

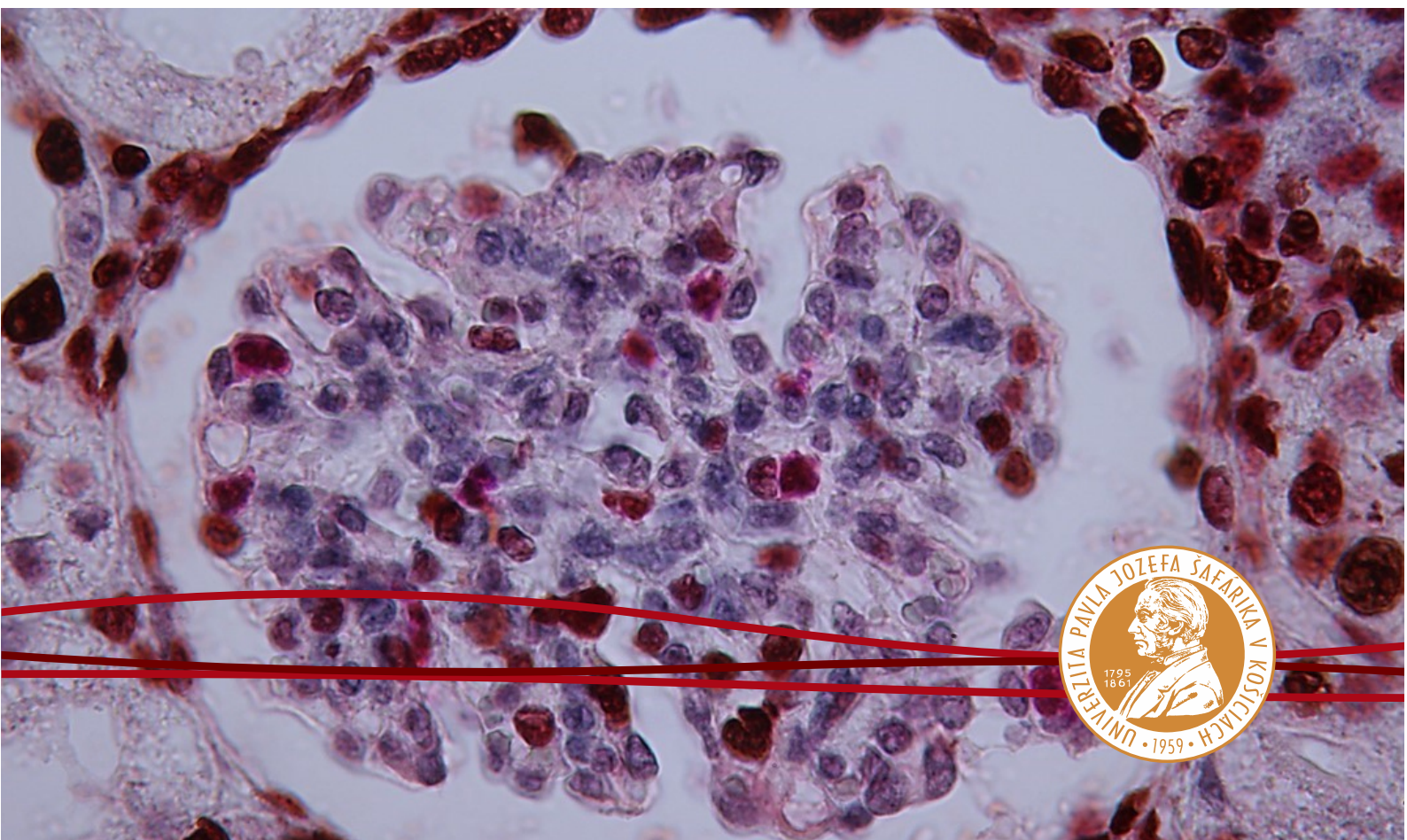
UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

29. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ

Imunohistochemia ako nástroj modernej medicíny

Zborník vedeckých prác

Štefan Tóth, Zuzana Fagová, Alexandra Kunová (eds.)



Lekárska fakulta

Vydavateľstvo ŠafárikPress

Košice 2026

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

Lekárska fakulta

Ústav histológie a embryológie

Slovenská lekárska spoločnosť

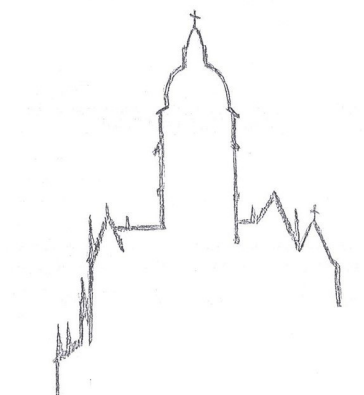
Slovenská anatomická spoločnosť



29. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ

Imunohistochemia ako nástroj modernej medicíny

Zborník vedeckých prác



UPJŠ LF Košice, 28.-29. mája 2026

Košice 2026

*Zborník príspevkov vznikol s finančnou podporou projektu **KEGA 088UPJŠ-4/2024**: „Modernizácia pedagogického procesu a implementácia inovatívnych metód pri výučbe histológie pre bakalárske odbory.“*

29. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ

Imunohistochemia ako nástroj modernej medicíny

Zborník vedeckých prác

Zostavovatelia:

doc. MVDr. Štefan Tóth, PhD.

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

MVDr. Zuzana Fagová, PhD.

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

MUDr. Alexandra Kunová

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

Recenzenti:

RNDr. Kristína Čurgali, PhD.

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

MVDr. Monika Holodová, PhD.

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



Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 license - CC BY-NC-SA ("Attribution-NonCommercial-ShareAlike").

Licencia umožňuje dielo voľne zdieľať a upravovať len s uvedením autora, bez komerčného použitia a za podmienky, že všetky odvodené diela budú šírené pod rovnakou licenciou.

Za jazykovú úpravu a obsahovú stránku publikácie zodpovedajú autori.

