acid for 1-minute, mechanical tissue defects appeared on some histological preparations of the brain (striatum and thalamus), which made their subsequent diagnosis difficult. After incubation of histological sections of groups No. 2 and No. 3, respectively, in 80% and 90% formic acid for 15 minutes, all histological preparations of the brain had no tissue defects; further stages of immunohistochemical research were applied to them.

When conducting a comparative study on the detection of 4D6 in histological preparations from 16 regions of the patient’s brain (No. 2 and No. 3), from 14 regions (No. 1) the presence of immunoreactive alpha-synuclein LN (Lewy neurites) and LB (Lewy bodies) was established in both groups with a predominance of neurites in the preparations Frontal, Temporal and Parietal cortex, Gyrus cinguli, Hippocampus anterior and posterior, Basal forebrain, Striatum (No. 2 and No. 3), Thalamus (No. 2 and No. 3), Midbrain, Pons and Medulla. Moreover, based on the scale of quantitative assessment of the severity of pathology according to Braak – severe (+++) was observed in Hippocampus anterior and posterior, Basal forebrain and Midbrain, Striatum (No. 3), Thalamus (No. 3); moderate (++) – in Gyrus cinguli, Striatum (No. 2), Thalamus (No. 2) and Pons. LBs are usually presented in the form of spherical or kidney-shaped inclusions with a smooth surface, opaque, of various shapes and sizes. In *S. nigra* Midbrain, against the background of Lewy points, isolated intraplasmic LBs were diagnosed, which were located in the deposits of neuromelanin granules of the affected nerve cells (Fig. 1a, c). Some neurons were subjected to depigmentation, with complete or partial loss of melanin granules. In preparations of the above-mentioned brain regions, LNs were located both separately and in groups; their morphology differed in polymorphism. Various shapes, sizes and projections of the LN were found in the preparations: short, long, thread-like (Fig. 1c), in the form of points (Fig. 1d), with club-shaped and spine-like thickenings at the end.

At the same time, in preparations of group No. 3 treated with a 90% formic acid solution, a higher level of quantitative manifestation of immunoreactive alpha-synuclein LN, LB and Lewy points was observed than when using a solution of 80% formic acid.



**Fig. 1**  $\alpha$ -Syn. aggregates in Midbrain of the patient's brain: **A** – Lewy bodies in S. nigra neurons in group No. 3 preparations; **B** – Lewy bodies in S. nigra neurons in group No. 2 preparations; **C** – Lewy neurites in preparations of group No. 3 (Midbrain); **D** – Lewy neurites in preparations of group No. 2 (Midbrain). Staining: immunohistochemical staining 4D6. Magnification  $\times 200$ .

## Discussion

In the immunohistochemical reaction for the detection of  $\alpha$ -Syn (4D6) in all studied groups of drugs (No. 1-3), the presence of  $\alpha$ -Syn in the form of bodies, neurites and Lewy points was established. In the present work, we optimized the staining protocol for  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in paraffin-embedded sections in relation to combination of heat and FA using 2 different concentrations of FA (80% and 90%) to detect accumulated  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in MSA tissue sample. Results showed that FA is essential for the staining of highly aggregated  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in human tissue.

At the same time, formic acid at a concentration of 80% and 90% and a prolonged incubation time (15 minutes) is a less aggressive environment compared to a 98% solution (incubation 1 minute). This makes it possible to diagnose postmortem changes in the brain of patients with  $\alpha$ -synucleinopathies and eliminate the appearance of mechanical defects and other artifacts in histological preparations. We did not observe any major differences between the 2 reported concentrations of formic acid, but the 90% formic acid solution provided slightly higher levels of quantitative detection of immunoreactive alpha-synucleic LN and LB than the 80% formic acid solution.

## Conclusion

Results showed that FA is essential for the staining of highly aggregated  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in human tissue. Furthermore, the applied lower concentration of FA significantly reduces risk of mechanical damage and other artefacts appearing in preparations and still remains quality of IHC staining. This approach can have positive effect on synucleinopathy analysis and diagnostic process in post-mortem FFPE human brain tissue.

## Literature

1. Beach TG, Charles L, White CW, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, Leverenz JB, Roncaroli F, Buttini M, Hladik CL, Sue LI, Noorigian JV, Adler CH (2008) Evaluation of  $\alpha$ -synuclein immunohistochemical methods used by invited experts Acta Neuropathol. 116(3): 277-288. doi:10.1007/s00401-008-0409-8
2. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Steur ENHJ, Eva Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of Aging 24(2): 197-211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
3. D'Amico F, Scarmutsu E, Stivala F (2009) Current state of antigen retrieval for immunohistochemistry. J Immunol Methods 341: 1-18
4. Hart de Ruyter FJ, Morrema THJ, den Haan J, Gase G, Twisk JWR, de Boer JF, Scheltens Ph, Bouwman FH, Verbraak FD, JM Annemieke, Rozemuller, Hoozemans JJM (2023)  $\alpha$ -Synuclein pathology in post-mortem retina and optic nerve is specific for  $\alpha$ -synucleinopathies. Parkinson's Disease 9: 124; <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00570-5>
5. Katorcha E, Makarava N, Lee YJ, Lindberg I, Monteiro MJ, Kovacs GG, et al. (2017) Cross-seeding of prions by aggregated  $\alpha$ -synuclein leads to transmissible spongiform encephalopathy. PLoS Pathog 13(8): e1006563. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006563>
6. Magaki Sh, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH (2019) Opus 25. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. Biobanking, Methods and Protocols. Humana Press. Los Angeles, CA, USA: 289-298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
7. Shi S-R, Shi Y, Taylor CR (2011) Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. J Histochem Cytochem 59: 13-32
8. Wiseman JA, Murray HC, Faull RLMF, Draganow M, Turner CP, Dieriks BV, Curtis MA (2024) Aggregate-prone brain regions in Parkinson's disease are rich in unique N-terminus  $\alpha$ -synuclein conformers with high proteolysis susceptibility. Parkinson's Disease 10:1; <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00614-w>

## Acknowledgement

*The work was carried out with the support of the EU grant "Next Generation EU" through the Recovery and Resilience Plan of Slovakia within the framework of project No. 09I03-03-V01-00147. The FFPE human brain tissue was provided by Neuroimmunology Institute, n.p.o.*

# HISTOLOGICKÁ ANALÝZA NOVOVYTVORENÉHO KOŽNÉHO TKANIVA V TERAPII RÁN

## HISTOLOGICAL ANALYSIS OF NEWLY FORMED SKIN TISSUE IN WOUND THERAPY

**Filip Humeník<sup>1</sup>**, Katarína Vdovíaková<sup>1</sup>, Lenka Krešáková<sup>1</sup>, Ján Danko<sup>1</sup>, Zuzana Fagová<sup>2</sup>,  
Štefan Tóth<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín UVLF, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Ústav histológie a embryológie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice

*filip.humenik@uvlf.sk*

### **Súhrn**

Cieľom tejto štúdie bolo preukázať priaznivý terapeutický efekt nového biopolymérneho materiálu na báze chitosanu obohateného o produkty mezenchymálnych kmeňových buniek izolovaných z tukového tkaniva psov (AT-MSC) sledovaný na umelo vytvorenom kožnom defekte u kráľika. Pre objektivitu hodnotenia regenerácie sme použili histologický rozbor a nami vytvorený skórovací systém zohľadňujúci všetky atribúty regenerácie, ako sú zápalová reakcia, nekróza, granulácia, tvorba jednotlivých vrstiev kože a vlasových folikulov. V porovnaní s negatívnou kontrolou (spontánne hojenie bez biomateriálu) sme pozorovali zrýchlenie a zlepšenie hojenia umelo vytvoreného kožného defektu po ôsmich a desiatich týždňoch. Okrem toho sme boli schopní opísať vlasové folikuly a vrstvu epidermis v histologických vzorkách kože ošetrených biomateriálom na báze chitosanu už po ôsmich týždňoch od aplikácie.

**Kľúčové slová:** rana, hojenie rán, biomateriály, kmeňové bunky, histologická analýza

### **Summary**

The aim of this study was to demonstrate the beneficial therapeutic effect of a new chitosan-based biopolymer material enriched with products of mesenchymal stem cells isolated from canine adipose tissue (AT-MSC) on an artificially created skin defect in a rabbit. For the objectivity of regeneration evaluation, we used histological analysis and a scoring system created by us taking into account all regeneration attributes, such as inflammatory reaction,

necrosis, granulation, formation of individual skin layers and hair follicles. Compared to the negative control (spontaneous healing without biomaterial), we observed an acceleration and improvement in the healing of the artificially created skin defect after eight and ten weeks. In addition, we were able to describe hair follicles and the epidermis layer in histological skin samples treated with chitosan-based biomaterial already eight weeks after application.

**Key words:** wound, wound healing, biomaterials, stem cells, histological analysis

## Úvod

Poranenia, popáleniny a chronické ochorenia môžu viesť k vzniku refraktérnych rán, ktoré vo výnimočných prípadoch končia smrteľne (1). Terapia založená na konvenčných postupoch často zlyhá. Do popredia sa teda dostávajú postupy založené na použití tkanivových kožných štepov alebo rastových faktorov. Medzi najnovšie patrí použitie mezenchymálnych kmeňových buniek (MSC), ich produktov obsiahnutých v kondicionovanom médiu (CM) aj v kombinácii s biomateriálom, ktoré ovplyvňujú celé spektrum procesov aplikovaných pri hojení chronických rán - zápalová reakcia, proliferácia a remodelácia (2). V posledných rokoch sa pozornosť upriamuje na materiály prírodného pôvodu. Vyššie uvedené biomateriály sú založené na uhlíkových nanomateriáloch, vodivých polyméroch alebo biomateriáloch na báze kovov (3). Samostatnú oblasť v hojení rán a regenerácii tkanív predstavujú biomateriály na báze chitosanu. Chitosan ako prírodná zlúčenina vykazuje antimikrobiálnu aktivitu, zlepšuje hemostatický účinok, podporuje bunkovú proliferáciu, sprostredkúva kompletnú regeneráciu rany a rekonštrukciu epitelu (4). MSC zohrávajú dôležitú úlohu v procese hojenia rán, najmä v zápalovej, proliferatívnej a remodelačnej fáze. MSC sa vyznačujú schopnosťou imunomodulácie, kedy v závislosti od mikroprostredia, v ktorom sa nachádzajú, môžu znižovať proliferáciu T-lymfocytov, diferenciáciu B lymfocytov a ovplyvňovať funkciu NK buniek. V procese remodelácie MSC uvoľňujú rastové faktory (VEGF, HGF, IGF, PDGF a TGF- $\beta$ ), ktoré prispievajú k proliferácii a migrácii fibroblastov a keratinocytov, rastu a tvorbe nových krvných ciev a syntéze kolagénu a extracelulárneho matricových proteínov a zároveň zabraňujú jeho degradácii inhibíciou metaloproteinázy (5). Použitie CM v porovnaní s MSC má niekoľko nesporných výhod: minimalizácia nežiaducej odozvy príjemcu, produkcia vo väčšom množstve, možnosť ovplyvnenia kvantitatívneho a kvalitatívneho zloženia, nižšie nároky na skladovanie a transport (6).

Cieľom tejto štúdie bolo vytvoriť biopolymérny skafold na báze chitosanu a overiť jeho účinnosť v kombinácii s médiom upraveným mezenchymálnymi kmeňovými bunkami v

tukovom tkanive (ATMSC-CM) na proces hojenia rán na umelo vytvorenom kožnom defekte na zvieracom modeli králiku.

## **Materiál a metódy**

Do tejto štúdie bolo zaradených 12 zdravých dospelých králikov plemena Hyla. Priemerná hmotnosť zvierat bola 3300 gramov (rozmedzie: 3000 – 3750 gramov) a v čase operácie boli králiky vo veku 12 – 16 mesiacov (pomer pohlaví = 1:1). Celková inhalačná anestézia sa vykonala s použitím izofluranu (Isofluran Piramal, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Viena, Rakúsko) v koncentrácii 5 % na navodenie anestézie a 3,5 % na chirurgický zákrok. U všetkých králikov bolo miesto chirurgického zákroku na chrbte podľa všeobecných zásad sterility a asepsy. Excíziou kože a podkožia sme urobili štvorcový umelý defekt. Zvieratá boli rozdelené do 2 skupín. Skupina 1 (n = 6): Boli vytvorené 2 kožné lézie 3 x 3 cm. Koža po excízii zväčšila svoju oblasť. Potom bolo lešenie CHIT/PHB implantované do rany kraniálne a CHIT/PHB obohatené o psie AT-MSC kondicionované médium v množstve (2 ml/cm<sup>2</sup>) kaudálne. Skupina 2 (n = 6): vytvorili sa kožné lézie 3 x 3 cm. Potom sa lešenie CHIT/PHB implantovalo do rany kraniálne a kaudálna lézia bola bez implantátu, ako kontrola. Primárne krytie rany sa uskutočnilo sterilným gázovým tampónom pripevneným k neporušenej koži resorbovateľným šicím materiálom. Sekundárnu vrstvu vonkajšieho krytia tvorila vodeodolná a priedušná fólia (Curapor, Lohman a Raucher int., Nemecko) a terciárnu vrstvu a fixáciu bandáže zabezpečovala fixačná elastická náplast' (Omnifix, Hartmann, Nemecko; obr.8D , E, F). Toaleta a rany a výmena sekundárneho a terciárneho krytia sa vykonávala každých 72 hodín. Odber vzoriek na histologické vyšetrenie sa uskutočnil 8., 10. a 12. týždeň po implantácii v celkovej anestézii s použitím izofluranu (Isofluran Piramal, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Viena, Rakúsko) v koncentrácii 5 % na navodenie anestézie a 3,5 % na chirurgický zákrok. Na histologickú štúdiu sme odobrali jednu vzorku (2 x 2 cm) od každého zvierat'a (n=2). Po odobratí vzoriek bola rana uzavretá a ošetrovaná podľa chirurgických štandardov.

Kožné biopsie boli fixované v 4% roztoku paraformaldehydu a spracované rutinným histopatologickým vyšetrením. Parafínové rezy (3-4 um) boli ponorené do xylénu a alkoholu, zafarbené metódou hematoxylín-eozín. Sklíčka boli upevnené v živici (Entellan; Merck, Nemecko).Histopatologické skóre hodnotili oddelene dvaja z výskumníkov. Na semikvantitatívnu analýzu bol použitý svetelný mikroskop OLYMPUS BX50 (Olympus; Tokio, Japonsko) s digitálnym fotoaparátom CANON EOS 2000D (Canon; Tokio, Japonsko) a softvérom na analýzu obrazu QuickPHOTO Industrial 2.3 (Promicra; Praha, Česká republika).

Štandardizované kritériá pre kvantitatívne hodnotenie hojenia kožných rán neboli doposiaľ definované. Preto sme na histopatologické hodnotenie hojenia kožných rán použili vlastný semikvantitatívny skórovací systém (0-3) nasledovne: 0 = žiadne; 1 = mierny; 2 = mierny; 3 = ťažké. Každá sekcia bola hodnotená pri 100x a 400x zväčšení.

Histopatologické skóre na hodnotenie biopsií kože:

0 = žiadne: normálna štruktúra kože bez histopatologických lézií (dobre definovaná architektúra epidermis a dermis, prítomnosť vlasových folikulov a iných kožných adnexov).

1 = mierna: štruktúra pripomína normálnu kožu, malé množstvo nezrelého tkaniva/granulačného tkaniva v derme, organizácia kolagénových vlákien je dobre definovaná, nevýrazná infiltrácia leukocytmi a/alebo krvácanie, prítomné vlasové folikuly, súvislá epidermis bez defektov.

2 = stredne závažné: výraznejšie zmeny v štruktúre kože, väčšie množstvo nezrelého/granulačného tkaniva v derme, homogénne eozinofilné zafarbenie extracelulárnej matrice, výraznejšia infiltrácia leukocytmi a/alebo krvácanie, absencia vlasových folikulov, je prítomná epidermis alebo/a zmenené (hrúbka a morfológia) + diskontinuálne (zistia sa fokálne defekty).

3 = ťažké: štruktúra kože je nerozoznatelná, nezrelé/zrnité tkanivo v derme, masívna infiltrácia leukocytmi a/alebo krvácanie, nekrotické lézie s kalcifikáciou, chýbajúce kožné adnexy, chýbajúca alebo úplne zmenená (nespojité s početnými defektmi) epidermis.

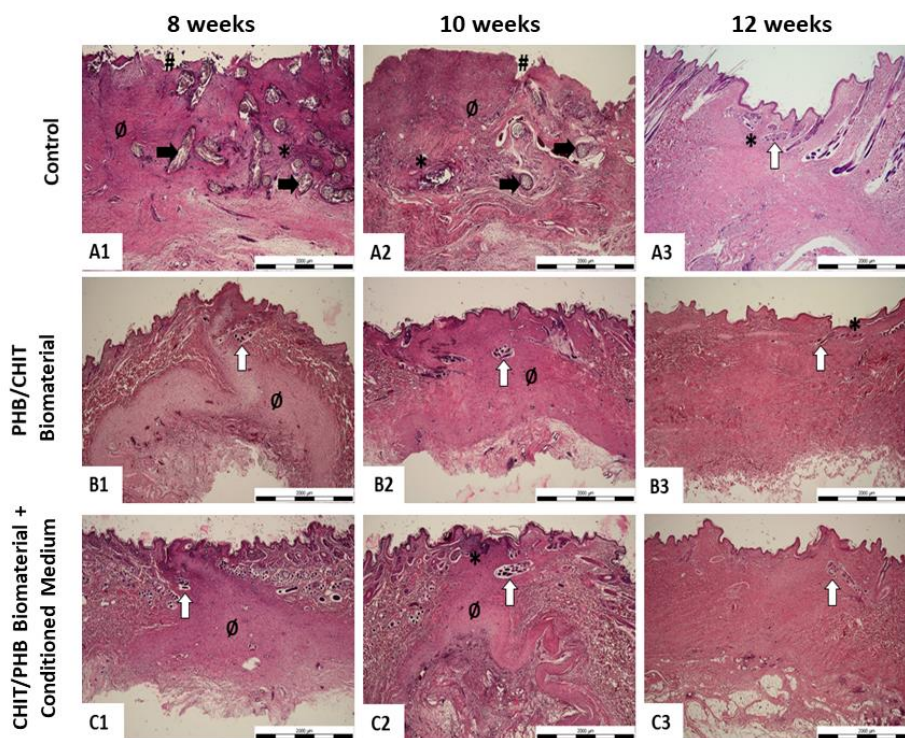
## Výsledky

Makroskopické vyšetrenie potvrdilo, že umelý kožný defekt sa u všetkých skúmaných zvierat po príslušných obdobiach pozorovania (8., 10. a 12. týždeň) dobre zahojil. Z makroskopických pozorovaní vyplýva že CHIT/PHB biomateriál obohatený o KM má pozitívny vplyv na rýchlosť hojenia rán. Ďalej sme pozorovali, že rany ošetrené CHIT/PHB nevykazujú žiadnu hypertrofiu granulačného tkaniva a tvorbu chrasty.

Výsledky histologického farbenia dokazujú, že po ôsmich a desiatich týždňoch od vzniku defektu a následnej aplikácii biomateriálu a biomateriálu obohateného o kondicionované médium dochádza k tvorbe granulačného tkaniva a vlasových folikulov (obr. 1 B1, B2 a C1 , C2). Rovnaký výsledok sme pozorovali aj v histologických vzorkách vyšetrených po desiatich týždňoch, čo v našom histopatologickom skóre znamená 1/1- (obr. 1 B1, B2 a C1, C2; tab. 1). V negatívnych kontrolných vzorkách z rovnakého časového obdobia nachádzame nekrotické lézie a chýbajúcu epidermis, ktoré hodnotíme ako 3 v našom skórovacom systéme (obr. 1, A1,



A2; tab.1). Po dvanástich týždňoch však pozorujeme v kontrolnej a experimentálnej skupine kožu normálnej štruktúry bez výskytu nekrotických ložísk, s vytvorenou epidermou a vlasovými folikulmi. Takéto zistenie zodpovedá hodnote 0/1 v skórovacom systéme (obr. 1, A3 - C3; tab.1). Výsledky histologickej analýzy a hodnotenia odobratých vzoriek kože n=2 zo všetkých skupín boli rovnaké alebo veľmi podobné.



**Obr. 1** Reprezentatívne mikrofotografie histopatologickej analýzy pre každú experimentálnu skupinu a obdobie hojenia.

Experimental group	Healing period		
	8w	10w	12w
Control	3	3	0/0-
Implant	1-	1-	0-/1
Implant + medium	1/1-	1-	0/0-

**Tab. 1** Výsledky histopatologického hodnotenia hojenia kožných rán.

## Diskusia

V našej štúdií sme opísali účinnosť biomateriálu na báze chitosanu/PHB a biomateriálu chitosanu/PHB v kombinácii s KM na proces hojenia rán na zvieracom modeli kráľika. Chitosan



je široko používaný v štúdiách hojenia rán pre svoje antibakteriálne, protizápalové vlastnosti, nízku imunogenicitu a biokompatibilitu. Rovnako chitosan vykazuje schopnosť zvyšovať bunkovú adhéziu, migráciu a proliferáciu a má vysokú schopnosť absorpcie vody, ktorá udržuje vlhkosť v rane ako aj bakteriostatické vlastnosti (4). Kombináciou chitosanu a PHB vzniká materiál so zlepšenou mechanickou pevnosťou a pórovitosťou matrice, ktorá je dôležitá pre difúziu živín a bunkovú infiltráciu (7). Výsledky boli potvrdené histologickou analýzou a použitím histopatologického skórovacieho systému, pri ktorom sa zohľadňujú atribúty ako architektúra dermis/epidermis, organizácia kolagénových vlákien, prítomnosť krvácania, zápalového infiltrátu a vlasových folikulov. Rozhodli sme sa vytvoriť vlastný systém, pretože chýba oficiálny systém histopatologického hodnotenia hojenia rán u králikov. Systém však berie do úvahy vlastnosti predchádzajúcich histopatologických systémov na hojenie rán, ktoré boli použité v iných zvieracích modeloch, ako sú myši a potkany (2). V 8. a 10. týždni po implantácii biomateriálu sa pozorovalo, že ošetrenie CHIT/PHB biomateriálom obohateným o kondicionované médium spôsobilo rýchlejšie uzavretie rany ako kontrola, rovnako ako žiadny obohatený biomateriál. Ďalej sme pozorovali, že rany ošetrené CHIT/PHB nevykazovali žiadnu hypertrofiu granulačného tkaniva a tvorbu chrasty, opäť na negatívnu kontrolu. Po 12 týždňoch sa však všetky lézie zahojili novovytvorenou srst'ou v celom rozsahu defektu. Výsledky histologického farbenia korelujú s klinickým stavom. Ukázalo sa, že po ôsmich a desiatich týždňoch od vzniku defektu a následnej aplikácii biomateriálu na báze chitosanu a toho istého biomateriálu obohateného o kondicionované médium dochádza k tvorbe granulačného tkaniva a vlasových folikulov. Rovnaký výsledok sme pozorovali v histologických vzorkách vyšetrených po desiatich týždňoch, čo v našom histopatologickom skóre znamená 1/1-. Veľmi podobné výsledky deklarovali aj iní autori uskutočnené na modeloch potkanov a myši (8) (9). Výsledky získané s použitím obohateného biomateriálu sa zdajú byť o pol bodu lepšie. Koreluje to s výsledkami našej predošlej publikovanej štúdie, kde bol použitý MSC-CM (10).

## **Záver**

Predložená štúdia popisuje pozitívny vplyv biomateriálu na báze chitosanu v kombinácii s kondicionovaným médiom izolovaným z kmeňových buniek z tukového tkaniva psov. Okrem toho sme čiastočne potvrdili možnosť medzidruhovej lokálnej aplikácie kondicionovaného média kmeňovými bunkami bez pozorovania akýchkoľvek nežiadúcich účinkov na zvieracom modeli králika. Na záver je potrebné povedať, že terapeutický efekt kondicionovaného média

kmeňových buniek závisí od obsahu rozpustných rastových faktorov, EV a voľných bioaktívnych molekúl, ktoré sú jeho podstatnou súčasťou.

## Literatúra

1. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ (2015) Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res.* 394917
2. Harman RM, Theoret CL, Van de Walle GR (2021) The Horse as a Model for the Study of Cutaneous Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*10(7): 381-99
3. Humeník F, Danko J, Krešáková L, Vdoviaková K, Vrabc V, Vasilová E, et al. (2023) A Chitosan-Based Biomaterial Combined with Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium for Wound Healing and Skin Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 24(22): 16080
4. Humeník F, Maloveská M, Hudáková N, Petroušková P, Šufliarska Z, Hornáková Ľ, et al. (2023) Impact of Canine Amniotic Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media on the Wound Healing Process: In Vitro and In Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences.* 24(9): 8214
5. Chen JS, Longaker MT, Gurtner GC (2013) Murine Models of Human Wound Healing. *Methods Mol Biol.* 1037: 265-74
6. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA (2012) Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl Med* 1(2): 142-9
7. Medvecký L, Giretova M, Stulajterova R (2014) Properties and in vitro characterization of polyhydroxybutyrate–chitosan scaffolds prepared by modified precipitation method. *J Mater Sci: Mater Med.* 25(3): 777-89
8. Pawitan JA(2014) Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int.* 2014;2014: 965849
9. Yupanqui Miele J, Vyas C, Aslan E, Humphreys G, Diver C, Bartolo P (2022) Honey: An Advanced Antimicrobial and Wound Healing Biomaterial for Tissue Engineering Applications. *Pharmaceutics.* 14(8): 1663.
10. Zhou S, Wang W, Zhou S, Zhang G, He J, Li Q (2019) A Novel Model for Cutaneous Wound Healing and Scarring in the Rat. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 143(2): 468.

Práca bola podporená grantom *KEGA č. 006UPJS-4-2024*.

# ALTERNATÍVNE ZVIERACIE MODELY VO VÝSKUME VÍRUSOVÝCH VEKTOROV

## ALTERNATIVE ANIMAL MODELS IN VIRAL VECTOR RESEARCH

**Júlia Hurniková, Zuzana Demčišáková, Eva Petrovová**

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 68, Košice

*julia.hurnikova@student.uvlf.sk*

### **Súhrn**

Génová terapia predstavuje sľubný potenciál v liečbe chronických aj akútnych ochorení prostredníctvom zavedenia terapeutického genetického materiálu do cieľových buniek pomocou vektorov. Vírusové vektory preukázali pozoruhodnú účinnosť aplikácie v širokom spektre chorôb a prinášajú nádejné výsledky v predklinických štúdiách na zvieratách a v klinických štúdiách. Novo dostupné testy a alternatívne zvieracie modely ponúkajú spoľahlivé testovacie prostredie na pochopenie účinnosti a bezpečnosti vírusových vektorov v rôznych biologických kontextoch, čím sa znižuje potreba používania cicavčích modelov vo výskume.

**Kľúčové slová:** alternatívne modely, vírusové vektory, génová terapia

### **Summary**

Gene therapy holds promising potential for treating both chronic and acute diseases by introducing therapeutic genetic material into target cells using vectors. Viral vectors have shown notable effectiveness across a broad spectrum of disease indications, showcasing encouraging results in both preclinical animal investigations and clinical trials. Newly available assays and alternative animal models offer a reliable testing environment for understanding the efficacy and safety of viral vectors in diverse biological contexts, reducing thus the need to use mammalian models in research.

**Key words:** alternative models, viral vectors, gene therapy

## Úvod

Génová terapia je liečba genetického ochorenia zavedením špecifického genetického materiálu, ktorý mení funkciu buniek, do tela pacienta pomocou nosičov na prenos génov, nazývaných vektory (1). Génový prenos je zavedenie cudzích génov alebo génových sekvencií do cieľovej bunkovej populácie pomocou nevírusových alebo vírusových vektorov na liečbu špecifickej poruchy u postihnutého jedinca (16). Úspešný prenos génov vyžaduje príjem terapeutickú sekvencie cieľovými bunkami internalizáciou bez modifikácie nežiaducich tkanív a buniek, po ktorej nasleduje endozomálny únik, aby sa zabezpečila ochrana cudzej sekvencie pred degradáciou. Následne je sekvencia transportovaná cez cytoplazmu do jadra, kde dochádza k jej expresii (16). V súčasnosti sa používajú vírusové vektory založené na retrovírusoch, adenovírusoch a adeno-asociovaných vírusoch. Zatiaľ čo v predklinických štúdiách zostávajú základným modelom laboratórne myši, pri pochopení účinnosti a bezpečnosti vírusových vektorov v rôznych biologických kontextoch, alternatívne modely zohrávajú čoraz dôležitejšiu úlohu. Táto prehľadová práca predstavuje využitie alternatívnych zvieracích modelov vo výskume vírusových vektorov a objasňuje ich rolu v napredovaní génovej terapie.

### **Danio pruhované (*Danio rerio*)**

Danio pruhované je v hodnotení vektorov génovej terapie alternatívou k tradičnému myšaciemu modelu. Tieto ryby disponujú hneď niekoľkými výhodami. Po prvé, ich veľkosť sa pohybuje v priemere medzi 3 až 4 cm, čo vedie k zníženým požiadavkám na priestor, zjednodušeniu manipulácie a umožňuje výskumníkom pracovať s väčšími populáciami za nižšie náklady. Po druhé, danio sa rýchlo rozmnožujú a každý pár dokáže vyprodukovať stovky ikier týždenne. Tie môžu byť oplodnené externe, čo vedie k nezávislému embryonálnemu vývoju a možnosti analýzy od najskorších štádií bunkového delenia až po úplnú dospelosť. Rýchly embryonálny a postembryonálny rast umožňuje rýchlu detekciu anomálií v priebehu niekoľkých dní (13). Genetické vlastnosti dania ponúkajú významné výhody, ako napríklad jednoduché vytvorenie knock-in a knock-out jedincov. Približne 70 % ľudských génov kódujúcich proteíny spojené s chorobami má u tohto druhu ryby ekvivalentný gén (6). Gulías a kol. (5) skúmali využitie dania ako *in vivo* modelu pre adenovírusové vektory. Demonštrovali účinnú transdukciiu dosiahnutú adenovírusovými vektormi s deléciou E1/E3 po intrakraniálnej injekcii do embryí rýb. Okrem toho pozorovali trvalú expresiu transgénu vpraveného pomocou vektorov, čím sa zdôraznil potenciál pre dlhodobé štúdie v tomto organizme. Vzhľadom na rozsiahlu škálu dostupných geneticky modifikovaných kmeňov dania a ohľadom na etické

aspekty výskumu predstavuje tento model sľubnú alternatívu na predklinické hodnotenie adenovírusových vektorov.

### **Vtáčia chorioalantoická membrána (CAM)**

Vtáčia chorioalantoická membrána (CAM) je extraembryonálna membrána vytvorená na štvrtý embryonálny deň (ED4) fúziou chorionu a alantoisu. CAM plní predovšetkým funkcie ako je výmena plynov, transport vápnika a regulácia acidobázickej rovnováhy v alantoickej dutine (11). Vďaka hustej vaskulárnej sieti sa CAM používa ako *in vivo* test v rôznych oblastiach výskumu, vrátane angiogenézy, bioinžinierstva, tkanivového inžinierstva a onkológie. Pomocou tohto modelu môžu výskumníci výrazne znížiť spotrebu cicavcov vo výskume, alebo ich potenciálne nahradiť, čím naplnia požiadavku princípov 3R (7). Štúdia Krutzkeho a kol. (10) predstavuje CAM ako rýchly a finančne efektívny vysokovýkonný nádorový model pre *in vivo* testovanie onkolytických vírusov. Aj keď na výskum použili iba ľudský adenovírus typu 5, sú presvedčení o všestrannosti modelu, ktorý by mohol slúžiť ako testovací systém pre širokú škálu vektorov odvodených od rôznych skupín vírusov. Výsledky týchto autorov ukazujú, že nádorový CAM model umožňuje intratumorálne a intravenózne podanie modifikovaného vírusu a ponúka komplexný prístup na analýzu kľúčových interakcií vírus-hostiteľ, biodistribučných vzorov a cielenia na nádor.

### **Bunkové kultúry**

Ako prídavok k zvieracím modelom slúžia bunkové kultúry ako nevyhnutné nástroje pri štúdiu správania vírusových vektorov, ich tropizmu a terapeutického potenciálu. Bunkové línie odvodené od rôznych tkanív a organizmov ponúkajú zjednodušené, no kontrolované prostredie na štúdium molekulárnych mechanizmov, ktoré sú základom interakcií vektor-hostiteľ. Tieto *in vitro* modely poskytujú cenné poznatky o interakciách vektor-bunka, dráhach vstupu vektorov a bunkových odpovediach na vektorovú transdukciiu, čím kladú základy pre optimalizáciu dizajnu vektorov a zlepšenie terapeutických výsledkov *in vivo*. Nedávne výskumy štruktúry kapsidov adeno-asociovaných vírusov (AAV) v kombinácii s poznatkami získanými z experimentov s mutagenézou kapsidových génov presne určili kritické oblasti zodpovedné za tkanivový tropizmus AAV vektora a jeho intracelulárne správanie. Tieto štúdie viedli k vytvoreniu nových AAV vektorov s mutáciami v kapside, ktoré zvyšujú účinnosť transdukcie naprieč rôznymi typmi buniek a tkanív v porovnaní s wild-type (WT) vektormi (20). Sayroo s kolektívom (18) dosiahli účinnú transdukciiu niekoľkých ľudských rakovinových

bunkových línií, vrátane adenokarcinómu, karcinómu mliečnej žľazy a hepatokarcinómu pomocou vektorov AAV6. Využitím rôznych stratégií na modifikáciu kapsidu AAV6-WT vyvinuli vektor založený na AAV, ktorý je schopný špecificky a účinne zacieliť na maligne bunky.

### **Organoidy**

Organoidy predstavujú trojrozmerné bunkové štruktúry kultivované v laboratórnom prostredí, ktoré odrážajú stavbu, funkcie a genetickú expresiu pôvodného tkaniva (9). Slúžia ako cenné nástroje na skúmanie priebehu chorôb, tvorby orgánov a iných základných biologických procesov. Okrem toho tieto 3D organoidy ponúkajú platformu na vývoj a hodnotenie rôznych liečiv, vrátane tých, ktoré využívajú techniky génovej terapie a úpravy genómu (4). Organoidy možno získať buď zo vzoriek biopsie alebo z kmeňových buniek pacienta. V prvom prípade organoidy pochádzajú z tkanivovo špecifických kmeňových buniek extrahovaných z bioptického materiálu a kultivovanými s rastovými faktormi. Táto metóda je finančne výhodná a rýchla, výsledné organoidy sú však obmedzené typmi buniek prítomných v odobratom materiáli (17). Alternatívne môžu byť organoidy generované z embryonálnych kmeňových buniek (ESC), ktoré majú potenciál diferencovať sa na rôzne typy buniek. Špecifické typy organoidov získaných z ESC závisia od zloženia kultivačného média použitého na vyvolanie diferenciácie. Získanie ESC je však komplikované kvôli obmedzenej dostupnosti tohto typu buniek a z etických dôvodov (2). Depla a kol. (3) navrhli mozgové organoidy odvodené z pluripotentných kmeňových buniek ako platformu na výber kapsidov rekombinantných adeno-asociovaných vírusových vektorov (rAAV) a hodnotenie účinnosti génových terapií založených na AAV. Tieto mozgové organoidy predstavujú fyziologické 3D štruktúry, ktoré lepšie imitujú zložitosť ľudského mozgu v porovnaní s bežnými 2D bunkovými líniami. Na overenie svojho modelu porovnali účinnosť dvoch bežne používaných sérotypov AAV. Ich zistenia predstavujú nový prístup k výberu a optimalizácii sérotypov AAV a demonštrujú terapeutickú účinnosť transgénov. Začlenenie cerebrálnych organoidov do vývoja génovej terapie má potenciál znížiť závislosť na zvieracích modeloch a zvýšiť transláciu do klinických aplikácií.

### **Organ-on-chip**

Spojením modelov založených na mikrofyziológických systémoch s organoidmi vznikla platforma známa ako organ-on-chip. Mikrofyziológické systémy sú skonštruované

v biologicky relevantnom meradle, využívajúc prietok tekutín a mechanické stimuly na vytvorenie dynamického prostredia, ktoré úzko napodobňuje fyziológiu a mikroprostredie natívnych tkanív. Začlenenie týchto prvkov umožňuje generovanie biomolekulových gradientov a zavedenie mechanických javov, ako je šmykové napätie a kontrakcia/relaxácia, čo umožňuje vernejšiu replikáciu fyziologických charakteristík jedinečných pre každé tkanivo v porovnaní s tradičnými statickými kultúrami (12, 14). Keďže ide o systémy založené výlučne na ľudských štruktúrach, platforma organ-on-chip sľubuje presné predpovedanie účinnosti transdukcie špecifických typov ľudských buniek, trompizmu/selektivity transdukcie pri konfrontácii s viacerými ľudskými tkanivami/bunkami súčasne, bunkovú špecifickosť promótorov v ľudských tkanivách a výskyt, ako aj presné genómové umiestnenie inzercie AAV. Okrem toho majú tieto platformy aj konštrukčné výhody pre výskum génovej terapie. Napríklad mikrofluidné zariadenia fungujú pri minimálnych objemoch, čo umožňuje dosiahnutie vysokých pomerov účinnosti transdukcie bez potreby aplikácie veľkého množstva vektorov (8, 15, 19).

## Literatúra

1. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PW, Gao G (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6: 53
2. de Wert G, Mummery (2003) Human embryonic stem cells: Research, ethics and policy. *Human Reproduction* 18 (4): 672-682
3. Depla JA, Sogorb-Gonzalez M, Mulder LA, Heine VM, Konstantinova P, van Deventer AJ et al. (2020) Cerebral Organoids: A Human Model for AAV Capsid Selection and Therapeutic Transgene Efficacy in the Brain. *Molecular Therapy, Methods, and Clinical Development* 18: 167-175
4. Dutta D, Heo I, Clevers H (2017) Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems. *Trends in Molecular Medicine* 23 (5): 393-410
5. Gúlias P, Guerra-Varela J, Gonzalez-Aparicio M, Ricobaraza A, Vales A, Gonzalez-Aseguinolaza et al. (2019) Danio Rerio as Model Organism for Adenoviral Vector Evaluation. *Genes* 10 (12): 1053
6. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496 (7446): 498-503
7. Chen L, Wang S, Feng Y, Zhang J, Du Y, van Ongeval CH et al. (2021) Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imagining-navigated biomedical research. *Cells* 10 (2): 463
8. Chi CHW, Ahmed AHR, Dereli-Korkut Z, Wang S (2016) Microfluidic cell chips for high-throughput drug screening. *Bioanalysis* 8 (9): 921-937
9. Kim J, Koo BK, Knoblich JA (2020) Human organoids: Model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (10): 571-584
10. Krutzske L, Allmendinger E, Hirt K, Kochanek S (2020) Chorioallantoic Membrane Tumor Model for Evaluating Oncolytic Viruses. *Human Gene Therapy* 31 (19-20): 1100-1113
11. Mangir N, Dikici S, Claeysse F, MacNail S (2019) Using ex ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay to Evaluate the Biocompatibility and Angiogenic Response to Biomaterials. *ACS Biomaterials Science and Engineering* 5 (7): 3190-3200
12. Marx U, Akabane T, Andersson TB, Baker E, Beilmann M, Beken S et al. (2020) Biology-inspired microphysiological systems to advance patient benefit and animal welfare in drug development. *Altx* 37 (3): 365-94
13. Nasiadka A, Clark MD (2012) Zebrafish breeding in the laboratory environment. *IRAL Journal* 53 (2): 161-8
14. Rajan SAP, Aleman J, Wan M, Zarandi Pourhabibi N, Nzou G, Murphy S et al. (2020) Probing prodrug metabolism and reciprocal toxicity with an integrated and humanized multi-tissue organ-on-a-chip platform. *Acta Biomaterialia* 106: 124-35

15. Ramamurthy RM, Atala A, Porada CHD, Almeida-Porada G (2022) Organoids and microphysiological systems: Promising models for accelerating AAV gene therapy studies. *Frontiers in Immunology* 13:1011143
16. Rey-Rico A, Cucchiaroni M (2016) Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomaterialia* 29: 1-10
17. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, van Ens JH, van den Brink S et al. (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141 (5): 1762-1772
18. Sayroo R, Nolasco D, Yin Z, Colon-Cortes Y, Pandya M, Ling C, Aslanidi G (2016) Development of novel AAV serotype 6 based vectors with selective tropism for human cancer cells. *Gene Therapy* 23 (1): 18-25
19. Schuster B, Junkin M, Kashaf SS, Romero-Calvo I, Kirby K, Matthews J et al. (2020) Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids. *Nature Communications* 11 (1): 5271-82
20. Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M et al. (2008) Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (22): 7828-32

Táto práca bola podporená projektom *APVV-20-0073* a *VEGA 1/0074/24*.



# UNILATERÁLNA NEKOMPLETNÁ DUPLIKÁCIA URETERU: KAZUISTIKA

## UNILATERAL INCOMPLETE URETERAL DUPLICATION: A CASE REPORT

**Natália Hvizdošová, Janka Vecanová, Ingrid Hodorová**  
Ústav anatómie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice  
*natalia.hvizdosova@upjs.sk*

### **Súhrn**

Počas rutinnej pitvy pre študentov všeobecného lekárstva sme zistili unilaterálny nález vrodenej anomálie vývodných močových ciest na kadáveri ženského pohlavia. V práci je opísaný prípad jednostrannej neúplnej duplikácie ureteru s výskytom na ľavej strane. Neúplne zdvojenie močovodu je charakterizované prítomnosťou dvoch samostatných močovodov vychádzajúcich z jednej obličky, ktoré sa následne spoja do spoločného vyústenia do močového mechúra. Takáto anomália vývoja je často asymptomatická, ale môže byť spojená s viacerými klinickými komplikáciami močových ciest. Poznanie anatomických anomálií a ich klinických dôsledkov je nevyhnutné pre správnu diagnostickú interpretáciu a možnú intervenciu.

**Kľúčové slová:** ureter, duplikácia, anomália

### **Summary**

During a routine dissection for general medical students, we found a unilateral finding of a congenital anomaly of the urinary tract on the cadaver of a female patient. A case of unilateral and incomplete ureteral duplication presenting on the left side is described. Incomplete ureteral duplication is characterized by the presence of two ureters arising from a single kidney followed by a common outlet to the bladder via a common ureter. Ureteral duplication is often asymptomatic but may be associated with several urinary tract complications. Knowledge of the anatomical anomalies and clinical implications is essential for accurate diagnosis and correct intervention.

**Key words:** ureter, duplication, anomaly

## Úvod

Anomálie obličiek a močových ciest predstavujú 23% zo všetkých vrodených chýb (6). Jednou z vrodených anomálií obličiek je duplikácia močovodu, ktorej výskyt sa pohybuje v rozmedzí 0,7 - 4%. Duplikácia močovodu má vyššiu incidenciu u žien a môže byť neúplná (nekompletná) alebo úplná (kompletná) (8). Neúplná duplikácia, tzv. ureter fissus, má trikrát častejší výskyt v porovnaní s úplným zdvojením močovodu a zvyčajne sa vyskytuje v proximálnom, a len veľmi zriedkavo v distálnom segmente močovodu (7). Pri neúplnej duplikácii ústia dva samostatné močovody do močového mechúra prostredníctvom jedného spoločného močovodu. Duplikácia môže byť jednostranná alebo obojstranná, avšak výskyt obojstrannej duplikácie sa uvádza len u 0,3% pacientov. Z embryologického hľadiska sú neúplné duplikácie výsledkom abnormálnej fúzie základov vývodných močových ciest z mezonefrického vývodu, zatiaľ čo úplné duplikácie sú výsledkom vzniku dvoch samostatných močovodov z mezonefrického vývodu (4). Zdvojenie močovodu je zvyčajne klinicky asymptomatické, ale môže byť spojené s inými vrodenými abnormalitami (ureterokéla, vezikoureterálny reflux) alebo patologickými jednotkami (urolitiáza, hematúria). Anatomické variácie močovodov zvyšujú možnosť iatrogeného poškodenia močovodu počas chirurgickej intervencie v brušnej alebo panvovej dutine. V práci uvádzame prípad náhodne objavenej ľavostrannej neúplnej duplikácie močovodu počas anatomickej pitvy kadáveru ženského pohlavia vo veku cca 80 rokov.

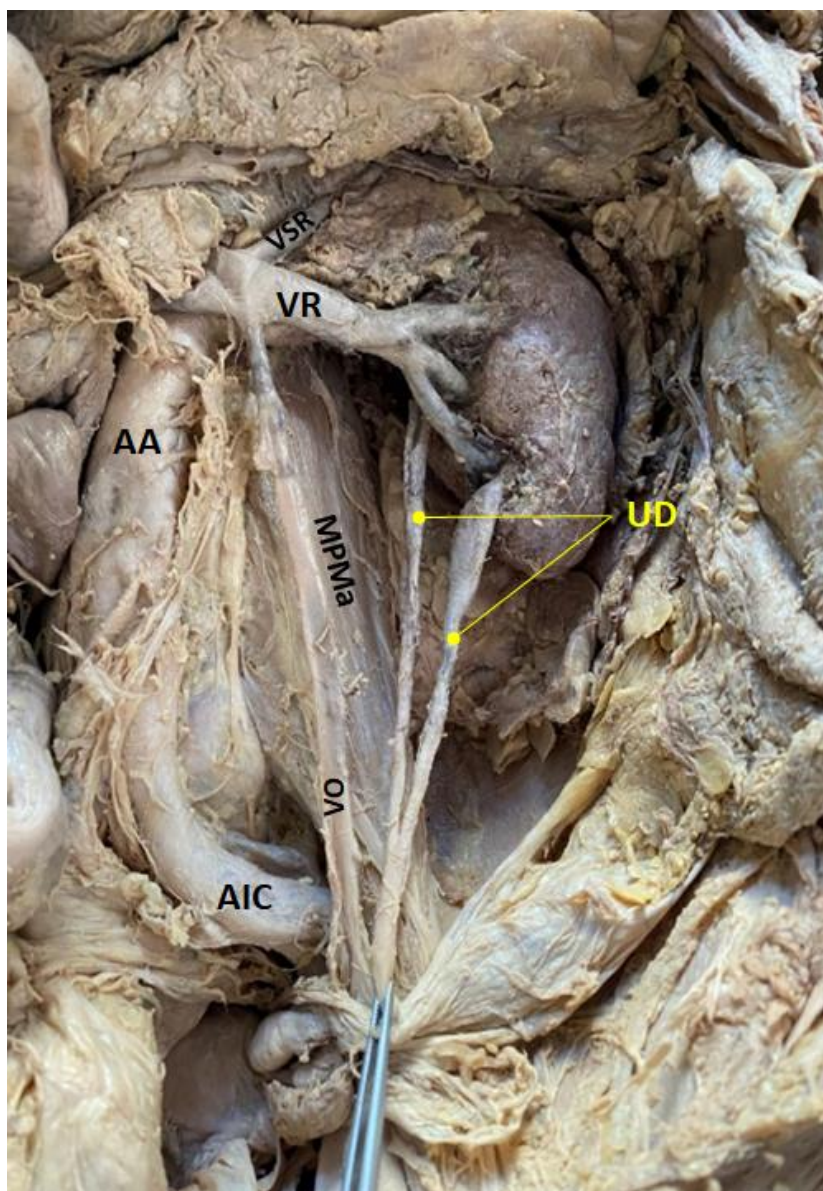
## Materiál a metódy

Uvedená anomália bola náhodne zistená u 80 ročnej ženy počas rutínnej anatomickej pitvy na Ústave anatómie UPJŠ LF. Kadáver darcu bol krátko po smrti fixovaný konzervačným roztokom na báze formalínu a benzínalkoholu. Pitva bola vykonaná súlade s pitevným protokolom a počas pitvy boli dodržané všetky etické princípy.

## Výsledky

Pri pitve v retroperitoneálnom priestore sme našli neúplne zdvojený ľavý močovod. Po odstránení parietálneho listu peritonea sme sledovali priebeh močovodov distálne až po vyústenie do močového mechúra. Zistili sme, že v úrovni kríženia močovodov s vasa ovarica, ventrálne od musculus psoas major sa obidva močovody spojili (cca 6 cm distálne od hilum renale) do jedného spoločného močovodu s následným vyústením do močového mechúra. Pri proximálnom sledovaní močovodov sme zistili prítomnosť dvoch samostatných obličkových panvičiek. Jeden močovod nadväzoval priamo na fyziologicky uloženú obličkovú panvičku

v hilum renale a druhý močovod vychádzal z inferiórnej časti hilum renale v blízkosti dolného pólu obličky spolu s vena renalis (Obr.1). Ureter dexter prebiehal fyziologicky a bez prítomnosti anatomickej variácie. Zmeny v cievnom zásobení obličky sme nepozorovali a obličkové tepny odstupovali štandardne z aorta abdominalis.