Umiestnenie: <http://unibook.upjs.sk>

Dostupné od: 22.5.2026

DOI: <https://doi.org/10.33542/KMD-0523-8>

ISBN 978-80-574-0523-8 (e-publikácia)

Sponzori:



Slovenská lekárska spoločnosť
Slovak Medical Association



baria



OBSAH

Porovnanie histologických fixačných techník pri spracovaní embryologického materiálu	
Almášiová V., Andrašková S., Hudáková P., Holovská K.....	7
Vývoj štítnej žľazy vtákov	
Andrašková S., Almášiová V., Hudáková P., Teleky J., Holovská K.....	11
Využitie imunohistochemie pri hodnotení vplyvu skrmovania ľanového semena u výkrmových ošípaných na úrovni čreva	
Andrejčáková Z., Vlčková R., Šmajda Rodáková K., Petrilla V., Sopková D.....	16
Vplyv n-3 PNMK a enterolaktónu na receptory proteínov tepelného šoku v bunkách maternice myši	
Babjaková D., Šeřčíková Z., Babel'ová J., Andrejčáková Z., Sopková D., Fabian D., Vlčková R.....	21
Histologické zmeny v pečeni starnúcich potkanov po expozícii ionizujúcim žiarením	
Báľentová S., Barboráková J., Kalenská D., Murín P., Kecskés I.....	26
Mnemotechnické pomôcky a kreativita ako nástroje na zefektívnenie učenia sa	
Boľeková A., Hodorová I.....	30
Priamy odstup a. circumflexa femoris lateralis z a. femoralis: anatomická variácia artériového vetvenia v proximálnej časti stehna	
Borza T., Kentoš Š., Vrzgula M., Hvizdošová N., Hodorová I.....	34
Izolácia primárnej kultúry z nádoru mliečnej žľazy psa	
Čobejová S., Nosáľová N., Huniadi M., Kešľáková A., Kalinaj B., Čížková D.....	39
Súčasné zobrazovacie a farbiace metódy používané na histologickú vizualizáciu kostného tkaniva	
Čurgali K., Tóth Š., Fagová Z.....	44
Transplantácia črevnej mikroflóry a integrita črevnej bariéry pri poruchách autistického spektra	
Danková M., Juríková M., Sirkovská Z., Varga I., Tomová A., Lorencová M.....	50
Imunohistochemické hodnotenie angiogenézy a biokompatibility biomateriálu pomocou ex ovo CAM modelu	
Demčišáková Z., Luptáková L., Medvecký L., Petrovová E.....	55
Analýza rezervných lipidov v orgánoch modelového organizmu Neocaridina davidi po expozícii acetamidom	
Galajda R., Almášiová V.....	61
Efekt prídavku kondicionovaného média na osteogénne vlastnosti kalcium fosfátového/kalcium sulfát hemihydrátového biocementu – in vitro štúdia	
Giretová M., Medvecký L., Štulajterová R., Sopčák T., Székiová E.....	65
Embryotoxický a teratogénny účinok albendazolu a fenbendazolu u laboratórnych kráľikov	
Hajovská K., Bettencourt Capece, Alves M.....	71
Prehľad imunohistochemických metód: história, súčasný stav a perspektíva v budúcnosti	
Holodová M.....	78
Štruktúra lumbosakrálnej oblasti u kuracieho embrya na 14. embryonálny deň	
Holovská K., Andrašková S., Hudáková P., Almášiová V.....	82
Použitie imunohistochemických metód na diagnostiku neurodegeneratívnych ochorení človeka a v experimentálnych zvieracích modeloch	
Hryntsova N., Smolek T., Zilka N.....	85
Histologická charakteristika diferenciácie orgánov kuracieho embrya na 9. deň inkubácie	
Hudáková P., Almášiová V., Andrašková S., Holovská K.....	91

Rozsah sympatickej denervácie po traumatickom poranení miechy ako determinant signalizácie receptorov angiotenzínu II v osi hypotalamus–hypofýza–nadobličky	
Kellerová E., Snopková J., Hvozdková E., Pavel J.....	95
Histologické hodnotenie novovytvorenej subchondrálnej kosti po aplikácii CFG biocementu	
Korim F., Vdoviaková K., Krešáková L., Humeník F., Danko J., Čurgali K., Fagová Z., Giretová M., Medvecký E.....	99
Morfologický obraz hepato-splenického lymfómu u koňa	
Korim F., Almášiová V., Šimaiová V., Karamanová M., Čriepoková Z., Valocký I.	103
Porovnanie účinnosti terapie osteochondrálnych defektov po aplikácii gaštanového medu v dvoch koncentráciách v kombinácii s biomateriálom	
Krešáková L., Vdoviaková K., Humeník F., Hromjaková Z., Totkovič R., Rusnák P., Andrejčáková Z., Korim F., Kadáši M., Medvecký E.	107
Hodnotenie iritačného potenciálu sekundárne hybridizovaného jedinca rodu Trimeresurus	
Krúpa A., Petrilla V., Polláková M., Petrovová E., Sopková D., Legáth J.	112
Enterický nervový systém	
Kunová A.	117
Analýza efektivity zavedenia inkluzívnych prvkov do výučby histológie a embryológie na Lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave	
Lorencová M., Danková M., Sirkovská Z., Varga I., Juríková M.....	124
Vplyv šalvie lekárskej na génovú expresiu CYP1A5 v pečeni kuracieho embrya	
Luptáková L., Mackaľová N., Štefancová S., Pokorná B., Demčišáková Z., Petrovová E.....	128
Parakeratóza ako pre-ulceratívne štádium žalúdočných vredov u ošípaných	
Novotný J., Krepelková Z., Andrašková S., Čulka E., Almášiová V.....	132
Vplyv šalvie lekárskej na vývin pečene	
Petrovová E., Bačkorová M., Demčišáková Z., Holovská K., Luptáková L., Hošková A.....	137
Využitie imunohistochemie pri hodnotení antioxidantného statusu v experimentálnych modeloch	
Pokorná B., Štefancová S., Petrovová E., Luptáková L.	141
Histologická charakterizácia poškodenia chorioalantoickej membrány po expozícii jedu "pľuvajúcej kobry" druhu Naja ashei	
Polláková M., Demčišáková Z., Krúpa A., Petrilla V., Petrillová M., Petrovová E., Sopková D., Legáth J.	145
Použitie ultrazvuku v diagnostike ochorení temporomandibulárneho kĺbu	
Rozprávková M., Vrzgula M.....	151
Hodnotenie toxicity zmesi mikonazol nitrátu a acetamipridu po 24 h expozícii v boviných lymfocytoch	
Schwarzbacherová V., Florková A., Halušková J., Galdíková M.	155
Histologické vyšetrenie čreva včely medonosnej (Apis mellifera) so zameraním na detekciu spór Nosema spp.	
Szabó I., Demčišáková Z., Sabo R., Staroň M., Sabová L., Sučík M.	160
Využitie nepriamej imunohistochemickej metódy na určenie proliferácie myocytov musculus pectoralis major u hydiny s podávaním prípravku Ecobiol	
Szabóová R., Herich R., Karaffová V., Hudec E., Ševčíková Z., Levkut M.....	165
Imunohistochemia – naše skúsenosti s jej využitím vo veterinárnej medicíne	
Ševčíková Z., Hudec E., Karaffová V., Szabóová R.....	169
Imunohistochemia: jej metódy a ich aplikácia – prehľad	
Šimaiová V., Korim F., Maková Z.....	174