**Obr. 1** Nekompletný ureter duplex sinister (Y-tvar) v retroperitoneálnom priestore  
UD-ureter duplex; VR-vena renalis; AA-aorta abdominalis; AIC-arteria iliaca communis; VO-vena renalis;  
VSR-vena suprarenalis; MPMa-musculus psoas major

## **Diskusia**

Zdvojený močovod je vrodená anomália močových ciest spôsobená abnormalitou vo vývoji mezonefrického vývodu. Prevalencia čiastočnej duplikácie močovodov je podľa Dähnera (2) trikrát vyššia v porovnaní s úplnou duplikáciou. V publikovanej štúdií 50 intravenózných pyelogramov bola zistená neúplná duplikácia len v jednom prípade, a to vpravo (5). Pri vyšetrení 50 kadáverov, Prakash et al. pozorovali úplnú duplikáciu na pravej strane na jednom kadáveri a čiastočne zdvojenie na dvoch kadáveroch, jednostranne. V našej práci uvádzame náhodný pitevný nález zdvojeného močovodu v retroperitoneálnom priestore na kadáveri ženského pohlavia vo veku približne 80 rokov. Nález sa vyskytoval unilaterálne vľavo pričom anomálie v priebehu pravého močovodu sme nezistili. Zdvojené odvodné močové cesty sú zvyčajne klinicky asymptomatické, diagnostikujú sa náhodne bez pridružených renálnych abnormalít a považujú sa za normálny variant (4). Ak sú prítomné renálne abnormality pri neúplných duplikáciách, majú tendenciu postihovať celú obličku, pri úplných duplikáciách môžu postihovať jeden alebo oba póly obličky. Prítomnosť zdvojeného močovodu môže zostať bezpríznaková alebo môže spôsobiť komplikácie, ako je stenóza močovodu, výskyt močových kameňov a pyelonefritída. Až 40 % patologických stavov urogenitálneho systému je spôsobených vrodenými abnormalitami, ktoré môžu byť diagnostikované pomocou intravenózne pyelografie (1). Pri ureter duplex vzniká aj riziko infekcie močových ciest spôsobenej obštrukciou druhého močovodu, kameňmi alebo vezikoureterickým refluxom (3). Prítomnosť ureter duplex môže predstavovať možnosť ako zachovať jeden ureter pri resekcii z dôvodu uroteliálneho karcinómu jedného z močovodov. Poznanie takýchto abnormalít je nevyhnutné pre diferenciálnu diagnostiku pri urografii alebo cystografii.

## **Záver**

Neúplná duplikácia močovodu je vrodená anomália, ktorá je často klinicky asymptomatická, avšak môže predisponovať jedincov k urologickým komplikáciám, ako sú opakované infekcie močových ciest, hydronefróza, urolitiáza alebo ureterokéla. Znalosť anomálii močového systému je nevyhnutná pre správny manažment v lekárskej praxi, ktorý môže siahať od konzervatívneho prístupu až po chirurgický zákrok.

## **Literatúra**

1. Busslinger M, Kaiser G (1992) Surgical significance of duplex kidney with bifid ureter. Eur J Paediatric Surg 2(3): 150-151
2. Dähner W (2007) Radiology review manual. 6 ed. Philadelphia: Lipincott Williams Wilkins

3. Das S, Dhar P, Mehra RD (2001) Unilateral isolated bifid ureter: a case report. *J Anat Soc India* 50(1): 43-44
4. Didier RA, Chow JS, Kwatra NS, Retik AB, Lebowitz RL (2017) The duplicated collecting system of the urinary tract: embryology, imaging appearances and clinical considerations. *Pediatr radiol* 47, 1526-1538.
5. Prakash, Rajini T, Venkatiah J, Bhardwaj AK, Singh DK, Singh G (2011) Double Ureter and Duplex System: A Cadaver and Radiological Study. *Urol J* 8(2): 145-148
6. Protoshchak VV, Iglovikov NY, Shevnin MV (2020) Combination of urolithiasis and anomaly: Bifid ureter with fusion in the intramural part. *Urol Ann* 12(2): 196-198
7. Sen V, Aydogdu O, Yonguc T, Bozkurt IH, Polat S, Basmaci I (2015) Endourological treatment of bilateral ureteral stones in bilateral ureteral duplication with right ureterocele. *Can Urol Assoc J* 9(7-8): 511-513.
8. Varlatzidou A, Zarokosta M, Nikou E, Theodoropoulos P, Kakaviatos D, Piperos T, Mariolis-Sapsakos T (2018) Complete unilateral ureteral duplication encountered during intersphincteric resection for low rectal cancer. *J Surg Case Rep* 266

# REGENERÁCIA DLHÝCH KOSTÍ NA ANIMÁLNO M MODEL I OVIEC S POUŽITÍ M FOSFOREČ NANU VÁ PENATÉ HO OBOHATENÉ HO O SÍ RAN VÁ PENATÝ

## REGENERATION OF LONG BONES IN A SHEEP ANIMAL MODEL USING CALCIUM PHOSPHATE ENRICHED WITH CALCIUM SULPHATE

Sonja Ivašková<sup>1</sup>, Lenka Krešáková<sup>1</sup>, Katarína Vdovíaková<sup>1</sup>, Filip Korim<sup>1</sup>, Filip Humeník<sup>1</sup>,  
Lubomír Medvecký<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra morfolo gických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Ústav materiálového výskumu SAV, Watsonova 47, Košice

*sonja.ivaskova@uvlf.sk*

### Súhrn

Cieľom našej štúdie bolo *in vivo* sledovanie terapeutického účinku biomateriálu na báze fosforečnanu vápenatého obohateného o hemihydrát síranu vápenatého na proces regenerácie kostného tkaniva. Náš výskum sme zamerali na sledovanie biokompatibility, bioaktivity, biodegradácie, osteinduktivity a osteokonduktivity biomateriálu s okolitým kostným tkanivom aplikovaného do umelo vytvorených kostných defektov u oviec. Regenerácia kostného tkaniva bola hodnotená makroskopicky a mikroskopicky po 6 mesiacoch od aplikácie. V mieste aplikácie biomateriálu sme makroskopicky pozorovali hladký povrch. Po narezaní tkaniva sme pozorovali čiastočne resorbovaný biomateriál, ktorý bol pevne spojený s okolitým kostným tkanivom. Mikroskopicky sa na okrajoch biomateriálu nachádzalo ako vláknité tak aj lamelárne kostné tkanivo. V okolitom kostnom tkanive sme nezaznamenali prítomnosť buniek zápalovej reakcie alebo iné patologické zmeny.

**Kľúčové slová:** biomateriál, fosforečnan vápenatý, síran vápenatý, regenerácia kostí, ovca

### Summary

The goal of our study was to monitor *in vivo* the therapeutic effect of a biomaterial based on calcium phosphate enriched with calcium sulfate hemihydrate on the process of bone tissue regeneration. We focused our research on monitoring the biocompatibility, bioactivity, biodegradation, osteoinductivity and osteoconductivity of the biomaterial with the surrounding

bone tissue applied to artificially created bone defects in sheep. Bone tissue regeneration was assessed macroscopically and microscopically 6 months after application. Macroscopically, we observed a smooth surface at the site of application of the biomaterial. After cutting the tissue, we observed a partially resorbed biomaterial that was firmly connected to the surrounding bone tissue. Microscopically, both fibrous and lamellar bone tissue was found at the edges of the biomaterial. In the surrounding bone tissue, we did not notice the presence of inflammatory reaction cells or other pathological changes.

**Key words:** biomaterial, calcium phosphate, calcium sulphate, bone regeneration, sheep

## Úvod

Ortopedické a zubné kostné defekty sú bežné problémy, ktoré sa môžu vyskytnúť v dôsledku traumy, infekcií, novotvarov, vrodených stavov alebo jednoducho starnutím. Preto sú potrebné štepy na nahradenie poraneneho tkaniva, čím sa zabezpečí tesné spojenie medzi implantátom a hostiteľskou kosťou. Materiály použité v tomto procese musia poskytovať ideálne štrukturálne prostredie pre bunky, ktoré sa podieľajú na procese hojenia kostí. Autogénna kosť je považovaná za „zlatý štandard“ pre regeneráciu kosti kvôli jej osteogénnym, osteokonduktívnym a osteoinduktívnym vlastnostiam. Jeho použitie však závisí od dostupnosti kostí s nevýhodami, ako je riziko vaskulárno-nervových lézií a morbidita v mieste príjemcu, čím sa jeho použitie obmedzuje (3). Menej invazívnou alternatívou sú xenogénne, alogénne a aloplastické kostné štepy. Obmedzenia xenogénnych štepov spočívajú v ich obmedzenej schopnosti plne sa začleniť do natívnej kosti, pričom sú prítomné v implantovanej oblasti po dlhú dobu, okrem rizika odmietnutia alebo prenosu choroby. Alogénna kosť vykazuje znížené osteoindukčné vlastnosti a takéto štepy majú riziko imunoreakcií a prenosu infekcií (4). Alternatívou ku kostným štepom je použitie širokej škály kostných náhrad v podobe biomateriálov (13). Hlavné stratégie pre reparáciu kostí predstavujú syntetické náhrady, nosiče kombinované s rôznymi aktívnymi molekulami, bunková terapia, biomimetické vláknité a nevláknité náhrady, bioaktívne polyméry, anorganické kompozity a pod. (1). Tento typ štepu bol skúmaný kvôli jeho výhodám, ako je ľahká manipulácia, veľká dostupnosť tvarov a veľkostí a veľká rozmanitosť zdrojov na jeho výrobu. Okrem toho použitie aloplastických biomateriálov prispieva k zníženiu chirurgickej morbidity, absencie antigenicity a rizika prenosu ochorenia (10).

V prípade kostí by mali byť materiály prednostne ako osteoinduktívne (schopné podporovať diferenciáciu progenitorových buniek po osteoblastickej línii), osteokonduktívne (podporovať rast kostí a podporovať vrastanie okolitej kosti) a schopné osteointegrácie (integrovat' sa do

okolitej kosti). Ideálnym základným predpokladom je, že materiály budú v priebehu času resorbované a nahradené a v súlade s novo regenerovaným biologickým tkanivom tela (11). Pri vývoji alternatívnych biomateriálov a ortopedických implantátov treba brať do úvahy aj mechanické vlastnosti, povrchové vlastnosti ako aj chemické vlastnosti materiálu, aby čo najlepšie kopíroval biomechanické vlastnosti kosti a integráciu s natívnym tkanivom pri zachovaní jeho integrity počas požadovanej doby (8).

Cieľom nášho výskumu bolo *in vivo* sledovanie kompozitného biomateriálu CAS na proces regenerácie kostného tkaniva. Zamerali sme sa na biokompatibilitu, biodegradáciu, osteoindukciu a resorpciu materiálu na báze fosforečnanu vápenatého obohateného o hemihydrát síranu vápenatého vo forme pasty na animálnom modeli ovce.

## **Materiál a metodika**

Použili sme biomateriál CAS na báze fosforečnanu vápenatého, ktorý bol obohatený o hemihydrát síranu vápenatého. Pred aplikáciou do kostných defektov sa zmes zmieša s vytvrdzovacou kvapalinou. Vzniknutá pasta sa následne aplikuje do vytvoreného defektu. *In vivo* testovanie biokompozitného materiálu sme realizovali na 6 ovciach o váhe 50 – 80 kg vo veku 2 – 2,5 roka. Chirurgický zákrok je vykonaný v celkovej anestézii. Na sedáciu oviec sme použili intramuskulárnu aplikáciu butorphanolu (0,01 mg na kg ž. h.) v kombinácii s medetomidínom (0,02 mg na kg ž. h.). Na intubáciu zvierat'a sa podáva i.v. 2 ml ketamínu a následne na udržiavanie anestézy sa podáva ketamín v malých množstvách. Za pomoci vrtačky s vrtákom o priemere 9 mm sa vyvrta defekt so šírkou 10 mm a hĺbkou 10 mm v proximálnej epifýze ľavej holennej kosti. Do defektu sa aplikuje biocement pastovitej konzistencie, ktorý sa vymiešava asepticky krátko pred aplikáciou. Po 6 mesiacoch od aplikácie sme vyhodnotili výsledky makroskopicky, histologicky za použitia farbenia hematoxylín - eozín a pomocou RTG a CT vyšetrenia.

## **Výsledky**

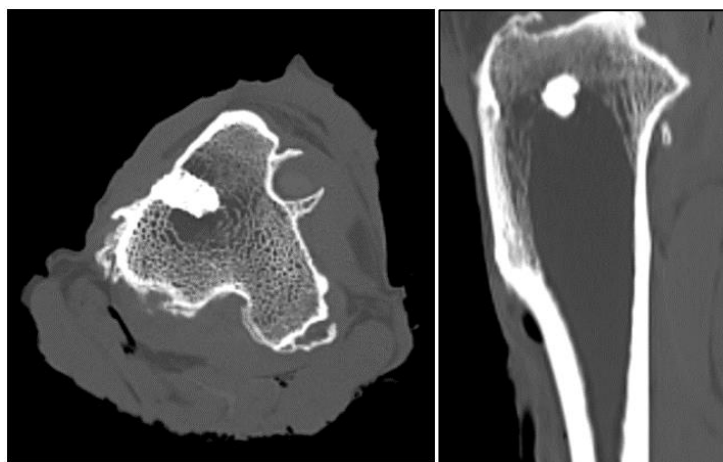
Makroskopicky sme pozorovali v mieste aplikácie biokompozitného cementu hladký povrch kosti, uzavretie defektu kompaktným kostným tkanivom zhodným s okolitým tkanivom. Nepozorovali sme žiadnu zápalovú reakciu okolitého tkaniva ani pozostatok biomateriálu. Kostné tkanivo sme následne narezali. V mieste aplikácie materiálu sme po narezaní kosti sledovali čiastočne neresorbovaný biomateriál, ktorý bol pevne integrovaný do okolitej kosti bez makroskopicky viditeľnej zápalovej reakcie tkaniva. CT vyšetrenie nám taktiež poukazuje



na integráciu biomateriálu do kosti a jeho prerastenie novým kostným tkanivom na povrchu kosti. Na histologických preparátoch sme sledovali na okrajoch neresorbovaného materiálu formáciu vláknitého kostného tkaniva s resorpčnými kanálmi, ako aj už premenené vláknité kostné tkanivo na lamelárne kostné tkanivo s prítomnosťou osteónov, osteogeneticky aktívnych buniek a Haversových kanálikov. Histologicky nebola pozorovaná prítomnosť zápalových buniek čo nasvedčuje, že regenerácia kostného tkaniva prebieha bez nežiadúcich reakcií organizmu. Na základe histologický preparátov môžeme zhodnotiť, že použitý materiál je biokompatibilný s kostným tkanivom, keďže nedochádza k zápalovej reakcii organizmu, má priaznivú bioaktívnu vlastnosť, čo nám dokazuje pevné spojenie s okolitým kostným tkanivom. Taktiež vykazuje aj osteokonduktívne a osteoinduktívne vlastnosti a dobrú biodegradovateľnosť.



**Obr. 2** Vľavo: miesto vytvoreného defektu prerastené okosticou. Vpravo: RTG snímok umiestnenia defektu po chirurgickom zákroku.



**Obr. 3** CT snímok po 6 mesiacoch od chirurgického zákroku. Vľavo: prierez proximálnej hlavice holennej kosti. Vpravo pozdĺžny prierez holennej kosti.

## Diskusia

Cementy na báze fosforečnanu vápenatého sú často používané na terapiu kostných defektov, vďaka ich podobnosti s kostným hydroxyapatitom a vynikajúcej biokompatibilite a osteokonduktivite (2). Jednou z najdôležitejších charakteristík kalcium fosfátov je ich schopnosť tvoriť sa *in situ* prostredníctvom reakcie rozpúšťania a vyzrážania pri telesnej teplote (5). Táto vlastnosť dáva vznik ďalším prospešným vlastnostiam ako je schopnosť tvarovania po zmiešaní (7), vstrekovateľnosť, ktorá umožňuje minimálne invazívnu aplikáciu (14) a schopnosť slúžiť ako nosič pre dodávanie liečiv a biologických molekúl (6).

V štúdiu Zhao a kol. (15) použili kalcium fosfát obohatený o síran vápenatý impregnovaný antibiotikami u pacientov na liečbu chronickej osteomyelitídy. Uviedli, že skupina pacientov, ktorá bola liečená za pomoci tohto materiálu mala vyššiu mieru formácie nového kostného tkaniva s nízkou mierou recidívy infekcie oproti skupine kde použili samotný síran vápenatý. Podobne výsledky mali v štúdiu Urban a kol. (12), kde porovnávali rýchlosť hojenia defektov u psov za použitia biomateriálu na báze fosforečnanu vápenatého obohateného o síran vápenatý ( $\text{CaSO}_4/\text{CaPO}_4$ ) a síran vápenatý. U skupiny psov kde bol použitý  $\text{CaSO}_4/\text{CaPO}_4$  biomateriál (skupina A) došlo k výrazne vyššej tvorbe nového kostného tkaniva a takisto aj vyššej odolnosti kosti voči mechanickým silám než u skupiny, u ktorej bol použitý samotný síran vápenatý (skupina B). Pacientov sledovali po 13 a 26 týždňoch kedy u skupiny A bol stále čiastočne prítomný neresorbovaný biomateriál narozdiel od skupiny B, u ktorej došlo k úplnej resorpcii biomateriálu už v 13. týždni, čím došlo k vytvoreniu prázdnych dutín v defekte, čo je nežiadúce kvôli možnej infekcií a spomaleniu hojenia kosti. Takisto aj v našej štúdiu je po 6 mesiacoch stále prítomnosť biocementu a rýchlosť odbúravania materiálu je pomerná rýchlosti prerastania nového kostného tkaniva.

V žiadnej z týchto štúdií nebola zaznamenaná patologická reakcia organizmu na biomateriál, rovnako ako aj v našej štúdiu sme nezaznamenali zápalovú reakciu organizmu ani vytvorenie fibróznej kapsuly či infiltrátu tkaniva bunkami zápalovej reakcie. Preto môžeme považovať kalcium fosfát obohatený o hemihydrát síranu vápenatého za vysoko biokompatibilný a bez schopnosti vyvolať zápalovú reakciu.

Resorpcia a degradácia biomateriálu použitá v našej štúdiu bola čiastočná, čo naznačujú aj ďalšie štúdie (9, 12, 15).

Rôzne ďalšie štúdie biomateriálov na báze fosforečnanu vápenatého v kombinácii so síranom vápenatým poukazujú na to, že tieto biomateriály podporujú adhéziu osteoblastov a

mezenchýmových buniek a ich následnú diferenciáciu a proliferáciu a podporujú tak hojenie kostných defektov.

## **Záver**

Defekty vyplnené biomateriálom na báze fosforečnanu vápenatého obohateného o hemihydrát síranu vápenatého vo forme pasty vykazovali dobrú biokompatibilitu kosti s biomateriálom, došlo k aktivácii osteoblastov a tvorbe novej vláknitej kosti v okolí biomateriálu. Na okolitom tkanive nebola pozorovaná zápalová reakcia ani iné patomorfologické zmeny. Biodegradácia a bioresorpcia materiálu bola čiastočná a valce boli pevne zrastené v kostnom tkanive a bola zachovaná ich integrita. Biomateriál má taktiež priaznivú bioaktívnu vlastnosť, čo nám dokazuje pevné spojenie s okolitou kosťou z čoho môžeme konštatovať, že tento materiál je vysoko kompatibilný s kostným tkanivom.

## **Literatúra**

1. Ansari M (2019) Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies Prog Biomater 8;223-237
2. Bohner M, Gbureck U, Barralet JE (2005) Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. Biomaterials 26;6423-6429
3. Bracey DN et al. (2019) Investigating the Osteoinductive Potential of a Decellularized Xenograft Bone Substitute. Cells Tissues Organs 207;97-113
4. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D et al. (2011) Bone regeneration: current concepts and future directions. BMC Med 9;66
5. Ginebra MP, Canal C, Espanol M et al. (2012) Calcium phosphate cements as drug delivery materials. Adv Drug Deliv Rev 64;1090-1110
6. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA (2006) Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. J Control Release 113;102-110
7. Chow L (2000) Calcium Phosphate Cements: Chemistry, Properties, and Applications. MRS OPL 599;27-37
8. Kim T, See CM, Li X et al. (2020) Orthopedic implants and devices for bone fractures and defects: Past, present and perspective. Eng Regen 1;6-18
9. Padaropoulos L, Veis AA, Papadimitriou S et al. (2009) Bone Regeneration Using B-Tricalcium Phosphate in a Calcium Sulfate Matrix. J Oral Implantol 35;28-36
10. Rolvien T, Barvenick F, Klatte TO et al. (2017)  $\beta$ -TCP bone substitutes in tibial plateau depression fractures. Knee 24;1138-1145
11. Stevens MM (2008) Biomaterials for Bone Tissue Engineering. Mater. Today 11;18-25
12. Urban RM, Turner TM, Hall DJ et al. (2007) Increased Bone Formation Using Calcium Sulfate-Calcium Phosphate Composite Graft. Clin Orthop Relat Res 459;110-117
13. Wasnik S, Goparaju N (2016) Recent trends in bone fracture therapeutics and management. J Dent Med Res 4;31-32
14. Xu HH, Weir MD, Burguera EF et al. (2006) Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. Biomaterials 27;4279-4287
15. Zhao Z, Wang G, Zhang Y et al. (2020) The effect of calcium sulfate/calcium phosphate composite for the treatment of chronic osteomyelitis compared with calcium sulfate. Ann Palliat Med 9

Práca bola podporená grantom APVV-20-0184 a VEGA 1/0237/23.

# ZMIEŠANÝ HEPATOCELULÁRNY CHOLANGIOKARCINÓM – KAZUISTIKA

## MIXED HEPATOCELLULAR CHOLANGIOCARCINOMA – A CASE REPORT

Viera Karaffová, Erik Hudec, Viera Revajová, Zuzana Ševčíková, Viera Almašiová

Katedra morfológických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

*viera.karaffova@uvlf.sk*

### Súhrn

Kombinovaný typ hepatocelulárneho a cholangiocelulárneho karcinómu bol diagnostikovaný u 13-ročného psa plemena zlatý retriever. Z klinického hľadiska bol pozorovaný celý rad neurologických príznakov, prezentovaný ataxiou, stratou citlivosti panvových končatín a vymiznutím análneho reflexu. Pitevné vyšetrenie preukázalo prítomnosť mnohopočetných nádorových ložísk v parenchýme pečene spolu s výskytom metastatických ložísk zistených v sliznici tenkého čreva. Nádor z histologického hľadiska pozostával z typických buniek charakterizujúcich tak hepatocelulárny, ako aj cholangiocelulárny karcinóm. Výskyt tohto typu primárneho nádoru pečene je u psov extrémne zriedkavý.

**Kľúčové slová:** zmiešaný hepatocelulárny cholangiokarcinóm, pes

### Summary

A combined type of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma was diagnosed in a 13-year-old golden retriever dog. From a clinical point of view, a whole set of neurological symptoms was observed, presented by ataxia, loss of sensitivity of the pelvic limbs and disappearance of the anal reflex. The autopsy showed the presence of multiple tumour foci in the liver parenchyma with the occurrence of metastatic foci found in the area of the small intestine. Histologically, the tumour consisted of typical cells characterizing both hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. The occurrence of this type of primary liver tumour is extremely rare in dogs.

**Key words:** mixed hepatocellular cholangiocarcinoma, dog

## Úvod

Primárne karcinómy pečene sú klasifikované ako hepatocelulárne karcinómy, ak prítomné neoplastické bunky pripomínajú hepatocyty, alebo ako cholangiokarcinómy, ak nádorové bunky tvoria štruktúry podobné biliárnemu epitelu. Avšak novotvar s koexistenciou neoplastických populácií hepatocytov a cholangioidných epitelových buniek je definovaný ako zmiešaný hepatocelulárny cholangiokarcinóm, hepatocholangiokarcinóm alebo zmiešaný karcinóm pečene (6). Hepatocelulárny cholangiokarcinóm je zriedkavý primárny hepatobiliárny nádor u ľudí a psov. Ide o hepatálnu malignitu so signifikantnou histologickou a biologickou heterogénnosťou. Prezentuje sa agresívnejším rastom a horším prežívaním v porovnaní so samotným hepatocelulárnym či cholangiocelulárnym karcinómom. Incidencia cholangiocelulárnych karcinómov u psov je všeobecne nízka, pričom predstavuje iba 1,8 až 2,0 % všetkých primárnych hepatobiliárnych nádorov (7, 8). V klinickom obraze u postihnutých jedincov prevláda anorexia, vomitus, hnačka, letargia a dýchacie ťažkosti. Na druhej strane sa ojedinele môže jednať aj o náhodný nález a to bez akýchkoľvek klinických príznakov (2). Pokročilé štádiá sa šíria metastázovaním lymfogénnou cestou do lymfatických uzlín a vnútorných orgánov, pričom komplexné údaje môžu chýbať, práve kvôli zriedkavosti výskytu tohto typu nádoru. Autori Maeda a kol. (3) popisujú v humánnej štúdií sedem pitevných prípadov s metastázami zistenými v pľúcach, nadobličkách, slezine, peritoneu, koži, kostiach, mozgu a portálnych, hilárnych a supraklavikulárnych lymfatických uzlinách.

Makroskopicky sú zvyčajne pozorované po pečeni roztrúsené početné svetlejšie ložiská rôznej veľkosti, prevažne so subkapsulárnou lokalizáciou. Na ich povrchu sa nachádzajú centrálné preliačené miesta, tzv. „rakovinové pupky“, ktoré sú typickým makroskopickým znakom cholangiocelulárnych karcinómov. Všetky primárne hepatobiliárne nádory možno na základe ich morfológie klasifikovať ako masívne, nodulárne alebo difúzne typy (5). Lobektómia pečene je prvou voľbou pri výskyte masívnych typov hepatobiliárnych nádorov. Nádory nodulárneho alebo difúzneho typu však nie sú ľahko prístupné chirurgickej excízii, preto majú horšiu prognózu oproti nádorom masívneho typu. Z uvedeného dôvodu je pri neresekovateľných nádoroch masívneho, nodulárneho alebo difúzneho typu potrebné zvážiť iné možnosti, ako je chemoterapia (5).

## Materiál a Metódy

### História prípadu

U 13-ročného psa plemena zlatý retriever anamnestické údaje uvádzali asi rok trvajúce

problémy s chôdzou, v zmysle „potácavej chôdze“ panvových končatín. Avšak posledné dva dni pred návštevou veterinárneho lekára boli pozorované klinické príznaky vo forme celkovej slabosti a nezájmu o okolie, ktoré sa na ďalší deň zlepšili a pes nadviazal očný kontakt s majiteľom, stále však pretrvávala neochota k pohybu, navyše sprevádzaná inapetenciou a hnačkou. Klinickým vyšetrením bola zistená strata citlivosti panvových končatín, ako aj vymiznutie análneho reflexu a celková apatia. Na základe želania majiteľov a po zhodnotení aktuálneho klinického stavu, bola vykonaná eutanázia s následným pitevným vyšetrením a odobratím vzoriek na histologické vyšetrenie.

### **Pitevný nález**

Najvýraznejšie patologické zmeny boli pozorované v parenchýme pečene vo forme početných žltobielo sfarbených nádorových ložísk s nepravidelnou distribúciou a mäkkou konzistenciou. Na ich povrchu sa nachádzali centrálné vpadnuté miesta (rakovinové pupky) (obrázok 1). Ložiská podobného vzhľadu boli pozorované aj v lamina propria mucosae jejunálnej časti tenkého čreva. Z uvedených lézií boli odobraté vzorky na histologické vyšetrenie.



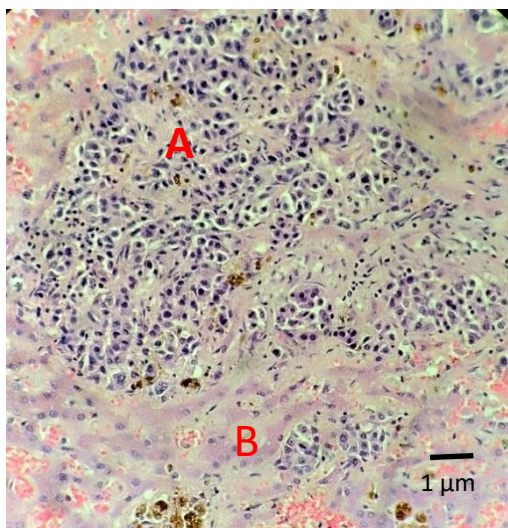
**Obr. 1** Svetlé nádorové ložiská s preliačenými centrami (tzv. rakovinové pupky) roztrúsené v parenchýme pečene (Zdroj: Karaffová, KaMD, UVLF Košice)

### **Histologické vyšetrenie**

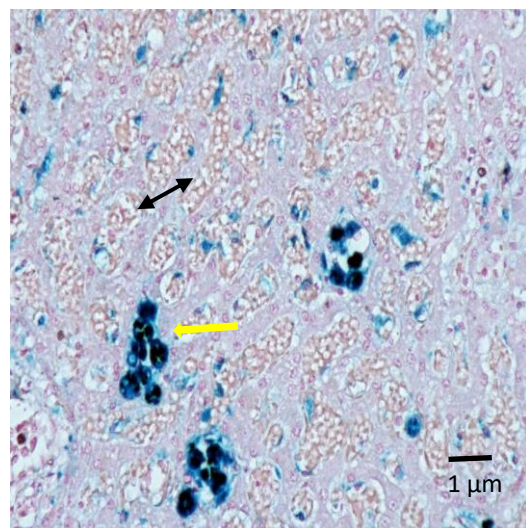
Odobraté vzorky z tkanív, fixované v 10 % formalíne, boli histologicky spracované rutinnou laboratórnou metódou a farbené prehľadným farbením hematoxylín-eozín (HE). Vo vzorkách tkaniva pečene boli pozorované multifokálne, acinárne usporiadané ložiská infiltrujúce parenchým pečene, oddelené kolagénou strómou rôznej hrúbky. Ložiská pozostávali z



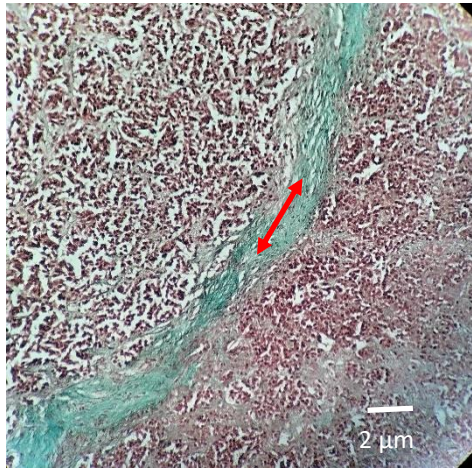
neoplastických hepatoidných buniek s veľkým množstvom eozinofilne sa farbiacej cytoplazmy a bazofilne sa farbiacimi okrúhlymi až polygonálnymi jadrami. V parenchýme pečene boli pozorované aj nádorové ložiská s duktálnym a acinárnym usporiadaním biliárneho epitelu (obrázok 2). Rozdiel bol zaznamenaný v známkach malignity, nakoľko v hepatocelulárnej oblasti bola výrazná anizocytóza a anizokaryóza s občasou binukleáciou, v porovnaní s cholangiocelulárnou zložkou charakterizovanou miernejšími morfológickými zmenami buniek a jadier. V oboch prípadoch boli zaznamenané atypické mitózy. Lokálne boli zistené aj početnejšie staršie krvácaniny, charakteristické prítomnosťou hrdzavohnedo sa farbiaceho hemosiderínu deponovaného v makrofágoch (siderocyty, siderofágy). Histochemický dôkaz hemosiderínu bol vykonaný Perlsovou prusianovou modrou (diagnostický kit), bežne používanou na detekciu prítomnosti modro sa farbiaceho železa vo vzorkách tkanív alebo cytoplazme buniek (obrázok 3). Použitím špeciálneho farbenia Masson Trichrome (MT) bola potvrdená prítomnosť zeleno sa farbiacich kolagénových vlákien (obrázok 4). Histologické vzorky odobraté z oblasti nádorových mäs v tenkom čreve (jejune) po ofarbení hematoxylín-eozínom odhalili histologický obraz totožný s nálezom na pečeni (obrázok 5).



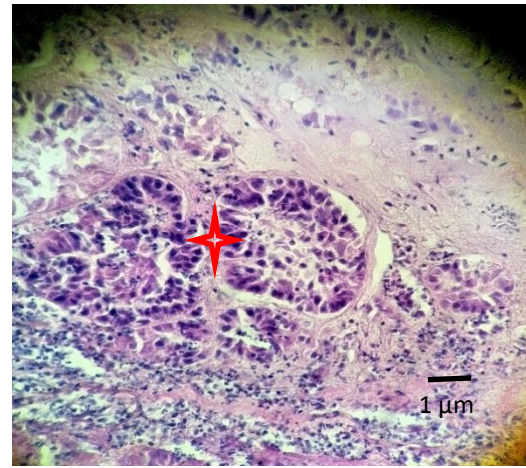
**Obr. 2** Nádorová proliferácia (A) v parenchýme pečene (B) (HE)



**Obr. 3** Dôkaz hemosiderínu (žltá šípka) s hyperémiou pečene (čierna šípka) (Pearlsova prusianova modrá)



**Obr. 4** Kolagénne vlákna strómy (červená šípka) deliace parenchým pečene (Masson-Trichróm)



**Obr. 5** Metastázy nádoru (červený znak) v sliznici jejunu (HE)

## Diskusia a záver

U nami prezentovaného pacienta, napriek závažnému klinickému stavu, ako aj patologicko-morfologickému nálezu, neboli pozorované metastatické ložiská typické pri tomto type nádoru predilekčne v pľúcach a iných parenchymatóznych orgánoch. Naopak, boli nájdené metastatické ložiská v jejunálnej časti tenkého čreva. Na druhej strane, pacient vykazoval celý rad závažných neurologických príznakov, ktoré zväčša nie sú pozorované u ľudí (4). Podobne aj Javanbakht a kol. (1) pri štúdiu podobných prípadov popísal výskyt neurologických príznakov u 12-ročného psa plemena nemecký špic v súvislosti s diagnostikovaním hepatocelulárneho cholangiokarcinómu. Avšak lokalizácia metastatických opúzdrených ložísk bola len v pľúcnom parenchýme, kde časti postihnutých pľúcnych lalokov vykazovali atelektázu. Histologický nálež bol totožný s nami opísaným obrazom. V našom prípade bol histologickým vyšetrením potvrdený zmiešaný hepatocelulárny cholangiokarcinóm, ktorému zodpovedal aj patologicko-morfologický nálež na parenchýme pečene. Samotná diagnostika, ako aj formy terapie tohto typu primárnych nádorov pečene, sú nielen u ľudí, ale aj u psov predmetom mnohých výskumov.

## Literatúra

1. Javanbakht J, Sasani F, Khaki F, Jamshidi S, Hassan MA, Marzban H (2013) Evaluation of metastatic cholangiocarcinoma in a spitz dog. *J Cancer Sci Ther* 5: 3
2. Kim SW, Choi JW, Kim JM, Yoon HY, Bae K, Yoon KA, Kim JH (2023) Case report: Toceranib as adjuvant chemotherapy in a dog with incompletely resected combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Front Vet Sci* 9: 963390



3. Maeda T, Adachi E, Kajiyama, K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M (1995) Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: Proposed criteria according to cytokeratin expression and analysis of clinicopathologic features. *Hum Pathol* 26: 956-964
4. Roßner F, Sinn BV, Horst D (2023) Pathology of combined hepatocellular carcinoma-cholangiocarcinoma: An Update. *Cancers* 15: 494
5. Selmic LE (2017) Hepatobiliary neoplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 47: 725-735
6. Shiga A, Shirota K, Enomoto M (2001) Combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma in a dog. *J Vet Med Sci* 63:483-486
7. Terai K, Ishigaki K, Kagawa Y, Okada K, Yoshida O, Sakurai N, Heishima T, Asano K (2022) Clinical, diagnostic, and pathologic features and surgical outcomes of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in dogs: 14 cases (2009-2021). *J Am Vet Med Assoc* 260: 1668-1674
8. Van Wettere AJ, Degernes LA, Barnes HJ (2010) Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in a lesser flamingo (*Phoenicopterus minor*). *Avian Pathol* 39: 275-278

# VZŤAH NADMERNÉHO PRÍJMU FRUKTÓZY K METABOLICKÝM A KOGNITÍVNYM ZMENÁM

## THE RELATION OF EXCESSIVE FRUCTOSE INTAKE TO METABOLIC AND COGNITIVE CHANGES

**Dalibor Kolesár**, Juraj Teslík, Ingrid Hodorová  
Ústav anatómie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice  
*dalibor.kolesar@upjs.sk*

### Súhrn

Fruktóza patrí v súčasnosti medzi najčastejšie používané sladidlo v potravinárskom priemysle. Je lacnejšia a dvakrát sladšia ako glukóza. Denný príjem fruktózy mnohonásobne prekračuje odporúčaný denný limit a to predovšetkým u detí a dospievajúcej mládeže. Dlhodobý nadmerný príjem fruktózy spôsobuje obezitu, hypertenziu a inzulínovú rezistenciu. Okrem toho pôsobí aj na rôzne oblasti mozgu a tým ovplyvňuje príjem potravy, učenie, pamäť, správanie a náladu. Bol dokázaný vplyv fruktózy na proliferáciu neurónov, neurotransmisiu, synaptickú plasticitu a neurodegeneráciu. Presný mechanizmus tohto pôsobenia zatiaľ nie je známy, ale predpokladá sa, že fruktóza spôsobuje chronický zápal a zvyšuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka, ktoré spôsobujú oxidačný stres a následné poškodenie citlivých bunkových organel predovšetkým mitochondrií.

**Kľúčové slová:** fruktóza, metabolický syndróm, chronický zápal, depresia, úzkosť

### Summary

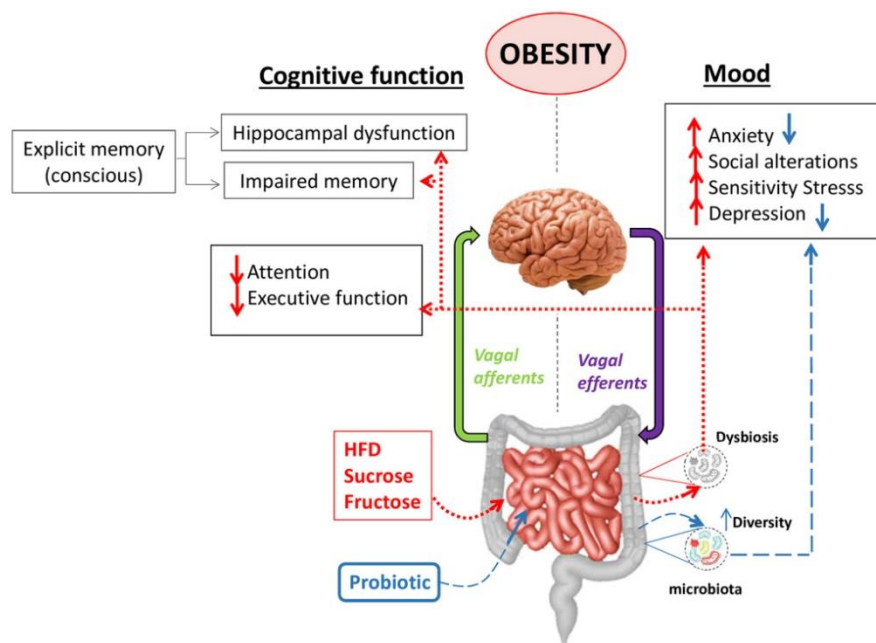
Fructose is one of the most commonly used sweeteners in the food industry today. It is cheaper and twice as sweet as glucose. The daily intake of fructose exceeds the recommended daily limit many times over, especially in children and adolescents. Long-term excessive intake of fructose causes obesity, hypertension and insulin resistance. In addition, it also affects various areas of the brain, thereby affecting food intake, learning, memory, behaviour and mood. Fructose has been shown to affect neuronal proliferation, neurotransmission, synaptic plasticity and neurodegeneration. The exact mechanism of these effects is not yet known, but fructose is thought to cause chronic inflammation and increase the production of reactive oxygen species,

which cause oxidative stress and subsequent damage to sensitive cellular organelles, particularly mitochondria.

**Key words:** fructose, metabolic syndrome, chronic inflammation, depression, anxiety

## Prehľad

Metabolický syndróm je v súčasnosti populačne veľmi rozšírená porucha využívania a skladovania energie, zahŕňajúca viscerálnu obezitu, dyslipidémiu, arteriálnu hypertenziu a zhoršenú glukózovú toleranciu v dôsledku inzulínovej rezistencie. Postihnutých je približne 20 – 25 % dospelých svetovej populácie. Metabolický syndróm je významným rizikovým faktorom pre rozvoj cukrovky 2. typu a kardiovaskulárnych ochorení. Čoraz častejšie sa však spája aj s rozvojom psychiatrických porúch (25). Epidemiologické štúdie odhalili súvislosť medzi obezitou a depresiou (21). Zistilo sa, že obezita zvyšuje riziko depresie a depresia je prediktívna pre rozvoj obezity. Podobne obezita súvisí s úzkostnými poruchami, hoci povaha tohto spojenia je menej jasná (10). Metabolický syndróm je spojený aj s poruchami kognitívnych funkcií u ľudí (31). Podľa Murphyho a Mercera (22) boli pozorované anxiogénne aj anxiolytické účinky u hlodavcov vystavených potrave s vysokým obsahom tukov a/alebo cukrov. Souza a kol. (26) zistili správanie podobné úzkosti u samcov potkanov Wistar konzumujúcich stravu obohatenú o sacharózu a Anderson a kol. (3) pozorovali väčšiu úzkosť u potkanov kŕmených vysokotučnou/vysokofruktózovou diétou.



Zdroj: Agustí et al. Interplay Between the Gut-Brain Axis, Obesity and Cognitive Function. Front Neurosci.

2018 Mar 16;12:155.

Potrava je nevyhnutná pre správne fungovanie organizmu, avšak nadbytok niektorých zložiek najmä fruktózy, ktorá je v posledných rokoch hojne konzumovaná, vedie k škodlivým účinkom na zdravie.

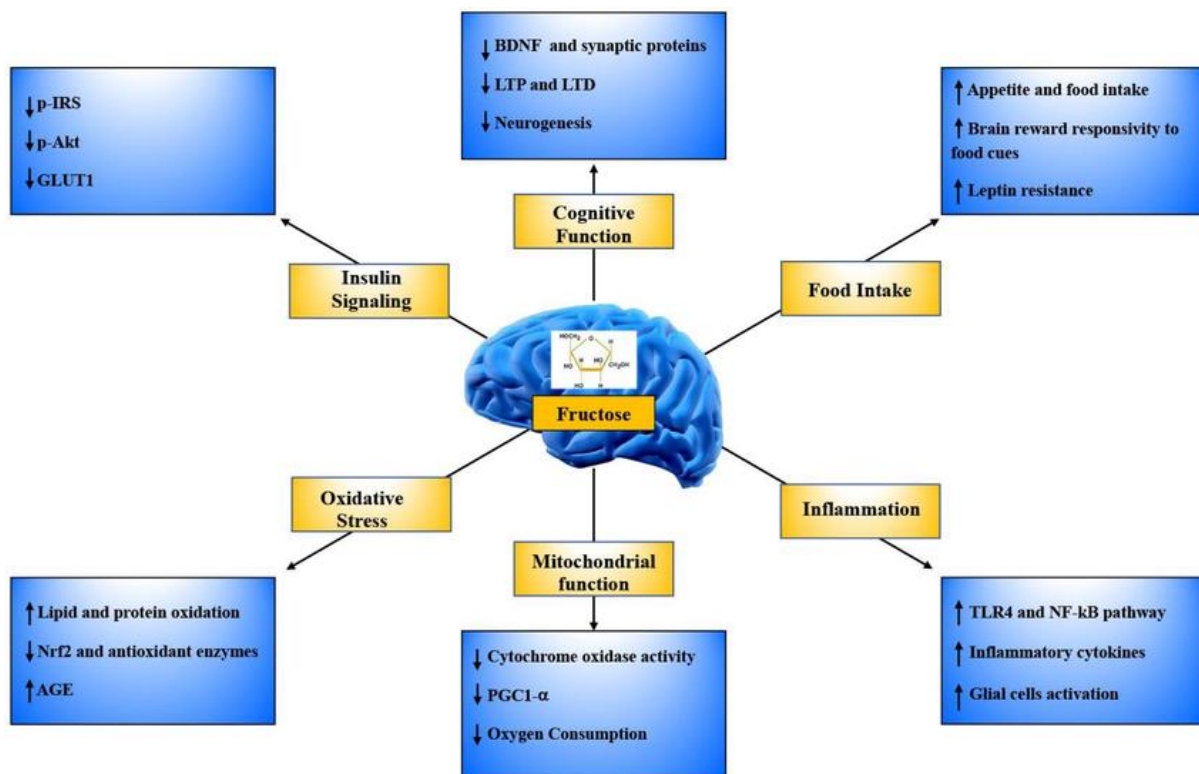
Fruktóza sa v súčasnosti považuje za veľmi nebezpečný faktor, ktorý negatívne ovplyvňuje ľudské zdravie (19). Tento monosacharid, tiež známy ako ovocný cukor, je dvakrát sladší ako glukóza a zvykol sa konzumovať vo vyváženom pomere fruktózy ku glukóze spolu s vlákninou, vitamínmi a minerálmi prítomnými v ovocí. V západnej strave sa však používa stále väčšie množstvo voľnej fruktózy, pričom niektoré nealkoholické nápoje obsahujú dokonca dvojnásobné množstvo fruktózy v porovnaní s glukózou (28). Spolu so zvýšenou spotrebou fruktózy neustále stúpa aj prevalencia metabolických ochorení, akými sú obezita a diabetes 2. typu. Zistilo sa, že strava s vysokým obsahom fruktózy spôsobuje oxidačný stres, zníženú glukózovú toleranciu, inzulínovú rezistenciu a hypertenziu (1, 33). Okrem toho sa ukázalo, že zvýšenie spotreby fruktózy ovplyvňuje funkciu neurónov a hormónov, ktoré regulujú chuť do jedla (16).

Fruktóza sa v čreve transportuje do enterocytu prostredníctvom špecifického fruktózového transportéra GLUT5 nezávisle od hydrolýzy ATP a absorpcie sodíka. Po vstupe do enterocytu sa fruktóza transportuje do krvného obehu prostredníctvom transportéra GLUT2 (8). Pokiaľ ide o metabolizmus fruktózy v čreve, enteroendokrinné bunky po detekcii fruktózy v čreve aktivujú kaskádu endokrinných udalostí. Luminálna fruktóza stimuluje najmä sekréciu ľudského polypeptidu Y, cholecystokinínu, neurotenzínu (14) a serotonínu sekrečnými črevnými bunkami (2). Dysfunkcia pečene sa môže konzumáciou fruktózy zhoršiť, pretože fruktóza sa metabolizuje najmä v pečeni, kde sa mení na mastné kyseliny, ktoré sa môžu dostať do mozgu a rozšíriť zápalovú reakciu začatú na periférii (12). Fruktóza sa metabolizuje v pečeni prostredníctvom fruktolýzy a medzi primárne metabolity a vedľajšie produkty patria glukóza, laktát, triglyceridy, voľné mastné kyseliny, kyselina močová a metylglyoxal. GLUT5 je široko exprimovaný v tukovom tkanive, obličkách, kostrovom svalstve, semenníkoch a mozgu (13), ktoré by sa tiež mohli podieľať na metabolizme fruktózy.

Nadmerná akumulácia lipidov vyvolaná fruktózou v hepatocytoch môže tiež narušiť funkciu mitochondrií (9) zvýšiť úroveň oxidačného stresu a zápalu (2). Katabolizmus fruktózy v pečeni spôsobuje rýchle vyčerpanie ATP a uvoľnenie kyseliny močovej do systémového obehu, čo vedie k hyperurikémii (13). V situáciách vysokej spotreby fruktózy oxidačný stres podporovaný akumuláciou kyseliny močovej spúšťa zápalovú reakciu v pečenných a extrahepatálnych tkanivách, čo spôsobuje zápal a akumuláciu lipidov (18). Kyselina močová môže poškodzovať

mozog, čo sa prejavuje u pacientov s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou, u ktorých kyselina močová pôsobí ako rizikový faktor progresie ochorenia a možný marker kognitívnej dysfunkcie (27). Oxidačný stres vyvolaný peroxidáciou lipidov spôsobuje poškodenie DNA a aktivuje zápalové faktory, ktoré vedú k poškodeniu buniek (32).

Fruktóza má prooxidačné a prozápalové vlastnosti. Indukuje tvorbu voľných radikálov a znižuje neenzymatickú a/alebo enzymatickú ochranu proti týmto reaktívnym zlúčeninám. Rovnako zvyšuje aktivitu transkripčného faktora NF- $\kappa$ B a následne produkciu prozápalových cytokínov (23).



Zdroj: Spagnuolo et al. Sweet but Bitter: Focus on Fructose Impact on Brain Function in Rodent Models. *Nutrients*. 2020 Dec 22;13(1):1.

Zápalové reakcie vyvolané nadmernou konzumáciou fruktózy boli zdokumentované v periférnych tkanivách, najmä v pečeni, svaloch a obličkách (5, 34), a v posledných rokoch sa pozornosť sústreďuje aj na schopnosť tohto cukru vyvolávať neurozápal (20, 4). Ukázalo sa, že konzumácia fruktózy vyvoláva psychický stres prostredníctvom zápalového mechanizmu (6). Kŕmenie fruktózou počas 4 týždňov vyvolalo zvýšenú expresiu prozápalových mediátorových génov interleukínu (IL)-1 $\beta$ , IL-6 a tumor nekrotizujúceho faktora TNF-alfa spolu s Toll-like receptorom 4 (TLR4), myeloidným diferenciačným faktorom 88 a NF- $\kappa$ B v hypotalame potkanov (15).

Prozápalový účinok fruktózy bol dokázaný aj v iných oblastiach mozgu. Nadmerná konzumácia fruktozového sirupu mala škodlivé účinky na funkciu hipokampu a spôsobila neurozápal v CNS počas dospievania (11). Je potrebné poznamenať, že kŕmenie fruktózou vyvolalo aktiváciu mikrogliu v hipokampe prostredníctvom stimulácie signalizácie TLR4/NF-kB, čo viedlo k zníženiu neurogenézy v gyrus dentatus u myší (30). Djordjevic a kol. (7) uviedli, že dlhodobá konzumácia 10 % roztoku fruktózy vyvolala zvýšenie IL-6 bez zmeny v aktivácii NF-kB, zatiaľ čo u potkanov pijúcich 60 % roztok fruktózy sa zistilo významné zvýšenie NF-kB, hoci analyzované cytokíny sa nezmenili.

Nadmerná konzumácia fruktózy môže ovplyvniť kognitívne funkcie a vyvolávať zmeny v správaní. Štúdie ukázali, že hlodavce kŕmené stravou s vysokým obsahom fruktózy majú poruchy pamäti alebo prejavujú úzkostné správanie (17, 29). Diéta s vysokým obsahom fruktózy počas periadolescentného vývoja zvyšuje depresívne správanie a remodeluje hypotalamický transkriptóm u samcov potkanov (11, 24).

## Literatúra

1. Akar F, Uludağ O, Aydın A, AYTEKIN YA, Elbeg S, Tuzcu M, Sahin K (2012) High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol.* 50: 2135-2141
2. Alwahsh SM, Gebhardt R (2017) Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol.* 91: 1545-1563
3. Anderson RA, Qin B, Canini F, Poulet L, Roussel AM (2013) Cinnamon counteracts the negative effects of a high fat/high fructose diet on behavior, brain insulin signaling and Alzheimer-associated changes. *PLoS One.* 8: e83243
4. Cigliano L, Spagnuolo MS, Crescenzo R, Cancelliere R, Iannotta L, Mazzoli A, Liverini G, Iossa S (2018) Short-Term Fructose Feeding Induces Inflammation and Oxidative Stress in the Hippocampus of Young and Adult Rats. *Mol Neurobiol.* 55: 2869-2883
5. Crescenzo R, Cigliano L, Mazzoli A, Cancelliere R, Carotenuto R, Tussellino M, Liverini G, Iossa S (2018) Early Effects of a Low Fat, Fructose-Rich Diet on Liver Metabolism, Insulin Signaling, and Oxidative Stress in Young and Adult Rats. *Front Physiol.* 9-411
6. de Sousa Rodrigues ME, Bekhbat M, Houser MC, Chang J, Walker DI, Jones DP, Oller do Nascimento CMP, Barnum CJ, Tansey MG (2017) Chronic psychological stress and high-fat high-fructose diet disrupt metabolic and inflammatory gene networks in the brain, liver, and gut and promote behavioral deficits in mice. *Brain Behav Immun.* 59: 158-172
7. Djordjevic A, Bursac B, Veličković N, Vasiljević A, Matic G (2015) The impact of different fructose loads on insulin sensitivity, inflammation, and PSA-NCAM-mediated plasticity in the hippocampus of fructose-fed male rats. *Nutr Neurosci.* 18: 66-75
8. Ferraris RP, Choe JY, Patel CR (2018) Intestinal Absorption of Fructose. *Annu Rev Nutr.* 38: 41-67
9. Fouret G, Gaillet S, Lecomte J, Bonafos B, Djohan F, Barea B, Badia E, Coudray C, Feillet-Coudray C (2018) 20-Week follow-up of hepatic steatosis installation and liver mitochondrial structure and activity and their interrelation in rats fed a high-fat-high-fructose diet. *Br J Nutr.* 119: 368-380
10. Garipey G, Nitka D, Schmitz N (2010) The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond).* 34: 407-419
11. Hsu TM, Konanur VR, Taing L, Usui R, Kayser BD, Goran MI, Kanoski SE (2015) Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. *Hippocampus.* 25: 227-239

12. Ishimoto T, Lanaspá MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, McMahan RH, Abdelmalek MF, Rosen HR, Jackman MR, MacLean PS, Diggie CP, Asipu A, Inaba S, Kosugi T, Sato W, Maruyama S, Sánchez-Lozada LG, Sautin YY, Hill JO, Bonthron DT, Johnson RJ (2013) High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology*. 58: b1632-1643
13. Jones HF, Butler RN, Brooks DA (2011) Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300: 202-206
14. Kuhre RE, Gribble FM, Hartmann B, Reimann F, Windeløv JA, Rehfeld JF, Holst JJ (2014) Fructose stimulates GLP-1 but not GIP secretion in mice, rats, and humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 306: 622-630
15. Li JM, Ge CX, Xu MX, Wang W, Yu R, Fan CY, Kong LD (2015) Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Mol Nutr Food Res*. 59: 189202
16. Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C (2008) Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept*. 150: 26-32
17. Lowette K, Roosen L, Tack J, Vanden Bergh P (2015) Effects of high-fructose diets on central appetite signaling and cognitive function. *Front Nutr*. 2-5
18. Ma CH, Kang LL, Ren HM, Zhang DM, Kong LD (2015) Simiao pill ameliorates renal glomerular injury via increasing Sirt1 expression and suppressing NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation in high fructose-fed rats. *J Ethnopharmacol*. 172: 108-117
19. Martinez FJ, Rizza RA, Romero JC (1994) High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension*. 23: 456-463
20. Mazzoli A, Spagnuolo MS, Gatto C, Nazzaro M, Cancelliere R, Crescenzo R, Iossa S, Cigliano L (2020) Adipose Tissue and Brain Metabolic Responses to Western Diet-Is There a Similarity between the Two?. *Int J Mol Sci*. 25: 21(3)
21. McElroy SL, Kotwal R, Malhotra S, Nelson EB, Keck PE, Nemeroff CB (2004) Are mood disorders and obesity related? A review for the mental health professional. *J Clin Psychiatry*. 65: 634-651
22. Murphy M, Mercer JG (2013) Diet-regulated anxiety. *Int J Endocrinol*. 2013-701967
23. Pektas MB, Koca HB, Sadi G, Akar F (2016) Dietary Fructose Activates Insulin Signaling and Inflammation in Adipose Tissue: Modulatory Role of Resveratrol. *Biomed Res Int*. 2016-8014252
24. Reddy BR, Maitra S, Jhelum P, Kumar KP, Bagul PK, Kaur G, Banerjee SK, Kumar A, Chakravarty S (2016) Sirtuin 1 and 7 mediate resveratrol-induced recovery from hyper-anxiety in high-fructose-fed prediabetic rats. *J Biosci*. 41: 407-417
25. Simon GE, Von Korff M, Saunders K, Miglioretti DL, Crane PK, van Belle G, Kessler RC (2006) Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population. *Arch Gen Psychiatry*. 63: 824-830
26. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, Souza TM, Portela LV, Perry ML (2007) Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci*. 81: 198-203
27. Tana C, Ticinesi A, Prati B, Nouvenne A, Meschi T (2018) Uric Acid and Cognitive Function in Older Individuals. *Nutrients*. 27: 975
28. White JS, Hobbs LJ, Fernandez S (2015) Re. "Fructose content in popular beverages made with and without high fructose corn syrup". *Nutrition*. 31: 417-418
29. Wu HW, Ren LF, Zhou X, Han DW (2015) A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Neurosci*. 18: 323-328
30. Xu MX, Yu R, Shao LF, Zhang YX, Ge CX, Liu XM, Wu WY, Li JM, Kong LD (2016) Up-regulated fractalkine (FKN) and its receptor CX3CR1 are involved in fructose-induced neuroinflammation: Suppression by curcumin. *Brain Behav Immun*. 58: 69-81
31. Yates KF, Sweat V, Yau PL, Turchiano MM, Convit A (2012) Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32: 2060-2067
32. Yu MA, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Kang DH (2010) Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 28: 1234-1242
33. Zavaroni I, Sander S, Scott S, Reaven GM (1980) Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism*. 29: 970-973
34. Zhang YB, Meng YH, Chang S, Zhang RY, Shi C (2016) High fructose causes cardiac hypertrophy via mitochondrial signaling pathway. *Am J Transl Res* 8: 4869-4880.

# POZITÍVNY ÚČINOK VZDIALENÉHO KONDICIONOVANIA NA VEĽKOSŤ INFARKTU A POŠKODENIE PĽÚC V PRÍTOMNOSTI HYPER-ZÁPALOVEJ REAKCIE

## BENEFICIAL EFFECT OF REMOTE CONDITIONING ON THE INFARCT SIZE AND LUNGS INJURY DURING THE HYPER-INFLAMMATORY RESPONSE

Jana Končeková<sup>1</sup>, Klaudia Petrová<sup>1</sup>, Miroslava Némethová<sup>1</sup>, Martin Bona<sup>2</sup>, Petra Bonová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologický ústav BMC SAV, v.v.i., Šoltésovej 4, Košice

<sup>2</sup> Ústav lekárskej fyziológie, Lekárska fakulta, UPJŠ, Trieda SNP 1, Košice

*koncekova@saske.sk*

### Súhrn

Mozgová príhoda predstavuje druhú najčastejšiu príčinu smrti a zdravotného postihnutia vo svete. Pri ochorení COVID-19 dochádza k uvoľneniu pro-zápalových cytokínov vedúcich k ovplyvneniu koagulačných parametrov, čo predstavuje nie len zvýšené riziko vzniku trombu a následného upchatia cievy v mozgu, ale aj zhoršenú liečbu tohto akútneho ochorenia. Vzdialené kondicionovanie sa ukazuje ako vhodná terapia pri liečbe viacerých patologických stavov. V súčasnej práci sme zisťovali účinnosť tejto terapie v redukcii infarktu a poškodenia pľúc v podmienkach hyper-zápalovej reakcie prítomnej pri ochorení COVID-19, ako aj mnohých iných vírusových, bakteriálnych a autoimunitných chorobách. Pozorovali sme pozitívny efekt vzdialeného kondicionovania vo vytvorení zvýšenej obrany mozgu a rovnako aj pľúc, čoho výsledkom bolo zníženie veľkosti infarktu a poškodenia pľúc v porovnaní s neliečenými zvieratami. Výsledky tejto práce potvrdili účinnosť vzdialeného kondicionovania v budovaní obrany orgánov voči patologickým stavom, a to aj v prítomnosti hyper-zápalovej reakcie.

**Kľúčové slová:** vzdialené kondicionovanie, ischemia mozgu, lipopolysacharid, poškodenie pľúc



## Summary

Stroke is the second leading cause of death and disability in the world. In COVID-19 disease, released pro-inflammatory cytokines lead to the coagulopathy, which represents an increased risk of thrombus formation and subsequent occlusion of a blood vessel in the brain, as well as impaired treatment of this acute disease. Remote conditioning represents a suitable therapy in the treatment of several pathological conditions. In this study, we investigated the effectiveness of this therapy in the reduction of infarct size and lungs injury during hyper-inflammatory response presented in COVID-19, as well as many other viral, bacterial and autoimmune diseases. We observed a positive effect of remote conditioning in the induction of increased defense of brain and lungs, resulting in a reduction of infarct size and lungs injury compared to untreated animals. The results of this work confirmed the effectiveness of remote conditioning in the induction of organs defense against pathological conditions, even in the presence of a hyper-inflammatory reaction.

**Key words:** remote conditioning, stroke, lipopolysaccharide, lungs injury

## Úvod

V roku 2019 predstavovala mozgová príhoda druhú najčastejšiu príčinu smrti a zdravotného postihnutia v celosvetovom meradle (3). Navyše, s príchodom pandémie COVID-19 sa incidencia a mortalita tohto akútneho ochorenia naďalej zvyšuje (7). U infikovaných pacientov dochádza okrem poškodenia pľúc k výraznému ovplyvneniu koagulácie v dôsledku uvoľnenia pro-zápalových cytokínov a vzniku tzv. cytokínovej búrky. Koagulopatia u týchto pacientov môže viesť ku tromboembolickým komplikáciám, ako je napríklad mozgová príhoda, trombóza periférnych artérií, trombóza hlbokých žíl, pľúcna embólia, infarkt myokardu a iné (4). Zhoršenie koagulačných parametrov navyše komplikuje účinnosť jedinej súčasnej liečby mozgovej príhody, a to podanie aktivátora plazminogénu na rozpustenie krvnej zrazeniny.

Vzdialené kondicionovanie (RIC) končatiny preukazuje v posledných rokoch vysoký potenciál v protekcii mozgu a iných orgánov voči patologickým podmienkam. Ide o aplikáciu krátkych, subletálnych epizód ischemie končatiny pred (pre-kondicioning), počas (per-kondicioning) alebo po (post-kondicioning) letálnej ischemii vzdialeného orgánu (1). Ide o neinvazívny, bezpečný a lacný terapeutický prístup, ľahko aplikovateľný v klinickej praxi.

Naše výsledky potvrdili efektivitu vzdialeného kondicionovania v redukcii infarktu na experimentálnom modeli navodenia fokálnej ischemie (2). Rovnako bol pozorovaný pozitívny efekt kondicionovania na systémový zápal, redukcii pro-zápalových cytokínov a uvoľňovanie

proti-zápalových (5). Cieľom tejto štúdie bolo zistiť účinnosť RIC na redukcii veľkosti infarktu a poškodenia pľúc v hyper-zápalových podmienkach, typických pre COVID-19, ako aj iné vírusové, bakteriálne a autoimunitné ochorenia.

## **Materiál a metódy**

Príznaky ochorenia COVID-19 sme simulovali *intratracheálnym* podaním lipopolysacharidu (LPS) (2,5mg/kg). Fokálnu ischémiu mozgu sme navodili 24 hodín po podaní LPS (v čase plného vývinu zápalu) zavedením filamentu do oblasti strednej mozgovej tepny. Vzdialené kondicionovanie sme aplikovali použitím elastického škrtidla, čím sme zamedzili prísun krvi do pravej zadnej končatiny v troch cykloch po dobu piatich minút. Zvieratá boli rozdelené do piatich skupín:

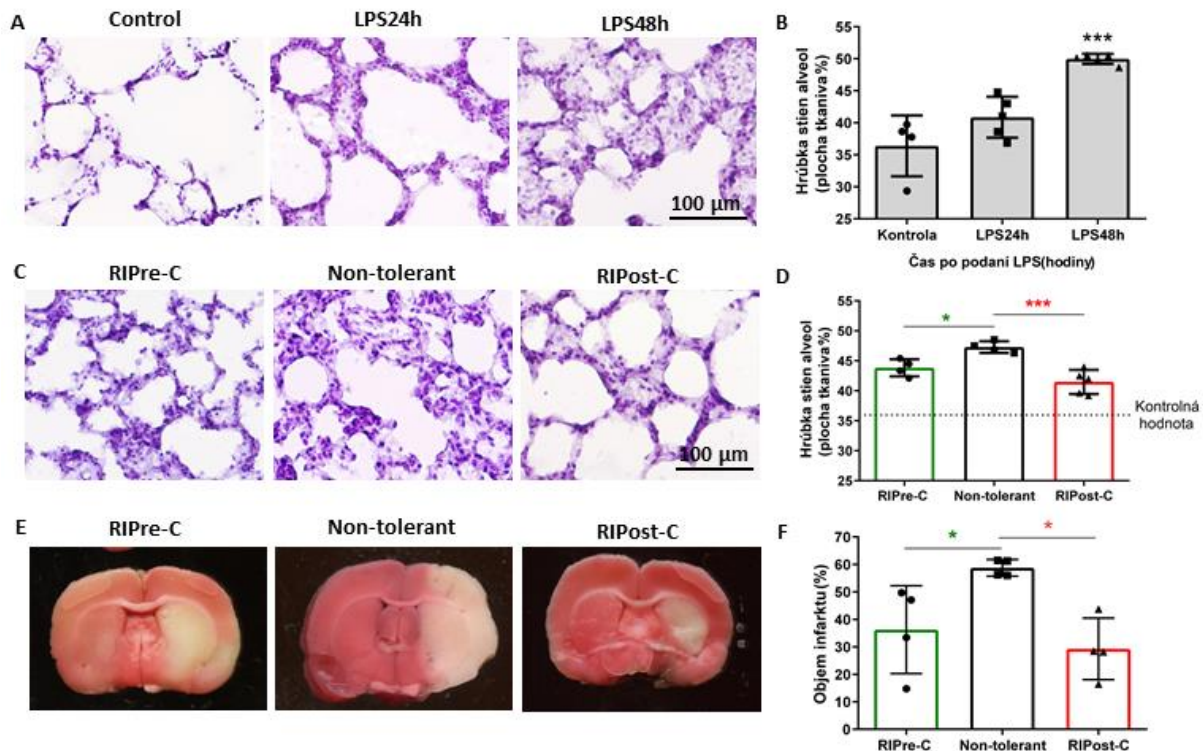
- Kontrolná skupina – intaktná skupina
- LPS24h – zvieratá s podaním LPS a prežívaním 24 hodín
- LPS48h - zvieratá s podaním LPS a prežívaním 48 hodín
- Non-tolerant – zvieratá s navodením ischémiu mozgu po 24 hodinách od podania LPS a prežívaním 48 hodín
- RIPre-C – pre-kondicionované zvieratá s navodením ischémiu mozgu po 24 hodinách od podania LPS a prežívaním 48 hodín
- RIPost-C – post-kondicionované zvieratá s navodením ischémiu mozgu po 24 hodinách od podania LPS a prežívaním 48 hodín

Ľavý lalok pľúc bol fixovaný v 10% formalíne, pokrývaný na 5 µm hrubé rezy. Na základe farbenia hematoxylín-eozín sme pozorovali rozsah poškodenia určením hrúbky alveolárnych stien. Izolovaný mozog bol pokrývaný na rezy s hrúbkou 2 mm. Veľkosť infarktu sme stanovovali na základe TTC farbenia určením objemu bielo sfarbenej plochy tkaniva.

## **Výsledky**

Zhrubnutie alveolárnych stien predstavuje typický znak poškodenia pľúc. Po 48 hodinách od podania LPS sme pozorovali zhrubnutie stien alveol takmer o 15% v porovnaní s kontrolnými zvieratami (Obr. 1 A B). Rovnaké poškodenie pľúc sme pozorovali u netolerantných zvierat s navodenou ischémiou mozgu (Obr. 1 C D). Kondicionovanie aplikované pred a rovnako aj po ischémiu viedlo k redukcii zhrubnutia alveolárnych stien pľúc (Obr. 1 C D).

Pozitívny efekt kondicionovania v hyper-zápalových podmienkach sme pozorovali aj pri redukcii objemu infarktu. Post-kondicionovanie viedlo k zníženiu poškodenia mozgu o polovicu v porovnaní s netolerantnými zvieratami (Obr. 1 E F).



**Obr. 1** Účinok vzdialeného kondicionovania na poškodenie pľúc a veľkosť infarktu v prítomnosti hyper-zápalovej reakcie. A) H&E farbenie pľúc 24 a 48 hodín po podaní LPS. Mierka: 100  $\mu$ m. B) Grafické vyhodnotenie zhrubnutia stien alveol pľúc po podaní LPS. C) H&E farbenie pľúc pre-kondicionovaných (RIPPre-C), post-kondicionovaných (RIPPost-C) a netolerantných (Non-tolerant) zvierat s navodenou ischémiou mozgu po 24 hodinách od podania LPS a prežívaním 48 hodín. Mierka: 100  $\mu$ m. D) Grafické vyhodnotenie zhrubnutia stien alveol pľúc u neliečených a kondicionovaných zvierat E) Reprezentačné obrázky rezov mozgu po TTC farbení zobrazujúcom veľkosť infarktu (biele sfarbenie) u pre-kondicionovaných (RIPPre-C), post-kondicionovaných (RIPPost-C) a netolerantných (Non-tolerant) zvierat s navodenou ischémiou mozgu po 24 hodinách od podania LPS a prežívaním 48 hodín. F) Objem infarktu (%). Výsledky sú vyjadrené ako Priemer  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## Diskusia

Vzdialené kondicionovanie vedie k celosystémovej obrane organizmu voči patologickým podmienkam. V tejto práci sme dokázali účinnosť kondicionovania v redukcii ischemického poškodenia mozgu v podmienkach hyper-zápalovej reakcie. Navyše sme pozorovali zníženie poškodenia pľúc vyvolaného zápalovou reakciou. Viacero prác poukazuje na pozitívny efekt kondicionovania v utlmení zápalových procesov, a to najmä v potlačení uvoľňovania pro-zápalových cytokínov zodpovedných za aktiváciu imunitných buniek a ich mobilizáciu v

mieste vzniku zápalu (5). Pri poškodení pľúc zohrávajú úlohu práve neutrofilové bunky, ktoré sa infiltrujú do tkaniva, kde produkujú ROS, granulárne enzýmy, NETs a ďalšie pro-zápalové cytokíny, čím sa zápalový proces naďalej zintenzívňuje a tkanivo pľúc poškodzuje (6). Zníženým uvoľňovaním pro-zápalových cytokínov pri kondicionovaní je pravdepodobne akumulácia neutrofilov v pľúcach regulovaná, čo sa prejaví na redukcii ich poškodenia. Správnou reguláciou systémového zápalu indukovaného podaním LPS sú zrejme vytvorené vhodné podmienky u kondicionovaných zvierat aj pri redukcii infarktu.

## **Záver**

Vzdialené kondicionovanie predstavuje komplexnú ochranu celého organizmu voči patologickým podmienkam. Jeho protektívnu schopnosť sme dokázali aj v podmienkach hyperzápalovej reakcie, čo zvyšuje možnosť jeho využitia aj pri mnohých vírusových, bakteriálnych a autoimunitných ochoreniach, pre ktoré je vznik systémového zápalu a cytokínovej búrky typické.

## **Literatúra**

1. Incognito AV, Miliar PJ, Pyle WG (2021) Remote ischemic conditioning for acute respiratory distress syndrome in COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 320: L331-L333
2. Jachova J, Gottlieb M, Nemethova M et al. (2020) Brain to blood efflux as a mechanism underlying the neuroprotection mediated by rapid remote preconditioning in brain ischemia. *Mol Biol Rep.* 47: 5385-5395.
3. Owolabi MO, Thrift AG, Mahal A (2022) Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action. *Lancet Public Health* 7: e74-e85
4. Ozturk S (2021) COVID-19 and Stroke: A Neurological Perspective. *Stroke*
5. Pearce L, Davidson SM, Yellon DM (2021) Does remote ischaemic conditioning reduce inflammation? A focus on innate immunity and cytokine response. *Basic Res Cardiol.* 116
6. Yang SCH, Tsai YF, Pan YL et al. (2021) Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. *Biomed J.* 44: 439-446
7. Zhou Y, Li W, Wang D, et al. (2020) Clinical time course of COVID-19, its neurological manifestation and some thoughts on its management. *Stroke Vasc Neurol.* 5: 177-9

Táto práca bola podporená grantmi: *APVV-21-0069*, *VEGA 2/0096/22* a *VEGA1/0723/21*.

# VYUŽITIE SVINE DOMÁCEJ V REGENERAČNEJ MEDICÍNE DLHÝCH KOSTÍ

## THE USE OF DOMESTIC PIG IN THE REGENERATION MEDICINE OF LONG BONES

**Filip Korim<sup>1</sup>**, Katarína Vdoviaková<sup>1</sup>, Sonja Ivašková<sup>1</sup>, Lenka Krešáková<sup>1</sup>, Filip Humeník<sup>1</sup>,  
Ján Danko<sup>1</sup>, Mária Giretová<sup>2</sup>, Lubomír Medvecký<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie  
v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>2</sup>Ústav materiálového výskumu SAV, Watsonova 47, Košice  
*filip.korim@student.uvlf.sk*

### **Súhrn**

Zavádzanie nových, progresívnych operačných techník a metód regenerácie kostného tkaniva vyžaduje pre-klinické testovanie na animálnych modeloch. Sviňa domáca je ideálnym kandidátom v pre-klinickom testovaní nových operačných techník a biomateriálov kvôli najbližšej podobnosti s človekom. V našej práci poukazujeme na opodstatnenie animálneho pokusu na svini domácej v regeneračnej medicíne dlhých kostí.

**Kľúčové slová:** biomateriály, biomedicína, kosti, regenerácia, sviňa domáca

### **Summary**

The introduction of new, progressive surgical techniques and methods of bone tissue regeneration requires pre-clinical testing on animal models. The domestic pig is an ideal candidate for pre-clinical testing of new surgical techniques and biomaterials due to its closest resemblance to humans. In our work, we point out the justification of an animal experiment on a domestic pig in the regenerative medicine of long bones.

**Key words:** biomaterials, biomedicine, bones, regeneration, swine

## Úvod

Používanie animálnych (quadrupedálnych) modelov v aplikovanom výskume je nevyhnutnosťou pre pokrok modernej medicíny a k pochopeniu komplexných reakcií organizmu na príslušný exogénny stimul (8, 12). Medzi základné kritérium pre výber najvhodnejšieho animálneho modelu by nemali byť nízka cena a ľahká manipulácia, ale čo najväčšia morfológická, genetická a fyziologická príbuznosť s človekom (2, 7, 10). Aj napriek tomu, že neexistuje žiaden ideálny model pre všetky oblasti aplikovaného výskumu, je práve sviňa domáca (*Sus scrofa domestica*) jedným z najčastejšie používaným biomodelom v biomedicínskom výskume kvôli svojej výraznej morfológickej a fyziologickej podobnosti s človekom (2). Väčšie druhy zvierat, ako je sviňa domáca, ovca, koza a primáty sú lepšími prediktormi reakcií organizmu ako sú napríklad hlodavce. U týchto druhov zvierat je ďalšou výhodou ich životnosť (dlhovekosť), čo umožňuje aj niekoľkoročné sledovanie fyziologických alebo patologických procesov organizmu experimentálnych zvierat (15).

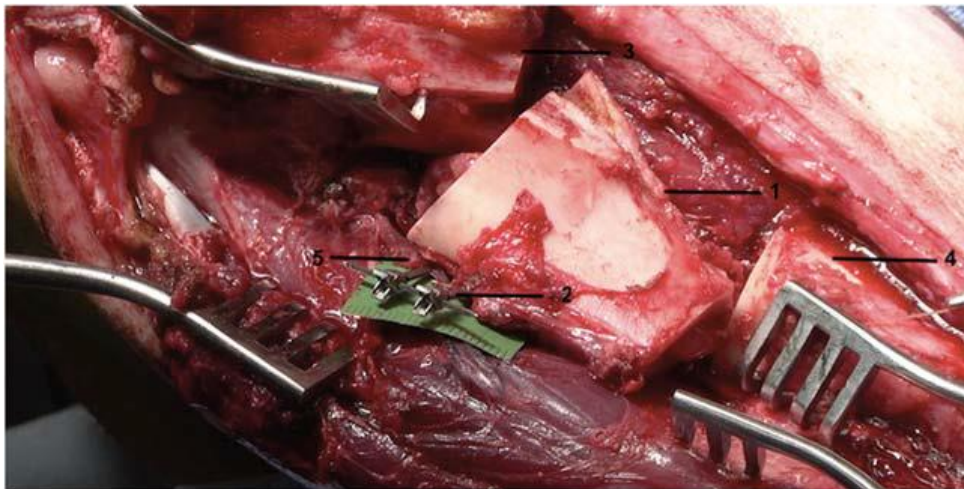
## Sviňa domáca ako biomodel

Sviňa domáca sa v súčasnosti používa vo všetkých smeroch výskumu kostí, najmä v problematike postovariohysterektomickej redukcie kostnej hmoty, starnutí, efekte rôznych liekov, homeostázy vápnika, hojenia zlomenín, regeneračnej medicíny a mechanického testovania kostí (2). Sviňa domáca bola študovaná ako biomodel regenerácie rôznych kostí tela ako sú kosti kalvárie, tváre, dlhé kosti končatín (stehnová kosť, holenná kosť, vretenná kosť), chrbtica a hrudná kosť (1, 6, 13, 16, 17, 18). Z hľadiska existencie viacerých plemien v rámci druhu je nutné podotknúť, že podľa niektorých autorov nie je odporúčané využitie klasických plemien ošípaných v regeneračnej medicíne kostného tkaniva z dôvodu rýchleho rastu a ťažkej váhy (8). Pre tento účel je odporúčané využívanie špeciálne vyšľachtených miniprasiat ako sú Gottingenske prasiatka, Yucatán a Hanford (4). Klasické plemená sviň ako Biela ušľachtilá, Yorkshire alebo Landras a ich krížence sú stále využívané v regeneračnej medicíne kostného tkaniva (9, 17). Jednou z výziev pri používaní zvieracích modelov pre translačný výskum je definícia ekvivalencie veku. Vek je možné definovať v niekoľkých mierkach vrátane chronologického veku, sexuálneho veku a veku kostry (3). Je všeobecne známe, že zvieratá dospievajú rýchlejšia ako ľudia. Mnoho plemien sviň dosahuje pohlavnú dospelosť vo veku 4,5 – 6 mesiacov (14). Vo všeobecnosti, je popísané, že svine vo veku 6 – 18 mesiacov sa považujú za dospelé a možno ich využiť ako vhodný model v regeneračnej medicíne kostného tkaniva (11).

## Využitie holenej kosti svine domácej v regeneračnej medicíne

Holenná kosť svine domácej bola a je intenzívne využívaná ako modelová kosť pre sledovanie regeneračného potenciálu rôznych typov biomateriálov a allograftov (5, 6, 9, 19). V nasledovných štúdiách boli použité klasické plemená svine domácej, ale aj miniprasatá. Štúdia vykonaná Yilmaz a kol. (19), ktorú realizovali na bližšie nešpecifikovaných 8 mesačných 60 kg sviniach počas 12. týždňov priniesla výborné výsledky ohľadom regeneračného potenciálu  $\beta$  - trikalcium fosfátového materiálu v kombinácii s trombocytmi bohatými na fibrín (PRF). Materiál bol aplikovaný do 5x5 mm cirkulárnych defektov holenej kosti. Autori zistili, že kombinácia trombocytmi bohatými na fibrín a  $\beta$  - trikalcium fosfátového materiálu urýchľuje hojenie kostí. V histologickom obraze je možné pozorovať oveľa väčšiu produkciu zrelej novovytvorenej kosti, ako keď sa aplikuje materiál samostatne. Biodegradácia materiálu bola úplná a nebolo možné pozorovať jeho rezíduá. Rovnako tak, autori pozorovali väčší výskyt krvných ciev. V štúdiu realizovanej Pek a kol. (9) boli použité svine plemena Yorkshire x Landras. Vek týchto ošípaných táto štúdia neuvádza, ale na základe preštudovanie rádiogramov usudzujeme, že sa jednalo o dospievajúce až dospelé svine. Experimentálnym zvieratám bol vytvorený segmentálny 2x1 cm defekt, ktorý bol následne vyplnený kolagén-apatitom. Končatiny boli následne stabilizované fixačným osteosyntetickým zariadením. Zvieratá prežívali 3 – 6 mesiacov. Na základe vyšetrení počítačovou tomografiou (CT), meraním denzity kostného tkaniva a klasickou histologickou technikou bolo zistené, že kolagén-apatit stimuloval osteogénu. Zhustenie kostného tkaniva v mieste defektu bolo pozorované už 3 mesiace po operácii a pokračovalo do 6. mesiaca. Kosť v mieste defektu dosahovala takmer podobnú hustotu ( $1,15 \pm 0,22 \text{ g/cm}^3$ ), ako nepoškodená kosť ( $1,24 \pm 0,23 \text{ g/cm}^3$ ). Obraz kostného tkaniva prezentoval rozsiahlu osteoblastickú a osteoklastickú aktivitu indikujúcu proces remodelácie. V kostnom defekte, ktorý nebol vyplnený materiálom bolo pozorované iba vláknité kostné tkanivo. Tieto dve práce sa zaoberali aplikáciou biomateriálu u relatívne dospelých veľkých plemien ošípaných. Na základe predložených výsledkov je možné konštatovať výborný regeneračný potenciál oboch materiálov. V štúdiách neboli spomínané žiadne komplikácie počas operácii a ani po operácii. Miniprasatá Yucatan (n=8) boli využité v jednej zaujímavej štúdiu študujúcej vplyv vaskularizovaného kostného autograftu (VKA). VKA bol umiestnený do vopred vytvoreného veľkého 3,5 cm segmentálneho defektu diafýzy holenej kosti. V práci bola využitá aj kontrolná skupina kde VKA bol zaslepený. Zvieratá prežívali 16 týždňov a po uplynutí tejto doby bolo vykonané CT vyšetrenie a histologická analýza. Po operácii všetky zvieratá zaťažovali postihnutú končatinu, aj napriek veľkosti kostného defektu. Kostné tkanivo

premostilo lomné okraje autograftu, obsahovalo vyššie množstvo osteoidu a podliehalo mineralizácii (6). Dospelým Gottingenským prasiatkam (vek 20 – 28 mesiacov) vážiacim 24 – 32 kg boli vytvorené 11x25 mm defekty v oblasti proximálnej epifyzy holennej kosti. Defekty boli vyplnené autografom, kombináciou kalcium fosfátových granúl s bunkami kostnej drene a plazmou bohatou na trombocyty, kalcium fosfátových granúl a bunkami kostnej drene alebo samotnými kalcium fosfátovými granulami. Po 6 týždňovom prežívaní boli kosti analyzované počítačovou tomografiou a histológiou. Na základe počítačovej tomografie a histológie najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím kombinácie kalcium fosfátových granúl obohatených bunkami kostnej drene a plazmou bohatou na trombocyty. Táto kombinácia výrazne viedla k vyššej tvorbe novej kosti v mieste defektu bez žiadnych prejavov zápalu. Táto štúdia výborne demonštruje možnosti liečby kostných defektov váhonosných kostí ako je v tomto prípade holenná kosť. Biomateriál obohatený bunkami a rastovými faktormi výborne stimuloval osteogenézu. V tejto práci neboli poskytnuté údaje o komplikáciách počas a po zákroku (5).



**Obr. 1** Umiestnenie tibiálneho štepu (1) do segmentálneho defektu holennej kosti príjemcu (3, 4). Na obrázku je vidieť aj cievne stopky darcu a príjemcu (2, 5). Zdroj: Kotsougiani a kol. (2018) (6).

## Záver

Z hľadiska procesu regenerácie neboli zistené takmer žiadne rozdiely v kvalite novovytvorenej kosti. Štúdie, ktoré využívali aj totožný materiál t.j. kalcium fosfátový minerál preukázali výborné osteoindukčné a osteokonduktívne vlastnosti biomateriálu a jeho takmer úplnú až úplnú biodegradáciu u oboch typov sviň (miniprasatá a klasické svine). Miesto defektu bolo u oboch typov sviň v oblasti holennej kosti. Na druhej strane, je samozrejme lepšie používať miniprasatá berúc do úvahy lepšiu manipuláciu, fixáciu a nižšiu spotrebu liečiv a materiálu.



Avšak, podľa porovnania týchto štúdií by veľkosť animálneho nemala byť limitujúca pre vykonanie zákroku a očakávanie sľubných výsledkov. Pomery hmotnosti, výšky a zaťažovania končatín sú v oboch prípadoch pravdepodobne rovnaké. Zlyhanie a výskyt perioperačných a postoperačných komplikácií môže súvisieť najmä s nevhodným algoritmom operačného zákroku, výberom materiálu, nesprávnou technológiou chovu zvierat, úzkou príbuzenskou plemenitbou a nesprávnou voľbou plemena.

## Literatúra

1. Abbah SA, Lam CX, Hutmacher DW et al. (2009) Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. *Biomaterials* 30: 5086-93
2. Aerssens J, Boonen S, Lowet G et al. (1998) Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139: 663-70
3. Baxter-Jones AD, Eisenmann JC, Sherar LB et al. (2005) Controlling for maturation in pediatric exercise science. *Pediatr Exerc Sci* 17: 18-30
4. Cone SG, Warren PB, Fisher MB et al. (2017) Rise of the pigs: utilization of the porcine model to study musculoskeletal biomechanics and tissue engineering during skeletal growth. *Tissue Eng Part C Methods* 23: 763-80
5. Hakimi M, Grassmann JP, Betsch M et al. (2014) The composite of bone marrow concentrate and PRP as an alternative to autologous bone grafting. *PLoS One* 9: e100143
6. Kotsougiani D, Willems JI, Shin AY et al. (2018) A new porcine vascularized tibial bone allotransplantation model. Anatomy and surgical technique. *Microsurgery* 38: 195-202
7. Lüthje FL, Skovgaard K, Jensen HE et al. (2018) Pigs are useful for the molecular study of bone inflammation and regeneration in humans. *Lab Anim* 52: 630-40
8. Pearce AI, Richards RG, Milz S et al. (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13: 1-10
9. Pek YS, Gao S, Arshad MM et al. (2008) Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials* 29: 4300-05
10. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D et al. (2015) The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70: 73-86
11. Pfeifer CG, Kinsella SD, Milby AH et al. (2015) Development of a large animal model of osteochondritis dissecans of the knee: a pilot study. *Orthop J Sports Med* 3: 2325967115570019
12. Pyszko M, Paral V, Kyllar M (2013) Thickness of the substantia compacta of porcine long bones. *Vet Med* 58: 543-52
13. Reedy BK, Pan F, Kim WS et al. (1999) Properties of coralline hydroxyapatite and expanded polytetrafluoroethylene membrane in the immature craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 103: 20-6
14. Reiland S (1978) Growth and skeletal development of the pig. *Acta Radiol Suppl* 358: 15-22
15. Rubessa M, Polkoff K, Bionaz M et al. (2017) Use of pig as a model for mesenchymal stem cell therapies for bone regeneration. *Anim Biotechnol* 28: 275-87
16. Tomco M, Petrovova E, Giretova M et al. (2017) In vitro and in vivo study of microporous ceramics using MC3T3 cells, CAM assay and a pig animal model. *Anat Sci Int* 92: 569-80
17. Vdoviaková K, Jenca A, Jenca Jr A et al. (2023) Regenerative Potential of Hydroxyapatite-Based Ceramic Biomaterial on Mandibular Cortical Bone: An In Vivo Study. *Biomedicines* 11: 877
18. Vestergaard RF, Brüel A, Thomsen JS et al. (2015) The influence of hemostatic agents on bone healing after sternotomy in a porcine model. *Ann Thorac Surg* 99: 1005-11
19. Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A et al. (2014) Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Bras Cir* 29: 59-65

Práca bola podporená projektom *APVV-20-0184*.

# MORFOLOGICKÁ ANALÝZA MOZGU OBEZNÉHO POTKANA PO PODANÍ SEKRETÓMU KRVNÝCH BUNIEK STIMULOVANÝCH VZDIALENÝM KONDICIONOVANÍM

## MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF BRAIN OF OBESE RAT FOLLOWING ADMINISTRATION OF BLOOD CELL-DERIVED SECRETOME STIMULATED BY REMOTE CONDITIONING

**Kludia Kotorová**, Jana Končeková, Miroslav Gottlieb, Petra Bonová

Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, v.v.i., Košice, Slovensko

*kotorova@saske.sk*

### **Súhrn**

Sekretómy predstavujú nový smer v oblasti regeneratívnej medicíny. Táto terapia je založená na parakrínnej signalizácii bioaktívnych faktorov, ktoré sú vylučované bunkami do extracelulárneho prostredia. V našej štúdií sme využili sekretóm krvných elementov od štíhlych potkanov stimulovaných vzdialeným kondicionovaním na terapiu ischemickej cievnej mozgovej príhody u obéznych jedincov. Zamerali sme sa na morfológickú analýzu mozgu obéznych potkanov s cieľom vizuálne verifikovať rozsah ischemického poškodenia a stanoviť percentuálne zastúpenie ischemiou poškodených buniek v oblasti penumbry pred a po aplikácií tolerantného sekretómu.

**Kľúčové slová:** sekretóm, krvné elementy, vzdialené kondicionovanie, neuroprotektcia, obezita

### **Summary**

Secretomes represents a new direction in the field of regenerative medicine. This therapy is based on paracrine signalling of bioactive factors that are secreted by cells into the extracellular environment. In our study, we used the blood cell-derived secretome from remote ischemic conditioned-lean and healthy rats for the therapy of obese individuals with ischemic stroke. We focused on the morphological analysis of the brains of obese rats to visually verify the extent of ischemic damage and determine the percentage of ischemia-damaged cells in the penumbra region before and after tolerant secretome administration.

**Key words:** secretome, blood elements, remote conditioning, neuroprotection, obesity

## Úvod

V oblasti regeneratívnej medicíny sa za posledné desaťročie osvedčila stratégia využívajúca kmeňové bunky na opravu poškodených tkanív (1). Nedávne výskumy však ukázali, že bunkové médium z kultúr kmeňových buniek môže produkovať pozitívne účinky vďaka sekrécií rôznych faktorov. Túto komplexnú zmes rôznych bioaktívnych faktorov, ktoré bunky uvoľňujú do extracelulárneho prostredia označujeme ako sekretóm. Produkciu týchto faktorov zabezpečujú rôzne typy buniek, vrátane krvných elementov. Ich výhodou je, že dokážu prekonať obmedzenia spojené s bunkovou terapiou, ako je napríklad nežiaduca diferenciácia implantovaných buniek. Vďaka týmto biologickým a logistickým výhodám sa podávanie sekretómov považuje za nový terapeutický prístup pri liečbe mnohých akútnych stavov, vrátane cievnej mozgovej príhody (CMP) (2). Sekréciu jednotlivých bioaktívnych faktorov (cytokíny, chemokíny, rastové faktory) môžeme navodiť tzv. vzdialeným kondicionovaním (RIC). Hoci sa ukázalo, že fenomén RIC zlepšuje klinické výsledky u pacientov s CMP, existujú faktory (vek, pohlavie, obezita), ktoré znižujú až eliminujú neuroprotektívny efekt RIC (3). Preto sme sa v našej štúdií zamerali na koncept využitia sekretómu odvodeného od krvných elementov RIC-stimulovaných štíhlych potkanov ako potenciálnej terapie pre obéznych jedincov s CMP.

## Materiál a metódy

### Animálny model

V experimente boli použité 12-týždňové štíhle samce kmeňa Wistar Albino (n=7) (Velaz Ltd., Česko) a 12-týždňové obézne samce kmeňa Zucker Diabetic Fatty (ZFD; n=7) (Dobrá Voda, Slovensko). Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach, v 12 hodinovom svetelnom režime, s prístupom k vode a potrave *ad libitum*.

### Experimentálny dizajn

Samce obéznych zvierat boli rozdelené do jednej z nasledujúcich troch skupín: 1. Kontrolná skupina; 2. Netolerantná skupina; 3. Tolerantná skupina. Potkanom všetkých skupín bola navodená fokálna ischémia mozgu generovaná 90 minútovou oklúziou strednej mozgovej tepny (MCAO) s následnou 24 hodinovou reperfúziou. Tolerantnej skupine bol intravenózne aplikovaný tolerantný sekretóm. Ten bol získaný z krvi RIC-stimulovaných Wistar potkanov. Intervencia vzdialeného kondicionovania (RIC) pozostávala z troch cyklov 5-minútovej ischémie a reperfúzie. Netolerantnej skupine bol aplikovaný sekretóm získaný z Wistar

potkanov bez aplikácie vzdialeného kondicionovania. Kontrolnej skupine bola aplikovaná umelá plazma. Zvieratá boli usmrtené po 24 hod preživaní dekapitáciou po chloralhydrátovej (300 mh/kg i.p) anestézii.

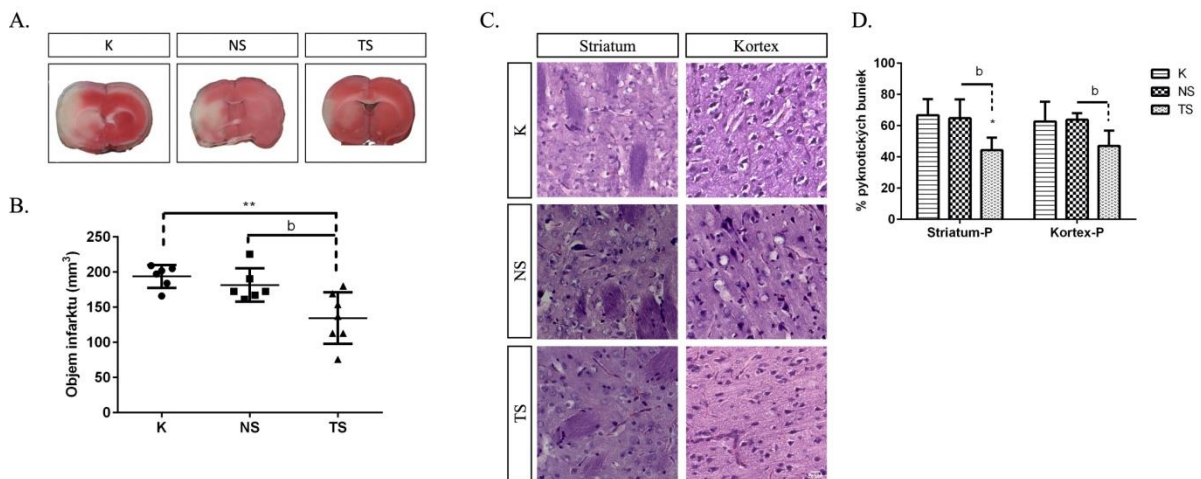
### **Experimentálne metódy**

Rozsah ischemického ložiska sme sledovali na 2 mm rezoch mozgu farbených 2% TTC roztokom (2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid; Sigma) v PBS (phosphate-buffered saline) po dobu 30 minút pri teplote 37°C. Po 24 hodinovej fixácii v 10% roztoku formaldehydu boli rezy naskenované pomocou skenera (Epson Perfection 4490 Photo, 600 dpi) a obrázky boli vyhodnotené pomocou softvéru ImageJ (ImageJ, 1.8.0., USA).

Rezy mozgu boli následne narezané na hrúbku 25  $\mu\text{m}$  a ofarbené histologickým farbením hematoxylín eozinom a montované do montážneho roztoku (DPX Mountant; Fluka Chemie AG, Švajčiarsko). Rezy boli vyhodnotené pomocou softvéru ImageJ vyjadrením percentuálneho zastúpenia pyknotických buniek v oblasti penumbry striata a kortexu.

### **Výsledky**

Aplikácia tolerantného sekretómu získaného z RIC-stimulovaných krvných buniek štíhlych potkanov spôsobila štatisticky významnú zmenu v rozsahu infarktového ložiska u obéznych zvierat. Objem infarktu sa signifikantne znížil na  $134,60 \pm 13,83 \text{ mm}^3$ , čo predstavuje 30,55% zníženie v porovnaní s kontrolnou skupinou a 25,88% zníženie v porovnaní s netolerantnou skupinou (Obr. 1A, B). Aplikáciou farbiva Hematoxylín-Eozín (H&E) na tkanivové rezy mozgov obéznych potkanov sme monitorovali základné morfológické zmeny buniek. Detail mozgového tkaniva kontrolných a netolerantných potkanov, ktorí podstúpili fokálnu ischémiu mozgu vykazujú morfológické zmeny neurónov v oblasti penumbry striata a kortexu. Možno vidieť tmavo zafarbené pyknotické jadrá obklopené bielou cytoplazmou (Obr. 1C). Ischemický zásah spôsobil v skupine kontrolných a netolerantných zvierat približne 60% poškodenie neurónov v oblasti striata a kortexu. Po intravenóznom podaní tolerantného sekretómu obéznym zvieratám sa percento pyknotických buniek v striate penumbry signifikantne znížilo na 44 % a v kortexe penumbry na 47% (Obr. 1D).



**Obr. 1** (A) TTC farbenie rezov mozgu obéznych zvierat zobrazujúce rozsah infarktového ložiska (biela zóna) v kontrolnej (K), netolerantnej (NS) a tolerantnej (TS) skupine. (B) Štatistické vyhodnotenie objemu infarktu (mm<sup>3</sup>). (C) H&E farbenie rezov mozgu so (D) štatistickým vyhodnotením percenta pyknotických buniek v jednotlivých skupinách v oblasti penumbry striata (striatum-P) a kôry (kortex-P). Výsledky sú vyjadrené ako aritmerický priemer ±SD, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 oproti kontrole; <sup>b</sup>p < 0,05 oproti netolerantnej skupine.

## Diskusia

Vzdialené ischemické kondicionovanie (RIC) sa javí ako limitujúci faktor neuroprotektívnej ochrany cievnej mozgovej príhody v kontexte obezity (3). Krvné elementy stimulované RIC však dokážu túto ochranu zabezpečiť. Bonová a kol. (4) poskytli dôkaz, že neuroprotektívna sprostredkovaná RIC by sa mohla intravenózne prenášať prostredníctvom sekretómu krvných buniek z jedného zvierat'a na druhé. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že sekretóm odvodený od krvných buniek stimulovaných vzdialeným kondicionovaním dokáže potlačiť neurologické prejavy u obéznych zvierat po cievnej mozgovej príhode. Zistili sme, že aplikácia tolerantného sekretómu vedie k významnému zníženiu objemu infarktu u obéznych zvierat, približne o 30% v porovnaní s kontrolnou skupinou a o 25% v porovnaní s netolerantnou skupinou. Morfológická analýza pomocou H&E farbenia odhalila, že percento ischemiou poškodených buniek u kontrolných zvierat sa štatisticky nelíšilo od tých, ktoré boli vystavené netolerantnému sekretómu. Avšak tolerantný sekretóm vyvolal významnú redukciu týchto poškodených buniek v striate aj kôre penumbry.