Imunohistochemická expresia proteínu p53 ako potenciálny prognostický marker v invazívnych karcinómoch prsníka	
Šlebodová M., Vecanová J., Hodorová I.....	178
Vplyv predinkubácie na tvorbu adiponektínu a vývin čreva kuracieho embrya	
Štefánková S., Pokorná B., Petrovová E., Luptáková L.....	183
Zvýšenie antibakteriálnej aktivity biocementu na báze α-trikalciumfosfát/med pôsobením glukózooxidázy	
Štulajterová R., Medvecký L., Giretová M., Jevinová P., Sopčák T.....	188
Úloha vomeronazálneho orgánu vo vzťahu človek-zviera	
Teleky J., Andrašková S.....	194
Histopatológia štepu obličky po mechanickej perfúzii kombinovanej s antibiotikami	
Tóth Š., Bočeva S., Krišková K., Hnatko O., Fagová Z., Kalanin R., Hulík Š., Gaľa I., Adandedjan D.	197
Morfologické znaky včasnej diabetickej nefropatie u detí s diabetes mellitus 1. typu	
Vikhrova I.	202

POROVNANIE HISTOLOGICKÝCH FIXAČNÝCH TECHNÍK PRI SPRACOVANÍ EMBRYOLOGICKÉHO MATERIÁLU

COMPARISON OF HISTOLOGICAL FIXATION TECHNIQUES IN THE PROCESSING OF EMBRYOLOGICAL MATERIAL

Viera Almášiová, Sandra Andrašková, Patrícia Hudáková, Katarína Holovská

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

viera.almasiova@uvlf.sk

Abstract

Fixation prevents tissue autolysis and maintains molecular integrity for subsequent investigation using various histopathological methods, including histochemical and immunohistochemical analysis. We decided to compare two fixation solutions, modified Davidson's fixative and neutral buffered formalin. These are the most commonly used solutions for routine tissue fixation in histological practice, as well as for the fixation of extremely sensitive embryonic tissues. When comparing the differences in the structure of various embryonic organs, we found that tissue fixed in modified Davidson's fixative had significantly better preserved original structure compared to tissue fixed in neutral buffered formalin.

Úvod

Pri spracovaní vzoriek na účely svetelnej mikroskopie v histológii a embryológii je kritickým krokom na zachovanie štruktúry tkaniva kvalitná fixácia (1). Cieľom fixácie je zabrániť autolyze tkaniva a udržať jeho štrukturálnu integritu pre následné vyšetrenie prostredníctvom rôznych histologických metód, vrátane histochemickej a imunohistochemickej analýzy (2). Rozhodli sme sa porovnať rozdiely medzi dvoma fixačnými roztokmi, a to modifikovaným Davidsonovým fixatívom (mDF) a formalínom (10 % neutrálny pufrovaný formalín, NPF), ktoré sa najčastejšie používajú pri rutinnej fixácii tkanív v histologickej praxi ako aj fixácii embryonálnych tkanív, ktoré sú z tohto pohľadu mimoriadne citlivé. K najdôležitejším kritériám dobrého fixatíva patria zachovanie pôvodnej štruktúry tkaniva, dobrá kvalita histologického farbenia rezov, kompatibilita s histochemickou (HC), imunohistochemickou (IHC) analýzou a minimálna prítomnosť artefaktov v tkanive (3). Rozhodli sme sa porovnať rozdiely vo fixácii embryologického materiálu, ktorý bol ošetrený mDF a NPF.

Materiál a metódy

V pokuse sme použili embryá získané z oplodnených vajíčok Kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) z certifikovaného chovu Párovské Háje v Nitre. Inkubácia prebehla za štandardných podmienok v inkubátore River system ET49 automatic. Kuracie embryá boli na 9. embryonálny deň vybraté z vajca a po odstránení všetkých obalov usmrtené cervikálnou dislokáciou. 20 embryí bolo imerzne fixovaných v modifikovanom Davidsonovom roztoku (mDF) a 20 embryí vo formalíne (10 % neutrálny pufrovaný formalín, NPF).