## Záver

Dospeli sme k záveru, že sekretóm krvných elementov stimulovaných vzdialeným kondicionovaním predstavuje sľubnú alternatívnu terapiu na zlepšenie funkčných výsledkov po

cievnej mozgovej príhode u pacientov s určitými sprievodnými komorbiditami, ako je napríklad obezita.

## **Literatúra**

1. Song CG, Zhang YZ, Wu HN, Cao XL, Guo CJ, Li YQ et al. (2018) Stem cells: a promising candidate to treat neurological disorders. *Neural Regen Res.* 13(7): 1294-304
2. Altmann P, Mildner M, Haider T, Traxler D, Beer L, Ristl R, et al. (2014) Secretomes of apoptotic mononuclear cells ameliorate neurological damage in rats with focal ischemia. *F1000Res.* Oct 28;3: 131
3. Kotorová K (2024) Obesity as a Limiting Factor for Remote Ischemic Postconditioning-Mediated Neuroprotection after Stroke. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome.* 33: 76-87
4. Bonova P, Jachova J, Nemethova M, Macakova L, Bona M, Gottlieb M (2020) Rapid remote conditioning mediates modulation of blood cell paracrine activity and leads to the production of a secretome with neuroprotective features. *Journal of Neurochemistry.* 154(1): 99-111

Pripravené za finančnej podpory grantov *APVV-21-0069*, *VEGA 1/0723/21* a *VEGA 2/0096/22*.

# ABSENCIA GLUTATIÓNPEROXIDÁZY 5 V OOCYTOCH A PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH U POTKANOV

## ABSENCE OF GLUTATHIONE PEROXIDASE 5 IN RAT OOCYTES AND PREIMPLANTATION EMBRYOS

Andrea Krehel'ová<sup>1</sup>, Veronika Kovaříková<sup>2</sup>, Ingrid Hodorová<sup>1</sup>, Dušan Fabian<sup>2</sup>,

**Jozef Mihalik<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied, SAV, Šoltésovej 4-6, Košice

*jozef.mihalik@upjs.sk*

### Súhrn

Antioxidačné enzýmy chránia bunky pred poškodením voľnými kyslíkovými radikálmi. Medzi tieto enzýmy patrí aj skupina ôsmich glutatiónperoxidáz, ktorej členom je glutatiónperoxidáza 5. Práve pri nedostatku antioxidačných enzýmov môže dôjsť k poškodeniu bunky, ktorého výsledkom sú tiež poruchy plodnosti. V našej práci sme sa preto zamerali na sledovanie výskytu glutatiónperoxidázy 5 počas preimplantačnej fázy gravidity v oocytoch a preimplantačných embryách imunofluorescenčnou metódou. Avšak v žiadnych oocytoch, ani preimplantačných embryách sme tento enzým nedetegovali.

**Kľúčové slová:** antioxidačný enzým, Cy3, imunofluorescencia, neplodnosť, voľné kyslíkové radikály

### Summary

Antioxidant enzymes protect cells from damage by free oxygen radicals. These enzymes also include the group of eight glutathione peroxidases, of which glutathione peroxidase 5 is a member. With a lack of antioxidant enzymes, cell damage can occur, which also results in fertility disorders. In our work, we therefore focused on monitoring the occurrence of glutathione peroxidase 5 during the preimplantation phase of pregnancy in oocytes and preimplantation embryos using the immunofluorescence. However, we did not detect this enzyme in any oocytes or pre implantation embryos.

**Key words:** antioxidant enzyme, Cy3, immunofluorescence, infertility, reactive oxygen species

## Úvod

Do skupiny glutatiónperoxidáz patrí osem doposiaľ objavených antioxidačných enzýmov, kde je zaradená aj glutatiónperoxidáza 5 (GPx5) (1). Tieto enzýmy zohrávajú úlohu v ochrane buniek pred pôsobením oxidačného stresu, ktorý môže vznikáť vplyvom peroxidu vodíka ( $H_2O_2$ ), ale aj voľných kyslíkových radikálov, ako sú napríklad superoxidový anión ( $O^{2-}$ ) a hydroxylové radikály ( $OH\cdot$ ) (2). GPx5 je enzým tvorený štyrmi rovnakými podjednotkami a v katalytickom centre sa nachádza aminokyselina cysteín (3, 4). GPx5, enzým špecifický pre nadsemenník, je dôležitý najmä pri ochrane spermií v lúmene tohto orgánu pred pôsobením voľných kyslíkových radikálov, keďže spermie obsahujú málo cytoplazmatických antioxidantov kvôli malému množstvu cytoplazmy (5). V samičích pohlavných bunkách a v preimplantačných embryách doposiaľ nebol skúmaný výskyt GPx5, no u myši sa zistil vyšší výskyt potratov a poškodení embryí v prípade samíc párených s knokautovanými samcami staršími než jeden rok (6).

## Materiál a metódy

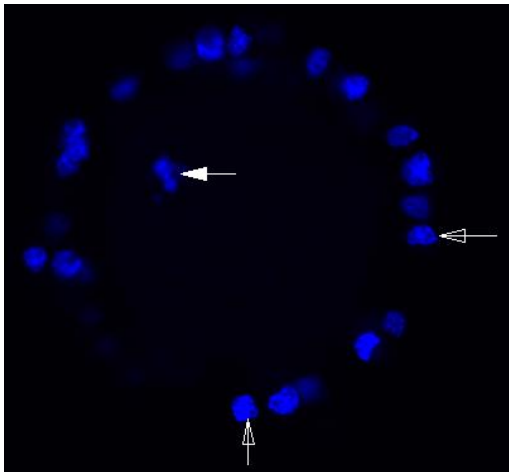
Experiment bol vykonaný na základe povolenia Etickej komisie pre experimenty na zvieratách Inštitútu fyziológie zvierat, schválené Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, a boli vykonané podľa legislatívy Slovenskej republiky na základe EU direktívy 2010/63/EU na ochranu zvierat používaných na experimentálne a iné vedecké účely.

Samice potkana kmeňa Sprague Dawley boli pripustené individuálne k samcom rovnakého kmeňa. Prítomnosť vaginálnej zátky bola znakom úspešného párenia, a tento deň bol zároveň označený ako prvý deň gravidity (D1). Samice boli následne usmrtené na prvý, tretí (D3) a piaty (D5) deň gravidity použitím letálnej dávky anestetika. Po odobratí vajčkovodov a maternicových rohov boli tieto orgány vypláchnuté manipulačným roztokom (PBS+BSA) kvôli získaniu oocytov a preimplantačných embryí. Tie boli zafixované v 4%-nom paraformaldehyde (31628, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) a uskladnené maximálne 1 týždeň v 1%-nom paraformaldehyde. Oocyty a preimplantačné embryá boli použité na imunofluorescenčné stanovenie sledovaného enzýmu pomocou protilátky konjugovanej s Cy3 (MBS2073799, MyBioSource, San Diego, CA, USA) a jadrá boli vizualizované s Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Po namontovaní na podložné sklíčka boli oocyty a preimplantačné embryá pozorované pod konfokálnym mikroskopom (FV-1000 BX61, Olympus, Tokyo, Japan).

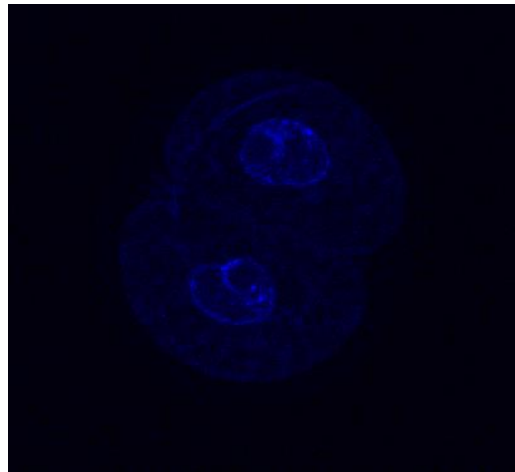


## Výsledky

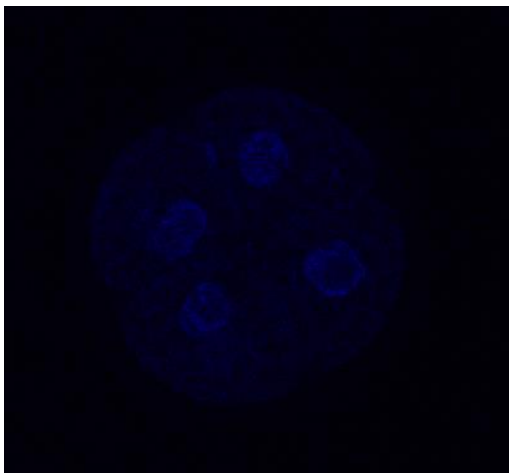
Vo všetkých sledovaných oocytoch (Obr. 1) a preimplantačných embryách (Obrázok 2 - 4) bola zistená absencia glutatiónperoxidázy 5. Na obrázkoch je DNA v jadrách oocytu, preimplantačných embryí a kumulárnych buniek vizualizovaná pomocou Hoechst 33342 (modrá).



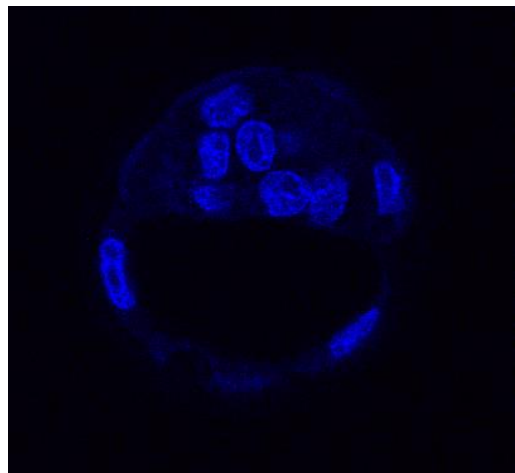
**Obr. 1** Absencia GPx5 v oocyte v štádiu metafáza II. Plná šípka označuje DNA oocytu, prázdne šípky jadrá kumulárnych buniek.



**Obr. 2** Absencia GPx5 v 2-bunkovom embryu



**Obr. 3** Absencia GPx5 v 4-bunkovom embryu



**Obr. 4** Absencia GPx5 v blastocyste

## Diskusia

Z našich výsledkov vyplýva, že enzým GPx5 nie je prítomný počas preimplantačnej fázy vývinu u potkanov. Je možné, že tento enzým je nahradený inými glutatiónperoxidázami alebo

enzýmami z iných skupín, napríklad katalázou, ktoré oocyty a preimplantačné embryá chránia pred oxidačným stresom v dostatočnej miere. Toto bolo zistené u GPx5 knokautovaných samcov myší, u ktorých neprítomnosť enzýmu GPx5 v prísemenníku bola kompenzovaná zvýšenými hladinami katalázy a iných glutatiónperoxidáz v lúmene prísemenníka (6). To môže znamenať, že enzým GPx5 nie je dôležitý počas preimplantačného vývinu.

## Záver

V našej práci sme nezistili prítomnosť GPx5 v preimplantačnej fáze gravidity potkanov. Preto predpokladáme, že GPx5 nemá význam v tomto období a jej funkciu môžu nahradiť iné enzýmy.

## Literatúra

1. Flohe L, Toppo S, Cozza G, Ursini F (2011) A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 15(3): 763-80
2. Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24(10): 453-62
3. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases (2013) *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1830(5): 3289-3303
4. Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F et al (2008) The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal* 10(9): 1515-26
5. Taylor A, Robson A, Houghton BC, Jepson CA, Ford WC, Frayne J (2013) Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Hum Reprod* 28(9): 2332-42
6. Chabory E, Damon C, Lenoir A et al (2009) Epididymis selenium-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 119(7): 2074-85

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR a Slovenskej akadémie vied: *VEGA 1/0173/19*.

# BIOCEMENT S PRÍDAVKOM KYSELINY FYTOVEJ/FYTÁZY V REGENERAČNOM PROCESE OSTEOCHONDRÁLNYCH DEFEKTOV

## BIOCEMENT WITH THE ADDITION OF PHYTIC ACID/PHYTASE IN THE REGENERATIVE PROCESS OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS

Lenka Krešáková<sup>1</sup>, Katarína Vdoviaková<sup>1</sup>, Filip Humeník<sup>1</sup>, Maroš Varga<sup>2</sup>, Sonja  
Ivašková<sup>1</sup>, Filip Korim<sup>1</sup>, Marián Kadáši<sup>3</sup>, Ľubomír Medvecký<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Nemocnica AGEL Košice-Šaca, Lúčna 57, Košice-Šaca

<sup>3</sup>Klinika prežúvavcov, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>4</sup>Ústav materiálového výskumu SAV, Watsonova 47, Košice

*lenka.kresakova@uvlf.sk*

### Súhrn

Hlavným cieľom tejto *in vivo* štúdie bolo zhodnotiť vplyv inovatívneho biocementu CX na báze fosforečnanu vápenatého/monetitu tvrdeného zmesou kyselina fytovej/fytáza na regeneráciu osteochondrálnych defektov u oviec. Vzorky sme hodnotili makroskopickými, histologickými metódami vrátane použitia adekvátnych skórovacích systémov. Na rozdiel od tvorby vláknitého tkaniva, vláknitej chrupky alebo dezintegrovaného tkaniva s hlbokou centrálnou priehlbínou a nerovným povrchom pri neošetrených defektoch, výsledkom liečby biocementom CX bolo vytvorenie tkaniva s dominantnou štruktúrou hyalínnej chrupky, hoci sme zaznamenali prítomnosť jemných vlákien ( $p < 0,001$ ). Nezistili sme žiadne známky patomorfologických zmien alebo zápalu. Biodegradácia a bioresorpcia cementov bola neúplná, v hubovitej kostnej hmote sme pozorovali nedegradované zvyšky biocementov, vo všetkých prípadoch bola subchondrálna kosť vytvorená.

**Kľúčové slová:** ovca, osteochondrálny defekt, kyselina fytovej, fosforečnan vápenatý

### Summary

The main objective of this *in vivo* study was to evaluate the effect of the innovative biocement CX based on calcium phosphate/monetite hardened with a mixture of phytic acid/phytase on

the regeneration of osteochondral defects in sheep. We evaluated the samples by macroscopic, histological methods, including the use of adequate scoring systems. In contrast to the formation of fibrous tissue, fibrous cartilage, or disintegrated tissue with a deep central depression and uneven surface in untreated defects, treatment with CX biocement resulted in the formation of tissue with a dominant hyaline cartilage structure, although we noted the presence of fine fibers ( $p < 0.001$ ). We found no signs of pathomorphological changes or inflammation. Biodegradation and bioresorption of cements was incomplete, we observed non-degraded remains of biocements in spongy bone mass, in all cases subchondral bone was formed.

**Key words:** sheep, osteochondral defect, phytic acid, calcium phosphate

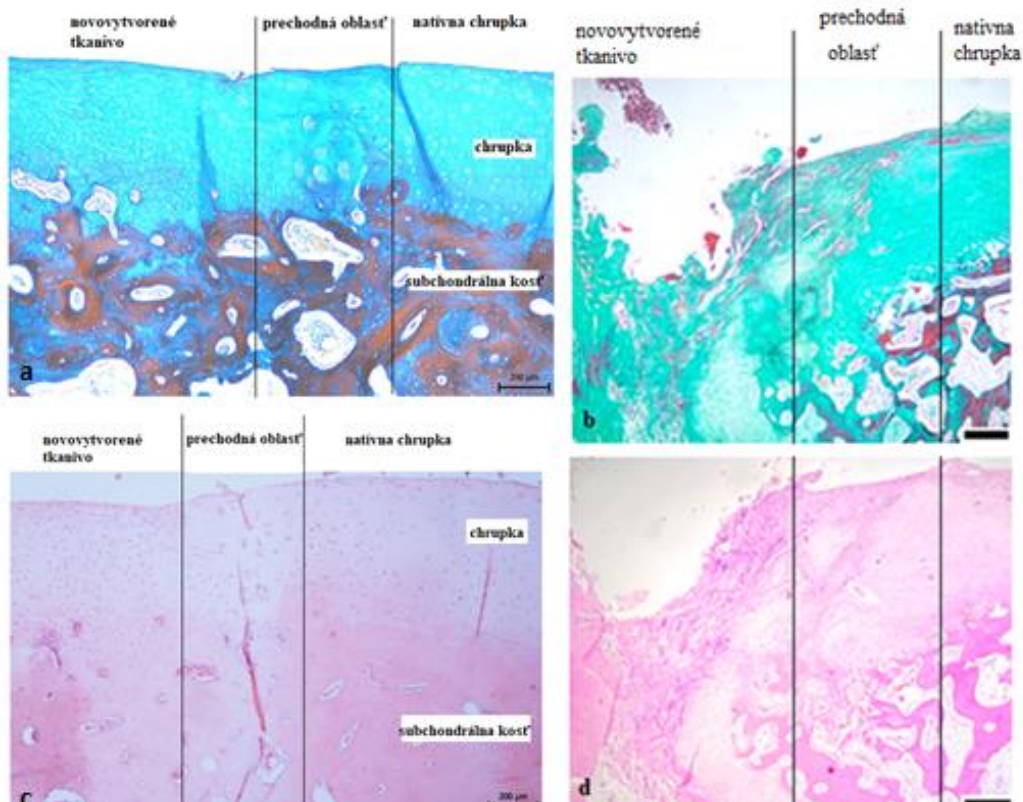
## Úvod

Kĺbová chrupka má jedinečné fyziologické, biologické a biomechanické vlastnosti v dôsledku ktorých, je regeneračný proces po vytvorení lézie mimoriadne náročný. Problematika ošetrenia kĺbovej chrupky a subchondrálnej kosti v súčasnosti predstavuje aktuálny biomedicínsky problém. Biomateriály na báze fosforečnanov vápenatých (CaP) sa používajú v terapii tvrdých tkanív v rôznych formách a typoch, napr. biocementy, povlaky biomateriálov, nosiče a iné (1,2). Mnoho štúdií sa zameralo na zlepšenie vlastností a účinnosti biomateriálov na báze fosforečnanu vápenatého pridaním rôznych terapeutických činidiel. Hlavným cieľom našej štúdie bolo sledovať efekt komplexu kyselina fytová/fytáza pridaného k CaP na zlepšenie hojenia osteochondrálnych defektov. Kyselina fytová je biogénna zlúčenina s vysokým biologickým potenciálom, ktorá sa hojne nachádza v semenách, obilninách, strukovinách a orechoch (3). Vo vedeckých štúdiách rastie záujem o pochopenie *in vitro* osteogénnych procesov, na ktorých sa podieľa kyselina fytová (4). Kyselina fytová znižuje pH, čo má za následok pozitívny vplyv na bioresorpčnú aktivitu osteoklastov a pôsobí na osteoblasty zvýšením produkcie osteopontínu. Antioxidačné a osteogénne vlastnosti kyseliny fytovej môžu hrať významnú úlohu v procesoch prestavby kostí (4). Kyselina fytová a produkty kyseliny fytovej (napr. inositoly, fytáty) sa po čiastočnej enzymatickej hydrolýze uvoľňujú do okolitého prostredia. Po vmiešaní do vhodného biocementu cementu pôsobia na alkalickú fosfatázu a podporujú diferenciáciu a osteogénnu aktivitu osteoblastov. Plesňová fytáza je špecifický enzým, ktorý hydrolyzuje kyselinu fytovú a uvoľňuje voľné fosfáty (5).

## Materiál a metódy

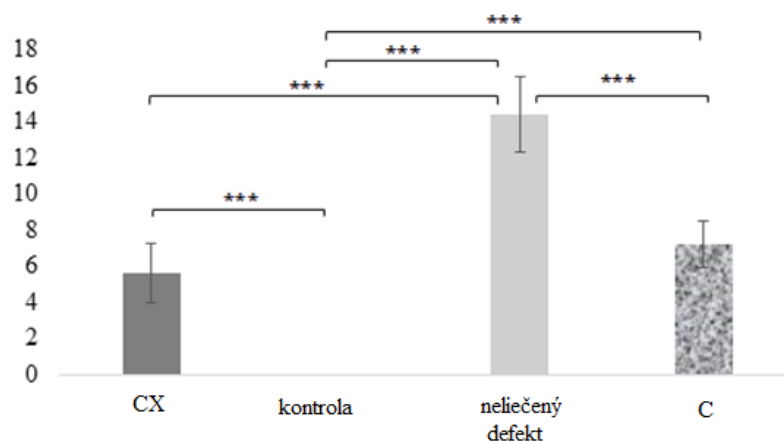
*In vivo* štúdiu sme realizovali na ovciach plemena Valaška/Merino vo veku 2 až 2,5 roka s hmotnosťou 60 až 75 kg. Ovciam sme pomocou OATS kitu vytvorili v celkovej anestézii osteochondrálnej defekt v kladke stehrovej kosti. Do vytvorených osteochondrálnych defetov sme aplikovali biomateriál CX na báze fosforečnanov vápenatých s pridanou kyselinou fytovou/fytázou (n=6). Biomateriál bol pripravený na Ústave materiálového výskumu SAV (5). Výsledky sme porovnali s biocementom C na báze fosforečnanu vápenatého s klasickými rýchlotuhnúcimi cementovými systémami, s neliečenými defektmi, ktoré sa vyhojili spontánne, bez aplikácie biomateriálu a s fyziologickou chrupkou (kontrola). Po 6 mesiacoch od aplikácie biocementov sme vzorky hodnotili pomocou makroskopických, histologických metód, vrátane použitia adekvátnych skórovacích systémov. Pre makroskopické hodnotenie bol použitý semikvantitatívny skórovací systém podľa Goebel a kol. (6) a pre histologické hodnotenie modifikovaný skórovací systém podľa O'Driscolla (7). Výsledky skórovacích systémov sme vyhodnotili pomocou One-way ANOVA s Tukey's post hoc analýzou.

## Výsledky

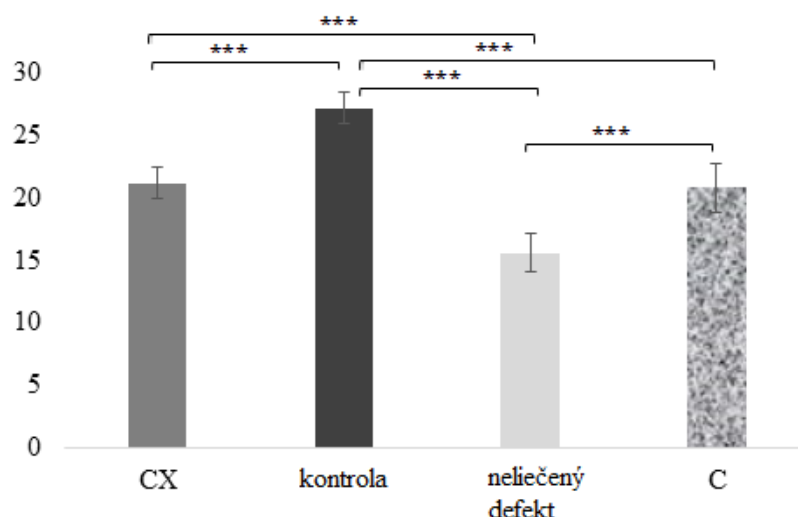


**Obr. 1** Organizácia vrstiev novovytvoreného tkaniva. (a,c) po 6 mesiacoch od aplikácie biocementu CX, (b,d) v neliečených defektoch. (a,b) Massonov trichróm, (c,d) Hematoxilín-eozín, 200µm

Osteochondrálne defekty ošetrené biocementom CX nevykazovali žiadne známky degeneratívnych patologických zmien a zápalu, prítomné boli súvislé vrstvy zodpovedajúce hyalínnej chrupke u oviec. Vo všetkých prípadoch sme pozorovali prítomnosť jemných fibróznych vlákien. Povrch tkaniva bol hladký, miestami mierne preliačený a bez fibrilácie. Morfológický charakter a usporiadanie chondrocytov zodpovedalo natívnej chrupke, ale vo viacerých oblastiach sme pozorovali miernu hypocelularita a zhlukovanie chondrocytov, najmä na prechode medzi pôvodnou a novovytvorenou chrupkou (Obr.1). Prítomnosť chrupkového tkaniva sme overili pozitívnym farbením Safraninom O a Alcianovou modrou, čo naznačuje významné množstvo proteoglykánov. Homogénna distribúcia kolagénu bola potvrdená farbením Picosirius red a Massonovým trichrómom. Novovytvorená chrupka bola pevne spojená so subchondrálnou kosťou. Štruktúra subchondrálnej kosti zodpovedala okolitej zdravej subchondrálnej kosti, miestami sme sledovali oblasti vláknitého kostného tkaniva. V lakúnach lamelárneho kostného tkaniva boli prítomné prevažne osteocyty. V porovnaní so skupinou zvierat ošetrených biocementom C sme zistili priaznivejšie výsledky v oboch skórovacích systémoch pre skupinu ošetrenú biocementom CX. Rozdiely medzi skupinami CX a C sa v celkovom skóre líšili v numerických hodnotách, avšak neboli významné. Významné rozdiely medzi jednotlivými skupinami podľa implementovaných skórovacích systémov sú uvedené v Grafe č.1 a 2. Na rozdiel od liečených defektov biocementom CX, neošetrené defekty typicky viedli k vytvoreniu fibrózneho tkaniva. U dvoch zvierat boli neošetrené defekty vyplnené vláknitým, dezintegrovaným a neusporiadaným tkanivom (Obr.1). Novovytvorené tkanivo vo väčšine prípadov vykazovalo povrchové nepravidelnosti, porušenie integrity a homogenity. V niekoľkých prípadoch sme zistili hlboké trhliny, ktoré boli rozšírené do vrstvy kalcifikovanej chrupky resp. plnej hĺbky defektu v chondrálnej časti.



**Graf 1** Výsledky makroskopického semikvantitatívneho skórovacieho systému, \*\*\*p < 0,001



**Graf 2** Výsledky histologického modifikovaného skórovacieho systému podľa O'Driscolla,

\*\*\* p < 0,001

## Diskusia

Biokompatibilita je v medicínskej oblasti veľmi dôležitým faktorom pri aplikácii akéhokoľvek biomateriálu (8). Výsledky našej štúdie poukazujú na vynikajúcu biokompatibilitu biocementu CX. V liečených skupinách neboli pozorované žiadne zápalové reakcie, príznaky infekcie, podráždenie tkaniva, tvorba fibrózneho puzdra okolo biocementu alebo patomorfologické zmeny. Biocement bol pevne integrovaný do okolitého tkaniva. V štúdiu Dong a kol. (9) bol povrch biomateriálu pokrytý zmesou kyseliny fytovej a hydroxidu vápenatého za účelom vylepšenia vlastností použitého materiálu. *In vivo* hodnotenie osteogenézy na animálnom modeli potkanov preukázalo, že povlak kyseliny fytovej zlepšil periimplantátovú osteointegráciu v porovnaní s biomateriálom bez povlaku.

Štúdia Guo et al. (10) sledovala biomateriál na báze CaP s pridanou kyselinou fytovou, aplikovaný do defektu vytvoreného v bočnom hrboli stehrovej kosti na animálnom modeli potkana. Výsledky boli porovnané s materiálmi na báze hydroxyapatitu (HA) a  $\beta$ -tricalcium fosfátu ( $\beta$ -TCP). 4 týždne po operácii boli  $\beta$ -TCP implantáty úplne degradované a neboli schopné podporiť tvorbu novej kosti. HA implantáty neboli degradované, preto nevytvárali dostatok priestoru pre tvorbu nového kostného tkaniva. Biomateriál s pridanou kyselinou fytovou vykazoval najlepšie výsledky v porovnaní s materiálmi  $\beta$ -TCP a HA, tvorba súvislého kostného tkaniva bola pozorovaná po 8. týždni experimentu. Táto *in vivo* a *in vitro* štúdia uvádza, že fytáty vápenaté vykazovali vynikajúce osteogénne vlastnosti v porovnaní s HA a  $\beta$ -TCP a udáva, že sa jedná o sľubný biomateriál určený na regeneráciu kostných defektov

kritickej veľkosti. Podobne naše výsledky poukazujú na pozitívny účinok kyseliny fytovej/fytázy pridanej k biocementu na báze fosforečnanu vápenatého v terapii tvrdých tkanív.

## **Záver**

Pridanie komplexu kyselina fytová/ fytáza v biocemente CX v porovnaní s klasickými rýchlotuhnúcimi cementovými systémami (biocement C) pozitívne ovplyvnilo proces hojenia osteochondrálnych defektov. V porovnaní s biocementom C nebol pozorovaný signifikantný rozdiel v dosiahnutom počte bodov v implementovaných skórovacích systémoch, celkové výsledky však boli priaznivejšie pre osteochondrálne defekty ošetrené biocementom CX.

## **Literatúra**

1. Jeong J et al. (2019) Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research* 23: 4
2. Lu J et al. (2018) Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. *RSC Advances* 8: 2015-2033
3. Sanchis P et al. (2021) Understanding the Protective Effect of Phytate in Bone Decalcification Related-Diseases. *Nutrients* 13: 2859
4. Asensio G et al. (2023) New Insights into the In Vitro Antioxidant Routes and Osteogenic Properties of Sr/Zn Phytate Compounds. *Pharmaceutics* 15: 339.
5. Medvecký L et al. (2020) Enzymatically hardened calcium phosphate biocement with phytic acid addition. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 31:54.
6. Goebel L et al. (2012) Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T-comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthritis and Cartilage* 20: 1046-1055
7. Ruvinov E et al. (2019) Articular cartilage regeneration using acellular bioactive affinity-binding alginate hydrogel: A 6-month study in a mini-pig model of osteochondral defects. *Journal of Orthopaedic Translation* 16: 40-52
8. Al-Sanabani et al. (2013) Application of calcium phosphate materials in dentistry. *International Journal of Biomaterials* 2013: 876132
9. Dong S (2023) Sandblasted/Acid-Etched Titanium Surface Modified with Calcium Phytate Enhances Bone Regeneration in a High-Glucose Microenvironment by Regulating Reactive Oxygen Species and Cell Senescence. *ACS biomaterials science & engineering* 9: 4720-4734
10. Guo Q et al. (2022) Bionerived amorphous calcium phytate as artificial bone substitute. *Materialia* 26: 101610

Práca bola podporená grantom *APVV-20-0184* a *VEGA 1/0237/23*.



# CHORIOALANTOICKÁ MEMBRÁNA - *IN VIVO* TESTOVANIE BIOKOMPATIBILITY BIOKONŠTRUKTOV

## CHORIOALLANTOIC MEMBRANE – *IN VIVO* TESTING OF BIOCOMPATIBILITY OF BIOCONSTRUCTS

Lenka Luptáková<sup>1</sup>, Eva Petrovová<sup>2</sup>, Zuzana Tirpáková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

*lenka.luptakova@uvlf.sk*

### Súhrn

Matrica použitá pre vytvorenie konštruktu bunka-matrica hrá kľúčovú úlohu pre vytvorenie vhodných interakcií, ktoré sú nevyhnutné pre úspech procesu hojenia a regenerácie. Práve preto je pri vývoji vhodného implantátu nevyhnutná charakterizácia vlastností matrice a *in vivo* hodnotenie tkanivovej odpovede. Medzi *in vivo* metódy patrí aj test chorioalantoickej membrány vtáčieho embrya (CAM test), ktorý je pomerne jednoduchý a ekonomicky nenáročný postup na štúdium biokompatibility skúmaných biokonštruktov. Výhody CAM modelu sú nízke náklady na experiment, jednoduchosť prevedenia, relatívne rýchle dosiahnutie výsledkov, bez etického obmedzenia a absencia imunitného systému. Doposiaľ získané výsledky potvrdzujú, že CAM test sa môže použiť ako predbežný skríningový test pred *in vivo* štúdiami na zvieratách na posúdenie vplyvu matrice na tkanivo.

**Kľúčové slová:** alternatívny model, biokompatibilita, biokonštrukt, chorioalantoická membrána

### Summary

The scaffold used to create the cell-matrix construct plays a key role in creating the appropriate interactions that are essential for the success of the healing and regeneration process. That is why the characterization of the properties of the scaffold and the *in vivo* evaluation of the tissue response are essential in the development of a suitable implant. Among the *in vivo* methods is also the test of the chorioallantoic membrane of the bird embryo (CAM test), which is a relatively simple and economically undemanding procedure for studying the biocompatibility

of the investigated bioconstructs. Among the advantages of the CAM model belong the low cost of the experiment, the simplicity of execution, the relatively quick achievement of results, almost any ethical restrictions and the absence of an immune system. The results obtained so far confirm that the CAM test can be used as a preliminary screening test before *in vivo* animal studies to assess the impact of the matrix on the tissue.

**Key words:** alternative model, biocompatibility, bioconstruct, chorioallantoic membrane

### **Biokompatibilita**

Biokompatibilita je jedným zásadných problémov výskumu biomateriálov a tkanivového inžinierstva, ktorá poukazuje na povahu a stupeň interakcie medzi biomateriálmi a hostiteľským tkanivom (6). Biokompatibilita matrice súvisí so schopnosťou fungovať ako substrát, ktorý bude podporovať vhodnú bunkovú aktivitu na optimalizáciu regenerácie tkaniva a vaskularizácie, bez vyvolania akýchkoľvek nežiaducich lokálnych alebo systémových reakcií príjemcu. Sledovanie biokompatibility materiálov možno hodnotiť *in vitro* a/alebo *in vivo* metódami založenými na hodnotení cytotoxicity, mutagenézy, bunkovej funkcie, regenerácie tkaniva a revaskularizácie. Výsledky testov *in vitro* boli vhodnejšie na skúmanie jednotlivých parametrov regenerácie tkaniva. Ale niektoré aspekty regenerácie tkaniva, ako je angiogénny proces (napr. kinetika procesu s rôznymi typmi buniek, hodnotenie prietokových podmienok alebo potenciál rastových faktorov), predstavujú príliš zložité procesy na hodnotenie *in vitro* (2). Testy *in vivo* sa zatiaľ považujú za najinformatívnejšie. Všetky v súčasnosti dostupné testy majú svoje vlastné jedinečné vlastnosti a obmedzenia. Väčšina z nich zahŕňa chirurgické zákroky náročné na čas, peniaze a prácu, vyžadujú opakované utrácanie zvierat (na vyhodnotenie reakcií tkaniva; 7). Spomedzi *in vivo* testov predstavuje prístup chorioalantoickej membrány kuracích embryí (CAM) pomerne rýchly, jednoduchý a nákladovo efektívny skrining reakcie tkaniva na biomateriály a predstavuje vhodný nástroj na skrining biomateriálov a ich biokompatibility (8).

### **Chorioalantoická membrána**

Chorioalantoická membrána (CAM) vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya je extraembryonálna membrána sprostredkujúca výmenu plynov až do vyliahnutia a jej povrch sa zväčší z približne 6 cm<sup>2</sup> na 6. deň na 65 cm<sup>2</sup> do 14. dňa. CAM slúži ako podpora pre extraembryonálne dýchacie kapiláry, aktívne transportuje sodík a chlorid z alantoického vaku a vápnik z vaječnej škrupiny

do embryonálnej vaskulatúry a tvorí časť steny alantoického vaku, ktorý zhromažďuje produkty vylučovania (8).

### **CAM test**

CAM je bežnou metódou na štúdium biologických procesov (ako je transport, výmena plynov, experimenty s transplantáciou nádorových buniek a štúdium toxicity) a angiogenézy. V skutočnosti až do 11. alebo 12. dňa vývoja kuracieho embrya má CAM veľmi hustú angiogénnu kapilárnu sieť a odpoveď CAM na angiogénne stimuly je relatívne rýchla (väčšina testov vyžaduje iba 3 až 5 dní). CAM test sa stal najpoužívanejším testom pre angiogénny výskum a bežne sa používa na *in vivo* štúdium angiogenézy aj antiangiogenézy v reakcii na rôzne faktory. Štandardný pôvodný postup zahŕňa aplikovanie testovaného materiálu na vyvíjajúcu sa CAM cez okienko vyrezané vo vaječnej škrupine (*in ovo* model CAM). Pri tomto prístupe sa oplodnené slepačie vajcia umiestnia do inkubátora a sú udržiavané pri konštantnej vlhkosti pri 37, 5 °C v horizontálnej polohe. Na 3. embryonálny deň (ED) sa v škrupine vystrihne okno a odsaje sa bielko (3-4 mL). Okno sa potom uzavrie prelepením a inkubácia pokračuje až do dňa experimentu (zvyčajne 7. – 8. ED). Tkanivové štepy sa umiestnia na CAM cez obdĺžnikové okienko, zatiaľ čo testované zlúčeniny sa môžu pripraviť ako pelety polyméru s pomalým uvoľňovaním alebo vysušené vzduchom na plastových krycích sklíčkach a implantované do CAM. Angiogénna odpoveď nastáva 72–96 hodín po stimulácii. Za dôkaz neoangiogenézy sa považuje radiálne usporiadanie krvných ciev, ktoré sa zbiehajú smerom k angiogénnemu stimulu/šepu ako náboju alebo zreteľný nárast ciev okolo šepu. Naopak, keď sa testuje angiostatická zlúčenina, cievy sa okolo implantátu stanú menej hustými a nakoniec zmiznú. Test CAM zachováva fyziologické prostredie a predstavuje základ pri štúdiu toxicity liekov, rastu nádorov, hojenia rán a angiogenézy (1).

Modifikovaný CAM test ako ďalší spôsob testovania angiogénneho materiálu na CAM zahŕňa použitie embryí bez škrupiny inkubovaných *ex ovo* metódou, pri ktorej je celý obsah oplodneného vajca umiestnený do Petriho miske. Po prenesení do Petriho misky sa CAM vyvinie na povrchu žĺtkového vaku, a vytvorí dvojrozmernú monovrstvu, čím je celý orgán dostupný pre pozorovanie. Keďže pri tomto prístupe je dostupný celý povrch CAM, tak je možné na ňu umiestniť viacero šepov a zhotoviť fotografie na dokumentáciu vaskulárnych zmien v priebehu času. Pomocou metódy *ex ovo* bola reakcia tkaniva na štandardné biomateriály (ako je nylon a silastic) hodnotená do 21 dní a bolo preukázané, že tento prístup by mohol byť alternatívou k tradičným modelom cicavcov a mohol by byť užitočný pri

skríningu a vývoj nových biomateriálov a implantátov (4). Napriek týmto výhodám kultivácie *ex ovo* v porovnaní s *in ovo* sú drahšie a prežítateľnosť embryí je nižšia (dochádza k 50 % mortalite v prvých 3 dňoch).

### **CAM test a tkanivové inžinierstvo**

CAM test sa používa už dlho *in vivo* angiogénne štúdie a predstavuje užitočný nástroj na hodnotenie *in vivo* vlastností konštruktov vytvorených tkanivom. Okrem toho miera úmrtnosti kuracích embryí a neprítomnosť/prítomnosť zápalovej reakcie v mieste implantátu sa ukázali ako spôsoby hodnotenia biokompatibility štetu alebo uvoľňovania škodlivých látok zo štetu.

Pomocou *in ovo* CAM modelu sa analyzovali účinky rôznych materiálov na angiogénu a tvorbu zápalového tkaniva (používané alebo určené na použitie ako dočasné alebo trvalé implantáty). Skúmaním hladkých polymérov (ako sú polyvinylchloridy a polyuretány) a drsných materiálov (ako je kolagénová/elastínová membrána a filtračný papier) bolo preukázané, že materiály s hladkým povrchom majú zrejme antiangiogénny účinok, zatiaľ čo drsné materiály vyvolávajú angiogénnu odpoveď. Okrem toho symetrická architektúra filtračného papiera (používaného ako experimentálny nosičový materiál) vyvolala nižšiu zápalovú reakciu a homogénnejšiu distribúciu infiltrujúcich buniek. Nakoniec sa ukázalo, že kladne nabitý povrch je zodpovedný za antiangiogénny účinok, zatiaľ čo kyslé zložky materiálu vyvolali nižší inhibičný účinok na rast kapilár (9). Tieto údaje naznačujú, že fyzikálne vlastnosti a chemické zloženie materiálu matrice by mohli ovplyvniť *in vivo* tkanivovú odozvu aplikovaných štetov. Potvrdilo sa tiež, že štruktúra materiálu (ako je pórovitosť, hladkosť a geometria) silne ovplyvňuje implantáciu vzorky do okolitých tkanív (8).

Kombináciou testu CAM s analýzou obrazu Oates a kol. (5) potvrdili ako môžu špecifické vlastnosti materiálu (ako je pórovitosť) ovplyvniť reakciu tkaniva *in vivo*. Ukázali, že zmeny v pórovitosti (veľkosť pórov v rozmedzí od 125 do 212  $\mu\text{m}$ ) ovplyvňujú nielen vnútorný angiogénny potenciál skeletu, ale zohrávajú kľúčovú úlohu aj pri aktivácii imunitnej odpovede hostiteľa s následkom zvýšených zápalových procesov. Otvorenejšia štruktúra pórov je lepšia pre tkanivovú inváziu a rast a výsledkom je, že nevyvoláva angiogénnu alebo výraznú zápalovú odpoveď (5). Modifikované matrice s väčšími pórami, nižšou rýchlosťou degradácie a pevnejšou štruktúrou ukázali výrazne väčší angiogénny potenciál vzhľadom na nemodifikované matrice. Zistenia naznačujú, že štruktúralne modifikácie vyvolané chemickým spracovaním, podstatne prispievajú k angiogénnym (a regeneračným) vlastnostiam kolagénových matric (3).

## Záver

CAM test je jedným z najpoužívanějších *in vivo* testov na sledovanie a posúdenie angiogenézy. CAM prístup sa úspešne používa ako skriningový test na biologickú odpoveď tkaniva na biomateriály, hlavne ako alternatíva k tradičným zvieracím modelom. V skutočnosti umožňuje rýchle, jednoduché a lacné skriningové hodnotenie reakcií tkanív na biomateriály. Výsledkom tohto modelu je skutočný *in vivo* systém, ktorý možno použiť ako medzistupeň medzi bunkovou kultúrou a komplexnejším cicavčím modelom. Získané výsledky naznačujú, že metóda CAM by sa mohla stať integrálnou súčasťou testovacieho procesu pre vývoj potenciálnych biomateriálov. Aj keď rozdiely medzi biológiou vtákov a cicavcov spochybňujú vhodnosť vyvodzovania záverov pre model cicavcov na základe výsledkov z CAM. Doteraz získané výsledky však naznačujú, že CAM test možno použiť ako predbežný skriningový test pred *in vivo* štúdiami na zvieratách, aby sa určilo, či je matrica schopná vyvolať nepriaznivú reakciu, a aby sa zväžilo budúce zlepšenie existujúcich materiálov pre tkanivové inžinierstvo.

## Literatúra

1. Baiguera S, Macchiarini P, Ribatti D (2012) Chorioallantoic membrane for *in vivo* investigation of tissue engineered construct biocompatibility. *J Biomed Mater Res Part B* 100B: 1425-1434
2. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936
3. Haag J, Baiguera S, Jungebluth P, Barale D, Del Gaudio C, Castiglione F, Bianco A, Comin CE, Ribatti D, Macchiarini P (2012) Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. *Biomaterials* 33: 780-789
4. Klueh U, Dorsky DI, Moussy F, Kreutzer DL (2003) Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel model for evaluation of tissue responses to biomaterials and implants. *J Biomed Mater Res A* 67: 838-843.
5. Oates M, Chen R, Duncan M, Hunt JA (2007) The angiogenic potential of three-dimensional open porous synthetic matrix materials. *Biomaterials* 28: 3679-3686
6. Schoen FJ, Anderson JM. Host response to biomaterials and their evolution. In: BD Ratner, FJ Schoen, JE Lemons, editors. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2004. 29-296
7. Staton CA, Reed MW, Brown NJ (2009) A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 90: 195-221
8. Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F (2002) The chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 62: 273-282
9. Zwadlo-Klarwasser G, Gorklitz K, Hafemann B, Klee D, Klosterhalfen B (2001) The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 12: 195-199

Táto práca bola podporená grantovou agentúrou *VEGA 1/0373/24* a *APVV-20-0073*.

# DETEKCIA SUPEROXIDDIZMUTÁZ V PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH POTKANA

## SUPEROXIDE DISMUTASES DETECTION IN RAT PREIMPLANTATION EMBRYOS

**Jozef Mihalik**<sup>1</sup>, Darina Petrášová<sup>2</sup>, Ingrid Hodorová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav anatómie Lekárskej fakulty UPJŠ, Šrobárova 2, Košice

<sup>2</sup>Laboratórium výskumných biomodelov, Tr. SNP 1, Košice

*jozef.mihalik@upjs.sk*

### Súhrn

V našej práci sme pozorovali výskyt enzýmov skupiny superoxiddizmutáz (SOD) v skorých fázach vývinu potkana fluorescenčnou metódou. Zistili sme, že všetky sledované SOD enzýmy sú prítomné s rôznou intenzitou od oocytu až po blastocystu, čo svedčí o ich veľkom význame pri ochrane nového jedinca pred oxidačným stresom.

**Kľúčové slová:** SOD, oocyt, zygota

### Summary

In our work, we observed the occurrence of superoxide dismutase (SOD) enzymes in the early stages of rat development using the fluorescence method. We found that all monitored SOD enzymes are present with varying intensity from oocyte to blastocyst, which indicates their great importance in protecting of the new individual against oxidative stress.

**Key words:** SOD, oocyte, zygote

### Úvod

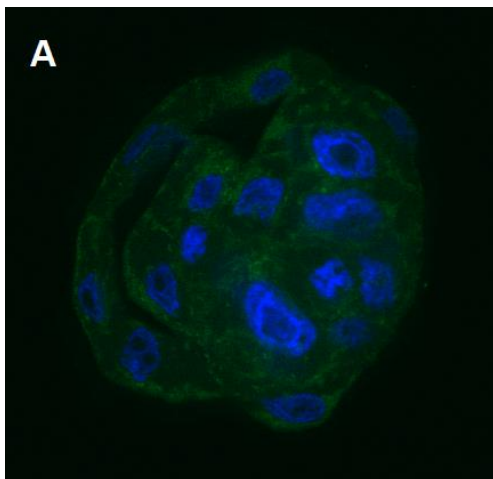
Rodina superoxiddizmutáz (SOD) pozostáva u cicavcov z troch zástupcov (SOD1, SOD2, SOD3) a zo šaperónu SOD4/CCS. Jednotlivé enzýmy sú v bunke lokalizované v cytoplazme (SOD1), v mitochondriách (SOD2), na povrchu cytoplazmatickej membrány (SOD3) alebo v jadre a cytosóle (SOD4/CCS). Enzýmy SOD transformujú toxický superoxidový radikál na kyslík a menej toxický peroxid vodíka, ktorý je ďalej degradovaný inými enzýmami. Cieľom práce bolo zmapovať možný výskyt SOD v dôležitých fázach preimplantačného vývinu.

## Materiál a metódy

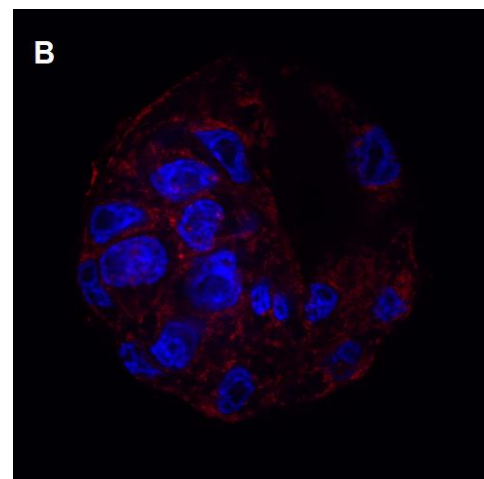
Pohlavne dospelé samice potkana kmeňa Sprague-Dawley boli pripustené so samcami rovnakého kmeňa. Prítomnosť vaginálnej zátky bola dôkazom úspešného párenia. Samice boli usmrtené letálnou dávkou anestetika na prvý (D1) tretí (D3) a piaty deň gravidity (D5). Výplachom vajčkovodov alebo rohov maternice sme izolovali oocyty a zygoty (na D1), štvorbunkové embryá (na D3) a blastocysty (na D5). Embryá boli fixované v 1% paraformaldehyde a permeabilizované v 0,5% TRITON X-100. Jednotlivé superoxidizmutázy boli zafarbené s nasledovnými protilátkami riedenými 1:100: anti-SOD1 (#bs-10216R-A488, Bioss, USA), anti-SOD2 (#bs-1080R-Cy3, Bioss, USA), anti-SOD3 (#MBS9440006, MyBioSource, USA), anti-SOD4/CCs (#MBS2044776, mMyBioSource, USA). Jadrá buniek boli dofarbené s DAPI (4', 6-diamidino-2-fenylindol) a embryá boli pozorované pod konfokálnym mikroskopom.