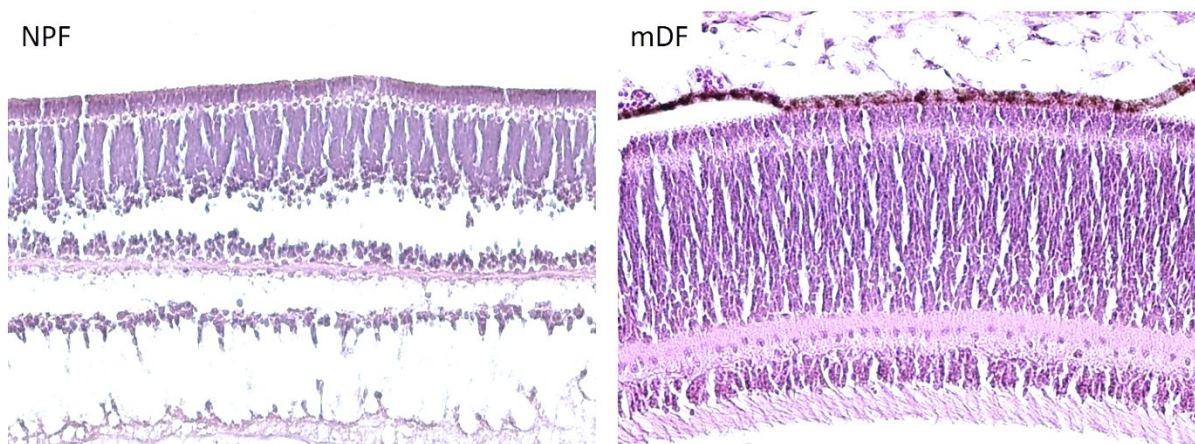
- NPF: 4 % formaldehyd vo fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku
- mDF: 37 – 40 % formaldehyd (30%), 95 – 100% etanol (15 %), kyselina octová (5%), destilovaná voda (50%).

Tkanivo bolo spracované rutinným spôsobom zaliatím do paraplantu a tkanivové rezy (7 μ m) boli ofarbené prehľadnou metódou hematoxylín – eozín (HE) a fotodokumentované svetelným mikroskopom Zeiss Axio Lab A1 s kamerou Axio Cam ERc 5.

Výsledky a diskusia

Pri porovnávaní rozdielov v štruktúre rôznych embryonálnych orgánov sme medzi vzorkami získanými rôznou fixáciou zistili, že tkanivo fixované v modifikovanom Davidsonovom roztoku malo oproti tkanivu fixovanému v 10 % neutrálnom pufrovanom formalíne výrazne lepšie zachovanú pôvodnú štruktúru. Ako reprezentatívnu oblasť sme si vybrali sietnicu oka, ktorá je voči fixácii mimoriadne citlivá (Obr. 1). V tkanive fixovanom mDF sme zaznamenali iba minimálne artefakty v podobe mierneho scvrkávania buniek a následnou tvorbou drobných prázdnych priestorov. Naopak vo vzorke fixovanej klasickým spôsobom v NPF boli prítomné výrazné trhliny a prázdne miesta, ktoré vznikli v dôsledku intenzívneho scvrkávania tkanivových komponentov. Veľmi podobné zistenia pozorovali aj autori, ktorí sa zamerali na fixáciu oka a iných opuzdrených orgánov (4-7). Predpokladáme, že vďaka svojmu špecifickému zloženiu má mDF rýchlejšiu penetračnú schopnosť do centra vzorky, čo napomáha zachovať jej pôvodnú štruktúru v dôsledku zamedzenia skorého enzymatického rozkladu (autolýzy) tkaniva s následným scvrknutím. Preto je mDF obzvlášť vhodný pre opuzdrené orgány ako sú oko, semenníky, lymfatické uzliny a rôzne ďalšie citlivé tkanivá. Modifikovaný Davidsonov roztok okrem rýchlej penetrácie do tkanív zároveň dokáže aj veľmi dobre zachovať pôvodnú antigenicitu tkanivových zložiek, čo je kritické pri IHC metódach (7). Dôležitým kritériom na dosiahnutie žiadaného výsledku pri fixácii mDF je ale striktné

održanie optimálneho času fixácie, ktorý je do 24 hod. pre bežné histopatologické vyšetrenie, 48 – 72 hod. pre IHC. Dlhšia fixácia (> 72 hod.) môže viesť k scvrknutiu tkaniva a zníženej detekovateľnosti antigénov. Po fixácii mDF sa tkanivá zvyčajne krátko opláchnu vo vode a pokiaľ sa ihneď ďalej nesppracúvajú, môžu sa následne skladovať v 10 % neutrálnom pufrovanom formalíne, aby sa zabránilo poškodeniu ich štrukturálnej integrity. Mierne zahriatie fixačného roztoku (~37 °C) prispieva ku zlepšeniu jeho penetračných schopností (8). Súhrn základných charakteristík a rozdielov v NPF a mDF je zhrnutý do prehľadnej tabuľky (Tab. 1).



Obr. 1 Rez sietnicou kuracieho embrya na 9. deň inkubácie (Hematoxylín-eozín, zv. 200x), NPF – tkanivo fixované v neutrálnom pufrovanom formalíne s výraznými artefaktami, mDF – tkanivo fixované v modifikovanom Davidsonovom roztoku s minimálnymi artefaktami.

Kritérium posudzovania	NPF	mDF
Mechanizmus fixácie	Tvorba krížových väzieb medzi molekulami proteínov	Tvorba krížových väzieb medzi molekulami proteínov (formaldehyd) + koagulácia (metanol) + pH modulácia (kyselina octová)
Scvrkávanie tkaniva	Výrazné	Minimálne
Kompatibilita s HC a IHC	Dobrá	Veľmi dobrá
Čas fixácie	24h +, dlhšia fixácia nespôsobuje scvrkávanie	12 - 24 h, dlhšia fixácia spôsobuje scvrkávanie
Použitie	Nevhodný pre citlivý embryologický materiál a opuzdrené orgány	Vhodný pre citlivý embryologický materiál a opuzdrené orgány: oko, mozog, lymfatická uzlina, semenník ...

Tab. 1 Prehľad hlavných charakteristík porovnávaných fixačných roztokov.