## Výsledky

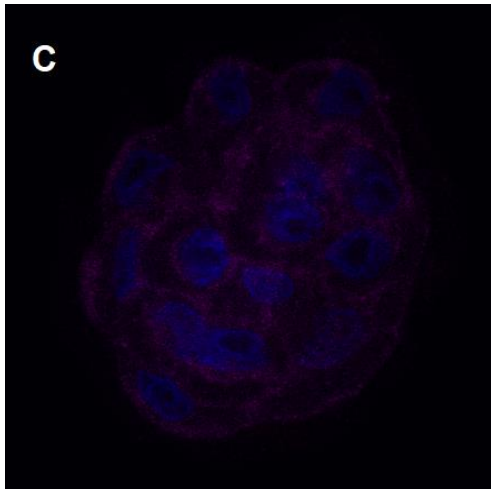
Všetky skúmané enzýmy boli prítomné počas preimplantačnej fázy gravidity od neoplozeného vajíčka až po blastocystu ale nikdy nie v jadrách. SOD1 bola pozorovaná difúzne v cytoplazme (Obr. 1A), SOD2 vytvárala v cytoplazme zhľuky (Obr. 1B), SOD3 sme pozorovali v cytoplamatických membránach (Obr. 1C) a SOD4/CCS sa vyskytoval predovšetkým perinukleárne vo forme granúl (Obr. 1D).



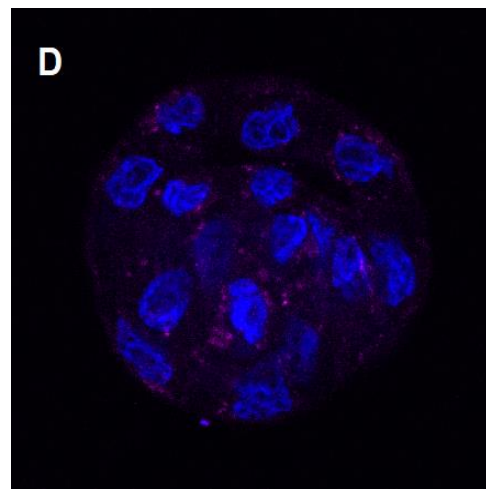
Obr. 1



Obr. 2



**Obr. 3**



**Obr. 4**

**Detekcia SOD v blastocystách potkana.** SOD1 (A) zobrazená zelenou farbou (AF488), SOD2 (B) červenou farbou (Cy3), SOD3 (C) purpurovou (AF647), rovnako ako SOD4/CCS (APC). Jadrá buniek znázornené modrou farbou (DAPI).

## Diskusia

SOD1 je jeden z najčastejšie sa vyskytujúcich antioxidantných enzýmov v bunkách eukaryotov. Ako kofaktor používa meď a zinok, preto pri ich nedostatku klesá jeho aktivita. Kvôli absencii voľnej medi v cytosóle je SOD1 závislý od svojho šaperónu SOD4/CCS. Pri SOD1 sme pozorovali jasnú a intenzívnu fluorescenciu v celej cytoplazme a to vo všetkých sledovaných fázach vývinu embrya. Na druhej strane, prekvapením pre nás bola iba nízka intenzita fluorescencie u SOD4/CCS, najlepšie viditeľná v štádiu blastocysty, perinukleárne v malých granulách. SOD2 je lokalizovaná v mitochondriách, pravdepodobne preto sme ju pozorovali v početných zhlukoch, najlepšie viditeľných v štvorbunkovom embryu a v blastocyste. Fluorescencia u SOD3 bola menej intenzívna než u SOD1 alebo SOD2 a najlepšie bola viditeľná v blastocystách na povrchu jednotlivých bunkových membrán.

## Záver

To, že všetci členovia z rodiny superoxidizmutáz sa vyskytujú v skorom embryu počas celej preimplantačnej fázy gravidity svedčí o ich veľkom význame v ochrane nového jedinca pred oxidačným stresom.



## Literatúra

1. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R (2008) Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*, 10(8), 1375-1403. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1964>
2. Aitken RJ (2020) Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction (Cambridge, England)*, 159(4), R189-R201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>
3. Kaltsas A, Zikopoulos A, Moustakli E, Zachariou A, Tsirka G, Tsiampali C, Palapela N, Sofikitis N, Dimitriadis F (2023). The Silent Threat to Women's Fertility: Uncovering the Devastating Effects of Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1490. <https://doi.org/10.3390/antiox12081490>
4. Krehelova A, Kovarikova V, Fabian D, Solar P, Curgali K, Neratzakis I, Hodorova I, Mihalik J (2024). Glutathione peroxidase 1 and 2 during preimplantation period of pregnancy in mouse. *Bratislavske lekarske listy*, 125(1), 64-74. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2024\\_011](https://doi.org/10.4149/BLL_2024_011)
5. Krehel'ová A, Kovaříková V, Domoráková I, Solár P, Pastornická A, Pavliuk-Karachevtseva A, Rybárová S, Hodorová I, Mihalik J (2021). Characterization of Glutathione Peroxidase 4 in Rat Oocytes, Preimplantation Embryos, and Selected Maternal Tissues during Early Development and Implantation. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5174. <https://doi.org/10.3390/ijms22105174>
6. Mihalik J, Krehel'ová A, Kovaříková V, Solár P, Domoráková I, Pavliuk-Karachevtseva A, Hladová A, Rybárová S, Hodorová I (2020). GPx8 Expression in Rat Oocytes, Embryos, and Female Genital Organs During Preimplantation Period of Pregnancy. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6313. <https://doi.org/10.3390/ijms21176313>
7. Zaha I, Muresan M, Tulcan C, Huniadi A, Naghi P, Sandor M, Tripon R, Gaspar C, Klaudia-Melinda M, Sachelarie L, Stefan L (2023) The Role of Oxidative Stress in Infertility. *Journal of personalized medicine*, 13(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/jpm13081264>

# DEZINFEKCIA VAJEČNEJ ŠKRUPINY A JEJ VPLYV NA VÝVIN EMBRYA

## EGG SHELL DISINFECTION AND ITS EFFECT ON EMBRYO DEVELOPMENT

Eva Petrovová<sup>1</sup>, Zuzana Demčišáková<sup>1</sup>, Júlia Hurníková<sup>1</sup>, Lenka Luptáková<sup>2</sup>,  
Beatrix Kazsmerová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 68, Košice

<sup>2</sup> Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 68, Košice

*eva.petrovova@uvlf.sk*

### Súhrn

Dezinfekcia vaječnej škrupiny a vhodnosť prípravkov určených na jej dezinfekciu je náročná, rovnako aj spôsob čistenia. Na preskúmanie funkčnosti dezinfekcie vaječnej škrupiny a vplyvu použitého prípravku (70% etanol, 1,5% peroxid vodíka, UV-C žiarenie, Betadine, roztok AgNO<sub>3</sub> s extraktom rastliny *Stachys recta* L.) na vývin embrya sme použili kuracie násadové vajcia. Sledovali sme výskyt malformácií, prežívateľnosť a hmotnosť embrya ako aj hmotnosti vybraných orgánov (srdce a pečeň). Bola pozorovaná 5 % mortalita pri aplikácii roztoku AgNO<sub>3</sub> s extraktom rastliny *Stachys recta* L., 6 % mortalita pri aplikácii 1,5 % peroxidu vodíka a UV-C žiarenia. Ďalej bolo zistené 17 % riziko vzniku malformácií pri 1,5 % peroxidu vodíka, 23 % riziko vzniku pečňových deformít pri aplikácii komerčného prípravku Betadine. Žiadna z použitých látok nemala negatívny vplyv na vývin srdca. Z našej analýzy vyplýva, že najvhodnejšia metóda ošetrenia je expozícia UV-C žiarenia a použitie roztoku AgNO<sub>3</sub> s extraktom rastliny *Stachys recta* L.

**Kľúčové slová:** dezinfekcia, kuracie embryo, vaječná škrupina, malformácie

### Summary

Disinfecting the eggshell and the suitability of the preparations intended for its disinfection is difficult, as is the method of cleaning. To examine the functionality of eggshell disinfection and the effect of the used preparation (70% ethanol, 1.5% hydrogen peroxide, UV-C radiation, Betadine, AgNO<sub>3</sub> solution with *Stachys recta* L. plant extract) on embryo development, we

used chicken hatching eggs. We monitored the incidence of malformations, survivability, and weight of the embryo as well as the weight of selected organs (heart and liver). Mortality (5%) was observed when applying AgNO<sub>3</sub> solution with *Stachys recta* L. plant extract, 6% mortality when applying 1.5% hydrogen peroxide and UV-C radiation. Furthermore, a 17% risk of malformations was found at 1.5% hydrogen peroxide, 23% risk of liver deformities when applying the commercial preparation Betadine. None of the substances used had a negative effect on heart development. Our analysis showed that the most suitable treatment method is exposure to UV-C radiation and the use of AgNO<sub>3</sub> solution with *Stachys recta* L plant extract.

**Key words:** alternative models, viral vectors, gene therapy

## Úvod

Na vaječných škrupinách sa nachádzajú stovky až milióny baktérií. Kontaminácia môže spôsobiť zlé liahnivosť a zníženú úžitkovosť kurčiat. Zníženie mikrobiálnej kontaminácie môže znížiť bakteriálnu infekciu vo vyvíjajúcich sa embryách, preto sú účinné čistiace a dezinfekčné programy základom v hydinárskom priemysle. Eliminuje sa nutnosť použitia antibiotík, čo predstavuje jednu z najväčších výziev biologickej bezpečnosti pre priemysel.

Potreba dezinfekcie oplodnených vajíčok sa podľa Baileho a kol. (1) uznáva od roku 1908, kedy k odstraňovaniu mikróbov dochádzalo používaním formaldehydu. V roku 1991 Úrad pre bezpečnosť a ochranu zdravia vykonal niekoľko štúdií, na základe ktorých navrhol používanie iných účinných, bezpečnejších dezinfekčných prostriedkov šetrných k životnému prostrediu a s minimálnou hrozbou pre ľudské zdravie (2).

Mikrobióm vaječnej škrupiny sa vyjadruje počtom jednotiek tvoriacich kolónie – colony forming units (cfu), pričom použitím dezinficiencií sa bakteriálna záťaž zníži z 10<sup>4</sup> až 10<sup>5</sup> cfu až na 10 cfu (3). V minulosti sa hodnotenie účinnosti rôznych dezinfekčných postupov obmedzovalo len na aeróbne mikroorganizmy, pričom v súčasnosti sa zohľadňuje celkový mikrobióm. V mikrobióme sú najviac zastúpené kmene Firmicutes, Bacteroidetes a Proteobacteria.

Najväčšiu hrozbu pre človeka predstavuje rod *Salmonella* z čeľade Enterobacteriaceae, ktorá nemá žiadne náročné podmienky pre existenciu a rozmnožovanie. Salmonelóza sa prejavuje silnými vodnatými hnačkami, bolesťami brucha, zvracaním, horúčkou a prítomné sú i kŕče brucha. Najväčšími komplikáciami sú následky dehydratácie (4).

Využitie kuracieho embrya je v súčasnosti veľmi obľúbeným alternatívnym modelom v oblasti výskumu a preto je dôležité zabezpečiť správne technické a metodické postupy pri inkubácii

oplodnených vajec. Je potrebné dbať na to, aby sme mali k dispozícii čo najviac zdravých embryí pre vykonanie experimentu a mali tak možnosť zhodnotiť závery. Preto je kľúčovým momentom spôsob dezinfekcie vaječnej škrupiny a následné vplyvy chemických činidiel na vývin embrya.

## **Materiál a metódy**

Vaječné škrupiny boli ošetrené činidlami otretím celej plochy vaječnej škrupiny, pričom pôsobeniu chemického činidla boli vystavené iba po dobu otretia. Takto boli vaječné škrupiny ošetrené sterilnou destilovanou vodou (kontrolná skupina), 70 % etanolom, 1,5 % roztokom peroxidom vodíka, jódovaným povidónom Betadine a pripravenými nanočasticami striebra s extraktom rastliny čistca rovného. Vaječná škrupina bola tiež ošetrená UV-C žiarením po dobu 15 minút pri vlnovej dĺžke 253,7 nm, ozone free, 18 mW/cm<sup>2</sup>/sek v DNA/RNA UV-Cleaner Boxe. V experimente bolo použitých 104 násadových kuracích vajec plemena Lohmann brown z certifikovaného chovu Liaharenský podnik Nitra, a.s. Slovensko. Vajcia boli inkubované za štandardných podmienok pri teplote 37,5°C ± 0,5°C a pri relatívnej vlhkosti 60 %.

Po 72. hodinách od začiatku inkubácie (3. embryonálny deň) boli vajcia z liahne vybrané za účelom odsatia 2 ml albumínu. Následne, vajcia boli ďalej inkubované. Na 9. embryonálny deň sme vykonali odber embryí. Embryá boli odvážené, sledovali sa malformácie a následne boli odobrané orgány srdce a pečeň použitím mikroskopu Olympus SZ61 (Olympus, Tokyo, Japonsko) s digitálnou kamerou PROMICRA (PROMICAM 3-3CP, softvér QuickPHOTO MICRO 3.2, Praha, Česká republika). Štatistická analýza bola vykonaná štatistickým programom GraphPad Prism 9.5 pomocou jednocestného ANOVA testu s Dunnettovým viacnásobným porovnávaním. Hladina významnosti bola stanovená na  $p \leq 0,05$ .

## **Výsledky**

Priemerná hmotnosť embrya po použití sterinej destilovanej vody bola 1,371 g, priemerná hmotnosť srdca bola 17 mg a priemerná hmotnosť pečene bola 21 mg. V tejto skupine sme nezaznamenali žiadne malformačné zmeny na embryách. Vajcia ošetrené sterilnou destilovanou vodou boli použité ako kontrolná skupina. Po aplikácii 70 % etanolu bola priemerná hmotnosť embrya 1,454 g, srdca 18 mg a pečene 27 mg. V tejto skupine sme zaznamenali výrazné morfológické zmeny ako nevyvinuté oči a zobáky embryí, rastovú retardáciu embrya, zrastené embryo bez vyvinutých očí – anoftalmia, resp. s jedným vyvinutým okom - monoftalmia. V skupine, ktorá bola ošetrená UV-C žiarením, bola priemerná prežívateľnosť 94 %. Priemerná

hmotnosť embrya bola 1,553 g, srdca 20 mg a pečene 25 mg. Zaznamenali sme najvyššiu hmotnosť embrya zo všetkých skupín, a to 2,033 g. Embryá, ako aj jednotlivé orgány boli už na prvý pohľad väčšie a vyvinutejšie v porovnaní s inými skupinami. V skupine s použitím 1,5% peroxidu vodíka bola priemerná hmotnosť embrya 1,506 g, hmotnosť srdca 19 mg a hmotnosť pečene 26 mg. V skupine sme pozorovali malformačné zmeny – krvácaniny, zrastené embryá, rastovú retardáciu a uloženie orgánov mimo telovej dutiny. Telová dutina bola veľmi mäkká, pri manipulácii sa telá embryí trhali a rozpadávali. V skupine ošetrenej Betadinom bola priemerná hmotnosť embrya 1,607 g, hmotnosť srdca 19 mg a pečene 29 mg. Zaznamenali sme viacero malformačných zmien, orgány boli uložené mimo telovej dutiny embrya (otvorená telová dutina), pečeň a srdce boli neformované, v dvoch prípadoch dokonca chýbal lalok pečene. Zistili sme, že jódovaný povidón nepriaznivo vplýval na pečeň vyvíjajúcich sa embryí, aj keď bola v priemere zo všetkých skupín najväčšia.

V skupine ošetrenej nanočasticami striebra v kombinácii s extraktom rastliny *Stachys recta* L. bola zaznamenaná prežívateľnosť 95 %. Priemerná hmotnosť embrya bola 1,692 g, hmotnosť srdca bola 22 mg a hmotnosť pečene 31 mg.

## Diskusia

V štúdií Bomfirm a kol. (5) sa uvádza, že pri expozícii vaječnej škrupiny etanolom po dobu 30 sekúnd nie sú pozorované žiadne rozdiely v životaschopnosti embryí, pri časovom odstupe 5 minút vedú k zníženiu životaschopnosti embryí až o 20 %. Turtoi a Borda (6) uvádzajú, že inaktivácia buniek UV-C žiarením je založená na poškodení nukleových kyselín DNA a RNA. Spôsobuje rozbitie niektorých väzieb a tvorbu pyrimidínových dimérov, ktoré zabraňujú replikácii buniek. Mikroorganizmy tak strácajú schopnosť sa množiť, sú však nažive. Táto vlastnosť UV-C žiarenia odlišuje túto metódu od iných foriem dekontaminácie, kde hrozí riziko zadržiavania činidiel na škrupinách, resp. ich prenikanie do obsahu vajec. To potencionálne môže spôsobiť toxicitu v prípade ľudskej konzumácie. Táto štúdia uvádza, že práve UV-C žiarenie by malo byť stále viac a viac preferované a používané pri výskume a spracovaní. Štúdia týkajúca sa aplikácie peroxidu vodíka ako prostriedku na dezinfekciu stanovuje minimálnu koncentráciu účinného roztoku peroxidu vodíka na 5 %. Táto štúdia Sheldona a kol. (7) však nezaznamenala žiadny významný rozdiel v liahnivosti. Motola a kol. (8) uviedol ošetrovanie peroxidom vodíka za splňajúci kritériá úspešnej dezinfekcie. Účinnosť dezinfekcie peroxidom vodíka stanovil na 90-100%. Hasani v štúdií z roku 2021 (9) opisuje, že najsilnejšiu antimikrobiálnu schopnosť má roztok koncentrácie 3 % peroxidu vodíka, zároveň však

pripúšťa, že vysoké koncentrácie roztoku môžu vykazovať nepriaznivé účinky na vaječné škrupiny.

Štúdia Sylte a kol. (10) udáva Betadine ako prídavnú látku na dezinfekciu, avšak s dobrými výsledkami pre ošetrovanie vaječnej škrupiny. Jeho použitie spôsobilo minimálnu embryotoxicitu, čo dokazuje jeho bezpečné použitie. V štúdiu uvádza, že roztokom Betadine sa mu podarilo znížiť počet baktérií, nie však ich elimináciu. Pripisuje roztoku Betadine i antifungálne vlastnosti. Štúdia Grodzik a kol. (11) sledovala vplyv nanočastíc striebra na vývoj kuracieho embrya. Nanočastice boli injikované do oplodnených kuracích vajec na 5., 11., a 17. embryonálny deň. Autori uvádzajú, že embryá v porovnaní s kontrolnou skupinou boli väčšie (2 %). Zároveň nanočastice koloidného striebra neovplyvnili zdravý vývin kuracieho embrya, teda nesledovali žiadne malformačné zmeny.

## Záver

Bola pozorovaná 5 % mortalita pri aplikácii roztoku AgNO<sub>3</sub> s extraktom rastliny *Stachys recta* L., 6 % mortalita pri aplikácii 1,5 % peroxidu vodíka a UV-C žiarenia. Ďalej bolo zistené 17 % riziko vzniku malformácií pri 1,5 % peroxidu vodíka, 23 % riziko vzniku pečenevých deformít pri aplikácii komerčného prípravku Betadine. Žiadna z použitých látok nemala negatívny vplyv na vývin srdca. Z našej analýzy vyplýva, že najvhodnejšia metóda ošetrovania je expozícia UV-C žiarenia a použitie roztoku AgNO<sub>3</sub> s extraktom rastliny *Stachys recta* L. Zistené informácie môžu byť užitočné pre rozmnožovacie chovy, chovateľa, ako aj pre vedecké tímy pracujúce s vtáčimi embryami. Zároveň chovateľ môže správnym ošetrovaním vaječnej škrupiny predísť tomu, aby sa z chovu dostalo infikované vajce, ktoré by mohlo byť zdrojom prenosu nákaz.

## Literatúra

1. Bailey JS, Cox NA, Berrang ME (2001) Bactericidal treatment of hatching eggs III: Effect of organic contaminants on efficacy of egg sanitizers. *Journal of Applied Poultry Research* 10: 117-120
2. Melo EF, Climaco WLS, Triginelli MV, Vaz DP, de Souza MR, Baião NC, Pompeu MA, Lara LJC (2019) An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs. *Poultry Science* 98: 2466-2473
3. Olsen R, Kudirkiene E, Thøfner I, Pors S, Karlskov-Mortensen P, Li L, Papisolomontos S, Angastiniotou C, Christensen J (2017) Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poultry Science* 96: 3901-3911
4. Horáková P (2019) Salmonella - prevencia, príznaky, liečba. internet: <<https://www.mojalekaren.sk/clanok/salmonela/>>.
5. Bomfirm L, Vieira P, Fonseca A, Ramos I (2017) Eggshell ultrastructure and delivery of pharmacological inhibitors to the early embryo of *R. prolixus* by ethanol permeabilization of the extraembryonic layers. *PLOS ONE* 12: 9
6. Turtoi M, Borda D (2014) Decontamination of egg shells using ultraviolet light treatment. *World's Poultry Science Journal* 70: 265-278
7. Sheldon BW, Brake J (1991) Hydrogen Peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. *Poultry Science* 70: 1092-1098

8. Motola G, Hafez HM, Brüggemann-Schwarze S (2020) Efficacy of six disinfection methods against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* on eggshells in vitro. *PLOS ONE* 15(9): e0238860
9. Hasani NR (2021) Treatment of egg shells with Hydrogen Peroxide and Sodium Carbonate as a disinfectant with bactericidal effect to eliminate *Salmonella enteritidis*. *The Eurasia Proceedings of Science, Technology, Engineering & Mathematics (EPSTEM)*. 12: 1-6.
10. Sylte MJ, Chandra LC, Looft T (2017) Evaluation of disinfectants and antiseptics to eliminate bacteria from the surface of turkey eggs and hatch gnotobiotic poults. *Poultry Science* 96: 2412-2420
11. Grodzik M, Sawosz E (2006) The influence of silver nanoparticles on chicken embryo development and bursa of Fabricius morphology. *J Anim Feed Sci* 15(Suppl. 1): 111-114

Táto práca bola podporená projektom *APVV-20-0073* a *VEGA 1/0074/24*.

# ***EX OVO A IN OVO KULTIVÁCIA VTÁČÍCH EMBRYÍ***

## ***EX OVO AND IN OVO CULTIVATION OF AVIAN EMBRYOS***

**Bronislava Pokorná**, Slavomíra Štefancová, Lenka Luptáková

Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 68/73, Košice

*bronislava.pokorna@gmail.com*

### **Súhrn**

Vtáacie embryá predstavujú vynikajúci model na pozorovanie skorého embryonálneho vývoja v podmienkach *ex utero*. Väčšina štúdií používa techniku vo vaječnej škrupine (*in ovo*), ale niektoré štúdie sledujú vývoj vtáčieho embrya mimo prirodzenej vaječnej škrupiny (*ex ovo*), napr. pri vývoji umelých krvných ciev alebo pri genetických manipuláciách. Každá metóda má však určité obmedzenia, ktoré v konečnom dôsledku ovplyvňujú výsledky experimentálnej práce.

**Kľúčové slová:** *in ovo kultivácia, ex ovo kultivácia, vtáacie embryo*

### **Summary**

Avian embryos represent an excellent model for observing the early development of embryos under *ex utero* conditions. Most studies use the technique in the eggshell (*in ovo*), but some studies follow the development of the bird embryo outside the natural eggshell (*ex ovo*), e.g., in the development of artificial blood vessels or for genetic manipulations. However, each method has some limitations that ultimately affect the results of experimental work.

**Key words:** *in ovo cultivation, ex ovo cultivation, avian embryo*

### **Úvod**

Zvieracie modely zohrávajú kľúčovú úlohu v základnom a medicínskom výskume, v oblasti objavovania liekov, regeneračnej medicíny a výskumu rakoviny. Práve použitie vtáčieho embrya ako experimentálneho modelu sa v posledných rokoch stalo atraktívnou alternatívou k *in vivo* testom, vzhľadom na čoraz viac kladený dôraz minimalizácie používania experimentálnych zvierat v akýchkoľvek výskumoch. Hlavné dôvody zvažovania alternatív sú spojené s etickou otázkou, minimalizáciou nákladov, časom, zákonmi a verejnou mienkou (4, 5, 6).



V porovnaní s inými experimentálnymi zvieracími modelmi ako sú myši, vtáacie embryó poskytuje dostatok tkanivového materiálu na analýzu, je sebestačné a vyžaduje iba kontrolu inkubačného systému (12).

### **Inkubácia vtáčích vajec**

Väčšiu časť vývinu vtáčích embryí zaberá vývin po znesení vajca, teda štádium inkubácie. Premena nešpecializovaných buniek na špecifické bunky nastáva počas prvých dvoch dní po znesení vajca, kedy je embryó náchylné na zmeny vonkajšieho prostredia. Práve preto pri inkubácii akýchkoľvek vajec je nevyhnutné dodržiavať ideálnu teplotu, vlhkosť, ventiláciu a pravidelné otáčanie vajec, aby sme zabránili úhynu a rôznym malformáciám embryí (2).

### **Kultivácia *in ovo***

Vtáacie embryá sa využívajú ako v *in ovo* tak aj v *ex ovo* experimentálnych metódach. Väčšina štúdií využíva techniku „windowing“, ktorá umožňuje pozorovanie morfológických zmien po aplikácii chemických látok počas embryonálneho vývinu priamo vo vaječnej škrupine (1). Oplodnené vajčka sú zvyčajne inkubované tri dni s automatickým otáčaním, ktoré zabezpečuje pomalý, ale neustály pohyb vajec. Na tretí deň je vytvorený otvor na tupom konci vajca, ktorý je prekrytý vhodným krycím materiálom. Vajcia sú následne ponechané v inkubátore až do začiatku experimentu bez automatického otáčania. Vďaka vytvoreniu otvoru sa vo vajci mení tlak a bráni rastúcej chorioalantoickej membráne (CAM) spájať sa so škrupinou (7, 8).

*In ovo* kultivácia v porovnaní s *ex ovo* metódou predstavuje pre embryó fyziologické prostredie, preto je častejšie využívaná na dlhšie trvajúce experimenty. Výsledkom je menej vývojových abnormalít a umožnenie prirodzeného vyliahnutia (7). Taktiež pri kultivácii *in ovo* vyvíjajúce embryó netrpí nedostatkom vápnika a experiment, v tomto smere nebude ovplyvnený (9).

Medzi nevýhody tohto prístupu patrí obmedzený prístup a viditeľnosť chorioalantoickej membrány, či samotného embrya (9). Vytvorený otvor musí byť pomerne veľký, aby bolo možné zobrazit' celé embryó (najmä v neskorých štádiách) a taktiež veľké otvory sa ťažko utesňujú, čo môže viesť k problémom so sterilitou a prežívateľnosťou (3).

Možné komplikácie môže spôsobiť samotné vytváranie otvoru do škrupiny, kedy neopatrným zaobchádzaním praskne celá škrupina alebo čiastočky škrupiny vpadnuté na CAM poškodia alebo znemožnia angiogézu. Hoci metóda *in ovo* môže byť ideálna v skorých embryonálnych štádiách, zobrazenie celého embrya v neskorých štádiách je komplikované.

## **Kultivácia *ex ovo***

*Ex ovo* metóda je využívaná v embryológii, genetickej manipulácii, toxikológii, či regeneračnej medicíne (11). Podstatou je odstránenie pôvodnej vaječnej škrupiny s následným presunutím embryí do nových kultivačných nádob podobných vaječnej škrupine na tretí deň inkubácie (7, 10). Odstránením vaječnej škrupiny, technika *ex ovo* umožňuje manipuláciu s vyvíjajúcimi embryami v určitých špecifických štádiách (3).

Tento typ kultivácie umožňuje dokonalú vizualizáciu a v podstate neobmedzený prístup k chorioalantoickej membráne, čo dovoľuje priame sledovanie vplyvu patogénov či testovanie niekoľkých vzoriek na vaskulatúru vyvíjajúceho sa embrya (7, 8). Na druhej strane sledovanie embryonálneho vývoja až do vyliahnutia pomocou *ex ovo* metódy potrebuje najšť optimálnu rovnováhu viacerých faktorov. Ide najmä o potrebu kyslíka, vápnika a vlhkosti vzhľadom na predpokladanú vyššiu mortalitu, kvôli rozsiahlejšiemu vysychaniu embryí alebo väčšiemu riziku infekcie (9), či dramaticky meniacemu sa metabolizmu v rôznych štádiách (10).

*Ex ovo* kultivácia oproti *in ovo* kultivácii má podstatne vyššiu mieru mortality (9). Keďže embryá v novom umelom prostredí nie sú vyživované prirodzene zo škrupiny, deficit vápnika býva častou komplikáciou a aj dôvodom deformácie končatín (10, 11). Ďalšou prekážkou je samotné presúvanie embrya do nového prostredia, ktoré je spájané s nízkou prežívateľnosťou v dôsledku častých ruptúr membrány žĺtka pri jeho vylievaní. Tento faktor dokážeme ovplyvniť zvýšenou opatnosťou počas praskania škrupiny vajíčka a umiestnením embrya do stiesneného zakriveného priestoru namiesto plochej Petriho misky (8).

## **Záver**

*In ovo* a *ex ovo* metódy inkubácie nám umožňujú rôzny prístup a manipuláciu s vtáčimi embryami. V súčasnosti medzi nimi existujú jasné rozdiely v určitých aspektoch ako je napríklad prežívateľnosť. Dosiahnutie nižšej mortality vtáčích embryí v podmienkach *ex ovo*, dokáže znížiť celkový počet násadových vajec potrebných pre experiment a zároveň zvýšiť početnosť skupín v danom experimente. Nežiadúce negatívne vplyvy ovplyvňujúce priebeh obidvoch typov inkubácie vtáčích vajec sú stále predmetom diskusií a výskumov.

## **Literatúra**

1. Andacht T, Hu W, Ivarie R (2004) Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 69(1), 31-34
2. Bellairs R, Osmond M (2005) *Atlas of chick development*. Elsevier

3. Cloney K, Franz-Odenaal TA (2015) Optimized ex-ovo culturing of chick embryos to advanced stages of development. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (95), e52129
4. Davies J (2012) *Replacing animal models: a practical guide to creating and using culture-based biomimetic alternatives*. John Wiley & Sons
5. Doke SK, Dhawale SC (2015) Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223-229
6. Freires IA et al. (2017) Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden? *Pharmaceutical research*, 34, 681-686
7. Kundeková B et al. (2021) Chorioallantoic membrane models of various avian species: Differences and applications. *Biology*, 10(4), 301
8. Nowak-Sliwinska P et al. (2014) The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 17, 779-804
9. Schomann T et al. (2013) Improved method for ex ovo-cultivation of developing chicken embryos for human stem cell xenografts. *Stem cells international*, 2013
10. Sukparangsi W, Thongphakdee A, Intarapat S (2022) Avian embryonic culture: A perspective of in ovo to ex ovo and in vitro studies. *Frontiers in Physiology*, 13, 903491
11. Tahara Y, Obara K (2021) Ex ovo culture system for avian embryos and its application. *The Journal of Poultry Science*, 58 (1), 1-4
12. Zosen D et al. (2021) Chicken embryo as animal model to study drug distribution to the developing brain. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 112, 107105

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore grantovej agentúry *APVV-20-0073*, *KEGA 004UVLF-4/2023* a *VEGA 1/0373/24*.

# LASEROM ASISTOVANÉ CHIRURGICKÉ PREREZÁVANIE ZUBOV S PORUCHOU PREREZÁVANIA

## LASER ASSISTED SURGICAL ERUPTION OF THE CANINE. LASER AUTONOMOUS ERUPTION

**Mirela Rozprávková<sup>1</sup>**, Jana Ohlasová<sup>2</sup>, Květuše Lovásová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav anatómie Lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice

<sup>2</sup>Súkromná zubná ambulancia Ohlasdent, Kalinčiakova 26, Košice

*gonnerill@yahoo.com*

### **Súhrn**

Asistencia laserom je najúspešnejšia u vestibulárne retinovaných očných zubov a palatinálne retinovaných očných zubov v pozícii v alfa uhle. Odporúča sa zhotovenie parodontálneho obväzu alebo dolepenie gombíka pre možnosť aplikácie ortodontickej sily, aby nedošlo k tvorbe granulačného tkaniva. Výhodou je zníženie krvácania v operačnom poli vplyvom laseru, dekontaminácia, stimulácia spontánnej erupcie, elegantný chirurgický zákrok a psychologický pozitívny efekt bez zanechania traumatickej skúsenosti. Low laser stimulácia k autonómnemu spontánnemu prerezávaniu je v súčasnosti predmetom ďalšej štúdie.

### **Summary**

Laser assistance in surgical eruption of canines is most successful in vestibular position of canines and palatine location of the canines in alpha angle. It is recommended to make a periodotal cure or glue a button for the possibility of applying orthodontic force to prevent the formation of granulation tissue. The advantage is the reduction of bleeding in the operating field under the influence of the laser, decontamination, stimulation of spontaneous eruption, elegant surgery and psychological positive effect without leaving a traumatic experience. Low laser stimulation to autonomous spontaneous eruption of canines is currently examined.

### **Úvod**

Čeľusť osifikuje endezmálne ako prvá z kostí lebky, od 6. fetálneho týždňa. Osifikačné jadro sa nachádza na hranici tela a *processus frontalis*, ako aj v *os incisivum* (1, 2). Okrem

perzistencia *sutura incisiva* a rázštepových vrodených vád medzi premaxilou a maxilou sa môže vyskytnúť komunikácia *canalis infraorbitalis* so sinus maxillaris alebo rôzne tvarové variácie *foramen infraorbitale* na *facies anterior maxillae* (3). Retencia očného zuba je anomália, kedy založený zub neprerezal po fyziologickom období určenom na jeho prerezanie (4). Termín je možné použiť, ak by zub ešte fyziologicky mohol prerezať, ale jeho uloženie je anomálne, možnosť prerezania do dutiny ústnej je veľmi nepravdepodobná. Frekvencia v populácii je 1,5 – 2% (5). Väčšina prípadov v literatúre je palatinálna lokalizácia a jednostranná retencia očných zubov (6). Príčiny poruchy prerezávania zubov sú problém v erupčnej dráhe zuba a diskrepancia v zubnom oblúku (7).

## Materiál a metódy

V štúdiu bol použitý zubný laser Fotona Lightwalker, Er:YAG, ktorým bol nasmerovaný lúč do lokality, ktorá bola výsledkom 3D RTG analýzy. Lokalizácia zuba bola porovnaná s vopred pripraveným anatomickým preparátom na vizualizáciu anatomických pomerov pred zákrokom. Bol monitorovaný klinický stav 14 pacientov podľa schémy 1 - 8 - 16 týždeň – 1 - 3 - 6 mesiacov. Situáciu sme zaznamenali fotoaparátom Olympus smart 14 mp, 24 mm a na kontrolnom 3D RTG. Podľa peridotálnej štrbiny bola zväžená aplikácia mechanickej ortodontickej sily na zub.

## Výsledky



**Obr. 1** Situácia *in vivo* po aplikácii laseru na retinovaný očný zub palatinálne v zóne I. a po 3 mesiacoch po aplikácii mechanickej sily elastickou nitkou (8); (Ohlasdent, zubná ambulancia, MDDr. Rozprávková)

Asistencia laserom je najrýchlejšia u vestibulárne retinovaných očných zubov a palatinálne retinovaných očných zubov v zóne I. Výhodou ošetrenia laserom je zníženie krvácania v operačnom poli vplyvom laseru, dekontaminácia, stimulácia spontánnej erupcie, elegantný chirurgický zákrok a psychologický pozitívny efekt bez zanechania traumatickej skúsenosti. Low laser stimulácia k autonómnemu spontánnemu prerezávaniu je v súčasnosti predmetom ďalšej štúdie.

## Diskusia

Chirurgické ošetrenie laserom je najúspešnejšie u vestibulárne retinovaných očných zubov a palatinálne retinovaných očných zubov v alfa uhle alebo zóne I. (9). Bola potvrdená významná signifikantná závislosť medzi dĺžkou liečby a anterioposteriornou pozíciou zuba v horizontálnej rovine. Medzi dĺžkou liečby a vekom pacienta nie je signifikantná závislosť. Medzi a inklináciou očného zuba bola zistená mierna závislosť (5). Liečba sa výrazne predlžuje v prípade retencie očného zuba palatinálne v zóne III (7).



**Obr. 2** Pozícia mesiálne od vertikálnej línie vedenej medzi hrotmi koreňov zubov prvého a druhého rezáka (7)

## Záver

Väčšina prípadov liečených laserom bola palatinálna lokalizácia a jednostranná retencia očného zuba. Dĺžka liečby závisela od pozície vo vzťahu k zóne III, kedy bola náročnejšia a dlhšia. Asistencia laserom je najúspešnejšia u vestibulárne retinovaných očných zubov a palatinálne retinovaných očných zubov v alfa uhle alebo zóne I. Je potrebné dostatočne sprístupniť erupčnú dráhu retinovaného zuba, hlavne odstrániť kostné tkanivo. Výhodou je zníženie krvácania v operačnom poli vplyvom laseru, dekontaminácia, stimulácia spontánnej erupcie, elegantný

chirurgický zákrok a psychologický pozitívny efekt bez zanechania traumatickej skúsenosti. Low laser stimulácia k autonómnemu spontánnemu prerezávaniu je v súčasnosti predmetom ďalšej štúdie.

## Literatúra

1. Andrik P a kol. (1981) Čeľustná ortopédia. Ortodoncia. Učebnica pre lekárske fakulty. 1. vyd. Martin: Osveta, 223 s.
2. Čihák R (2011) Anatomie 1. 3. uprav. a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 552 s.
3. Lovásová K, Kluchová D (2010) Topografická anatomia ťažko prístupných a klinicky významných oblastí hlavy. (Topographical anatomy of hardly accessible and clinically significant areas of head). 1. vyd. Košice – Myslava: Typopress, 184 s.
4. Graber et al. (2012) Orthodontic: Current Principles and Techniques, 5th edition. Philadelphia: Elsevier Mosby, 1104 p.
5. Kamínek M a kol, (2014) Ortodoncie. 1, vyd. Praha: Galén, 279 s.
6. Proffit W et al. (2013) Contemporary Orthodontics. 5th edition. Philadelphia: Elsevier, 768 p.
7. Dubovská I a kol. (2013) Faktory ovplyvňujúce dĺžku ortodontickej liečby, Atestačná práca k špecializačnej skúške. 101 s.
8. Lee JY et al. (2007) Applications of Orthodontic Miniimplants. Edition. Canada: Elsevier, 269 p.
9. Impellizzeri A et al. (2021) Uncovering and Autonomous Eruption of Palatally Impacted Canines, In Dent J Basel, 9(6), 66, PMID: 34207531
10. McSherry et al. (1996) The assessment of and treatment options for the buried maxillary canine, January/February dental update, p. 7-10

**DETEKCIA APOPTOTICKÝCH ZMIEN V BOVINNÝCH  
LYMFOCYTOCH PO KRÁTKODOBEJ EXPOZÍCIÍ MOSPILANU®  
20SP**

**CLINIC DETECTION OF APOPTOTIC CHANGES IN BOVINE  
LYMPHOCYTES AFTER SHORT-TERM EXPOSURE TO MOSPILAN® 20SP**

**Viera Schwarzbacherová, Beáta Holečková, Martina Galdíková, Jana Halušková,  
Jaroslav Bučan, Dagmara Dolníková**  
Katedra biológie a fyziológie UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice  
*viera.schwarzbacherova@uvlf.sk*

**Súhrn**

Acetamiprid je neonicotinoidový insekticíd, ktorý má široké využitie hlavne v poľnohospodárstve na ničenie rôznych škodcov, ale i v domácich oblastiach proti širokému spektru hmyzu. Potenciálnu cytotoxicitu sme hodnotili metódou dvojitého farbenia akrídín oranž/etídium bromid (AO/EtBr) v lymfocytoch periférnej krvi hovädzieho dobytku *in vitro*. Komerčne dostupný prípravok sme testovali v koncentráciách 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 25,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  po dobu 4 h. Analýza výsledkov nezistila štatisticky významné zmeny indukcie apoptózy ani u jedného donora; cytotoxický efekt nebol potvrdený.

**Kľúčové slová:** apoptóza, acetamiprid, cytotoxicita, lymfocyty

**Summary**

Acetamiprid is a neonicotinoid insecticide, which is widely used in agriculture for the destruction of various pests, but also in domestic areas against a wide range of insects. We evaluated the potential cytotoxicity by the acridine orange/ethidium bromide (AO/EtBr) double staining method in bovine peripheral blood lymphocytes *in vitro*. We evaluated the commercially available insecticide formulation in concentrations of 1.5; 3.0; 6.0; 12.0; 25.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for 4 h. Analysis of the results did not detect statistically significant changes in the induction of apoptosis in any donor; the cytotoxic effect was not confirmed.

**Key words:** apoptosis, acetamiprid, cytotoxicity, lymphocytes



## Úvod

Acetamiprid je neonicotinoidový insekticíd, ktorý je najmenej toxický neonicotinoid pre opel'ovače. Súčasne je ako posledný neonicotinoid voľne dostupný; ostatné neonicotinoidey sú v EÚ zakázané. Neonicotinoidey pôsobia na postsynaptické nikotínové receptory pre acetylcholín nachádzajúce sa v CNS hmyzu. Spočiatku stimulujú receptor a spôsobujú depolarizačnú blokádu, ktorá neskôr vedie k smrti v dôsledku paralýzy (5) Neonicotinoidey majú relatívne nízke riziko pre ne cieľové organizmy a životné prostredie, vysokú cieľovú špecifickosť voči hmyzu a univerzálnosť aplikačných metód.

Apoptóza bola charakterizovaná ako typ programovanej bunkovej smrti spojenej s charakteristickými morfológickými a biochemickými zmenami buniek. Detekcia apoptózy zahŕňa najčastejšie metódy súvisiace s membránovými zmenami (detekcia Annexin V, dvojité farbenie AO/EtBr), fragmentáciou DNA (TUNEL test, „DNA ladder test“), cytotoxicitou a bunkovou proliferáciou, mitochondriálnym poškodením (MTT test), imunologickou detekciou (cytochróm c detekcia pomocou Western blotu) a analýzami založenými na mechanizme indukcie apoptózy (detekcia proteínu p53, syntéza opravy DNA) (1). V našej práci sme sa zamerali na vyhodnotenie krátkodobého vplyvu povoleného neonicotinoidového insekticídu Mospilan® 20SP na boviné lymfocyty *in vitro* použitím dvojitého farbenia AO/EtBr.

## Materiál a metódy

Zdravým býčkom (krížence Holsteinského dobytká, 1 rok) bola odobratá celá krv. Lymfocyty sa izolovali pomocou Histopaque-1077, premyli a kultivovali v kultivačnom médiu v koncentrácii  $2 \times 10^5$  na ml pri  $37^\circ \text{C}$  počas 24 h (9). Na posledné 4 h kultivácie bol pridaný do kultivačného média testovaný insekticíd Mospilan® 20SP v koncentráciách 1,5; 3; 6; 12 a  $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  rozpustený vo vode, ktorá slúžila aj ako negatívna kontrola. Po 24 h kultivácii sa lymfocyty dvakrát premyli v PBS, scentrifugovali (3500 ot/min) a sediment obsahujúci bunky sa použil na farbenie. K bunkám bola pridaná zmes akridínovej oranžovej ( $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a etídiumbromidu ( $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) v pomere 1: 1 (3). Sklá boli analyzované pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse vybaveného CCD kamerou a softvérom LUCIA FISH. Analyzovalo sa celkom 100 buniek z troch nezávislých kultúr na koncentráciu. Pre zmeny frekvencie jednotlivých štádií apoptických buniek zistených AO/EtBr farbením bola použitá metóda ANOVA s Dunnettovým aposteriornym testom.

## Výsledky

Výsledky indukcie apoptózy po 4 h expozícii Mospilanu® 20SP u zvierat'a č. 1 sú zobrazené v tab. 1. Zistili sme, že žiadna z koncentrácií štatisticky významne neindukovala apoptózu. Po 4 h expozícii došlo najprv k postupnému zvýšeniu počtu živých buniek ( $1,5$  a  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 72,23 % a 77,75 %); pri vyšších testovaných koncentráciách k postupnému znižovaniu. Frekvencia buniek v štádiu skorej apoptózy dosiahla svoje maximum pri koncentrácii  $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (16,72 %), následne už len klesala. Počet buniek v štádiu neskorkej apoptózy pri prvých dvoch testovaných koncentráciách klesal, ale od koncentracie  $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  začal stúpať a dosiahol svoje maximum pri koncentrácii  $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (22,96 %).

<b>Zviera 1</b>	<b>% buniek</b>		
<b>Koncentrácia (<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Živé <math>\pm</math> SD</b>	<b>Skorá apoptóza <math>\pm</math> SD</b>	<b>Neskorá apoptóza <math>\pm</math> SD</b>
<b>Kontrola</b>	68,66 $\pm$ 4,981	14,00 $\pm$ 4,598	17,34 $\pm$ 5,523
<b>1,5</b>	72,23 $\pm$ 1,067	14,11 $\pm$ 1,93	13,66 $\pm$ 0,8854
<b>3</b>	77,75 $\pm$ 1,096	10,13 $\pm$ 1,742	12,12 $\pm$ 2,086
<b>6</b>	66,85 $\pm$ 8,316	16,72 $\pm$ 6,437	16,43 $\pm$ 2,82
<b>12</b>	62,08 $\pm$ 4,373	14,95 $\pm$ 2,872	22,96 $\pm$ 2,374
<b>25</b>	67,83 $\pm$ 3,173	12,55 $\pm$ 1,759	19,62 $\pm$ 2,996

**Tab. 1** Indukcia apoptózy po 4 h expozícii Mospilanu® 20SP v bovinných lymfocytoch u zvierat'a č.1

<b>Zviera 2</b>	<b>% buniek</b>		
<b>Koncentrácia (<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Živé <math>\pm</math> SD</b>	<b>Skorá apoptóza <math>\pm</math> SD</b>	<b>Neskorá apoptóza <math>\pm</math> SD</b>
<b>Kontrola</b>	63,39 $\pm$ 8,207	10,78 $\pm$ 2,759	25,83 $\pm$ 6,219
<b>1,5</b>	58,81 $\pm$ 7,77	12,90 $\pm$ 4,337	28,29 $\pm$ 4,199
<b>3</b>	56,33 $\pm$ 4,621	15,61 $\pm$ 1,529	28,06 $\pm$ 4,682
<b>6</b>	63,43 $\pm$ 4,661	13,71 $\pm$ 1,442	22,86 $\pm$ 3,347
<b>12</b>	54,38 $\pm$ 3,428	12,08 $\pm$ 3,075	33,54 $\pm$ 2,262
<b>25</b>	54,73 $\pm$ 3,626	12,05 $\pm$ 3,693	33,22 $\pm$ 0,7901

**Tab. 2** Indukcia apoptózy po 4 h expozícii Mospilanu® 20SP v bovinných lymfocytoch u zvierat'a č.2.

Výsledky indukcie apoptózy po 4 h expozícii Mospilanu 20SP u zvierat'a č. 2 sú zobrazené v tab. 2. Nezistili sme štatisticky významne zmenené hodnoty indukcie apoptózy. Po 4 h expozícii došlo k postupnému znižovaniu počtu živých buniek okrem koncentrácie  $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (63,43 %), kedy sa počet živých buniek zvýšil. Frekvencia buniek v štádiu skorej apoptózy dosiahla svoje maximum pri koncentrácii  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (15,61 %), následne už len klesala. Počet buniek v štádiu neskorej apoptózy klesal len pri koncentracií  $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (22,86 %), pri ostatných koncentráciách sme zaznamenali nárast a svoje maximum dosiahol pri koncentracií  $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (33,54 %).

## Diskusia

Apoptóza, programovaná bunková smrť je nevyhnutná na udržanie homeostázy organizmu. Ďalšou funkciou je odstránenie nenávratne poškodených buniek, buniek napadnutých vírusom alebo buniek s mutáciou DNA (11). Farbenie apoptotických buniek fluorescenčnými farbivami, ako je AO/EtBr sa považuje za vhodnú metódu analýzy zmien jadrovej morfológie (8). Farbenie AO/EB na základe jadrovej morfológie (perinukleárna kondenzácia chromatínu, jadrový kolaps a prípadná fragmentácia) nám umožňuje rozlíšiť niekoľko subpopulácií apoptotických buniek. Navyše vzhľad týchto buniek vo svetelnej mikroskopii ako je zaoblenie buniek, povrchové škvvrny a zmrštenie, poskytuje úplný morfológický profil apoptotickej bunky (7).

Vysoká hladina apoptotických buniek bola detegovaná po expozícii viacerým pesticídom, napr. DDT (6), imidaklopridom (4) a mnohým iným.

Výsledky podľa Schwarzbacherová et al. (10) ukazujú, že komerčný prípravok na báze tiaklopridu (neonikotinooidový insekticíd) v testovaných koncentráciách indukoval zmeny životaschopnosti bovinných lymfocytov po 4-hodinovom pôsobení *in vitro*. Pomocou testu Annexin V a TUNEL zistili pokles životaschopnosti buniek (až o 29 % buniek v neskorej apoptóze) a výskyt apoptózy v koncentráciách v rozmedzí od 30 do  $240 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Podobné výsledky získali Calderon-Segura et al. (2), ktorí exponovali ľudské periférne lymfocyty prípravkom Calypso®. Mnoho prác potvrdilo, že expozícia pesticídom môže spôsobiť produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čo má za následok vznik oxidačného stresu. Predpokladá sa, že neonikotinooidy pôsobia na mitochondrie, ktoré sa poškodia a následne produkujú zvýšené množstvo ROS (12).