Súhrn

Zatiaľ čo formalín zostáva štandardom pre rutinné spracovanie vzoriek na histologické vyšetrenie vďaka dobrej dostupnosti a dlhodobým skúsenostiam, mDF môže byť veľmi dobrou voľbou najmä v prípadoch, kedy je žiadúca detailná morfológická, histochemická a imunohistochemická analýza. Modifikovaný Davidsonov roztok vďaka svojmu zloženiu poskytuje rýchlu penetráciu do tkanív s vynikajúcim zachovaním pôvodnej štruktúry tkaniva, ako aj antigenicity tkanivových zložiek, čo je kritické najmä pri spracovaní citlivého embryologického materiálu, orgánov pokrytých hrubým väzivovým obalom ako aj materiálu určeného na histochemickú a imunohistochemickú analýzu.

Literatúra

1. Eltoun, I., Fredenburgh, J. et al.: J Histotechnol, 2001; 24:173-190.
2. Cox, M.L., Schray, C.L., Luster, C.N. et al.: Exp Mol Pathol, 2006; 80:183-191.
3. Jalali, S.F., Jadidi-Niaragh, F., Endera, S.E. et al.: Biomed J Sci & Tech Res, 2023; 47(5):25-63.
4. Shariati, A., Ameri, H., Hinton, D. R., Humayun, M. S.: Investig Ophth Vis Sci, 2008; 49(1): 98-102.
5. Tian, P., Yang, Z., Qu, C. et al.: Eur J Med Res, 2024; 29(3): 30-39.
6. Tokuda, K., Baron, B., Kuramitsu, Y. et al.: Jpn J Ophth, 2018; 62(2):480-490.
7. Wang, W.Y., Meng, L.J., Xu, Y.J., et al.: J Toxicol Pathol, 2020; 33(2):97-104.
8. Latendresse, J.R. et al.: Toxicol Pathol, 2002; 30(4):524-533.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0036/22.

VÝVOJ ŠTÍTNEJ ŽĽAZY VTÁKOV

DEVELOPMENT OF AVIAN THYROID GLAND

**Sandra Andrašková, Viera Almášiová, Patrícia Hudáková, Teleky Jana,
Katarína Holovská**

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR
sandra.andraskova@uvlf.sk

Abstract

The aim of this study was to describe the morphological changes during dynamic development of the avian thyroid gland. Specifically, we focused on morphogenesis of this endocrine gland in chicken embryo. The endocrine system of an organism is responsible for the coordination of general metabolic processes and the regulation of the development and function of many organs of the body. On the second day of incubation of chick embryo development, thyroid gland appeared as a median outpocketing at the bottom of the primitive pharynx. By the fifth day, thyroid gland was already a two-lobed structure moving to its definitive position, and by the time of hatching, it is functioning and nearly fully formed.

Úvod

Endokrinný systém organizmu je zodpovedný za koordináciu metabolických procesov, reguláciu vývoja a funkcie mnohých orgánov tela. Tento zložitý mechanizmus závisí od pôsobenia hormónov, ktoré uvoľňujú žľazy s vnútornou sekréciou.

O vývoji jednotlivých orgánových systémov vtákov z morfológického pohľadu, existuje len prekvapivo málo poznatkov. Štítna žľaza je počas embryogenézy vtákov jednou z najaktívnejších endokrinných žliaz. Je dôležitá pri regulácii bazálneho metabolizmu a svoj vplyv uplatňuje prostredníctvom produkcie tyroxínu. Rast embrya, meraný telesnou hmotnosťou, veľkosťou kostry, rastom svalov a rastom chrupky a kostí, je v neskorom embryonálnom vývoji výrazne ovplyvňovaný práve hormónmi štítnej žľazy (1). Špecifickým faktorom vylučovaným hypofýzou, stimulujúcim štítnu žľazu je tyreotropný hormón. U kuracieho embrya sa interakcia medzi hypofýzou a štítnou žľazou nadväzuje približne na jedenásty deň inkubácie. Dovtedy je funkcia štítnej žľazy nezávislá od adenohipofýzy (2).

Štítna žľaza vtákov je dvojlaločná štruktúra, ležiaca ventrálne od hltana v spodnej časti krku. Nikdy nie je v úzkom kontakte s priedušnicou, ako je to u cicavcov. Ľavý lalok leží pripojený

k ventrálnemu povrchu ľavej krčnej tepny, zvonka priedušnice a pažeráka, vnútorne k jugulárnej žile a pred syrinxom. Pravý lalok je pripojený podobne k pravej jugulárnej žile (3). Štítna žľaza vzniká evagináciou dna hltana a svoju folikulárnu štruktúru dosahuje v polovici inkubačnej doby kedy začína aj jej sekrečná funkcia. Skladá sa z folikulov, z ktorých každý pozostáva z lúmenu obsahujúceho koloid. Folikuly štítnej žľazy sú vystlané jednou vrstvou kubických epitelových buniek. Masa folikulov štítnej žľazy je obklopená rozsiahlym cievnym zásobením (4).

Vývojová morfológia štítnej žľazy

Štítna žľaza je jednou z prvých endokrinných žliaz, ktoré sa v kuracom embryu vyvíjajú. Už na druhý deň inkubácie sa javí ako mediálny výbežok na dne primitívneho hltana medzi kupolou a *tuberculum impar*. Na piaty deň inkubácie má už dvojľaločnú štruktúru, postupne sa posúva do svojej definitívnej polohy a diferencujú sa v nej folikuly. V čase liahnutia je štítna žľaza už plne funkčná a definitívne sformovaná (4).

Raná embryogenéza

Štítna žľaza je endodermového pôvodu (5). Lokalizácia tkaniva tvoriaceho štítnu žľazu sa sústreďuje do prednej časti blastodermu. V štádiách primitívneho prúžku a po vytvorení hlavového záhybu sa na štítnu žľazu transformujú iba laterálne časti blastodermu. To má za následok bilaterálnu lokalizáciu štítnej žľazy v kuracom embryu, a to už po 72 hodinách inkubácie. Žľaza sa spočiatku skladá iba z jednej vrstvy vysokých cylindrických buniek. Na štvrtý deň epitelový základ štítnej žľazy vyrastá zo steny hltana, s ktorého lúmenom však dočasne zostáva prepojený pomocou kanálíka (*ductus thyreoglossus*) (6). Čoskoro sa toto spojenie s tráviacim traktom preruší a rozdelí sa na dvojľaločnú štruktúru (7). V strede sa zužuje a postupne sa predlžuje smerom k tretiemu aortálnemu oblúku. Zúženie, z ktorého vzniká isthmus sa prehľbuje čím sú jej laloky takmer oddelené a zároveň sa posúvajú kraniálne pred tretí aortálny oblúk. Odtiaľ dochádza k jej rozsiahlej vaskularizácii prostredníctvom podklúčnych artérií. Až do 6. dňa štítna žľaza pozostáva výlučne z epitelu endodermového pôvodu. Od šiesteho až do jedenásteho dňa inkubácie preniká do žľazy aj mezenchým bohatý na kapiláry. Mezenchým postupne zatláča žľazový epitel do trámcov alebo povrazcov (8). Štítna žľaza 8-dňového kuracieho embrya má dĺžku približne 0,4 mm a pozostáva z neluminizovaných povrazcov buniek, krvných sínusoíd a malého množstva spojivového tkaniva (9). Do dvanásteho embryonálneho dňa základ štítnej žľazy doteraz usporiadaný do povrazcov sa postupne luminizuje a diferencuje na folikuly (9).

Obdobie rastu a začiatok funkcie

Štítna žľaza začína fungovať v polovici inkubačného obdobia. Nasvedčuje tomu výskyt kvapiek koloidu vo folikuloch štítnej žľazy, kedy je už štítna žľaza schopná akumulovať jód. Hladiny jódu v plazme sa zvyšujú od 10. dňa inkubácie až do vyliahnutia (10). V tomto čase sú primárne folikuly plne diferencované. Secernujúce folikuly sú vystlané kubickými bunkami s periférne uloženými jadrami.

Počas druhej polovice inkubácie možno v štítnej žľaze pozorovať všetky štádiá tvorby folikulov (8), vrátane štádií typických pre dospelú žľazu. Na trinásty deň je vnútro žľazy tvorené veľkou dutinou (11). Na 14. deň sú folikuly vystlané vysokými cylindrickými bunkami, v ktorých sa akumulujú sekrečné granuly. Po pätnástom dni folikuly rastú čo do veľkosti a počtu a to v dôsledku fúzie folikulov, ako aj proliferácie epitelových buniek. V 16-dňovom kuracom embryu je väčšina folikulov v kontakte s cievnymi sinusoidami (9). Vysoký cylindrický epitel je spojený so zvýšenou aktivitou. V čase vyliahnutia sú interfolikulárne bunky väčšie ako bunky v samotných folikuloch. Vo všeobecnosti je tkanivo štítnej žľazy v čase vyliahnutia kompaktné. Endotelová výstelka kapilár zostáva medzi folikulmi a tvorí bazálnu membránu pre folikulárne bunky (4). Žľaza je zároveň obalená kapsulou spojivového tkaniva, z ktorej do parenchýmu odstupujú jemné trabekuly.

Štítna žľaza v čase liahnutia

Na 20.-21. deň inkubácie je štítna žľaza plne vytvorená a aktívna. Definitívnu polohu štítnej žľazy u vtákov opísal Forsyth (3), ktorý skúmal štítné žľazy tridsiatich štyroch rôznych druhov prevažne dospelých vtákov. Všeobecná poloha je takmer rovnaká ako u embrya v polovici inkubačnej doby, teda pozdĺž vnútornej jugulárnej žily na spojení podkľúčnej a krčnej tepny.

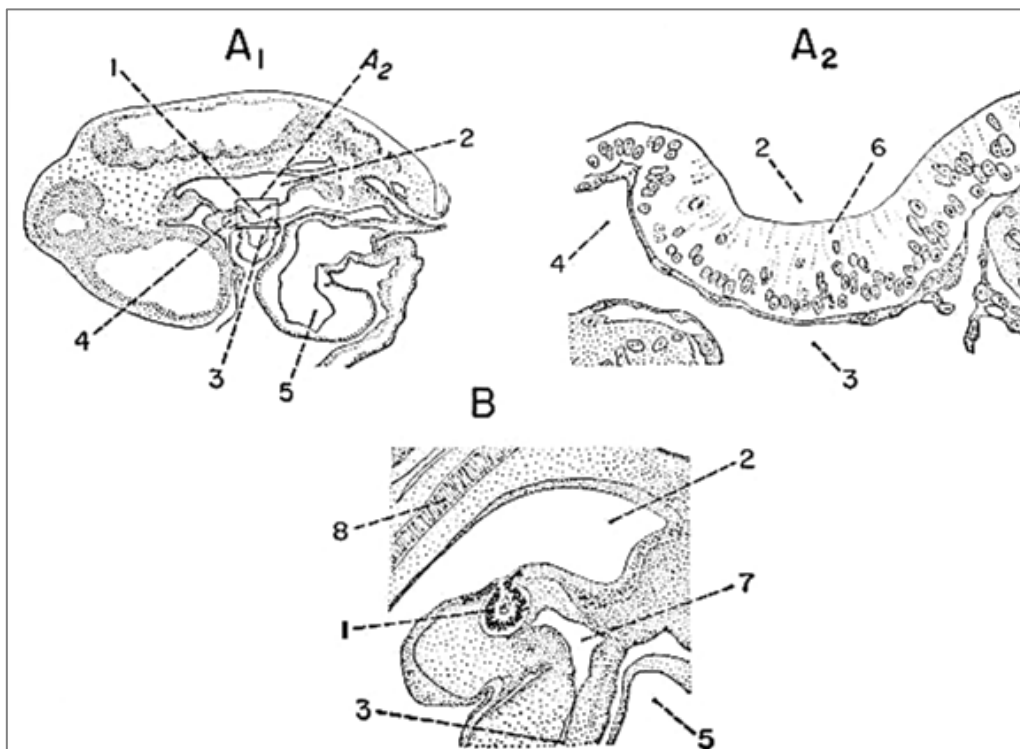
Diskusia

Existuje mnoho opisov pôvodu a vývoja štítnej žľazy, ale všetci autori sa zhodujú na tom, že sa vyvíja z endodermového zhrubnutia na dne hltana (4, 8). Čas vzniku evaginácie bol rôzne uvádzaný rôznymi autormi. Venzke (8) zaznamenal sférický výbežok faryngeálneho epitelu u 30- až 36-hodinového kurčat'a. Seessel (13) uviedol prvú známku prítomnosti štítnej žľazy na konci druhého dňa inkubácie. Primordium bolo pozorované u kurčiat inkubovaných 42 hodín (4), 54 hodín (14) a 3 dni (11, 12). Žľaza bola v tomto štádiu opísaná ako priehlbina v tvare tanierika, vyčnievajúca zo strednej sagitálnej úrovne steny hltana s rozmerom 0,15 mm (8).