## Záver

Detekcia apoptózy pomocou dvojitého farbenia AO/EtBr nebola štatisticky významná; zmeny v jednotlivých kategóriách buniek však boli pozorované. Pre potvrdenie resp. vyvrátenie možných cytotoxických účinkov insekticídu je potrebné vykonať ešte ďalšie experimenty.

## Literatúra

1. Banfalvi G (2017) Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* 22: 306-323
2. Calderon-Segura et al. (2012) Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *J Toxicol* 2012: 612647
3. Dworak N, Wnuk M, Zebrowski J et al. (2014) Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes in vitro. *Carbon* 68: 763e776
4. Gregorc A, Ellis DJ (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pest Biochem Physiol* 99: 200-207
5. Liu, MY, Casida, JE (1993) High affinity binding of [3H] Imidakloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pestic Biochem Physiol* 46: 40-46
6. Pérez-Maldonado IN (2004) DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environ Res* 94: 38-46
7. Plasier B, Lloyd DR, Paul GC et al. (1999) Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *J Immunol Methods* 229: 81-95
8. Savitski VP, Shman TV, Potapnev MP (2003) Comparative measurement of spontaneous apoptosis in pediatric acute leukemia by different techniques. *Cytometry*. 56: 16-22
9. Schwarzbacherová V, Wnuk M, Lewinska A et al. (2017) Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango® Super in bovine lymphocytes. *Environ Pol* 220: 255-263
10. Schwarzbacherová V et al. (2019) In vitro exposure to thiacloprid-based insecticide formulation promotes oxidative stress, apoptosis and genetic instability in bovine lymphocytes. *Toxicol In Vitro* 61: 104654
11. Soriano M, Scorrano L (2011) Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell* 145: 15-17
12. Wang X, Anadón A, Wu Q et al. (2018) Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 58: 471-507

Táto práca vznikla vďaka grantovej podpore *VEGA 1/0166/21* a *KEGA 008UVLF-4/2023*.

# STIMULÁCIA ANGIOTENZÍNŮVÝCH RECEPTOROV TYPU 2 A JEJ VPLYV NA OBNOVU VASKULATÚRY PO ZÁVAŽNEJ TRAUME MIECHY

## STIMULATION OF THE ANGIOTENSIN TYPE 2 RECEPTOR CAN IMPROVE VASCULAR RECOVERY FOLLOWING SEVERE SPINAL CORD INJURY

**Jana Snopková**, Veronika Liptáková, Erika Hvozdíková, Jaroslav Pavel  
Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Šoltésovej 4, Košice  
*snopkova@saske.sk*

### Súhrn

Trauma miechy predstavuje závažný klinický stav, ktorý postihnutým pacientom spôsobuje trvalé funkčné deficity. Napriek dlhodobému intenzívnemu výskumu však doposiaľ neexistuje spoľahlivá a klinicky akceptovaná liečba umožňujúca aspoň čiastočné obmedzenie neurologickej dysfunkcie. Vzhľadom k tomu, že narušenie vaskulárnej siete miechy po traume vedie k iniciácii mnohých autodeštruktívnych procesov, ktoré výrazne prispievajú k degradácii tkaniva, sa za rozhodujúce terapeutické ciele považujú práve proangiogénne stratégie. V našej práci sme sa preto venovali stimulácii AT<sub>2</sub> receptorov v kontexte regenerácie vaskulárnej siete miechy po závažnej kompresii miechy u potkanov. Cieľom práce bolo posúdiť možný vplyv stimulácie týchto receptorov na tvorbu nových ciev, ich integráciu do funkčnej neurovaskulatury a jej dopad na celkové funkčné vylepšenie.

**Kľúčové slová:** trauma miechy, AT<sub>2</sub> receptor, revaskularizácia

### Summary

Spinal cord injury is a severe clinical condition that leads to permanent functional deficits in patients. Despite long-term research, there is still no reliable and clinically accepted treatment that can even partially limit neurological dysfunction. Considering that the disruption of the vascular network of the spinal cord after trauma leads to the initiation of many autodestructive processes that significantly contribute to tissue degradation, proangiogenic strategies are considered as crucial therapeutic targets. Our study focused on the stimulation of AT<sub>2</sub> receptors

in order to promote the regeneration of the vascular network in the spinal cord after severe compression in rats. The study assessed the potential impact of the stimulation of these receptors on the formation of new blood vessels, their integration into the functional neurovasculature, and their overall effect on functional improvement.

**Key words:** spinal cord injury, AT<sub>2</sub> receptor, revascularization

## Úvod

Neuróny sú bunky extrémne citlivé na hypoxické podmienky, a preto kontinuálny prívod kyslíka z krvi je kľúčovým faktorom zabezpečujúcim funkčnosť nervového tkaniva. Narušenie vaskulárnej siete miechy po traume však vedie k ischemii a následnému rozvoju mnohých akútnych aj chronických patofyziologických mechanizmov, ktoré významne prispievajú k postupnej degenerácii nervového tkaniva (5). Podpora tvorby nových ciev, tzv. angiogenéza a regenerácia reverzibilne poškodenej neurovaskulatúry predstavuje sľubný terapeutický cieľ, ktorý by mohol výrazným spôsobom prispieť k funkčnému vylepšeniu (2). Napriek tomu, že po traume miechy dochádza k iniciácii endogénnych neuroprotektívnych a regeneračných mechanizmov, ich rozsah je výrazne obmedzený a v podstatnej miere závisí na závažnosti primárneho poranenia. Počas posledného desaťročia sa ukázalo, že priame manipulácie rôznych signálnych dráh môžu dostatočne podporiť procesy neuroregenerácie (4). Jednou z nich je tzv. protektívne rameno renín-angiotenzínového systému – AT<sub>2</sub> receptory. Naše preliminárne výsledky poukázali na to, že aktivácia týchto receptorov v období ich prechodnej expresie podnecuje procesy vaskulárnej regenerácie, a preto sme sa v tejto práci venovali práve účinku stimulácie AT<sub>2</sub> receptorov na podporu procesu angiogenézy poškodeného tkaniva miechy a jej dopadu na celkové funkčné vylepšenie.

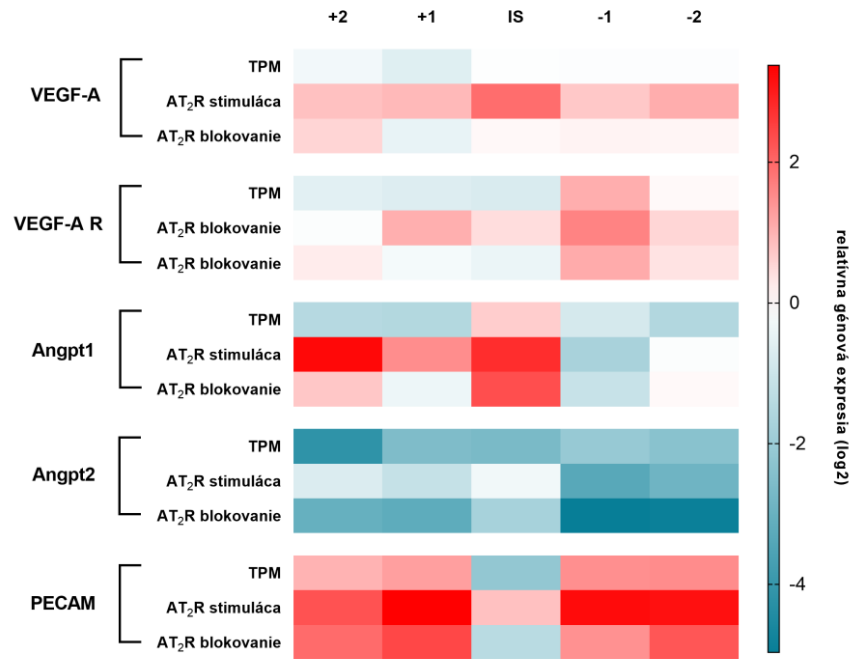
## Materiál a metódy

V štúdiu sme pracovali s dospelými samicami potkanov kmeňa Wistar s hmotnosťou od 250g do 300g, ktoré sme náhodne rozdelili do štyroch skupín, a to: (a) intaktná kontrolná skupina, n=14, (b) traumatické poranenie miechy – TPM, n=14, (c) TPM + stimulácia AT<sub>2</sub> receptorov, n=14 a (d) TPM + blokovanie AT<sub>2</sub> receptorov, n=14. Ako experimentálny model poranenia miechy sme využili optimalizovaný model závažnej kompresie miechy – 40g kompresia trvajúca 15min na úrovni Th9. Kontinuálna stimulácia, resp. blokovanie AT<sub>2</sub> receptorov bola uskutočnená od 14. do 28. post-traumatického dňa prostredníctvom selektívneho agonistu CGP42112 (0,1mg/kg/deň), resp. antagonistu PD123319 (1mg/kg/deň). Štyri týždne od traumy

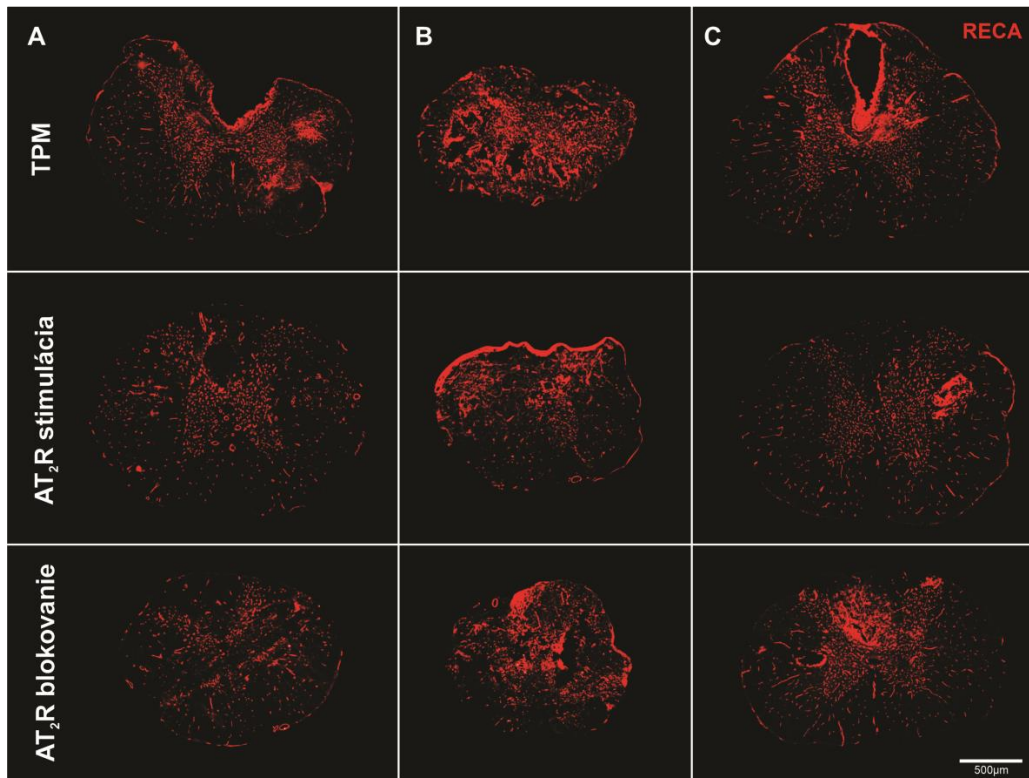
sme pomocou BBB lokomočnej škály analyzovali funkčnú motorickú obnovu zadných končatín v korelácii s latenciou neuronálnej odpovede získanej meraním motorických evokovaných potenciálov. Hodnotili sme tiež zmeny v mikcii, váhe, tlaku a srdcovej frekvencii experimentálnych zvierat. Génovú analýzu kľúčových proangiogénnych markerov ako sú vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF-A), VEGF-A receptor, angiopoetín 1 a 2 (Angpt1 a Angpt2) a PECAM sme uskutočnili kvantitatívnou RT-PCR a vybrané proteíny analyzovali prostredníctvom ELISA metódy, a to v epicentre lézie a príľahlých rostro-kaudálnych segmentoch. Mieru vaskulárneho poškodenia v tkanive miechy sme stanovovali pomocou imunofluorescenčného značenia proteínu RECA-1. Získané výsledky boli vyhodnotené v štatistickom programe GraphPad Prism 8 a prezentované ako priemer  $\pm$  SEM.

## Výsledky

Selektívna stimulácia AT<sub>2</sub> receptorov viedla k upregulácii génovej expzie kľúčových proangiogénnych rastových faktorov VEGF-A a jeho receptora, Angpt1, Angpt2 a vaskulárnej signálnej adhéznej molekuly PECAM, a to predovšetkým v epicentre lézie a v jej bezprostrednom okolí (Obr. 1). Rovnaký trend sme pozorovali aj pri analýze proteínovej úrovne vybraných markerov. Výrazné rozdiely boli zaznamenané pri VEGF-A, ktorého hladiny sa vo všetkých analyzovaných segmentoch pohybovali po samotnej traume pod kontrolnou úrovňou  $1938 \pm 80$  pg/mol, zatiaľ čo po stimulácii došlo k ich signifikantnému navýšeniu, a to najmä v kraniálnych segmentoch. Signifikantné zmeny sme po stimulácii pozorovali taktiež pri receptoroch VEGF-A, a to nad epicentrom lézie –  $61,83 \pm 5,3$  pg/ml vs.  $45,1 \pm 5,6$  pg/ml, a taktiež kaudálnych segmentoch miechy –  $64,1 \pm 4,6$  pg/ml vs.  $52,6 \pm 3,7$  pg/ml. V porovnaní s kontrolnou skupinou sme najvýraznejšie cieвне poškodenie zaznamenali v mieste lézie a kaudálnej oblasti, a to predovšetkým v dorzálnnej bielej hmote (Obr. 2). Tieto morfológické zmeny korelovali s celkovým histopatologickým obrazom.



Obr. 2 Heat mapa génovej expresie kľúčových proangiogénnych markerov 28 dní po TPM



Obr. 3 Morfologické zmeny vo vaskulatúre miechy štyri týždne po traume

(A - kraniálne segmenty, B – epicentrum poranenia, C- kaudálne segmenty)



U zvierat po stimulácii AT<sub>2</sub> receptorov sme v porovnaní s traumou samotnou zaznamenali výrazné vylepšenie v lokomočnej aktivite ich zadných končatín (BBB skóre: 10,45 bodov vs. 9,05 bodov), ktoré signifikantne korelovalo (Pearsonov  $r = -0,908$ ) s evidentne kratšou latenciou neuronálnej odpovede (7,4 ms vs. 10,8 ms). Okrem lokomočných zmien boli u zvierat zaznamenané aj rozdiely v obnove močovej funkcie. Po stimulácii sa zvieratám mikcia prinavrátala v priemere o šesť dní rýchlejšie. Po blokovaní AT<sub>2</sub> receptora sme obnovu mikcie v sledovanom období pozorovali iba u 75% zvierat. Rovnako sme detegovali výrazný rozdiel v hmotnosti zvierat oproti ich predoperačnej váhe. Po stimulácii došlo štyri týždne k nárastu hmotnosti približne o 5%, avšak po kompresii samotnej, ako aj po blokovaní bol pozorovaný jej úbytok (Obr.3). Pozorované pozitívne účinky stimulácie boli potlačené pri blokovaní AT<sub>2</sub> receptora.

VYBRANÉ PARAMETRE FUNKČNEJ OBNOVY			
	TPM	AT <sub>2</sub> R stimulácia	AT <sub>2</sub> R blokovanie
Finálne BBB skóre	9.05 ± 0.25	10.45 ± 0.34	9.03 ± 0.33
Latencia neuronálnej odpovede (ms)	10.8 ± 1.7	7.4 ± 0.6	10.0 ± 0.3
Dĺžka obnovy mikcie po TPM	26 dní	20 dní	-
Finálna vs. pôvodná hmotnosť (%)	-1.84 ± 0.02	5,22 ± 0.04	-3.09 ± 0.03

Obr. 4 Vybrané parametre pozorovanej funkčnej obnovy

## Diskusia

Po traume miechy dochádza k poškodeniu mikrocirkulácie a narušeniu hematoencefalickej bariéry, čo vedie k rozvoju sekundárnych zmien zodpovedných za degradáciu tkaniva. Aj napriek tomu, že mechanické poškodenie iniciuje proces endogénnej revaskularizácie, tá nie je dostatočná, pretože inhibičné prostredie lézie bráni integrácii novovzniknutých ciev do funkčnej vaskulatúry miechy (6). Nedostatočná integrácia nových ciev do funkčnej kapilárnej siete má za následok ich výraznú redukciu (3). Nervové tkanivo je však vysoko závislé na kontinuálnej dodávke kyslíka, a preto je adekvátne prekrvenie zásadným aspektom pre zachovanie jeho funkčnosti. Na iniciácii a regulácii angiogenézy sa výrazne podieľajú VEGF-A a Angpt2, zatiaľ čo Angpt1 prispieva k stabilizácii a maturácii krvných ciev (7). Stimulácia AT<sub>2</sub> receptorov, ktoré zohrávajú úlohu v regeneračných procesoch, viedla k upregulácii proangiogénnych markerov, a to ako na génovej tak aj na fyziologicky relevantnej proteínovej

úrovni. Stimulácia v poškodenom tkanive miechy prispela k tvorbe nových ciev pomocou expresie VEGF-A a jeho receptorov, a taktiež podporila vznik prepojení medzi novovzniknutými cievami a bunkami nervového tkaniva prostredníctvom regulácie Angpt1. Nové cievy vytvárajú vhodné prostredie pre remodeláciu poškodeného tkaniva a prerastanie nových axónov. Reorganizácia neuronálnej siete má pritom priamy vplyv na odozvu motorických evokovaných potenciálov (1). Lepšie prekrvenie zabezpečuje dostatok živín potrebných pre správne fungovanie tkaniva, a preto sme po stimulácii AT<sub>2</sub> receptorov zaznamenali výraznú redukciu jeho straty a výraznejšie zachovanie integrity sivej a bielej hmoty. Od množstva funkčne zachovaného tkaniva je závislý aj celkový neurologický obraz, čo sme pozorovali aj v našich experimentoch, kedy sme po stimulácii pozorovali rýchlejšiu neuronálnu odpoveď, ktorá výrazne korelovala s motorickým vylepšením zadných končatín a rovnako tak s funkčnou obnovou mikcie.

## **Záver**

Stimulácia AT<sub>2</sub> receptorov v poškodenej mieche prispela k tvorbe a integrácii nových ciev, a tým zvýšila regeneračný potenciál tkaniva s efektom na celkové funkčné vylepšenie. Môžeme ju teda označiť sa sľubného adepta pri vývoji adekvátnej terapeutickkej stratégie vhodnej aj pre klinickú prax.

## **Literatúra**

1. Hu Y et al. (2001) Prevention of spinal cord injury with time-frequency analysis of evoked potentials: an experimental study. In: J Neurol Neurosurg Psychiatry. Vol.6, p. 732-740
2. Michelle TL et al. (2011) Vascular disruption and the role of angiogenic proteins after spinal cord injury. In: Trans Stroke Res. 2011, vol. 2, p. 474-491
3. Oudega M (2012) Molecular and cellular mechanisms underlying the role of blood vessels in spinal cord injury and repair. In Cell Tissue Research. 2012, vol. 349, p. 269-288
4. Qian, Zhou F (2020) Updates and challenges of axon regeneration in the mammalian central nervous system. In: Journal of Molecular Cell Biology. Vol. 12, no. 10, p. 798-806
5. Tator CH et al. (1997) Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. In: Journal of Neurosurgery. 1997, vol. 86, no. 3, p. 483-492
6. Whetsone W et al. (2003) Blood-spinal cord barrier after spinal cord injury: Relation to revascularization and wound healing. In: J Neurosci Res. Vol. 74, p. 227-239
7. Yu S et al. (2016) Angiogenic microspheres promote neural regeneration and motor function recovery after spinal cord injury in rats. In Scientific Reports. 2016, vol. 6

Práca bola podporená Agentúrou pre vedu a výskum: APVV-22-0248 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠVV a SAV: VEGA č. 2/0123/23.

**DILATÁCIA A VOLVULUS ŽALÚDKA.**  
**NÁHLY ÚHYN FENKY BEZ KLINICKÝCH PRÍZNAKOV**  
**GASTRIC DILATATION AND VOLVULUS**  
**SUDDEN DEATH OF PUPPY WITHOUT CLINICAL SIGNS**

**Zuzana Ševčíková<sup>1</sup>, Branislav Lukáč<sup>2</sup>, Viera Karaffová<sup>1</sup>, Viera Revajová<sup>1</sup>,  
Erik Hudec<sup>1</sup>, Renáta Szabóová<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Katedra morfológických disciplín UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

<sup>2</sup>Klinika malých zvierat, Univerzitná veterinárna nemocnica, UVLF v Košiciach  
Komenského 73, Košice

<sup>3</sup>Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice  
*zuzana.sevcikova@uvlf.sk*

## **Súhrn**

Dilatácia a volvulus žalúdka sú pomerne často sa vyskytujúcim, život ohrozujúcim stavom veľkých plemien psov. Etiológia nie je známa, avšak určité fenotypické a enviromentálne rizikové faktory boli identifikované. Pitva 6 mesačnej fenky Novofundlandského psa, ktorá uhynula bez predchádzajúcich klinických príznakov preukázala dilatáciu a volvulus žalúdka, s kongesciou sleziny a dislokáciou čriev aj sleziny. Morfológický obraz srdca poukazoval na periférne cirkulačné zlyhanie.

**Kľúčové slová:** pes, dilatácia a volvulus žalúdka, náhly úhyn

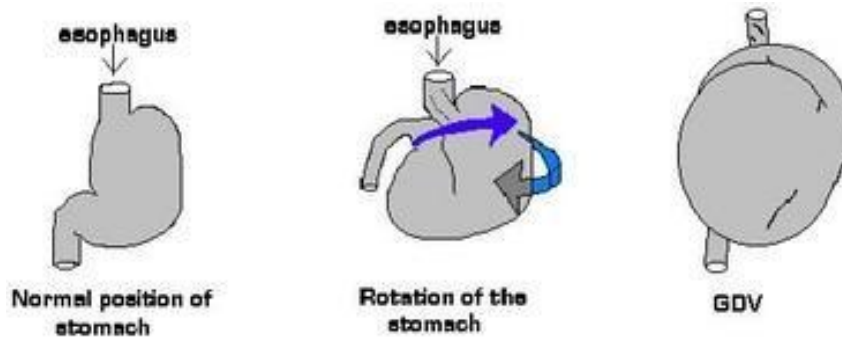
## **Summary**

Gastric dilatation and volvulus (GDV) is a common emergency condition in large and giant breed dogs that is associated with high morbidity and mortality. The aetiology is unknown, but several phenotypic and environmental risk factors have been identified for developing GDV. The necropsy of 6 months old Newfoundland female puppy which died with no previous clinical symptoms revealed the severe gastric dilatation and volvulus with displacement and congestion of the spleen and by dislocation of intestine. The morphological appearance of heart indicates to peripheral circulatory failure.

**Key words:** dog, gastric dilatation and volvulus, sudden death

## Introduction

Gastric dilatation and volvulus (GDV) is an enlargement of the stomach associated with rotation on mesenteric axis (Fig 1).



**Fig. 1** Anatomic position of stomach during gastric dilatation and volvulus in the dog.

Source: <https://bullmastiff.us/health-rescue/bloat/>

It is a life-threatening disorder most commonly seen in large, deep-chested dogs, although any dog may be affected. In its early stage, the stomach fills with gas, causing a simple gastric dilatation or "bloat". Sometimes, the condition progresses no further than a bloat. A GDV, however, is a progression of the bloat into a volvulus, in which the huge, gas-filled stomach twists upon itself so that both the entrance and exit of the stomach become blocked. This is an emergency that requires urgent surgery to correct (3).

The aetiology of gastric dilatation and volvulus is unknown, but several phenotypic and environmental risk factors have been identified for developing GDV. No sex predisposition exists, and dogs appear to be at increased risk with advancing age. Other reported predisposing factors include lean body condition, deep/narrow thoracic conformation, a first-degree relative with a history of GDV, stress, aggressive or fearful behaviour, once daily feeding, dry food, and rapid consumption of food, previous splenic disease, and increased gastric ligament laxity (4).

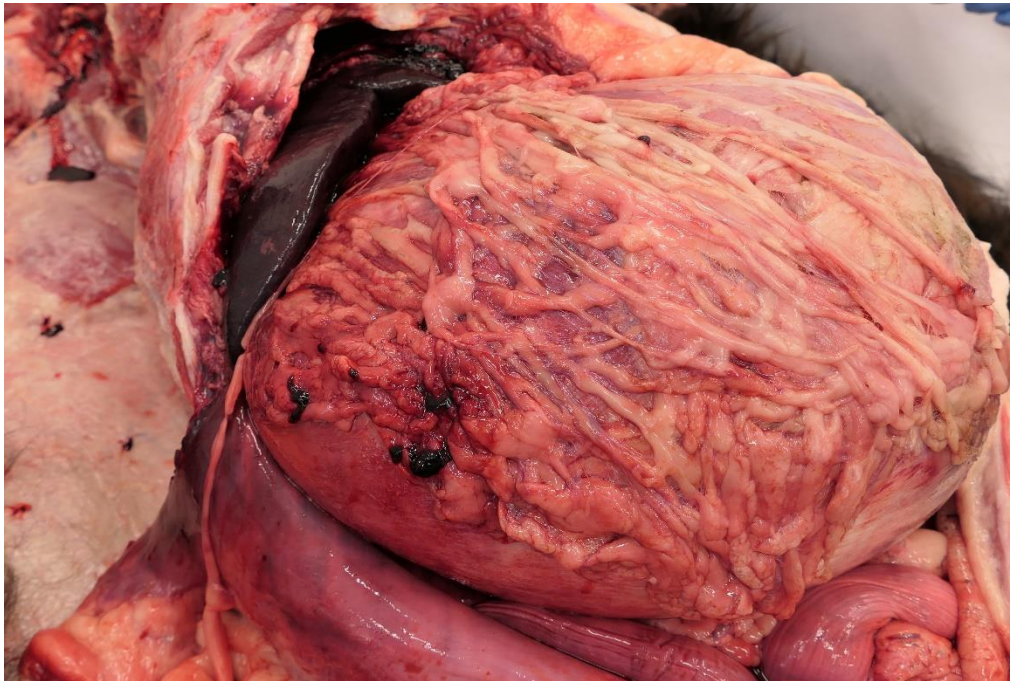
In our work the necropsy results of 6 months old Newfoundland female puppy with gastric dilatation and volvulus are presented.

## Material and Method

6 months old Newfoundland female puppy was found dead with no previous clinical symptoms by owner. He supposed the puppy was poisoned. He asked for the necropsy.

## Results

The necropsy revealed disproportionality of the body in the meaning of severe abdominal enlargement; the abdomen was very hard. There was a discharge of turbid secretion from the oral cavity. After opening of the abdominal cavity the severe gastric dilatation was observed. There was also the dislocation and congestion of the spleen which was localized on the right side of the body between stomach, liver and diaphragm (Fig. 2).



**Fig. 2** Severe gastric dilatation and displacement of the spleen were found. Source: Own picture

According to the edges and colour of the spleen, the diagnosis of severe splenomegaly caused by congestion was accepted. There was also the distention and displacement of part the intestines (duodenum) was observed on the right side of the body, close to the diaphragm and /or oesophagus. The rest of the intestine was found on the left side of the abdomen and partially beneath cranial edge of the stomach, where its severe hyperaemia even congestion were also detected. The eccentric left ventricular hypertrophy and dilatation of right ventricle were also observed.

## Discussion

The syndrome of GDV occur relatively common in dogs, and uncommonly in cats. The gas that contributes to the development of dilatation is probably the result of aerophagia, and possibly the evolution of carbon dioxide by physiological mechanism. Inability to relieve the

accumulation of food, fluid and gas in the stomach causes the organ to dilate and alter its intra-abdominal position, so that its long axis rotates from a transverse left-right orientation to one paralleling that of abdomen. In simple dilatation the oesophagus is not physically completely occluded, the spleen remains on the left side, and the duodenum is only slightly displaced dorsally and toward the midline. Repeated episode of gastric dilatation probably compromise splenic venous return during period when the stomach is distended and eventually leads to spleen ischemia and segmental infarcts (1).

For reasons that are not fully clear, gastric dilatation may converted to gastric volvulus, which is presented in this work. The stomach rotates about oesophagus in a clockwise direction, as viewed from the caudal aspect. The greater curvature of distended organ moves ventrally and caudally and then rotates dorsally to the right. This forces the pylorus and terminal duodenum cranially to the right and clockwise to the oesophagus (7). In our case, the whole intestine was dislocated, the part one was seen immediately after the opening of the abdominal cavity which points to its abnormal position. Depending on the degree of volvulus, the spleen which follows the *ligamentum gastrolienale*, usually ends up lying in a right-ventral position between the stomach, liver and diaphragm, which was observed also in our case. Spleen bends to the V shape by tension on its ligaments, becomes extremely congested and may undergo torsion, infarction and rupture (5). The oesophagus becomes completely occluded which may involve rotation of up 270-360°. Venous infarction of gastric mucosa ensues, as volvulus progressively constricts outflow of blood from the stomach. The gastric wall is oedematous and dark red to black and there is blood content in the lumen of stomach. Ischemic mucosa becomes necrotic and the stomach may rupture. Hemoperitoneum may occur as a result of avulsion of gastric blood vessels (1). These pathologic changes were not found in our case. The stomach wall was a little thick, but only mild red discoloration was found in approximately half of the stomach wall.

Distension and displacement of the stomach cause obstruction of the caudal vena cava and portal vein resulting in venous stasis and sequestration of blood in splanchnic, renal, and posterior muscular capillary beds. It results in cardiac arrhythmias, mainly ventricular in origin and occur in approximately 40% of patients with GDV (8). The decrease in circulating blood volume (venous return) and subsequent decrease in cardiac output, arterial blood pressure, and tissue perfusion culminate in hypovolemic shock. Endotoxemia, a consequence of portal vein occlusion, contributes to the shock syndrome. The release of myocardial depressant factors from ischemic pancreatic tissue impairs the clearance of endotoxins by the reticuloendothelial system as well as causing direct cardio depressant effects (Lees et al., 1977, cit. 2; 1). The

morphology of the heart in our case points to peripheral circulatory failure which is characterized by reduction in the effective circulating blood volume with insufficient venous return and reduced cardiac output. Acute haemorrhages and shock are examples of the form of circulatory failure (1).

The mortality rates for GDV are reported to be as high as 15-25%. Prognostic indicators such as recumbence, depression or coma on presentation, gastric necrosis, and arrhythmia all increase mortality (6).

## **Conclusion**

In this work the cause of sudden, unexpected death of young 6 month old female puppy of Newfoundland breed was described. During necropsy the gastric dilatation and volvulus were found. This pathological diagnosis was supported by displacement and congestion of the spleen and by dislocation of intestine. The morphological appearance of heart indicates to peripheral circulatory failure.

## **References**

1. Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer NC (2016) Pathology of Domestic Animals, Vol 2, 6<sup>th</sup> edition, Elsevier, St. Lois, Missouri
2. Hornbuckle, WE, Simpson KW, Tennat BC (2008) Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition), Chapter 14 - Gastrointestinal Function 413-457, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00014-3>
3. <https://vcahospitals.com/know-your-pet/bloat-gastric-dilatation-and-volvulus-in-dogs>
4. <https://www.msdtvetmanual.com/digestive-system/diseases-of-the-stomach-and-intestines-in-small-animals/gastric-dilation-and-volvulus-in-small-animals>
5. <https://www.acvs.org/small-animal/gastric-dilatation-volvulus/>
6. <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/2005/Summer/canine-acd.htm>
7. Zweig JN and DeGroot WD (2022) Counterclockwise gastric dilatation and volvulus in a dog. Canadian Veterinary Journal 63: 711-714
8. Volk SW (2009) Small Animal Critical Care Medicine, Chapter 134: Gastric Dilatation-Volvulus and Bloat, 413-457 doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781416025917101341?via%3Dihub>

# HISTOLOGICKÉ A IMUNOHISTOCHEMICKÉ HODNOTENIE REGENERÁCIE KOSTNÉHO TKANIVA POMOCOU HYDROXYAPATITOVEJ KOSTNEJ PLATNIČKY

## HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF BONE TISSUE REGENERATION USING HYDROXYAPATITE BONE PLATE

Veronika Šimaiová, Jana Teleky

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

*veronika.simaiova@uvlf.sk*

### Súhrn

V posledných rokoch, s prudkým rozvojom biologických materiálov a potreby modernej regeneratívnej medicíny, náhradné biomateriály pre výskum kostí, ktoré boli aplikované do oblasti defektov na mandibule sú čoraz viac predmetom záujmu vedcov po celom svete. Hydroxyapatitové keramické lešenia majú plne prijateľné fázové zloženie, mikroštruktúru a pevnosť v tlaku na ich použitie v regeneratívnej medicíne. Nami používaná inovatívna hydroxyapatitová keramika bola pripravená metódou páskového odlievania, ktorá umožňuje variáciu tvaru vzoriek po formovaní hydroxyapatitovej pasty do foriem kyseliny polymliečnej a vytlačení na 3D tlačiarňi. Účelom našej kvalitatívnej štúdie bolo zhodnotiť regeneračný potenciál inovatívneho keramického biomateriálu pripraveného touto metódou v terapii defektov kortikálnej kosti sánky u piatich dospelých ošípaných. Kostné defekty sánky boli hodnotené v časových obdobiach po 3, 4, 5 a 6 mesiacoch a porovnané s kontrolnou vzorkou zdravej kortikálnej kosti z opačnej strany sánky. Výsledky histologického, ako aj imunohistochemického vyšetrenia potvrdili pozitívny regeneračný potenciál keramických implantátov po ošetrovaní kostných defektov dolnej čeľuste na modeli prasacej mandibuly.

**Kľúčové slová:** kostný defekt, sánka, hydroxyapatit, ošípaná



## Summary

In recent years, with the rapid development of biological materials and the need for modern regenerative medicine, substitute biomaterials for bone research that have been applied to the area of defects on the mandible are increasingly the subject of interest of scientists around the world. Hydroxyapatite ceramic scaffolds have fully acceptable phase composition, microstructure and compressive strength for their use in regenerative medicine. The innovative hydroxyapatite ceramic used by us was prepared by the tape casting method, which allows the variation of the shape of the samples after forming the hydroxyapatite paste into polylactic acid molds and printing them on a 3D printer. The purpose of our qualitative study was to evaluate the regenerative potential of the innovative ceramic biomaterial prepared by this method in the therapy of cortical bone defects of the mandible in five adult pigs. Bone defects of the sled were evaluated at time periods of 3, 4, 5, and 6 months and compared with a control sample of healthy cortical bone from the opposite side of the mandible. The results of histological as well as immunohistochemical examination confirmed the positive regenerative potential of ceramic implants after the treatment of bone defects of the lower jaw on the porcine mandible model.

**Key words:** bone defect, mandible, hydroxyapatite, pig

## Úvod

Mandíbula je kostené lešenie, ktoré tvorí spodnú tretinu tváre. Nesúvisí len s udržiavaním kontúry a tvaru tváre, ale úzko súvisí aj so žuvaním, artikuláciou a rečou pacienta. Poranenie, nádor, infekcia, funkčná atrofia, vrodené ochorenie, periodontitída a iatrogénne poranenia (ako je nadmerná osteotómia pri plastickej chirurgii s hypertrofiou dolnej čeľuste) môžu viesť k úbytku kostnej hmoty tkaniva v ústnej dutine, čo ovplyvňuje vzhľad tváre pacienta rôzneho stupňa a zodpovedajúcej orálnej funkcie (19). Tieto skutočnosti nevyhnutne prinášajú veľkú psychickú záťaž pre pacientov a traumy, mnohí pacienti môžu pociťovať bolesť, menejcennosť, excentricitu, atď. Vzhľadom na smer výskumu bola rekonštrukcia defektov dolnej čeľuste neustálym záujmom (14, 7, 11). Hľadanie ideálneho spôsobu opravy kostného defektu bola predmetom dlhodobého úsilia príbuzných disciplín. Tradičný autológny kostný štep je zlatým štandardom pre kostný štep (20). Nedostatok zdrojov a komplikácie darcov (ako je chronická bolesť a hypofunkcia) však obmedzujú ich aplikáciu a sú náchylné na sekundárnu kostnú resorpciu (1, 16). V súčasnosti sa v klinickej praxi bežne používajú aloštepky a xenogénne štepy. Aby sa znížila indukcia závažnej imunitnej rejekcie hostiteľa, alogénna kosť je často ošetrovaná

zmrazením, lyofilizáciou, dekalifikáciou alebo iným chemickým ošetrením a jej bunkové zložky sú väčšinou nekrotické. Preto má alogénny štep od autoštepú určité rozdiely v aspektoch osteogenézy, prejavu v procese hojenia a imunitnej odpovede (2, 18). Ideálna náhrada kostného štepu by mala byť: osteokonduktívna, osteoinduktívna, biokompatibilná, bioresorbovateľná, štrukturálne podobná kosti, ľahko použiteľná a nákladovo efektívna. Zároveň môže včas tvoriť kostné väzbové rozhranie s kostným tkanivom, časom sa rozložiť a nakoniec byť úplne nahradený autológym kostným tkanivom (5, 6). Biomateriály zahŕňajú tri typy: kovové materiály (titán a jeho zliatiny), anorganické materiály (bioaktívna keramika, hydroxyapatit) a organické materiály.

Biomateriály nielenže majú alebo plnia určité biologické funkcie, ale majú aj dobrú biokompatibilitu. Existuje však mnoho druhov biomateriálov aplikovaných na defekty dolnej čeľuste, ktorých vlastnosti sa môžu meniť.

## **Materiál a metódy**

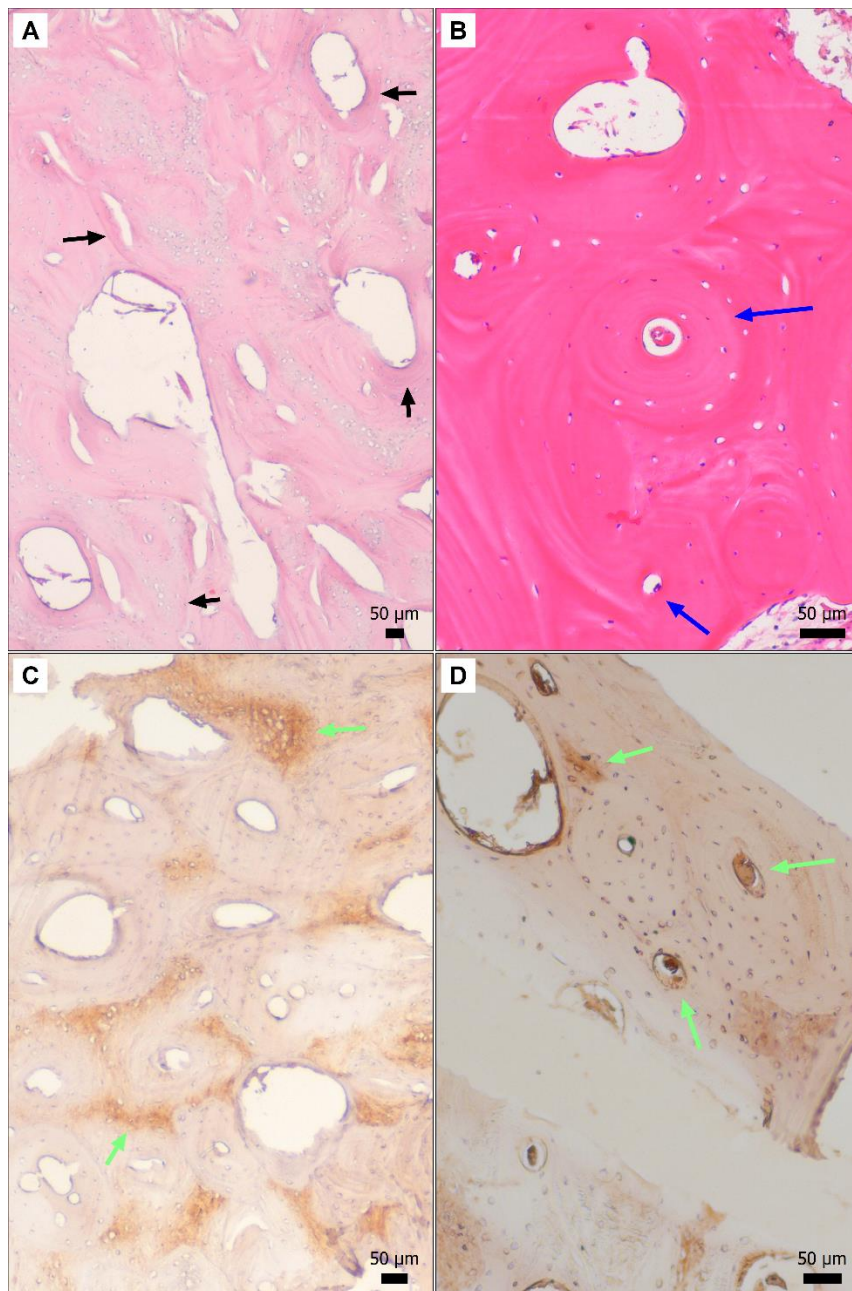
V práci bolo použitých päť dospelých samíc ošípaných plemena Large White (n=5) (Farma PD Agro Michalovce, Slovenská republika). Experiment bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR č. 4650/17-221. Zvieratám v celkovej anestéze boli vytvorené jednostranné defekty kortikálnej kosti pomocou extraorálneho prístupu k sánke. Chirurgický rez bol vedený v rostrálnej časti tela sánky súbežne s jej ventrálным okrajom na pravej strane sánky na úrovni prvého a druhého premolára. Okrajové kostné defekty na pravej strane exponovaného mandibulárneho tela boli vytvorené pomocou reverzibilnej pílkou na kosti chladenej 0,9 % sterilným fyziologickým roztokom. Vytvorené defekty mali dĺžku 1,6 cm (predozadný), 0,8 cm šírku (bukálne-lingválne) a 0,4 cm hrúbku (spodný okraj-výška obrysu). Sterilná hydroxyapatitová keramická platňa (HA) s dĺžkou 1,5 cm, šírkou 0,7 cm a hrúbkou 0,3 cm bola vložená na vyplnenie okrajového defektu na pravej strane sánky. Pre stimuláciu hojenia defektu bola veľmi dôležitá prítomnosť krvi z okolitého kostného tkaniva. Natívna kosť na ľavej strane mandibulárneho tela slúžila ako kontrola. Po skončení monitorovacieho obdobia boli zvieratá usmrtené jednotlivo v rôznych časových obdobiach po 3, 4, 5 a 6 mesiacoch v súlade so zákonmi welfare zvierat. Zo zahojeného miesta defektu kosti na tele sánky boli odobraté vzorky tkaniva, ktoré boli následne posúdené histologicky a imunohistochemicky. Po fixácii v 4% formaldehyde bolo odobraté tkanivo veľkosti 10 mm x 10 mm prenesené do dekalifikačného roztoku Chelaton (Slavus) na dobu 3 - 6 týždňov. Tkanivo bolo ďalej spracované do parafínových bločkov. Po narezaní na mikrotóme na 4 µm rezy a deparafinácii

boli rezy ofarbené Hematoxylín- Eozínom. Sériové rezy boli ofarbené imunohistochemicky, kvôli detekcii prítomnosti kolagénu typu I pomocou metódy pre imunohistochemickú reakciu primárnou králičou polyklonálnou protilátkou proti kolagénu I (ab233080, Abcam, Cambridge, UK) po dobu 60 minút pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke a následne boli rezy inkubované so súpravou sekundárnych protilátok DB DET SYS, DB, detekčná súprava HRP - králičí/myšací duálny systém (DB Biotech, Košice, SR) počas 30 minút pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke. Nasledoval krok na vizualizáciu reakcie s použitím čerstvo pripraveného chromogénového systému DAB (3,3'-diaminobenzidín) (DAKO, North America, USA).

## Výsledky

Histologická analýza regenerácie kosti v rostrálnej časti sánky v mieste okrajového defektu poukázala na rozdiely v intramembranóznej kostnej regenerácii v štádiu kostnej remodelácie podľa dĺžky pooperačného obdobia. Po príslušných intervaloch hojenia (3., 4., 5., 6. mesiac) neboli zistené žiadne makroskopické defekty. Nové tkanivo u všetkých liečených defektov okrajovej časti sánky siahalo hlboko do priestoru defektu. Mikroskopická analýza potvrdila významnú regeneráciu kompaktného (kortikálneho) kostného tkaniva na zrelú, hubovitú kosť. Toto pozorovanie viedlo k dodatočnej analýze detailov kostnej remodelácie v jednotlivých časových obdobiach pri skúmaní regenerácie sánky. Pozorovali sme regenerujúce sa kostné tkanivo s prítomnosťou kostných buniek osteoblastov, osteocytov a mineralizované matrice. Povrch kosti bol relatívne hladký a neboli pozorované žiadne zvyšky hydroxyapatitových keramických platničiek. V mieste vytvoreného defektu bola keramická platnička celkom degradovaná a defekt bol úplne vyplnený novovytvoreným, regenerovaným kostným tkanivom. Nové kostné tkanivo sa začalo formovať od okraja ako lamelárna kosť a postupovalo do stredu defektu, kde bol kalus nahradený kompaktnou kosťou. Podľa štádia vývoja kosti vyplňala nezrelá kosť (tkané kostné tkanivo) len časť priestoru v mieste defektu. Resorpcia osteoklastmi a novotvorba kosti osteoblastmi je typická pre prestavbu kosti. V zóne nezrelej kosti bola pozorovaná kostná matrica s veľkým množstvom osteoblastov, neusporiadaných kolagénových vlákien a cementových línií. Kostná matrica s cementovými líniami bola charakteristická pre nezrelé, vyvíjajúce sa kostné tkanivo (Obr. 1 A, čierna šípka, 50  $\mu\text{m}$ ), zatiaľ čo v zrelej kosti prevládali osteóny s typickým usporiadaním osteocytov a Haversovým systémom v strede (Obr. 1 B, modrá šípka, 50  $\mu\text{m}$ ). Imunohistochemická detekcia kolagénu typu I v kostnom defekte na tele sánky 3, 4, 5 a 6 mesiacov po implantácii hydroxyapatitovej keramickej platničky u ošipanej ukázala prítomnosť kolagénu typu I v kostnej matrici compactnej kosti, v hubovitej

kosti, okolo dutín kostnej drene, ako aj v okolí a vo vnútri osteónov i lakúnach osteocytov (Obr. 1 C, D, zelená šípka, 50  $\mu\text{m}$ ).



**Obr. 1** Histologická analýza regenerácie kosti v rostrálnej časti sánky v mieste okrajového defektu

## Diskusia

Bolo vykonaných mnoho štúdií s cieľom vyvinúť najvhodnejší a prispôsobivý materiál na regeneráciu kostného tkaniva. Možné sú však krátkodobé a dlhodobé komplikácie (12). Kost' zložená z kryštálov kolagénu a fosforečnanu vápenatého apatitu je druhým najčastejšie

transplantovaným orgánom na svete, ktorý živému telu poskytuje tuhosť, pevnosť a určitý stupeň elasticity (22).

Biokeramika je druh anorganických nekovových materiálov. Pretože hlavnými zložkami kostného tkaniva sú hydroxyapatit (HAp), typické biomateriály kalciumfosfátovej keramiky (CaP) a bioaktívnych skiel (BG) sa už mnoho rokov široko používajú ako kostné náhrady. Ich mimika minerálnej fázy dodáva kosti bioaktivitu pre tvorbu nového tkaniva (3, 10). HAp, biokeramika fosforečnanu vápenatého, je základnou zložkou pre regeneráciu kostí s dobrou biokompatibilitou, bioaktivitou a kostnou vodivosťou, ktorá sa široko používa v biomedicíne a materiáloch na opravu kostných defektov (4, 15). Na vyhodnotenie regenerácie kranio-maxilofaciálnej kosti sa používajú malé zvieracie modely (myš, potkan a králik), ako aj veľké zvieracie modely (pes, koza, ovca a prasa). Pri výbere veľkého zvieracieho modelu je dôležité, aby fyziologické procesy vrátane hojenia kostí v príslušnom zvieracom modeli optimálne zodpovedali situácii človeka. Okrem toho musia veľké zvieracie modely umožniť vytvorenie defektu kritickej veľkosti v mieste, kde je kostná štruktúra podobná ľudskej kranio-maxilofaciálnej kosti. Vzhľadom na tieto požiadavky, predstavujú ošípané, a najmä miniprasiatka vynikajúci zvierací model, ktorý sa má použiť v záverečnej fáze predklinického testovania biomateriálov alebo produktov tkanivového inžinierstva (8, 21). Výhoda mini-ošípaných oproti iným zvieracím modelom je, že ich anatomické a fyziologické vlastnosti kranio-faciálnych kostí sú porovnateľnejšie s ľuďmi v porovnaní s inými zvieracími modelmi. Proces hojenia kostí u ošípaných je rovnaký ako u ľudí (13, 17). Mnohé predchádzajúce štúdie naznačujú, že biochemické vlastnosti novovytvorenej kosti boli podobné vlastnostiam okolitého kostného tkaniva, pretože kosť je dynamická štruktúra, ktorá prechádza neustálou prestavbou. Každé ošetrenie fraktúry alebo kostného defektu závisí od použitého materiálu a ošetrovanej oblasti tela; veľmi dôležitý je aj typ osifikácie (9). Morfológické a klinické hodnotenia skúmaných kostí nepreukázali žiadne známky zápalu alebo infekcie.