Mnohí autori pozorovali, že transformácia na dvojlaločnatú štruktúru prebieha na piaty deň inkubácie kuracieho embrya (8, 12, 14).

Carpenter (9) opísal štítnu žľazu 8-dňového kuracieho embrya dlhú od 0,34 do 0,40 mm, ktorá pozostáva zo spleťných povrazcov buniek, krvných sínusoid a stôp spojivového tkaniva. Podľa Bernarda (11) 13-dňová žľaza stále pozostáva z epitelových platničiek, v ktorých sa však už začínajú objavovať koloidné kvapôčky. Seessel (13) opísal žľazu na deviaty deň inkubácie ako sieť pevných valcovitých povrazcov s hrúbkou 15 až 25 mikrometrov.

Na základe počiatkovej sekrécie injekčne podaného rádiojódu (1%) folikulmi štítnej žľazy embryonálneho kurčat'a King a May (1) dospeli k záveru, že sekrečná funkcia začína jedenásty inkubačný deň. Podľa Nillsona (5) sa ukladanie jódu začína po 10 dňoch inkubácie. Prvý výskyt primárnych (definitívnych) folikulov sa pozoroval na 11. deň (4, 14). V rovnakom čase začína aj ich sekrečná funkcia.



Obr 1. Ranný vývoj štítnej žľazy u kuracieho embrya (Modifikované podľa Yoshikawu, 1930)

A₁ parasagitálny rez 2,5-dňového embrya zobrazujúci polohu štítnej žľazy; *A₂* detail zobrazujúci štruktúru štítnej žľazy; *B*, sagitálny rez 3-dňového embrya. 1, štítna žľaza; 2, hltan (pažerák); 3, truncus arteriosus; 4, prvý aortálny oblúk; 5, srdce; 6, cylindrický epitel; 7, ventrálna aorta; 8, notochorda

Súhrn

Štítna žľaza je jedným z najaktívnejších endokrinných orgánov. Hlavnou úlohou tohoto zložitého a chýlostivého koordinačného mechanizmu je pôsobením hormónov udržiavať

všeobecne normálnu metabolickú aktivitu v organizme. Mnohé embryonálne histogenetické procesy môžu byť ovplyvnené endokrinnými faktormi. Vzhľadom k tomu, že o endokrinných vzťahoch u vtáčieho embrya existuje prekvapivo málo poznatkov, našim cieľom bolo komplexne preštudovať priebeh vývoja štítnej žľazy u kuracieho embrya . Následne sa chceme zamerať na morfológické aspekty zmien vo vývoji tejto žľazy u kuracieho embrya a to po vystavení neionizujúcemu elektromagnetickému žiareniu.

Literatúra

1. King, D.B. and May, J.D.: J Exp Zool, 1984; 2(3):453-460.
2. Thommes, R.C.: J Exp Zool, 1987; 1:273-280.
3. Forsyth, D.: J Anat, 1908; 42:302-319.
4. Romanoff, A.L.: The Avian Embryo, MacMilan, New York, 1960; 863-904.
5. Nilsson, M., Williams, D.: Eur Thyroid J, 2016; 5(2):79-93.
6. Allen, E., Fingeret, A.: Stat Pearls Publ, 2025; 23.
7. Bellairs. R., Osmond, M.: The Atlas of Chick Development, Elsevier, London, 2005.
8. Venzke, W.G.: Am J Vet Research, 1949; 10:272-281.
9. Carpenter, E.: J Exptl Zool, 1942; 89:407-431.
10. Daugeras-Bernard, N., Lachiver, F.: Cell Differ, 1980; 9(1):31-39.
11. Bernard, N., Lachiver, F.: Cell Differ, 1980; 9(1):31-39.
12. Remak, R., G.Reimer, 1855; 195.
13. Seessel, A.: Arch Anat Physiol Anat Ab, 1877; 449-466.
14. Bradley, E.M.: Anat Record, 1941; 79:507-530.

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

VYUŽITIE IMUNOHISTOCHÉMIE PRI HODNOTENÍ VPLYVU SKRMOVANIA ĽANOVÉHO SEMENA U VÝKRMOVÝCH OŠÍPANÝCH NA ÚROVNI ČREVA

USE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN EVALUATING THE EFFECT OF FEEDING
FLAX SEED IN FATTENING PIGS ON THE LEVEL OF THE INTESTINE

**Zuzana Andrejčáková, Radoslava Vlčková, Kristína Šmajda Rodáková, Vladimír
Petrilla, Drahomíra Sopková**

*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR
zuzana.andrejcakova@uvlf.sk*

Abstract

Immunohistochemistry is a highly specialized diagnostic method that can detect various intestinal diseases, differentially diagnose pathological conditions, evaluate the course of carcinogenesis, and others. According to literature flaxseed could affect the gut of experimental animals. Therefore, our study was aimed at observing the expression of proliferation marker and apoptosis in the intestine of fattening pigs, which were fed flaxseed mixed in the feed for 3 and 6 weeks. The measured results show that 6-week application of flaxseed in pig feed increased proliferation, but did not affect apoptosis, of intestinal epithelial cells.