## **Záver**

Záverom môžeme zhodnotiť, že úspešnosť regenerácie marginálnych kostných defektov závisí od mnohých špecifických faktorov. Je tu nutnosť prítomnosti kostných buniek na jednej strane a použitia vhodného biomateriálu na strane druhej. V našej štúdií sme implantovali acelulárnu hydroxyapatitovú keramickú platničku do miesta vytvorených kostných defektov pravostranne v rostrálnej časti tela sánky. Histologicky sme potvrdili nové tkanivo u všetkých liečených defektov okrajovej časti sánky, ktoré siahalo hlboko do priestoru defektu. Mikroskopická

analýza potvrdila významnú regeneráciu kompaktného (kortikálneho) kostného tkaniva na zrelú, hubovitú kosť. V zóne nezrelej kosti bola pozorovaná kostná matrica s veľkým množstvom osteoblastov, neusporiadaných kolagénových vlákien a cementových línií. Kostná matrica s cementovými líniami bola charakteristická pre nezrelé, vyvíjajúce sa kostné tkanivo, zatiaľ čo v zrelej kosti prevládali osteóny s typickým usporiadaním osteocytov a Haversovým systémom v strede. Imunohistochemicky sme potvrdili prítomnosť kolagénu typu I v kostnom defekte na tele sánky 3, 4, 5 a 6 mesiacov po implantácii HA keramickej platničky u ošípanej. Kolagén typu I sa vyskytoval v kostnej matrici kompaktnej kosti, v hubovitej kosti, okolo dutín kostnej drene, ako aj v okolí a vo vnútri osteónov i lakúnach osteocytov.

## Literatúra

1. Bartaire E, Mouawad F, Mallet Y, Milet P, El Bedoui S, Ton Van J, Chevalier D, Lefebvre JL (2012) Morphologic assessment of mandibular reconstruction by free fibula flap and donor-site functional impairment in a series of 23 patients, *Eur Ann. Head Neck Dis.* 129, 230-237
2. Cornu OX, Banse PL, Docquier S, Luyck C Delloye(2000). Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone, *J Orthop Res* 18, 426-431
3. El-Ghannam A (2005) Bone reconstruction: From bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 2, 87-101. doi: 10.1586/17434440.2.1.87
4. Farokhi M, Mottaghitab F, Samani S, Shokrgozar MA, Kundu SC, Reis RL et al. (2018) Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnol Adv* 36, 68-91. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.10.001
5. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005). Bone substitutes: an update, *Injury* 36 (S3) S20-S27
6. Hao Z, Song Z, Huang J, Huang K, Panetta A, Gu Z, Wu (2017) The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering, *Biomater Sci* 5, 1382-1392
7. Ishida S, Shibuya Y, Kobayashi M, Komori T (2015). Assessing stomatognathic performance after mandibulectomy according to the method of mandibular reconstruction, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 44, 948-955
8. Kantarci A, Hasturk H, and Van Dyke TE (2015) Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontol*, 2000, 68, 66
9. Kim T, Wang See C, Li X, Zhu D (2020) Orthopedic implants and devices for bone fractures and defects: Past, present and perspective. *Eng Regen*, 1, 6-18
10. Kokubo T, Kim HM and Kawashita M (2003). Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 24, 2161-2175. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00044-9
11. Kumar BP, Venkatesh V, Kumar KA, Yadav BY, Mohan SR (2016) Mandibular reconstruction: overview, *J Maxillofac Oral Surg* 15, 425-441
12. Laureti M, Ferrigno N, Rosella D et al. (2017) Unusual case of osseointegrated dental implant migration into maxillary sinus removed 12 years after insertion. *Case Reports in Dentistry* 2017: 9634672.
13. Lüthje FL, Skovgaard K, Jensen HE, Jensen LK (2018) Pigs are useful for the molecular study of bone inflammation and regeneration in humans. *Lab Anim*, 52, 630-640
14. Mala E, Vejrazkova E, Bielmeierova J, Jindra M, Vosmik M, Novosad J, Sobotka L (2015) Long term monitoring of nutritional, clinical status and quality of life in head and neck cancer patients, *Klin Onkol* 28, 200-214
15. Mao D, Li Q, Bai N, Dong H, and Li D (2018). Porous stable poly(lactic acid)/ethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffolds prepared by a combined method for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers* 180, 104-111. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.10.031
16. McMahon RE, Wang L, Skoracki R, Mathur AB (2013) Development of nanomaterials for bone repair and regeneration, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101, 387-397
17. Murison PJ, Jones A, Mitchard L, Burt R, Bircha MA (2009) Development of perioperative care for pigs undergoing laryngeal transplantation: A case series. *Lab Anim* 43, 338343.

18. Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR (2007) Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics, *Cell Tissue Bank* 8, 93-105.
19. Rubio-Palau J, Prieto-Gundin A, Cazalla AA, Serrano MB, Fructuoso GG, Ferrandis FP, Baro AR (2016). Three-dimensional planning in craniomaxillofacial surgery, *Ann Maxillofac Surg* 6, 281-286
20. Sarkar SK, Lee BT (2015) Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials, *Korean J Intern Med* 30, 279-293
21. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ Jr. and Frazier KS (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol*, 49, 344
22. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. (2018) 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Mater.* 3, 278-314. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.

Táto práca bola podporená grantom *VEGA 1/0336/20*.

# ADIPOKÍNY U VTÁKOV – TYPY A ÚLOHY VO VTÁČOM ORGANIZME

## ADIPOKINES IN BIRDS – TYPES AND TASKS IN THE BIRD ORGANISM

**Slavomíra Štefancová**, Bronislava Pokorná, Lenka Luptáková

Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

*slavomira.stefancova@student.uvlf.sk*

### **Súhrn**

Kurací model predstavuje vhodné prostredie pre skúmanie adipokínov a pre pochopenie ich vzájomných vzťahov a funkcií v organizme. Adiponektín je jedným z najpreskúmanejších adipokínov a pôsobí ako negatívny regulátor obezity u vtákov. Ďalším významným adipokínom je leptín, avšak jeho funkcia vo vtáčom organizme je stále predmetom výskumu. Chemerín sa podieľa hlavne na kontrole oxidačného stresu a hoci je známe, že sa nachádza aj vo vaječníkoch vtákov, jeho úloha v embryonálnom vývoji je zatiaľ nejasná. Apelín ovplyvňuje krvné cievy a obehový systém, no jeho úlohu v reprodukcii a vývoji organizmu je potrebné ešte preskúmať. Visfatín sa podieľa na regulácii rastu svalov, metabolizmu, príjmu potravy a reprodukčných funkcií. Existencia a funkcia niektorých druhov adipokínov v kuracom embryu je v súčasnosti stále otázná a je predmetom ďalšieho výskumu.

**Kľúčové slová:** adipokíny, tukové tkanivo, leptín, chemerín, adiponektín

### **Summary**

The chicken model represents a suitable environment for investigating adipokines and understanding their interrelationships and functions in the organism. Adiponectin is one of the most studied adipokines and acts as a negative regulator of obesity in birds. Another important adipokine is leptin, but its function in the bird organism is still a subject of research. Chemerin is mainly involved in the control of oxidative stress, and although it is known to be found in the ovaries of birds, its role in embryonic development is still unclear. Apelin affects blood vessels and the circulatory system, but its role in the reproduction and development of the organism still needs to be investigated. Visfatin is involved in the regulation of muscle growth, metabolism, food intake and reproductive functions. The existence and function of some types



of adipokines in the chicken embryo is currently still questionable and is the subject of further research.

**Key words:** adipokines, adipose tissue, leptin, chemerin, adiponectin

## Úvod

Tukové tkanivo je voľné spojivé tkanivo, ktoré sa delí na dva typy, t.j. biele a hnedé tukové tkanivo, ktoré sa odlišujú farbou, tvarom, veľkosťou a vnútrobunkovou štruktúrou (Richard et al. 2020). Biele tukové tkanivo (WAT) je dôležitým priestorom tvorby adipokínov a je základným kameňom homeostázy energetického metabolizmu. Vtáčim genómom chýba charakteristický gén pre hnedé adipocyty a táto vlastnosť robí z vtákov ideálny zvierací model na štúdium WAT v neprítomnosti hnedých adipocytov (Bernardi et al. 2021). Adipocyty sú klasifikované na základe ich sekrečného pôvodu, diferenciácie, distribúcie a bunkových charakteristík (Chaudhry et al. 2023), čo z nich robí potenciálny terapeutický cieľ na nové stratégie farmakologickej liečby ako aj diagnostické nástroje (Bernardi et al. 2021).

## Prehľad vybraných adipokínov u vtákov

### Adiponektín

Gén adiponektínu kurčiat kóduje polypeptid s 240 aminokyselinami (30kDa). Kuracia cDNA adiponektínu je zo 65-68% homolónna s cDNA rôznych cicavčích adiponektínov. Gén adiponektínu je okrem tukového tkaniva exprimovaný aj v pečeni, diencefale, prednej hypofýze, obličkách, vaječníkoch, slezine a kostrovom svale (Bernardi et al. 2021). Plazmatické hladiny adiponektínu sú nižšie u 8-týždňových kurčiat, ktoré majú viac hmoty brušného tukového vankúša v pomere k telesnej hmotnosti ako u 4-týždňových kurčiat, čo naznačuje, že adipozita alebo vek ovplyvňujú plazmatické hladiny adiponektínu u kurčiat (Mellouk et al. 2018). Aminokyselinové zloženie adiponektínových receptorov AdipoR1 a AdipoR2 je na 91 % a 82 % podobné ako u cicavčích verzíí. Rovnako ako u cicavcov, väzba adiponektínu u kurčiat spúšťa mnohé signálne dráhy, vrátane AMPK, MAPK, aktivovaného p38, ERK1/2 a PAR alfa. Tieto dráhy sú spojené s metabolickými funkciami, ako je uvoľňovanie inzulínu, inhibícia syntézy lipidov, absorpcia glukózy a reprodukčné procesy. U kurčiat je adiponektín nevyhnutným negatívnym regulátorom obezity (Bernardi et al. 2021).

### Apelín

U kuracích embryí apelín reguluje vývoj srdca a obehového systému, angiogenézu a tvorbu

krvných ciev. Vaječníky sliepok obsahujú aj apelínové signálne dráhy, ktoré sú dôležité pri tvorbe vajec. Žiaľ, v súčasnosti nie sú v literatúre žiadne ďalšie informácie týkajúce sa expresie apelínu a jeho receptora v reprodukčnom systéme vtákov (Bernardi et al. 2023).

### **Leptín**

Biele tukové tkanivo vylučuje a produkuje leptín, ktorý je nevyhnutný pre kontrolu energetického metabolizmu, príjmu potravy a telesnej hmotnosti (Ge et al. 2018). Až donedávna bol kurací leptínový polypeptid nedetekovateľný v krvi čo vyvolalo otázku o jeho prítomnosti v periférnej cirkulácii (Bernardi et al. 2021). Ukázalo sa, že vtáčie LEP proteíny zdieľajú iba 26–30 % identitu s ľudským LEP (Mellouk et al. 2018). V súčasnosti nie je známe ako fungujú molekulárne dráhy prenosu signálu sprostredkované LEP-R v adipocytoch. Knockdown LEP-R u kurčiat ovplyvňuje expresiu mRNA génov spojených s metabolizmom mastných kyselín, ako je CPT1 (karnitín palmitoyltransferáza 1) a gény zapojené do prenosu signálu, ako sú JAK2, STAT3 a SOCS3 (Bernardi et al. 2021). Nedávna štúdia navyše nepreukázala žiadny vplyv kuracieho leptínového peptidu na príjem potravy alebo správanie, čo naznačuje, že kurací leptín nie je dostatočný na sprostredkovanie účinkov na chuť do jedla v mozgu (Sims et al. 2017). Úloha leptínu vo vtáčích druhoch je však stále nejasná a je potrebné vykonať ďalšie štúdie (Bernardi et al. 2021).

### **Chemérín**

Chemérín je adipózný cytokín, ktorý bol predtým známy ako tazaroténom indukovaný gén 2 (TIG2) a proteín odpovedajúci na receptor kyseliny retinovej 2 (RARRES2). U rôznych druhov vtákov sa chemérín a jeho receptory exprimujú v periférnych tkanivách a ovariálnych bunkách (Mellouk et al. 2018). Na rozdiel od cicavcov je plazmatický chemérín u moriek a kurčiat spojený skôr s chudnutím ako s výkrmom a môže zohrávať úlohu pri kontrole oxidačného stresu u vtákov. Bolo preukázané, že chemérín a jeho receptor sú prítomné vo vaječníkoch vtáčích druhov. Aj keď kuracie embryo obsahuje aj chemérínový systém, jeho funkcia v embryonálnom vývoji je v súčasnosti nejasná (Bernardi et al. 2021).

### **Visfatín**

Kurací visfatínový proteín má vysokú podobnosť s aminokyselinovými sekvenciami ľudí (94 %), hlodavcov (94 %) a iných agronomických druhov (94 %) (Mellouk et al. 2018). mRNA visfatínu sa nachádza v mozgu, srdci, čreve, obličkách, pečeni, pľúcach, svaloch a tiež v

tukovom tkanive (Bernardi et al. 2021). U vtákov je úloha visfatínu stále nepreskúmaná, ale na základe jeho vysokej expresie vo svaloch, môžeme predpokladať, že môže pôsobiť ako myokín (Li et al. 2017). Visfatín sa taktiež podieľa na regulácii rastu svalov, metabolizmu, príjmu potravy a reprodukčných funkcií. Jeho centrálna injekcia u kurčiat vyvolala zvýšenie príjmu potravy, čo naznačuje, že je silným orexigénnym faktorom. Okrem toho doplnenie kuracieho krmiva kyselinou chenodeoxycholovou vyvolalo zníženie príjmu krmiva a telesnej hmotnosti spojené so znížením expresie visfatínu v pečeni, čo naznačuje jeho potenciálnu úlohu v lipogenéze pečene. Visfatín pôsobí aj v reprodukčných tkanivách, ako sú ovariálne (bunky *theca* a granulózové bunky) a bunky semenníkov (Sertolihov bunky, Leydigove bunky a spermie). Presnejšie povedané, visfatín inhibuje produkciu progesterónu indukovanú IGF1 v granulóznych bunkách sliepok a jeho hladiny proteínu v semenníkoch a plazme sa zvyšujú u dospelých v porovnaní s prepupertálnymi kurčatami, čo naznačuje potenciálnu úlohu pri regulácii produkcie testosterónu (Mellouk et al. 2018).

## Záver

Adipokíny sú bioaktívne molekuly, ktoré majú rôzne účinky na zdravie a choroby. Hrajú dôležitú úlohu pri regulácii metabolizmu, zápalu, imunity, kardiovaskulárnych funkcií a rakoviny. Typ a množstvo adipokínov produkovaných tukovým tkanivom závisí od typu adipocytov, ich veľkosti, počtu, umiestnenia a interakcie s inými bunkami (Clemente-Suaréz et al. 2023). Adipokíny sú teda sľubnými kandidátmi pre nové stratégie farmakologickej liečby aj ako diagnostické nástroje. V porovnaní s cicavcami vykazujú vtáky niekoľko jedinečných fyziologických vlastností, ktoré z nich robia zaujímavý model pre porovnávacie štúdie endokrinné kontroly metabolizmu, adipozity a reprodukčných funkcií.

## Literatúra

1. Bernardi O et al. (2021) Adipokines in metabolic and reproductive functions in birds: An overview of current knowns and unknowns. *Molecular and reproductive functions in birds* 534
2. Bernardi O et al. (2023) Adipokines expression in reproductive tract, egg white and embryonic annexes in hen. *Poultry Science* 102
3. Clemente-Suaréz VJ et al. (2023) The Role of Adipokines in Health and Disease. *Biomedicines* 11
4. Ge T et al. (2018) Leptin in depression: a potential therapeutic target. *Cell death and disease* 9
5. Li Z et al. (2017) Characterization of the visfatin gene and its expression pattern and effect on 3T3-L1 adipocyte differentiation in chickens. *Gene*. 632: 16-24
6. Mellouk N, Ramé C, Barbe A, Grandhaye J, Froment P, Dupont J (2018) Chicken Is a Useful Model to Investigate the Role of Adipokines in Metabolic and Reproductive Diseases. *Int J Endocrinol*. 2018: 4579734
7. Richard AJ et al. (2020) Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. *Endotext*
8. Sims W, Yi J, Cline M, Gilbert ER (2017) Central injection of a synthetic chicken partial leptin peptide does not affect food intake in chicks. *Neuroscience Letters*. 656: 165-168

Táto práca bola podporená grantovom *KEGA č. 004UVLF-4/2023* a *VEGA 1/0373/24*.

# BIOKOMPOZITY S PRÍDAVKOM MEDU PRE REGENERÁCIU KOSTÍ

## BIOCOMPOSITE CEMENT WITH HONEY FOR BONE REGENERATION

Radoslava Štulajterová<sup>1</sup>, Ľubomír Medvecký<sup>1</sup>, Mária Giretová<sup>1</sup>, Tibor Sopčák<sup>1</sup>,  
Pavína Jevinová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Divízia funkčných a hybridných systémov, Ústav materiálového výskumu SAV, v.v.i.,  
Watsonova 47, Košice

<sup>2</sup>Katedra hygieny, technológie a bezpečnosti potravín, UVLF Komenského 73, Košice  
*rstulajterova@saske.sk*

### Súhrn

Biocementy na báze zmesi fosforečnan vápenatý/monetit (TTCPM) s prídavkom medu boli pripravené zmiešaním práškovej a medovej zložky v koncentrácii medu (do 10 hmotn.%) . Proces tuhnutia cementov nebol ovplyvnený prídavkom medu a čas tuhnutia ~ 4 minúty zodpovedal rýchlo tuhúcim kalciumfosfátovým cementom (CPC). Zmes cementového prášku sa úplne transformovala na deficitný nanohydroxyapatit po 24 hodinách tvrdnutia v simulovanej telovej tekutine (SBF). Tlaková pevnosť cementov s medom sa znižovala s obsahom medu v cimente. Antibakteriálne aktivity boli zistené pre cementy s medovými roztokmi na *Escherichia coli*, pričom veľmi nízke antibakteriálne aktivity boli zistené pre *Staphylococcus aureus* pre všetky cementy. Bola overená zvýšená antioxidačná inhibičná aktivita kompozitných extraktov. Testovanie cytotoxicity *in vitro* potvrdilo necytotoxickú povahu extraktov cementov s medom. Pozitívny synergický účinok medu a CPC na bioaktivitu cementov potvrdzuje, že by tieto kompozity mohli byť vhodnými terapeutickými kandidátmi pri liečbe kostných defektov.

**Kľúčové slová:** biokompozit, med, mechanické vlastnosti, mikroštruktúra, cytotoxicita

### Summary

Honey-containing calcium phosphate/monetite (TTCPM) based biocements were prepared by mixing the powder and honey components with honey concentration ( $\leq 10$  wt%). The setting process of the cements was not affected by the addition of honey, and the setting time of ~4 minutes corresponded to fast-setting calcium phosphate cements (CPC). The cement powder

mixture was completely transformed into calcium deficient nanohydroxyapatite (nHA) after 24 h of hardening in simulated body fluid (SBF). The compressive strength of the cements with honey decreased with the honey content in the cement. Antibacterial activities were detected for the cements with honey solutions against *Escherichia coli*, while very low antibacterial activities were detected for all cements against *Staphylococcus aureus*. The increased antioxidant inhibitory activity of the composite extracts was verified. In vitro cytotoxicity testing confirmed the non-cytotoxic nature of the honey cement extracts. The positive synergistic effect of honey and CPC on the bioactivity of the cements confirms that these composites could be potential therapeutic candidates for the treatment of bone defects.

**Key words:** biocomposite, honey, mechanical properties, microstructure, cytotoxicity

## Úvod

Kostné defekty (>2 cm v priemere u ľudí) sa nedajú spontánne opraviť reparačnými mechanizmami a potrebujú pomoc zvonku vo forme štepov alebo opory (scaffolds) s príslušnými biologickými a mechanickými vlastnosťami (najlepšie doplnené o bunky a rastové faktory) (1,2). Na svete sa ročne vykonajú takmer 2 milióny kostných štepov. Žiadny „scaffold“ sa však nepovažuje za najlepšieho kandidáta na hojenie veľkých kostných defektov, pretože hojenie kostného tkaniva je ovplyvnené vekom pacienta, jeho životným štýlom a celkovým zdravotným stavom (3). Kalciumfosfátové cementy (CPCs) patria do skupiny biomateriálov, ktoré sa vyznačujú vynikajúcou biokompatibilitou a osteokonduktivitou, necytotoxicitou a bioresorpciou, čo ich predurčuje na možné využitie v ľudskom organizme na opravu a náhradu kostí (4). CPC vo všeobecnosti pozostávajú z práškovej a tekutej zložky, ktoré sa zmiešajú na vytvorenie pasty, ktorá má schopnosť sa prispôbiť tvaru kostného defektu (5). Tento kalciumfosfátový cement je zložený zo zmesi zásaditého fosforečnanu vápenatého (TTCP) a kyslého brushitu, resp. monetitu (DCPA), ktoré sa počas tuhnutia cementu transformujú na nanokryštalický kalcium-deficitný hydroxyapatit (CDHA). CDHA je chemicky a štruktúrne podobný minerálnemu zloženiu kosti. Med obsahuje viac ako 200 látok a je jednou z najkomplexnejších prírodných potravín (6). Zistilo sa, že med stimuluje hojenie rán a popálenín a je účinný aj pri liečbe infikovaných rán (7). Cieľom tejto práce bolo preskúmať a vyhodnotiť vlastnosti inovatívneho kompozitného cementu na báze TTCP/monetit s prídavkom medu, kde fosforečnan vápenatý podporujú bioaktivitu buniek prostredníctvom vápnikových a fosforečnanových iónov a na druhej strane vplyv medu na vlastnosti cementu a jeho interakciu

s bunkami. V práci bol skúmaný vplyv prídavku medu (dva druhy medu) na proces tuhnutia, mikroštruktúru, mechanické a antibakteriálne vlastnosti a in vitro cytotoxicitu cementov.

## **Materiál a metódy**

### **Príprava práškovej cementovej zmesi a cementovej pasty**

Prášková zmes fosforečnan vápenatý/monetit cement (molárny pomer Ca/P = 1,67) sa syntetizovala in situ zmiešaním fosforečnanu vápenatého (TTCP) so zriedeným etanolovým roztokom kyseliny ortofosforečnej. Konečná prášková zmes bola zložená z TTCP a monetitu (DCPA) v ekvimolárnom pomere. Ako kvapalná zložka na prípravu cementových pást sa použil 2 % roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, v ktorom boli rozpustené aj medy. Boli použité dva druhy lekárskeho medu, na báze manuky (Activon<sup>®</sup>, lekársky stupeň) a gaštanový med (Vivamel<sup>®</sup>, lekársky stupeň). Ich obsahy v tekutej zložke boli 5 a 10 hmotn. %, pomer prášku ku kvapaline (P/L) bol 2. Cementy pripravené s 5 a 10 hmotn. % medu v tekutej zložke boli označené ako M5, V5, resp. M10 a V10.

### **Charakterizácia mikroštruktúry, čas tuhnutia a mechanické vlastnosti**

Pevnosť v tlaku (CS) cementov bola meraná na univerzálnom testovacom stroji (LR5K Plus, Lloyd Instruments Ltd.). Vzorky boli pripravené z cementových pást vtlačených do valcovej formy (6 mm D × 12 mm H), následne boli vytvrdzované v 100% vlhkosti pri 37 °C a namáčané v simulovanej telovej tekutine (SBF) pri 37 °C/7 dní. Fázové zloženie vzoriek bolo charakterizované pomocou röntgenovej difrakčnej analýzy (RTG) a FTIR spektroskopie. Mikroštruktúra cementov bola pozorovaná pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM). Morfológia častíc fosforečnanu vápenatého v cementoch bola analyzovaná pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM).

Konečné časy tuhnutia (ST) cementových pást boli stanovené pomocou Vicatovho zariadenia so záťažou 400 g (podľa normy ISO 1566). Zmeny v koncentrácii vápenatých a fosforečnanových iónov uvoľnených z cementov počas namáčania cementových vzoriek v roztoku SBF pri 37 °C (400 mg/15 ml roztoku) sa analyzovali pomocou ICP (Horiba Activa) po filtrácii membránovým filtrom (PVDF, veľkosť pórov 45 μm, Millipore), pri časoch namáčania 0, 2, 4, 6, 24, 48 a 168 h.

### **In vitro testovanie cytotoxicity extraktov**

Hustota, distribúcia a morfológia buniek sa hodnotili po 2 dňoch kultivácie pomocou živého /

mŕtveho fluorescenčného farbenia s použitím invertovaného optického fluorescenčného mikroskopu (Leica DM IL LED).

Na stanovenie cytotoxicity extraktov boli bunky MC3T3E1 resuspendované v kultivačnom médiu a hustota buniek bola upravená na  $1,0 \times 10^5$  buniek /ml vo fľaštičke. Cementové pasty boli ponorené do kultivačného média (0,2 g/ml kultivačného média) (podľa ISO 10993-12:2012) (8) na 24 hodín pri 37 °C. Následne sa kultivačné médium v jamkách nahradilo 100 µl 100 % extraktu. Všetky experimenty sa uskutočnili 3x a bunky v jamkách s kompletným kultivačným médiom bez extraktu sa považovali za negatívnu kontrolu (NC). Po 24 hodinách kultivácie boli extrakty nahradené čerstvým kultivačným médiom a bola vyhodnotená in vitro cytotoxicita (ISO 10993-5: 2009) (9). Stanovenie dlhodobej cytotoxicity cementovo-medových pást sa uskutočnilo po 7 a 14 dňoch kultivácie MSC potkanov.

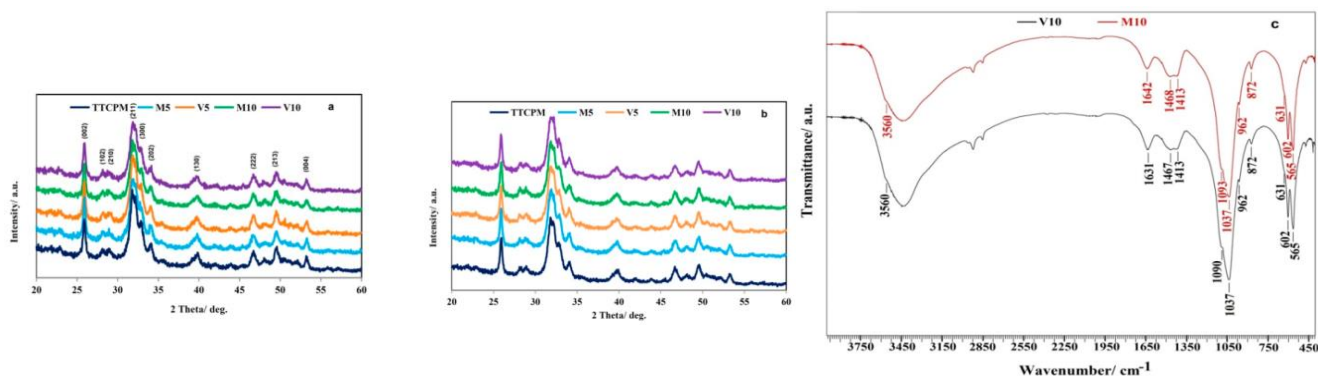
### **Antibakteriálna aktivita vzoriek cementu a medu**

Antibakteriálna aktivita vzoriek cementu s medom bola skúmaná pomocou dvoch bakteriálnych kmeňov: Gram-negatívnej *Escherichia coli* ATCC 11303 a Gram-pozitívneho *Staphylococcus aureus* CCM 5776 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika). Testované vzorky boli použité vo formách: 1 ml neriedeného medu lekárskeho, 1 g cementovej pasty TTCPM, 1 g pasty V10 alebo M10. Pasty boli pripravené zo sterilných práškov a tekutín za aseptických podmienok. Ku každej čerstvo pripravenej vzorke sa pridali celkom 3 ml bakteriálnej suspenzie BHI bujónu a premiešali sa. BHI bujón (3 ml) so *S. aureus* a *E. coli* sa považoval za negatívnu kontrolu (NC), BHI bujón (3 ml) bez bakteriálnych kmeňov bol považovaný za slepý pokus. Vzorky baktérií sa kultivovali v inkubátore pri 37 °C počas 24 hodín. Po 30 minútach inkubácie pri 37 °C sa merala absorbancia formazanu metabolizovaného aktívnymi baktériami z tetrazólia pomocou UV-VIS spektrofotometra pri 490 nm (Shimadzu).

### **Výsledky**

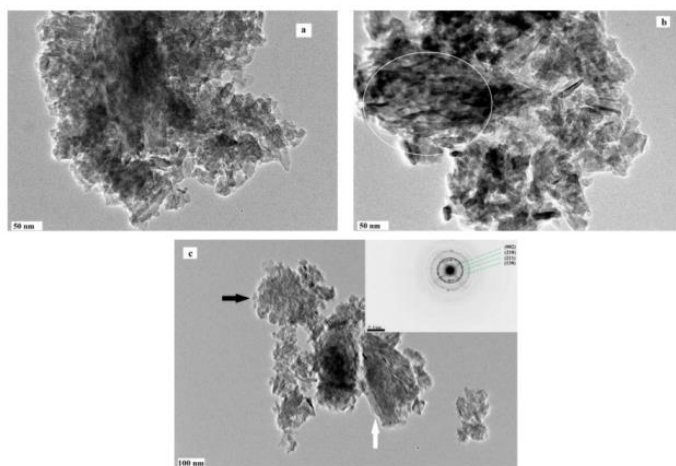
RTG spektrá cementov po vytvrdnutí počas 1 a 7 dní v SBF pri 37 °C sú znázornené na obrázku 1 a,b. Vo všetkých spektrách bol identifikovaný nanokryštalický hydroxyapatit (HAP) (PDF4 01-071-5048) a nenašli sa žiadne stopy po iných sekundárnych fázach. Chemická analýza finálnej nanohydroxyapatitovej fázy pomocou ICP preukázala tvorbu hydroxyapatitu s deficitom vápnika s molárnym pomerom Ca/P =  $1,64 \pm 0,02$ . Výsledky ukázali, že veľkosť kryštálov nezávisela od prídavku medu v cementoch a priemerná veľkosť kryštálov bola ~ 29

a 33 nm pre vytvrdnuté cementy po 1 a 7 dňoch. FTIR analýza cementov M10 a V10 po 7 dňoch namáčania v SBF pri 37 °C potvrdila výsledky RTG analýzy (Obr. 1c).



**Obr. 1** RTG spektrá TTCM a cementov s medom po 1 (a) a 7 (b) dňoch namáčania pri 37 °C v SBF po 24 hodinách bez vzniku sekundárnych fáz bez ohľadu na prídavok medu a FTIR spektrá (c) cementov M10 a V10 po 7 dňoch namáčania pri 37 °C v SBF.

Morfológia častíc HAP v cementoch M5 a M10 po 7 dňoch namáčania v SBF bola charakterizovaná pomocou TEM (Obr. 2). Ihlicovitá morfológia HAP prevládala v cementoch bez ohľadu na druh alebo koncentráciu medu v cementovej matrici. Okrem toho bol v cementoch pozorovaný nižší počet veľmi jemných sférických častíc HAP (veľkosť 5 – 10 nm). Zvyšky stien so stĺpcovito usporiadanými ihličkovitými časticami HAP pôvodne nájdenými v mikroštruktúrach okolo pórov možno nájsť na Obr. 2 c (aglomerát častíc veľkosti ~ 300 nm).



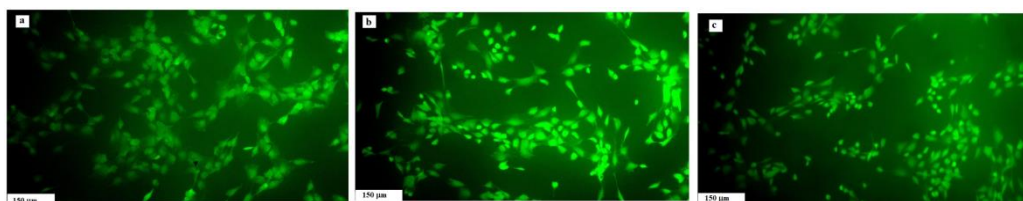
**Obr. 2** Morfológia HAP častíc v cementoch po 7 dňoch namáčania pri 37 °C v SBF : ( a ) – M5; ( b , c ) – M10; vybraná oblasť elektrónovej difrakcie podrobne s príslušnými čiarami HAP; biela šípka – časť steny póru so stĺpcovitými časticami HAP, čierna šípka – aglomerát veľmi jemných 10 – 20 nm guľovitých častíc HAP, biely ovál – aglomerát ihličkovitých častíc HAP.

Zdanlivá hustota vytvrdnutých cementov bola nezávislá od pridania medu do cementu a bola blízka  $52 \pm 2$  % teoretickej hustoty HAP. CS cementu TTCPM bola  $42 \pm 2$  MPa a s prídavkom



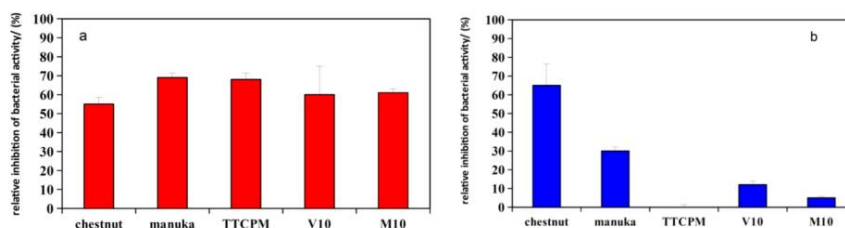
5 hmotn.% medu sa znížila na  $35 \pm 5$  MPa a  $26 \pm 4$  MPa pre cementy V10 a M10. Konečný čas tuhnutia TTCPM a cementov s medom bol  $4 \pm 1$  min, a nezávisel od typu použitého prídavku medu.

Obrázky získané našim farbením živých/mŕtvych buniek (Obr. 3a – c) jasne preukazujú dobrú adhéziu buniek MC3T3E1 na povrchu cementových vzoriek po 48 hodinách kultivácie, pretože sa nenašli žiadne mŕtve bunky. Hustota buniek a ich rozloženie na povrchoch boli pre cementy takmer identické, bunky boli dobre rozprestreté a čiastočne prepojené filopódiami, čo potvrdilo necytotoxickú povahu povrchov vzoriek, bez ohľadu na typ cementu.



**Obr. 3** Farbenie živých/mŕtvych buniek buniek MC3T3E1 na povrchu cementových vzoriek po 48 hodinnej kultivácii v cementových extraktoch (a – c) preukázalo dobrú adhéziu buniek na cementové povrchy bez pozorovania mŕtvych buniek.

Antibakteriálna aktivita pasty TTCP/med sa skúmala pomocou dvoch bakteriálnych kmeňov: *Escherichia coli* ako gramnegatívny kmeň a *Staphylococcus aureus* ako grampozitívny kmeň. *E. coli* bola citlivejšia na extrakty z cementu a tvrdnúcu kvapalinu s medom. V prípade *E. coli* predstavuje relatívna inhibícia bakteriálnej aktivity (RIA) všetkých testovaných vzoriek interval v rozsahu 55 – 70 % vo vzťahu k NC, čo je v kontraste s inhibíciou *S. Aureus*, kde RIA extraktov cementu V10 a M10 boli 12 a 5 % (štatisticky významný rozdiel,  $p < 0,05$ ), zatiaľ čo extrakt TTCPM mal takmer nulovú RIA. Tekuté zložky gaštanového a manukového medu mali RIA 55 a 70 % pre *E. Coli* (štatisticky významný rozdiel,  $p < 0,05$ ) a 65 a 30 % pre *S. Aureus* ( Obr. 4 a, b).



**Obr. 4** Relatívna inhibícia bakteriálnej aktivity (RIA) cementových extraktov pre *Escherichia coli* (a) a *Staphylococcus aureus* (b) vo vzorkách cementu

## Diskusia

V literatúre je len veľmi málo informácií o vplyve medu na materiálové charakteristiky alebo vlastnosti kalcium fosfátových cementov (CPC), ako aj na správanie sa osteoblastických buniek in vitro po pridaní medu k CPC. Medy obsahujú vysokú koncentráciu cukrov, najmä fruktózy a glukózy, čo bolo namerané v manukovom a gaštanovom mede (82, resp. 87 hmotn. % cukrov), pričom podiel iných účinných látok je v desatinách %. Tieto zlúčeniny môžu ovplyvňovať mikroštruktúru cementov s prídavkom medu. Tvorba ihličkovitých častíc HAP bola preukázaná po pridaní glukózy do reakčnej zmesi za alkalických podmienok pri 70 °C a výsledky ukázali, že vyššia teplota zrážania podporovala predĺžovanie a rast kryštálov HAP pozdĺž osi c (10). Na druhej strane, v roztokoch počas precipitácie hydroxyapatitu za neutrálnych podmienok sa preukázali stabilné komplexy medzi iónmi  $\text{Ca}^{2+}$  alebo fosfátovými iónmi a glukózou, čo spôsobilo zjemnenie častíc hydroxyapatitu. Po pridaní glukózy k čerstvo precipitovaným časticiam hydroxyapatitu sa preukázalo zjemnenie a zníženie veľkosti kryštálikov v smere osi c. Adsorbovaná glukóza pritom silno interagovala s OH skupinami v hydroxyapatite a naznačila sa tvorba hydroxidu vápenatého a uhličitanu vápenatého (11). Slabšia väzba medzi HAP aglomerátmi a cementovou maticou, ako aj adsorpcia rôznych organických látok na povrchoch častíc HAP pravdepodobne znižovala súdržnosť nanočastíc a celkovú pevnosť cementovej matrice, čo dokumentovalo pokles pevnosti v tlaku cementov s medmi. RIA pre *E. coli* boli takmer 50 – 60 % vo všetkých testovaných vzorkách. Z nášho porovnania, pridanie medu malo zdanlivo malý vplyv na RIA. Preto antibakteriálna aktivita cementov pre *E. coli* môže súvisieť s uvoľňovaním  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  počas transformácie cementu. Absolútne opačné výsledky boli zistené pre *S. aureus*, kde napriek tomu, že antimikrobiálna aktivita pre cement TTCPM bola veľmi nízka, cementy V10 a M10 mali hodnoty RIA štatisticky významne vyššie ako 0 ( $p < 0,05$ ), ale oveľa nižšie ako hodnoty RIA roztokov gaštanového alebo manukového medu (štatisticky významný rozdiel,  $p < 0,001$ ). Tieto výsledky poukazujú na priamy vplyv prídavku medu na antimikrobiálne vlastnosti cementov s ohľadom na *S. Aureus*, čo môže byť dôsledok množstva polyfenolov uvoľnených z cementov a koncentrácie metylglyoxalu alebo  $\text{H}_2\text{O}_2$  v extraktoch. Ukázalo sa, že manukový med má schopnosť potláčať meticilín-rezistentný *S. aureus* a má synergický účinok s antibiotikami, čím zlepšuje ich antimikrobiálne vlastnosti (12). Okrem toho má vyššiu antimikrobiálnu aktivitu proti grampozitívnym baktériám v porovnaní s gramnegatívnymi baktériami (*E. coli*). Pozitívny účinok medu v spojení s CPC sa prejavil aj vyššou in vitro osteogénnou aktivitou

buniek v extraktoch, pričom získaný kompozitný systém by mohol byť vhodný na opravu kostných defektov.

## Záver

Pripravil sa nový biocement na báze práškovej zmesi fosforečnan vápenatý/monetit s prídavkom medu, s cieľom zistiť vplyv medu na výsledné vlastnosti cementu. Skúmaním bolo zistené, že proces tuhnutia cementov nebol ovplyvnený pridaním tekutej zložky obsahujúcej med v necytotoxickkej koncentrácii (do 10 hmotn.%), a že doba tuhnutia približne 4 minúty zodpovedala rýchlo tuhnúcemu CPC. Pôvodná zmes fosforečnanového cementového prášku sa po 24 hodinách vytvrdzovania v SBF úplne transformovala na nanohydroxyapatit s deficitom vápnika. V cementoch s medom sa pozoroval rast dlhých ihličkovitých častíc nanohydroxyapatitu, ktoré obklopovali pôvodné častice fosforečnanu vápenatého. Tlaková pevnosť cementov s medom sa znižovala s obsahom medu v cemente. Antibakteriálna aktivita cementov s medom na *Escherichia coli* sa nelíšila od antibakteriálnej aktivity roztokov medu alebo cementu TTCPM, čo môže súvisieť s uvoľňovaním hydroxidu vápenatého počas premeny cementu. Vo všetkých cementoch sa však zistila veľmi nízka antibakteriálna aktivita na *Staphylococcus aureus*. V budúcnosti by sme chceli potvrdiť naše in vitro experimenty, ktoré naznačujú pozitívny vplyv medu s biocementom na hojenie kostných defektov, na zvieracích in vivo modeloch.

## Literatúra

1. Kageyama T, Akieda H, Sonoyama Y, Sato K, Yoshikawa H, Isono H, Hirota M, Kitajima H, Chun JS, Maruo S et al. (2023) Bone beads enveloped with vascular endothelial cells for bone regenerative medicine. *Acta Biomater* 165: 168-179
2. Wei S, Wang Y, Sun Y, Gong L, Dai X, Meng H, Xu W, Ma J, Hu Q, Ma X. et al. (2023) Biodegradable silk fibroin scaffold doped with mineralized collagen induces bone regeneration in rat cranial defects. *Int J Biol Macromol* 235: 123861
3. Veronesi F, Martini L, Giavaresi G, Fini M (2020) Bone regenerative medicine: Metatarsus defects in sheep to evaluate new therapeutic strategies for human long bone defect. A systematic review. *Injury* 51: 1457-1467
4. Carey LE, Xu HHK, Simon CG, Takagi S, Chow LC (2005) Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. *Biomaterials* 26: 5002-5014
5. Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD (2001) Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 58: 36-41
6. Valverde S, Ares AM, Elmore JS, Bernal J (2022) Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chem* 387: 132920
7. Abd-El Aal AM, El-Hadidy MR, El-Mashad NB, El-Sebaie AH (2007) Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Ann Burn Fire Disasters* 20: 83-88
8. ISO 10993-12 (2012) Biological Evaluation of Medical Devices-Part 12: Sample Preparation and Reference Materials. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland
9. ISO 10993-5:2009 (2009) Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland

10. Walsh D, Kingstone JL, Heywood BR, Mann S (1993) Influence of monosaccharides and related molecules on the morphology of hydroxyapatite. *J Cryst Growth* 133: 1-12
11. Murillo LM, Iessi IL, Quintino MP, Damasceno DC, Rodrigues CG (2020) Glucose is an active chemical agent on degradation of hydroxyapatite nanostructure. *Mater Chem Phys* 240: 122166
12. Alvarez-Suarez JM, Gasparini M, Forbes-Hernández TY, Mazzoni L, Giampieri F (2014) The composition and biological activity of honey: A focus on manuka honey. *Foods* 3: 420-432

Táto práca bola podporená projektom *APVV 20-0184* a projektom *VEGA 2/0032/23*.

# VLASTNOSTI DISKU V TEMPOROMANDIBULÁRNOM KLÍBE U OŠÍPANÝCH

## PROPERTIES OF THE DISC IN THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT IN PIGS

**Jana Teleky, Veronika Šimaiová**

Katedra morfológických disciplín, UVLF, Komenského 73, Košice

*jana.teleky@uvlf.sk*

### Súhrn

Temporomandibulárny (TMK) kĺb je integrálnou súčasťou žuvacieho orgánu a zabezpečuje spojenie sánky s nepohyblivými kosťami lebky. Ide o obojstranný kĺb, ktorý pracuje synchronne. Súčasťou kĺbu je kĺbová platnička (*discus articularis*) fibrózneho charakteru, ktorej úlohou je minimalizovať nesúlad medzi sánkovým kondylom a spánkovou kosťou. Účelom tejto práce bolo posúdiť disk u domácej ošípanej morfometricky a pomocou kompresného testu.

**Kľúčové slová:** spánkovosánkový kĺb, *discus articularis*, kompresný test, morfometria

### Summary

The temporomandibular joint is an integral part of the chewing organ and ensures the connection of the mandible with immobile skull bones. It is a double-sided joint that works synchronously. Part of this joint is a fibrocartilaginous disc, whose role is to minimize the incongruity between the articulation of the temporal bone and mandibular condyle. The purpose of this study was to evaluate the disc morphometrically and compression test was done.

**Key words:** temporomandibular joint disc, temporomandibular joint, compression, pigs

### Úvod

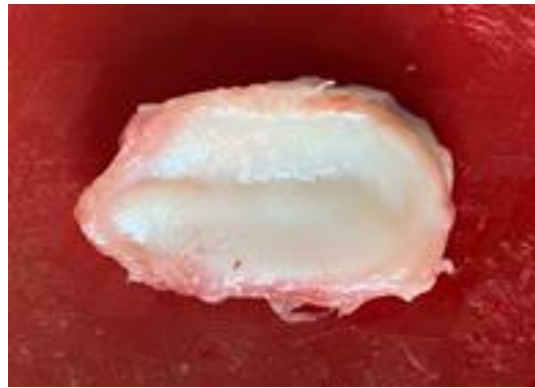
Temporomandibulárny kĺb sa nachádza v tvárovej oblasti lebky, v *regio articulationis temporomandibularis*, rostrálne od oblasti ušnice, v žuvacej oblasti (*regio masseterica*). Kĺb predstavuje integrálnu súčasť žuvacieho orgánu a zabezpečuje spojenie sánky s nepohyblivými lebečnými kosťami (2). Ide o obojstranný kĺb, ktorý funguje synchronne. Zložitosť kĺbu

spočíva v jeho stavbe. Na tvorbe kĺbu sa podieľa *processus condylaris capitis mandibulae* a *fossa mandibulae pars squamosis ossis temporalis* spolu s *tuberculum articulare* spánkovej kosti. Kĺbová jamka a hlavica sú pokryté väzivovou chrupkou, ktorá je bohatá na kolagén. Súčasťou kĺbu je kĺbový disk (*discus articularis*), ktorého úlohou je kompenzovať tlakové sily pôsobiace na kĺbové plochy, zároveň minimalizuje nesúlad medzi nimi (3). Disk a synoviálna tekutina vo vnútri kĺbového púzdra majú za úlohu zabezpečovať hladké pohyby v kĺbe. Disk je priečne oválny, v strednej zóne veľmi tenký a na obvode hrubý cca 5 mm. Je z veľkej časti avaskulárny, vysoko vláknitý a obsahuje nízky podiel glykózaminoglykánov a vysoký podiel kolagénu. Disk rozdeľuje kĺbovú dutinu na dve samostatné dutiny: hornú a dolnú. Kolaterálne väzy disku a kĺbové púzdro udržiavajú disk v správnej polohe, tiež obmedzujú jeho pohyb v súlade s pohybom sánky. Tieto štruktúry sú zodpovedné tiež za dynamickú a statickú stabilizáciu disku (4). Cieľom práce bolo posúdiť morfológické a mechanické vlastnosti kĺbových diskov u domácich ošípaných.

## **Materiál a metódy**

V práci sme použili 16 hláv čerstvo zabitých ošípaných plemena Slovenská biela ušľachtilá, ktoré nám poskytol bitúnok v Košiciach. Vek ošípaných bol 6 mesiacov, zvieratá boli samičieho pohlavia a všetky boli klinicky zdravé. Za účelom získania diskov TMK pre ich následné morfometrické a mechanické posúdenie, bola vykonaná anatomická pitva. Pomocou skalpela sme viedli rez od prístredného očného kútika až po ústny kútik. Ďalší rez bol vedený od toho istého ústneho kútika smerom ventrálnym, ku okraju sánky. Posledný rez sme vykonali od bočného očného kútika ku ušnici. Takýmto spôsobom sme si ohraničili priestor, ktorý sme pomocou pinzety a skalpela zbavili kože, podkožia a tuku. Ďalej sme odstránili všetky svaly nachádzajúce sa na bočnej ploche sánky. Pre lepší prístup k spánkovosánkovej kĺbu, sme odstránili svaly v okolí jarmového oblúka a pomocou veľkých nožníc sme odstránili časť jarmovej kosti a jarmového oblúka. Pomocou skalpela a pinzety sme odstránili príslušné svaly, aby oblasť kĺbu bola čo najmenej nimi ohraničená a najlepšie prístupná. Po vykĺbení TMK sa nám bez deformácie oddelil disk od hlavice sánky. Už pri tomto kroku sme vedeli prvotne posúdiť vzhľad disku a jeho uchytenie v kĺbe. Pomocou skalpela a pinzety sme opatrne vypreparovali disk spolu s okolitým tkanivom. Následne sme okolité tkanivo dôkladne odstránili, aby nám zostal samotný disk. *Discus articularis* sme posudzovali adspekčne, keď sme hodnotili jeho tvar, štruktúru, farbu a metricky sme zisťovali jeho šírkové a dĺžkové parametre. Číselné údaje sme získali digitálnym posuvným meradlom s rozsahom merania 0-

200 mm a presnosťou  $\pm 0,01$  mm. Pre zvýšenie presnosti sme každý rozmer zmerali trikrát a z týchto meraní sme spravili aritmetický priemer. Získané hodnoty sme vyjadrovali v milimetroch. Po morfometrickom posúdení sme disky vložili do 50ml Falcon skúmaviek (na 72 hodín), s roztokom PBS - fosfátový pufer, čo je fosfátový roztok s 0,15 M NaCl. Disky v PBS roztoku si uchovali svoje prirodzené vlastnosti, ktoré boli potrebné na vykonanie mechanického posúdenia pomocou kompresnej skúšky. Kompresnú skúšku jednotlivých diskov sme vykonali pomocou špeciálneho prístroja *Inspect 5 table blue* na Katedre biomedicínskeho inžinierstva a merania, Strojníckej fakulty Technickej univerzity v Košiciach, kde sme medzi dve kompresné platničky vložili disk a následne po jeho kompresii nám počítač vygeneroval jednotlivé hodnoty konkrétneho disku, potrebné ku vyhotoveniu grafu. Prístroj sme nastavili na rýchlosť kompresie 2 mm za 1 minútu s počiatočnou silou 5 N a maximálnou (konečnou) silou 5000 N.

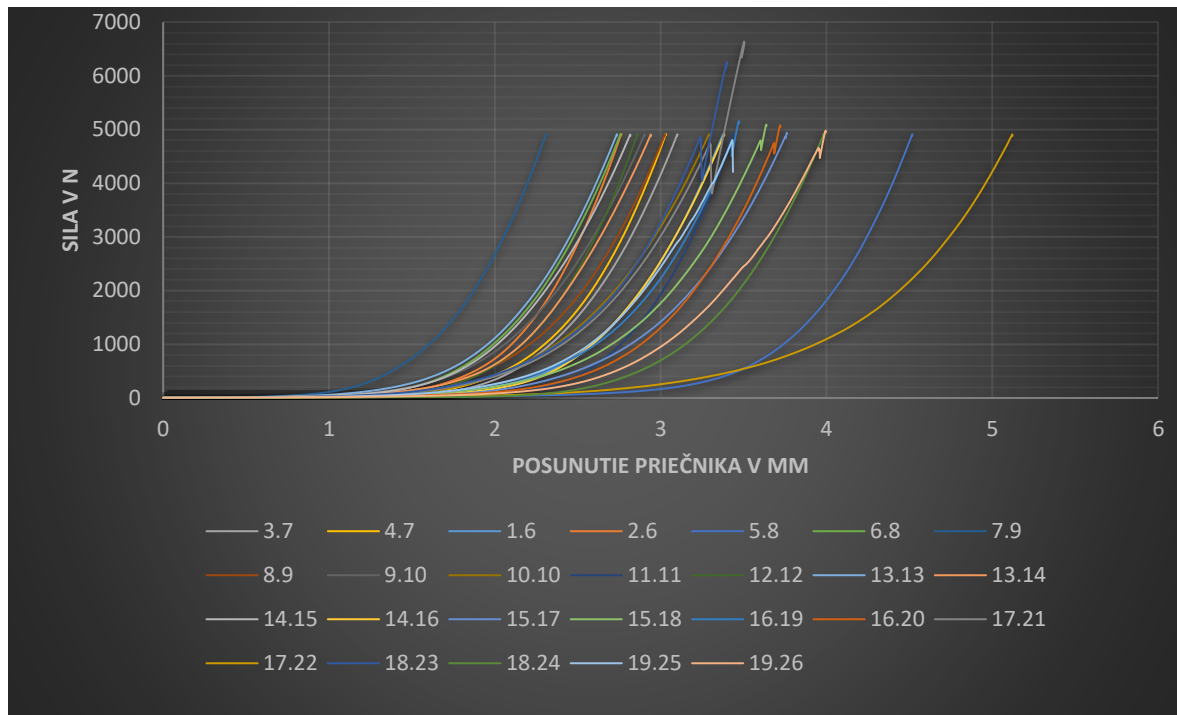


**Obr. 1** Discus articularis u svine domácej

## Výsledky a diskusia

Výsledkom adspekčného posúdenia 32 kĺbových diskov bolo, že *discus articularis* sa javil ako tuhá, elastická, bledoružová až biela štruktúra. Tvar disku bol z dorzálneho pohľadu oválny, z bočného pohľadu bikonkávny, ako to uvádzajú vo svojej práci aj Herring (1) a Vapniarsky a kol. (5). Meraním diskov sme zistili, že priemerná hodnota pravého disku v sledovanej skupine zvierat bola 28,04 mm x 16,86 mm (šírka x dĺžka), priemerná hodnota ľavého disku bola 29,03 mm x 18,36 mm. Lokalizácia disku bola na oboch stranách rovnaká, t.j. centrálna v temporomandibulárnom kĺbe. Lowe a kol. (3) merali veľkosti diskov u 3, 6 a 9 mesačných ošípaných. Priemerné hodnoty veľkosti diskov u 6 mesačných ošípaných udávajú  $27,0 \pm 0,1$  mm (šírka) a  $15,0 \pm 0,2$  mm (dĺžka). Kompresnou skúškou sme sledovali mechanickú vlastnosť diskov, pevnosť. Rozpätie hodnôt stlačenia diskov u domácej ošípanej sa pohyboval od 2,30957 mm do 5,121114 mm. Priebeh väčšiny kriviek bol v norme (Graf. 1), prvá krivka č. 7.9

a posledné dve krivky č. 5.8 a č. 17.22 sa priebehom odlišujú od normy. Presnú príčinu týchto odchýlok si vysvetľujeme tak, že príslušné disky (krivka č. 7.9) boli v porovnaní s ostatnými krehkejšie a disky (krivka č. 5.8 a č. 17.22) boli zase pevnejšie. Lowe a kol. (3) vo svojej práci tiež sledovali pevnosť diskov pomocou kompresie. Výsledky ich kompresných meraní ukázali, že disky v sledovanej skupine zvierat vykazovali rovnakú pevnosť, a teda neboli štatisticky významné.



**Graf 1.** Pevnosť discus articularis u svine domácej stanovovaná kompresnou skúškou

## Záver

Výsledky našej práce ukazujú, že metrické rozdiely medzi diskami ošápaných na pravej a ľavej strane lebky nie sú štatisticky významné. Pevnosť diskov stanovovaná kompresnou skúškou sa pohybuje v rozpätí od 2,30957 mm do 5,121114 mm. Mierne odchýlky sme zaznamenali len pri 3 diskoch.

## Literatúra

1. Herring WS, Decker JD, Liu ZD et al. (2002) Temporomandibular joint in miniature pigs: anatomy, cell replication, and relation to loading. *Anat Rec* (266)3:152
2. Kijak E, Margielewicz J, Pihut M (2020) Identification of biomechanical properties of temporomandibular discs. *Pain research and management* <https://www.hindawi.com/journals/prm/2020/6032832/>
3. Lowe J et al. (2018) Properties of the temporomandibular joint in growing pigs. *J Biomech Eng* 140(7)
4. Murphy MK et al. (2013) Temporomandibular disorders: A review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28(6)
5. Vapniarsky N et al. (2017) The Yucatan minipig temporomandibular joint disc structure function relationships support its suitability for human comparative studies. *Tissue engineering* 23(11)



# PERSPEKTÍVY TECHNOLOGIE ORGÁN NA ČIPE

## THE PROSPECTS OF ORGAN-ON-A-CHIP TECHNOLOGY

Zuzana Tirpáková<sup>1</sup>, Lenka Luptáková<sup>1</sup>, Eva Petrovová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>2</sup>Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v

Košiciach

*zuzana.tirpakova@student.uvlf.sk*

### Súhrn

Predklinické štúdie závisia na tradičných bunkových kultúrach a animálnych modeloch, fyziológia ktorých nezodpovedá ľudskej fyziológii. Výsledkom je vysoká neúspešnosť liečiv testovaných v klinických štúdiách. Technológia orgán na čipe kombinuje poznatky mikrofluidného inžinierstva, bunkovej biológie a materiálnej vedy za účelom simulácie *in vivo* bunkového a tkanivového prostredia v *in vitro* podmienkach. Cieľom technológie orgán na čipe je poskytnutie rýchlejších a relevantnejších výsledkov pri testovaní liečiv a tvorba patofyziologických modelov.

**Kľúčové slová:** Organ-on-a-Chip, alternatívne modely

### Summary

Preclinical studies depend on traditional cell cultures and animal models whose physiology does not correspond to human physiology. The result is a high rate of failure of drugs tested in clinical trials. The organ-on-a-chip technology combines the knowledge of microfluidic engineering, cell biology and material science in order to simulate the *in vivo* cellular and tissue environment in *in vitro* conditions. The goal of organ-on-a-chip technology is to provide faster and more relevant results in drug testing and the creation of pathophysiological models.

**Key words:** Organ-on-a-Chip, alternative models

### Úvod

Konvenčné metódy predklinického testovania liečiv závisia na bunkových kultúrach a animálnych modeloch. Tieto modely však plne nereprezentujú ľudskú fyziológiu.

Vývoj nových liečiv je finančne náročným procesom, navyše prechádza niekoľkými náročnými fázami testovania v predklinických a klinických štúdiách. Približne 59% liečiv, ktoré vstúpia do procesu klinických štúdií pokročia do fázy II, do fázy III postúpi 21% a iba 10% liečiv získa povolenie regulačných autorít. Medzi hlavné zlyhania liečiv v klinických štúdiách sa zaradzuje výskyt nežiaducich účinkov, ako aj nedostatočná klinická účinnosť. Animálne modely využívané v predklinických štúdiách poskytujú nedostatočnú predikciu efektivity a bezpečnosti liečiv (7). Orgán na čipe (OOC) predstavuje potenciálnu alternatívu testovania na animálnych modeloch, ich úlohou je napodobňovať vlastnosti a fyziologické funkcie komplexných tkanív alebo orgánov v *in vitro* podmienkach (5).

Platforma predstavuje mikrofluidné zariadenie napodobňujúce fyziológiu a funkcionality ľudských orgánov na čipe za využitia ľudských buniek (3). Integruje štruktúrnu a fyziologickú diverzitu ľudských tkanív a orgánových jednotiek, teda aspekty, ktoré tradičné bunkové kultúry nie sú na fyziologickej úrovni schopné reprodukovať (5). OOC pozostáva z mikrofluidných kanálov, komôrok pre bunkové kultúry a komponentov napodobňujúcich *in vivo* mikroprostredie (3). Mikrofluidné zariadenia sú vyrobené z opticky transparentných materiálov (2). Transparentnosť zariadenia dovoľuje vizualizáciu počas celého procesu testovania liečiva na bunkovej úrovni. Možnosti OOC poskytujú možnosti pre diagnostické a liečebné prístupy špecifické pre pacienta (5). Hlavnou štruktúrou je mikrokanál s kontrolovaným prietokom pre rast buniek – bunkových kultúr, primárnych buniek, kmeňových buniek (9). OOC navyše poskytuje možnosť zakomponovania jedného alebo viacerých orgánových štruktúr v rámci jedného zariadenia (5). Technológia prepája poznatky bunkovej biológie, inžinierstva, materiálnej vedy (2). OOC systém predstavuje platformu pre štúdium fyziologických procesov, vývoja liečiv a ich testovania (2).

### **Mikrofluidika**

Mikrofluidika zabezpečuje manipuláciu s tekutinami za kontrolovaného prietoku. Vnútorň priemer aspoň jedného z komponentov pritom musí byť menší ako 1mm. Vďaka integrácii mikrofluidiky je možné skúmať aj vlastnosti tekutín v iných ako makroskopických systémoch. Zmenšujúce sa rozmery systému majú vplyv na sily pôsobiace na tekutinu, napríklad z gravitácie na povrchové napätie. Integrácia mikrofluidiky v rámci čipu zabezpečuje modelovanie fyziologického prostredia prostredníctvom kontrolovaného prietoku kvapaliny a teda zásobovanie živinami (6).

## **Materiály**

Výber materiálu pre výrobu čipu závisí od niekoľkých faktorov ako funkcionalita, stratégia výroby či biokompatibilita. Väčšina OOC zariadení je vyrobená z kombinácie materiálov. Najčastejšie využívané materiály sú polydimetylsiloxán, sklo, polymetylmetakrylát alebo polykarbonát. Každý materiál má svoje výhody a nevýhody ako priepustnosť plynov, optická transparentnosť, elasticita, biokompatibilita, absorpcia malých molekúl, permeabilita, či cenová efektívnosť. Výber sa väčšinou zameriava na funkcionalitu, prístup a vývojovú fázu produktu (4).

## **Aplikácia**

Aplikácia OOC má pomerne široký záber aplikácie v predklinických štúdiách a personalizovanej medicíne. Doterajší progres priniesol pľúca na čipe, obličku na čipe alebo pečeň na čipe. Renálne disfunkcie sú častým výsledkom virálnych infekcií, ktorých patogenéza však zatiaľ zostáva neodhalená. Wang a kol. (8) indukovali obličkovú disfunkciu na čipe prostredníctvom Pseudorabies vírusu, pričom sledoval regulačnú disfunkciu erektoleptov (8).

Ahn a kol. predstavil endometrium na čipe s tromi vrstvami – epitelom, stromom a krvnými cievami. Model endometria dokázal reagovať na hormonálne zmeny, pričom vykazoval kľúčové vlastnosti proliferatívnej a sekrečnej fázy menštruačného cyklu. Využitý bol pri testovaní efektivity a bezpečnosti antikoncepcie. Predpokladá sa, že vytvorené zariadenie možno uplatniť nielen pri testovaní liečiv a toxicity, ale aj ako pokročilý in vitro model implantácie embrya a v oblasti personalizovanej medicíny (1).

## **Záver**

Technológia OOC je zaujímavým konceptom najmä pre farmaceutické spoločnosti. Ideou je zaradenie reprezentačných orgánových štruktúr celého ľudského tela do jedného mikrofluidného zariadenia. Navyše, možné je aj integrovanie funkčných biosenzorov na analýzu výsledkov priamo na čipe. Napriek tomu, že ku dosiahnutiu vysoko funkčných OOC vedie ešte dlhá cesta, široké možnosti využitia, ktoré technológia ponúka predpovedajú, že si v oblasti farmakológie a personalizovanej medicíny nájdu svoje miesto.

## **Literatúra**

1. Ahn J, Yoon MJ, Hong SH, Cha, Lee D, Koo HS, Ko, JE, Lee J, Oh S, Jeon NL, Kang YJ (2021). Three-dimensional microengineered vascularised endometrium-on-a-chip. *Human Reproduction* 36(10), 2720-2731
2. Busek M, Aizenshtadt A, Amirolo-Martinez M, Delon L, Krauss S (2022) Academic User View: Organ-on-a-Chip Technology. *Biosensors*, 12(2), 126

3. Ko J, Park D, Lee S, Gumuscu B, Jeon N (2022) Engineering Organ-on-a-Chip to Accelerate Translational Research. *Micromachines*, 13(8), 1200
4. Leung CM, de Haan P, Ronaldson-Bouchard K, Kim GA, Ko J, Rho HS, Chen Z, Habibovic P, Jeon NL, Takayama S, Shuler ML, Vunjak-Novakovic G, Frey O, Verpoorte E, Toh YC (2022) A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 33.
5. RN, Aggarwal A, Sravani AB, Mallya P, Lewis S (2023) Organ-On-A-Chip: An Emerging Research Platform. *Organogenesis*, 19(1)
6. Saorin G, Caligiuri I, Rizzolio F (2023) Microfluidic organoids-on-a-chip: The future of human models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 144, 41-54
7. Vargas R, Medina L, Egurbide A (2021). Organ-on-a-Chip systems for new drugs development. *ADMET and DMPK*, 9(2), 111-141
8. Wang J, Wang C, Xu N, Liu ZF, Pang DW, Zhang ZL (2019) A virus-induced kidney disease model based on organ-on-a-chip: Pathogenesis exploration of virus-related renal dysfunctions. *Biomaterials*, 219, 119367.
9. Zhu J, Ji L, Chen Y, Li H, Huang M, Dai Z, Wang J, Xiang D, Fu G, Lei Z, Chu X (2023). Organoids and organs-on-chips: insights into predicting the efficacy of systemic treatment in colorectal cancer. *Cell Death Discovery*, 9(1), 72

Táto práca bola podporená grantovou agentúrou *VEGA 1/0074/24* a *KEGA 004UVLF-4/2023*.

# VÝSLEDKY VYŠETRENÍ INFERTILNÝCH ŽIEN S PREDPOKLADANOU PATOLÓGIU VAJÍČKOVODOV

## RESULTS OF EXAMINATIONS OF INFERTILE WOMEN WITH SUSPECTED FALLOPIAN TUBE PATHOLOGY

Jana Trubianska<sup>1</sup>, Maksym Kurasov<sup>2</sup>, Tomáš Holan<sup>3</sup>, Štefan Polák<sup>4</sup>, **Ladislav Guller<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>OK ambulancia, a.s., M. R. Štefánika 27, Martin

<sup>2</sup>II. gynekologicko- pôrodnická klinika SZU, FN s poliklinikou F. D. Roosevelta, Nám. L.

Svobodu 1, 975 17 Banská Bystrica

<sup>3</sup>Nefro-dializačné centrum, s.r.o., Priehradka 10638/18A, Martin

<sup>4</sup>Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Špitálska 24, Bratislava,

*ladislav.guller@fmed.uniba.sk*

### Súhrn

Neplodnosť je choroba reprodukčného systému charakterizovaná zlyhaním klinickej gravidity po 12 alebo viac mesiacoch pravidelného a nechráneného pohlavného styku. Neplodnosť môže byť primárna alebo sekundárna. Primárna neplodnosť je neschopnosť dosiahnuť spontánne klinické tehotenstvo. Sekundárna neplodnosť je definovaná ako neschopnosť dosiahnuť spontánne klinické tehotenstvo po predchádzajúcej spontánnej gravidite. Vyhodnotili sme hysterosalpingografické (HSG) vyšetrenia 49 žien vo veku 24 – 42 rokov. HSG bola vykonaná za antiseptických podmienok pomocou štandardných postupov. Z celkového počtu bolo 28 pacientiek (57,16 %) bez nálezu a 21 (42,84 %) malo patologický nález. 5 nálezov bolo na úrovni maternice (24 % z nálezov). 16 žien malo patologický nález na úrovni vajíčovodov (76 % patológií), z toho u 15 (93,75 z patologických zmien vajíčovodov) boli okluzívne zmeny. Proximálna oklúzia v oblasti *pars uterina* a *isthmus tubae uterinae* tvorila viac ako polovicu prípadov (53,33 %) okluzívnych zmien vajíčovodov. Patológia vajíčovodov je jednou z hlavných príčin neplodnosti žien.

**Kľúčové slová:** neplodnosť, vajíčovody, tuba uterina, patológia, oklúzia, hysterosalpingografia, HSG

## Summary

Infertility is a disease of the reproductive system characterized by the failure to establish a clinical pregnancy after 12 or more months of regular and unprotected sexual intercourse. Infertility can be primary or secondary. Primary infertility is inability to achieve a spontaneous clinical pregnancy. Secondary infertility is defined as the inability to achieve a spontaneous clinical pregnancy following a previous spontaneous pregnancy. We evaluated hysterosalpingographic (HSG) examinations of 49 women 24-42 years old. HSG was performed under antiseptic conditions using standard procedures. There were 28 patients (57,16 %) that had no findings and 21 (42,84 %) had pathological findings. 5 findings were at the level of the uterus (24 % of pathological findings). 16 women had pathological findings at the level of fallopian tubes (76 % of pathologies), of which 15 (93,75 % of pathological changes in fallopian tubes) had occlusive changes. Proximal occlusion in the area of pars uterina and isthmus tubae uterinae accounted for more than half of the cases (53.33%) of occlusive changes in fallopian tubes. Fallopian tube pathology is one of the causes of female infertility.

**Key words:** infertility, fallopian tubes, uterine tube, pathology, occlusion, hysterosalpingography, HSG

## Úvod

Neplodnosť je kritickým problémom pre páry v plodnom veku na celom svete a problém neplodnosti bol vždy primárnou výzvou pre reprodukčnú medicínu. V dôsledku zmien životného štýlu a prítomnosti rôznych enviromentálnych stresov sa výskyt neplodnosti významne zvýšil a stal sa tretím najzávažnejším ochorením po rakovine a srdcovocievnych chorobách (11, 3). Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) je neplodnosť špecifickým chorobným subjektom a vzhľadom na jej výskyt by sa mala považovať za sociálnu chorobu (2). Literatúra na túto tému však neposkytuje jednotnú a stručnú definíciu. Jedna z najnovších definícií navrhnutá WHO a Medzinárodným výborom pre monitorovanie technológie asistovanej reprodukcie (ICMART) sa klinická neplodnosť považuje za „chorobu“ reprodukčného systému definovanú nedosiahnutím klinického tehotenstva po 12 a viac mesiacoch pravidelného nechráneného pohlavného styku pre ženy do 35 rokov a po šiestich a viac mesiacoch pre ženy nad 35 rokov (5, 16).

Neplodnosť môže byť primárna alebo sekundárna. Primárna infertilita je, keď žena nie je schopná a v minulosti ani nebola schopná vynosiť dieťa, a to alebo z dôvodu neschopnosti otehotnieť, alebo z dôvodu neschopnosti vynosiť a porodiť živo narodené dieťa. Sekundárna

infertilita je, keď žena taktiež nie je schopná vynosiť dieťa, a to alebo z dôvodu neschopnosti otehotnieť, alebo z dôvodu neschopnosti vynosiť a porodiť živo narodené dieťa, ale v minulosti mala aspoň jedno predchádzajúce tehotenstvo resp. porodila živé dieťa (6, 10).

Sekundárna neplodnosť je najbežnejšou formou ženskej neplodnosti na celom svete, najmä v rozvojových krajinách, často v dôsledku infekcií reprodukčného traktu (15).

Z morfológicko-funkčného hľadiska hovoríme o infertilita na úrovni reprodukčných orgánov, tzv. „pravá neplodnosť“. Majoritné zastúpenie v 32 % prípadov tu zohrávajú faktory neplodnosti na úrovni vaječníkov. Neplodnosť na úrovni vajíčkovodov (tzv. „tubárna neplodnosť“) predstavuje 25 – 30 % prípadov ženskej neplodnosti, nasledovaná endometriózou, faktormi na úrovni maternice spoločne s abnormalitami cervix uteri. V menšom počte prípadov porucha vzniká na úrovni iného ako reprodukčného systému, hovoríme o tzv. „nepravej neplodnosti“. Sú to predovšetkým stavy spojené s endokrinnou patológiou v úzkom vzťahu s poruchami na úrovni hypothalamu, hypofýzy či štítnej žľazy a nadobličiek, ďalej psychické príčiny, ako bolo dokázané poslednými štúdiami a iné (8, 10).

Široké spektrum porúch môže interferovať s vhodnou funkciou vajíčkovodov. Blokáda tuba uterina môže byť buď vrodená malformácia alebo získané abnormality, ktoré zahŕňajú kŕče, polypy, hlienové zátky, infekciu, zjazvenie, endometriózu alebo iné faktory (1). Patológia vajíčkovodov sa môže vyskytnúť v ktorejkoľvek časti trubice – v proximálnej, strednej, distálnej alebo na viacerých miestach – a môže byť prechodná (obštrukcia) alebo trvalá (oklúzia) a jednostranná alebo obojstranná. (7).

Obštrukcia je časovo obmedzený proces, ktorý môže byť reverzibilný. Mechanické príčiny obštrukcie vajíčkovodov zahŕňajú kŕče alebo upchatie amorfným materiálom (napr hlienové zátky). Oklúzia vajíčkovodov je trvalé organické poškodenie, ako je salpingitis isthmica nodosa (SIN), tuberkulóza a hydrosalpinx (7, 13).

## **Materiál a metódy**

Získali sme výsledky 49 neplodných žien vo veku od 24 do 42 rokov, ktoré podstúpili hysterosalpingografické vyšetrenie v období od januára 2018 do decembra 2018 na II. gynekologicko- pôrodníckej klinike SZU vo Fakultnej nemocnici s poliklinikou F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici.

Hysterosalpingografia (HSG) je metódou fluoroskopického vyšetrenia, v rámci ktorého sa prostredníctvom kanyly zavádza pošvovou cestou, konkrétne cez cervikálny kanál do dutiny

maternice kontrastná látka, vďaka ktorej je pod RTG kontrolou vizualizovaná dutina maternice, vajíčkovody a z časti aj dutina malej panvy.

HSG bola vykonaná za aseptických podmienok pomocou štandardných postupov odporúčaných ACOG (American College of Obstetrics and Gynaecology). Postup napríklad opísali Onwuchekwa a Oriji (12).

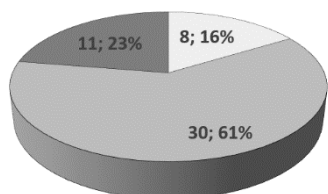
## Výsledky

### a/ Veková a klinická charakteristika pacientiek

V súbore 49 infertilných žien patrilo 8 pacientiek do vekovej kategórie 24 – 29 rokov, 30 pacientiek bolo vo vekovej kategórii 30 – 36 rokov a 11 vo veku 37 – 42 rokov (Graf 1). Z nich bolo 39 primárne infertilných (79,6 %) a 10 žien bolo sekundárne infertilných (20,4 %). V celom vyšetřovanom súbore bolo vyšetřenie pomerne dobre tolerované, len malý počet pacientiek pociťoval slabú bolesť v oblasti podbruška a objavilo sa slabé vaginálne krvácanie (4 % prípadov).

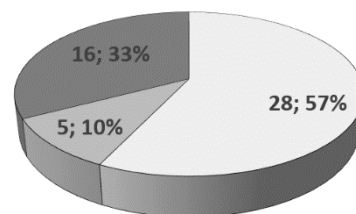
### b/ Hysterosalpingografické nálezy

V sledovanom súbore z celkového počtu 49 HSG vyšetření bolo 28 pacientiek bez patologického nálezu (57,14 %). V 21 prípadoch (42,84 %) sme zaznamenali patologický nález, z toho u 5 pacientiek boli nálezy na úrovni maternice (24 % z patologických nálezov, resp. 10,2 % zo všetkých vyšetření). Najčastejšie to boli kongenitálne abnormality – jedno/dvojrohá maternica alebo hypoplázia maternice a nález fibroidov v dutine maternice. U 16 pacientiek (76 % z patologických nálezov resp. 32,66 % prípadov zo sledovaného súboru) sa jednalo o abnormality na úrovni vajíčkovodov (Graf 2).



□ 23 - 29 □ 30 - 36 ■ 37 - 42

**Graf 1.** Počty pacientiek a ich percentuálne vyjadrenie v jednotlivých vekových skupinách vyšetřovaného súboru



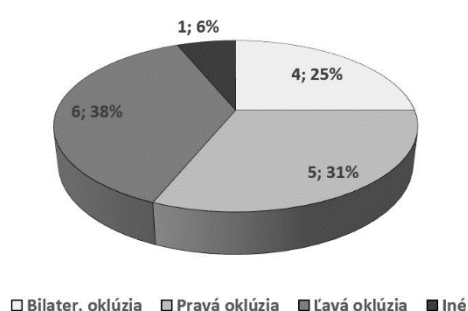
□ Bez nálezu □ Maternica ■ Vajíčkovody

**Graf 2.** Výskyt patologických nálezov vo vyšetřovanom súbore a ich percentuálne vyjadrenie

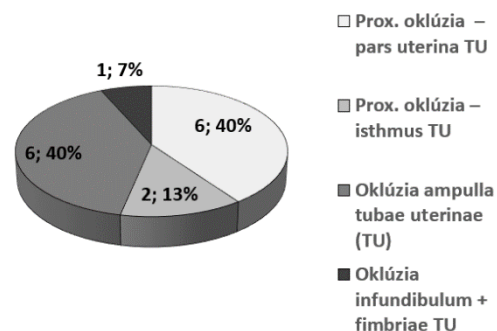


Najčastejšie pozorovanými zmenami v anatómii vajíčovodov boli okluzívne zmeny, ktoré tvorili celkovo 93,75 % (n = 15) prípadov, pričom oklúzia bola najčastejšie pozorovaná v oblasti ľavého vajíčovodu (n = 6; 37,5 %), potom v oblasti pravého vajíčovodu (n = 5; 31 %) a ešte menej bilaterálna oklúzia (n = 4; 25 %). Len v jednom prípade (6,25 %) bol nález tvorený inou ako okluzívnou zmenou. V tomto prípade to bol záchyt zrastov v malej panve (Graf 3).

Pri okluzívných zmenách vajíčovodov sa jednalo vo viac ako polovici prípadov (53,33 %, n = 8) o proximálnu oklúziu v oblasti *pars uterina* a *isthmus tubae uterinae*. Pomerne častým nálezom je aj oklúzia *ampullae tubae uterinae* (40 %, n = 6). Len v 1 prípade (6,67 %) bola oklúzia pozorovaná distálne na úrovni *infundibulum a fimbriae tubae uterinae* (Graf 4).



**Graf 3.** Výskyt patologických nálezov vajíčovodov vo vyšetrovanom súbore a ich percentuálne vyjadrenie



**Graf 4.** Lokalizácia oklúzií vajíčovodov vo vyšetrovanom súbore a ich percentuálne vyjadrenie

## Diskusia

Systém vnútorných pohlavných orgánov ženy je sústavou orgánov, ktoré zabezpečujú procesy ľudskej reprodukcie. Patologické nálezy na vnútorných pohlavných orgánoch sú potenciou príčinou neplodnosti. Pri patológiách vajíčovodov, ktoré vedú k morfolologickej zmene ich stavby, sa rozvíja tzv. tubárna infertilita.

V našej práci sme zistili patologický nález u 21 pacientiek, čo je 42,84 % pacientiek z vyšetrovaného súboru. Z toho boli 10,2 % (24 % z patologických nálezov) nálezy na úrovni maternice a 32,66 % (76 % z patologických nálezov) na úrovni vajíčovodov. Najčastejším nálezom bola oklúzia v oblasti ľavého vajíčovodu (37,5 %) a najmenej nálezov bolo z bilaterálnej oklúzie vajíčovodov (25 %). V rámci vajíčovodu bola vo viac ako polovici prípadov oklúzia proximálnej časti vajíčovodov – v *pars uterina* a *isthmus tubae uterinae* (spolu 53,3 %), častým nálezom bola aj oklúzia *ampullae tubae uterinae* (40 %). K podobným výsledkom dospeli Joshi a Joshi (9) v populácii indických žien, ktorí evidovali medzi patologickými nálezmi 20 % nálezov na úrovni maternice, 76 % na úrovni tuba uterina a 4 %

rôzne iné príčiny. Porovnateľne Onwuchekwa a Oriji (12) zistili patológiu vajíčkodov u 27,6 % vyšetovaných žien, čo je len o trochu menej ako my.

Najčastejším nálezom v práci Onwuchekwu a Orijiho (12) bola unilaterálna oklúzia vľavo (31% ), čo je v korelácii s našimi výsledkami (37,25%). Joshi a Joshi (9) pozorovali podobne ako my oklúziu v proximálnych častiach vajíčkodov, ale na rozdiel od nás zistili najčastejšie bilaterálnu oklúziu (35 %), potom oklúziu pravého vajíčkodov (11 %) a nakoniec oklúziu ľavého vajíčkodov. Poslední autori zistili tiež ako príčinu nepriechodnosti vajíčkodov v 30 % prípadoch peritubálne adhézie, my sme zrasty v malej panve pozorovali iba v 6,25 % prípadoch nepriechodnosti vajíčkodov.

Toufig so spoluautormi (14) zistili u 24 % pacientiek abnormality maternice a 42,7 % abnormality týkajúce sa vajíčkodov. Pri vajíčkodoch zistili u 14,9 % pacientiek bilaterálnu blokádu a pri 23 % unilaterálnu blokádu. Rozdielne výsledky od našich zistili pri lokalizácii blokády na vajíčkodode, pretože viacej blokád zistili na distálnom konci (23 %) vajíčkodov ako na proximálnom konci (16,2 %).

Pri porovnaní výsledkov našej práce a prác iných autorov z rôznych lokalít sveta možno konštatovať čiastočne koreláciu, čiastočne nie. Ako tiež vyplýva z literatúry, je nevyhnutné študovať príčiny neplodnosti lokálne, pretože sa líšia v závislosti od charakteristík miestnej populácie (faktory socio-kultúrne a hygienické - napríklad aj vyšší výskyt sexuálne prenosných chorôb, životaspráva a celkový zdravotný stav) a podľa toho sa riadiť (4, 14). Naše výsledky boli ovplyvnené tým, že k vyšetreniu boli indikované len neplodné pacientky a väčšinou pri podozrení na patológiu vajíčkodov.

## **Záver**

HSG je diagnostický test používaný na posúdenie priechodnosti vajíčkodov. Táto metóda poskytuje cenné informácie o vnútornej anatómii a vnútornej architektúre vajíčkodov, ktoré sa berú do úvahy pri diferenciálnej diagnostike patologických stavov, správnej intervencii a primeranej liečbe. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že zo všetkých pacientiek malo 42,8 % patologický nález a z tohto počtu malo 24 % nález na úrovni maternice a 76% malo nález na úrovni vajíčkodov. Proximálna oklúzia v oblasti *pars uterina* a *isthmus tubae uterinae* tvorila viac ako polovicu prípadov (53,33 %) okluzívnych zmien vajíčkodov. Patológia vajíčkodov je potenciálne hlavnou príčinou neplodnosti žien.

## **Literatúra**

1. Al-Jaroudi D, Aldughayyim AA, Alshamry WS et al. (2018) Hysterosalpingogram findings among subfertile women undergoing assisted reproductive technology. Int J Womens Health 10: 431-436.

2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 22(6): 1506-12.
3. Cong J, Li P, Zheng L, Tan J (2016) Prevalence and Risk Factors of Infertility at a Rural Site of Northern China. *PLoS One*, 11(5): e0155563
4. Deshpande PS, Gupta AS (2019) Causes of factors causing infertility in a public health facility. *J Hum Reprod Sci* 12(4): 287-293
5. El-Kharoubi AF (2023) Tubal Pathologies and Fertility Outcomes: A Review. *Cureus* 15(5): e3888
6. Ghaffari F (2018) The role of conception type in the definition of primary and secondary infertility. *Int J Reprod BioMed* 16(5): 355-356
7. Honoré GM, Holden AE, Schenken RS (1999) Pathophysiology and management of proximal tubal blockage. *Fertil Steril* 71(5): 785-95
8. Jose-Miller AB, Boyden JW, Frey KA (2007) Infertility. *Am Family Physician* 75(6): 849-56
9. Joshi A, Joshi R (2016) Evidence based incidence of tubal factor in secondary infertility as detected by hysterosalpingography in western Maharashtra. *J Evid Based Med Healthc* 3(43): 2125-2130
10. Lobo RA, Gershenson DM, Lentz GM (2017) *Comprehensive gynecology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 968 p
11. Macaluso M, Wright-Schnapp TJ, Chandra A, et al. (2010) A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertil Steril* 93(1): 16.e1-10
12. Onwuchekwa CR, Oriji VK (2017) Hysterosalpingographic (HSG) Pattern of Infertility in Women of Reproductive Age. *J Hum Reprod Sci* 10(3): 178-184
13. Sulak PJ, Letterie GS, Coddington CC, et al. (1987) Histology of proximal tubal occlusion. *Fertil Steril* 48(3): 437-440
14. Toufig H, Benameur T, Twfieg ME, Omer H, El-Musharaf T (2020) Evaluation of hysterosalpingographic findings among patients presenting with infertility. *Saudi J Biol Sci* 27(11): 2876-2882
15. Vander Borgh M, Wyns Ch (2018) Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 62:2-10
16. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. (2017) The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Hum Reprod* 32(9): 1786-180

# VYUŽITIE ULTRASONOGRAFIE PRI REALIZÁCII INTERVENČNÝCH VÝKONOV NA VYBRANÝCH SVALOCH RAMENA

## ULTRASOUND IMAGING IN THE IMPLEMENTATION OF INTERVENTIONAL PROCEDURES ON SELECTED ARM MUSCLES

**Marko Vrzgula<sup>1</sup>**, Lenka Josayová<sup>2</sup>, Květuše Lovásová<sup>1</sup>, Ingrid Hodorová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav anatómie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Neurologická klinika, Lekárska fakulta UPJŠ a UNLP, Košice

*marko.vrzgula@upjs.sk*

### **Súhrn**

Výsledný efekt každej intervenčnej procedúry závisí najmä na presnosti jej realizácie. Intramuskulárna aplikácia botulotoxínu sa používa v liečbe spasticity, najčastejšie po cievnej mozgovej príhode. Na zvýšenie terapeutického efektu a elimináciu nežiadúcich komplikácií je nevyhnutné exaktné umiestnenie injekčnej ihly v svalu. Ultrasonografia umožňuje neinvazívne zobrazenie svalu a jeho okolia, ale aj zobrazenie samotnej ihly, čím výrazne zdokonaľuje celý intervenčný postup. Na vybraných svaloch ramena sme anatomickou a ultrasonografickou štúdiou charakterizovali miesta optimálne na aplikáciu botulotoxínovej liečby. Svaly ramena sú typické relatívne častým výskytom rôznych anatomických variácií. Tieto môžu byť navyše spojené s alteráciou štandardného priebehu nervovo-cievnych štruktúr. Práve v takýchto prípadoch je ultrasonografická navigácia obzvlášť užitočná.

**Kľúčové slová:** botulotoxín, svaly ramena, spasticita, ultrasonografia

### **Summary**

The effectiveness of each interventional procedure ultimately relies on its precise implementation. Botulinum toxin is commonly administered intramuscularly to treat spasticity, most often after a stroke. Achieving optimal therapeutic outcomes and preventing complications necessitates precise needle placement within the muscle. Ultrasonography facilitates non-invasive imaging of the muscle and surrounding structures, including real-time visualization of the needle, thereby enhancing the entire interventional process. Our anatomical

and ultrasound study aimed to identify the optimal injection sites for botulinum toxin treatment on selected arm muscles. However, shoulder muscles often demonstrate anatomical variations that can impact the course of neurovascular structures. In such instances, ultrasound guidance proves particularly advantageous.

**Key words:** botulinum toxin, arm muscles, spasticity, ultrasonography

## Úvod

Ultrasonografia je zobrazovacia vyšetrovacia metóda, ktorá využíva odrazy ultrazvukových vln od rozhrania tkanív s rozdielnou akustickou impedanciou. Základnou ultrazvukovou modalitou, ktorá informuje o topograficko-anatomických vzťahoch je dynamické zobrazenie B-mód (Brightness mode), pri ktorom vzniká dvojrozmerný obraz zachytením veľkého množstva vedľa seba umiestnených odrazov, ktorým je v závislosti na intenzite odrazenej vlny priradený na monitore príslušný odtieň šedi. Pri vyšetrení sa získava dynamický obraz zobrazovaných častí ľudského tela v reálnom čase, čo dovoľuje zvoliť najvhodnejšiu rovinu zobrazenia. Ultrasonografia je v klinickej praxi predmetom trvalého záujmu najmä z dôvodu jej relatívne rýchlej dostupnosti, absencie ionizačného žiarenia a absolútnych kontraindikácií, ako aj z dôvodu neustáleho zdokonaľovania prístrojovej techniky. Okrem štandardnej diagnostiky rôznych ochorení sa uplatňuje aj pri realizácii rozličných intervenčných zákrokov ako sú napr. odber vzoriek na histopatologické vyšetrenie, aspirácia tekutiny, aplikácia regionálnej anestézie alebo intramuskulárna aplikácia botulotoxínu. Podávanie botulotoxínu priamo do svalu je metódou prvej voľby v liečbe fokálnej, multifokálnej a segmentálnej spasticity. Poskytuje úľavu od bolesti, znižuje mimovoľné pohyby a pomáha obnoviť pasívne aj aktívne funkcie svalu (6). Cieľom našej práce bolo určiť bezpečný prístup ako aj miesto podania botulotoxínu do m. biceps brachii, m. brachialis a m. triceps brachii pri terapii spasticity.

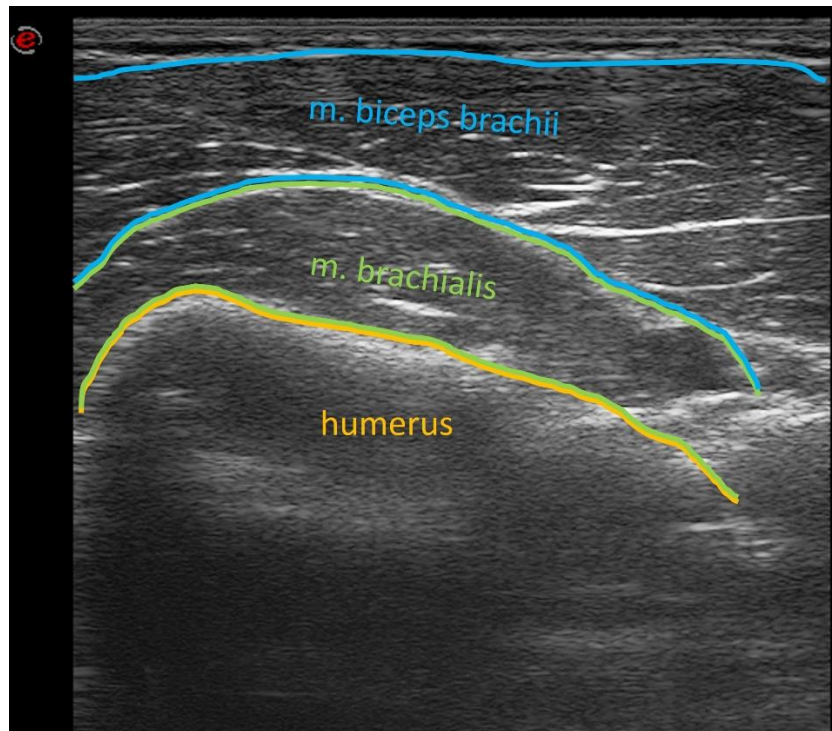
## Materiál a metodika

Štúdia sa uskutočnila na Lekárskej fakulte Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. Na Ústave anatómie bola vykonaná anatomická pitva svalov ramena (kadáver mužského pohlavia, 65 rokov, 176 cm) s detailným ozrejením topografických vzťahov v danej oblasti, bol sledovaný priebeh hlavných nervovo-cievnych štruktúr a boli odporúčané potenciálne vhodné prístupy a miesta na intramuskulárnu aplikáciu botulotoxínu. Na Neurologickej klinike prebehlo po podpísaní informovaného súhlasu ultrasonografické zobrazenie vybraných svalov ramena na zdravom dobrovoľníkovi (muž, 24 rokov, 175 cm), ktorý bol anamnesticky bez

traumatických a iných zmien horných končatín. Ultrasonografické skenovanie v sede z predného aj zadného prístupu bolo prevedené rádiológom a neurológom na ultrazvukovom prístroji Esaote - MyLabEight eXP. Bola použitá lineárna ultrazvuková sonda s frekvenciou 9 až 15 MHz a svaly boli zobrazené v celom rozsahu od ich odstupu po úpon v transverzálnej a sagitálnej rovine.

## **Výsledky**

Na základe anatomickej pitvy svalov ramena boli vytipované potenciálne vhodné miesta na intramuskulárnu aplikáciu botulotoxínu. V prípade m. biceps brachii bola doporučená aplikácia do spoločného bruška svalu v rozsahu strednej tretiny ramennej kosti prístupom spredu, kolmo na dlhú os hornej končatiny. V m. brachialis bola určená vhodná oblasť v jeho distálnej polovici, asi 3-4 cm nad lakt'ovou jamou, prístupom z boku, laterálne od bruška resp. úponovej šľachy m. biceps brachii, kolmo na dlhú os hornej končatiny. V m. triceps brachii bola navrhnutá ako vyhovujúca jeho stredná tretina, prístupom zozadu, kolmo na dlhú os ramennej kosti, približne v polovici jej dĺžky. Všetky tri svaly boli dobre prístupné ultrasonografickému zobrazeniu v celom rozsahu. Svalové vlákna boli usporiadané paralelne vedľa seba a zobrazovali sa ako tmavé (hypoechogénne) štruktúry, naopak fascie a väzivové septá boli svetlé (hyperechogénne). M. biceps brachii a m. brachialis boli vizualizované z predného prístupu, m. triceps brachii zozadu. Okrem samotných svalov boli sledované aj okolité štruktúry, t. j. cievy, nervy, kosti a podkožie. Následne bola ultrazvuková sonda cielene polohovaná do vyššie uvedených navrhovaných pozícií a bola zhodnotená nielen morfológia svalov v daných miestach, ale aj odporúčaný prístup do daných oblastí. Všetky tri svaly boli v daných lokalitách optimálne zobraziteľné a navrhované prístupy pod ultrasonografickou kontrolou boli vyhodnotené ako bezpečné a vyhovujúce.



**Obr. 1** Ultrasonografický obraz ventrálnych svalov ramena, USG sonda polohovaná v strede dĺžky ramennej kosti, prístup spredu, kolmo na dlhú os hornej končatiny.

## Diskusia

Svaly ramena tvoria jednu zo štyroch skupín svalov hornej končatiny. Prebiehajú okolo ramennej kosti, na ktorej čiastočne začínajú, niektoré z nich však odstupujú aj kranialnejšie od lopatky. Upínajú sa prevažne na kosti predlaktia tak, že premostujú lakťový kĺb. V tomto kĺbe vykonávajú flexiu alebo extenziu, podľa čoho sa delia do dvoch hlavných funkčných skupín. Skupina flexorov je lokalizovaná ventrálne. Patrí do nej povrchový m. biceps brachii a hlboký m. brachialis. Topograficky patrí do tejto skupiny aj m. coracobrachialis. Do skupiny extenzorov, ktorá sa nachádza dorzálne, patrí m. triceps brachii a malý, funkčne nevýznamný, m. anconeus. V literatúre boli popísané rozmanité anatomické variácie svalov ramena, týkali sa atypických miest odstupu a úponu, zmien v počte hláv, ale aj segmentácie alebo duplikácie jednotlivých svalov (2, 4, 5). Navyše, boli zaznamenané aj rozličné anatomické variácie nervovo-cievnych štruktúr hornej končatiny (1, 3).

Pri intramuskulárnej aplikácii botulotoxínu je potrebné podať ho presne do určeného svalu a nepoškodiť okolité štruktúry. Na dosiahnutie týchto cieľov sa používajú viaceré lokalizačné techniky ako palpácia a orientácia podľa typických anatomických bodov, elektromyografia, elektrická stimulácia a rôzne rádiologické modalít, príp. ich kombinácia. Všetky tieto metódy majú určité limitácie, v prípade ultrasonografickej navigácie sú potrebné aspoň základné

znalosti topografickej anatómie a vedomosti o princípoch ultrazvukového zobrazovania. Ultrasonografia má výhodu v tom, že umožňuje detailne lokalizovať sval a určiť jeho veľkosť, zásadná výhoda spočíva v možnosti priamo detegovať ihlu ako aj všetky štruktúry v jej okolí. Ultrasonografická vizualizácia je mimoriadne prospešná pri odhaľovaní svalových, ale aj nervovo-cievnych anatomických variácií pri plánovaní aj samotnom uskutočňovaní intervenčných procedúr.

## **Záver**

Ultrasonografické zobrazovanie jednotlivých štruktúr ľudského tela je bezpečnou metódou pri vykonávaní širokého spektra intervenčných výkonov. Anatomickou a ultrasonografickou štúdiou vybraných svalov ramena sme určili vhodné lokality ako aj prístupy pre intramuskulárnu aplikáciu botulotoxínu pri liečbe spasticity.

## **Literatúra**

1. Chakravarthi KK, Ks S, Venumadhav N, Sharma A, Kumar N (2014) Anatomical variations of brachial artery - its morphology, embryogenesis and clinical implications. *J Clin Diagn Res* 12: 17-20
2. Khandey S (2014) Morphology of brachialis m.: Variations and clinical significance. *Int J Anat Res* 2: 184-186
3. Nakatani T, Tanaka S, Mizukami S (1998) Bilateral four-headed biceps brachii muscles: The median nerve and brachial artery passing through a tunnel formed by a muscle slip. *Clin Anat* 11: 209-212
4. Pratik K, Ashwini C (2017) A study of variations of the triceps brachii muscle. *Indian J A Surg HNB* 4: 101-103
5. Rodríguez NM, Vázquez T, Choi D, Parkin I, Sañudo JR (2003) Supernumerary humeral heads of the biceps brachii muscle revisited. *Clin Anat* 16: 197-203
6. Wissel J, Camões-Barbosa A, Carda S, Hoad D, Jacinto J (2022) A practical guide to botulinum neurotoxin treatment of shoulder spasticity 2: Injection techniques, scales, and case studies. *Front Neurol* 13: 1022549



## **27. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ**

### **Miesto morfológie v súčasnej medicíne**

*Zborník vedeckých prác*

Zostavovatelia: doc. MUDr. Adriana Boleková, PhD.  
MVDr. Natália Hvizdošová, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach  
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2024  
Počet strán: 243  
Rozsah: 14,1 AH

DOI: <https://doi.org/10.33542/KMD-0313-5>  
ISBN 978-80-574-0313-5 (e-publikácia)