Úvod

Imunohistochemia je vysoko-špecializovaná diagnostická metóda, ktorá dokáže odhaliť rôzne ochorenia čriev, diferencially diagnostikovať patologické stavy, hodnotiť priebeh karcinogenézy, detekovať histomorfologické zmeny a iné (1). PCNA (proliferating cell nuclear antigen) je v čreve ale aj celom organizme kľúčový proteín, ktorý slúži ako marker bunkového delenia alebo proliferácie a môže slúžiť ako pomocný diagnostický marker (2). Kaspáza-3 (caspase-3) zohráva v čreve kľúčovú úlohu ako hlavný vykonávateľ apoptózy (programovanej bunkovej smrti), čo je nevyhnutné pre udržanie zdravej črevnej bariéry a homeostázy (3). Črevný epitel predstavuje teda vysoko citlivé miesto, ktorého zdravie je potrebné podporovať pridávaním zdraviu prospešných nutraceutík ako je napríklad ľan. Ľanové semienka sú bohaté na rozpustnú aj nerozpustnú vlákninu, n-3 polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK), lignany a iné. V štúdiách na animálnych modeloch ľan preukázal protizápalové, protinádorové a ďalšie benefičné účinky (4-6) medzi ktoré patrí aj ovplyvnenie kvality bravčového mäsa (7) ako

výstupnej suroviny pre výživu ľudí. Úroveň účinku pridávaného ľanu závisí od jeho odrody, pretože sa líšia v pomere n-6/n-3 PNMK a skrmovaného množstva. Niektorí autori zaznamenali že 2% podiel ľanového semena v krmive neovplyvňuje kvalitu ani obsah intramuskulárneho tuku (8) a na druhej strane iní autori tvrdia, že príliš vysoký podiel ľanu nad 15% negatívne ovplyvňuje skladovateľnosť mäsa (9).

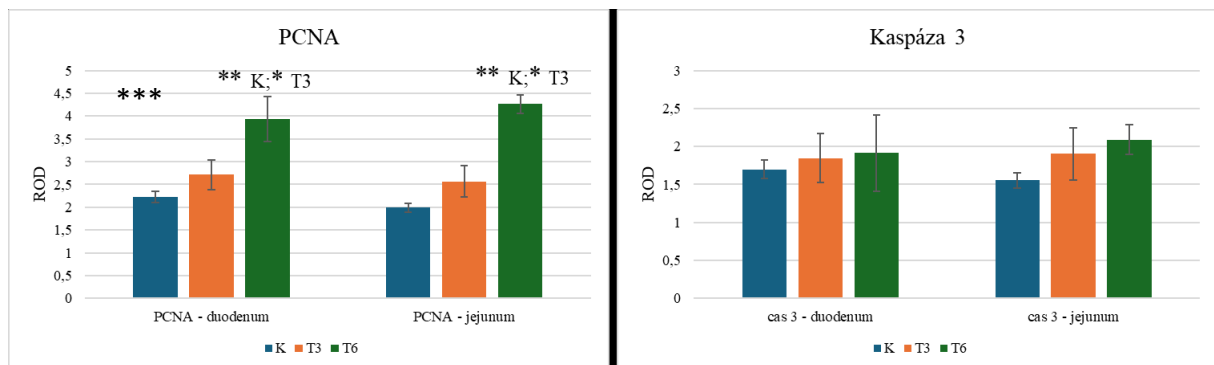
Naša štúdia bola zameraná na pozorovanie expresie markerov proliferácie (PCNA) a apoptózy (kaspáza 3) v čreve výkrmových ošípaných, ktorým bol podávaný ľan namiešaný v krmive (dávka 10%) po dobu 3 a 6 týždňov.

Materiál a metódy

V experimente bolo použitých 18 výkrmových ošípaných plemena Landras, ktoré boli zaradené do pokusu 3 a 6 týždňov pred porážkou na bitúnku (Stanica výkrmnosti a jatočnej hodnoty ošípaných, s.r.o., Spišské Vlachy, SR). Počas experimentu bol pokusným ošípaným primiešavaný do krmiva ľan (odrody Libra; obsah kyseliny alfa-linolénovej = 57%) po dobu 3 (skupina T3; n=6) alebo 6 týždňov (skupina T6; n=6) pred porážkou. Kontrolná skupina (K; n=6) bola kŕmená výlučne štandardným krmivom pre výkrmové ošípané OŠ-06 (Dom krmív, Spišské Vlachy, SR) v dávke 3kg/kus/deň. Ľanové semeno bolo šrotované a podávané v 10% koncentrácii kontinuálne namiešané v krmive. Po dosiahnutí jatočnej hmotnosti (± 120 kg) boli zvieratá odporazené na bitúnku a boli im odobraté vzorky duodena a jejuna na imunohistochemickú analýzu antigénov PCNA a caspase 3. Vzorky boli fixované v 4% paraformaldehyde, dehydratované a zaliate do parafínu. Rezy s hrúbkou 5 μ m boli deparafinizované, rehydratované, nasledovalo odkrytie väzobných miest, blokovanie aktivity endogénnej peroxidázy a nešpecifického viazania, aplikácia primárnych protilátok anti-PCNA a anti-cas 3 (Santa Cruz Biotechnology, USA) s riedením 1:250 a inkubovali cez noc pri 4°C. Ďalej boli aplikované značené sekundárne protilátky (Dako, Denmark). Farebná reakcia bola navodená diaminobenzidínom, rezy boli kontrastne podfarbené hematoxylínom a zaliate do DPX. Po odfotografovaní kamerou s mikroskopom sme intenzitu reakcie kvantitatívne zhodnotili v programe ImageJ software. Intenzita reakcie bola vyjadrená indexom ROD (relative optical density) diaminobenzidínovej (hnedej) reakcie a bola prepočítaná pomocou vzorca (10). Výsledky boli štatisticky spracované v programe Graph Pad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Na zistenie rozdielov medzi skupinami sme použili Unpaired T-test. Sledované diferencie (Mean \pm SEM) boli považované za štatisticky významné pri $p < 0,05$ a označené indexom *,**, kde * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Výsledky a diskusia

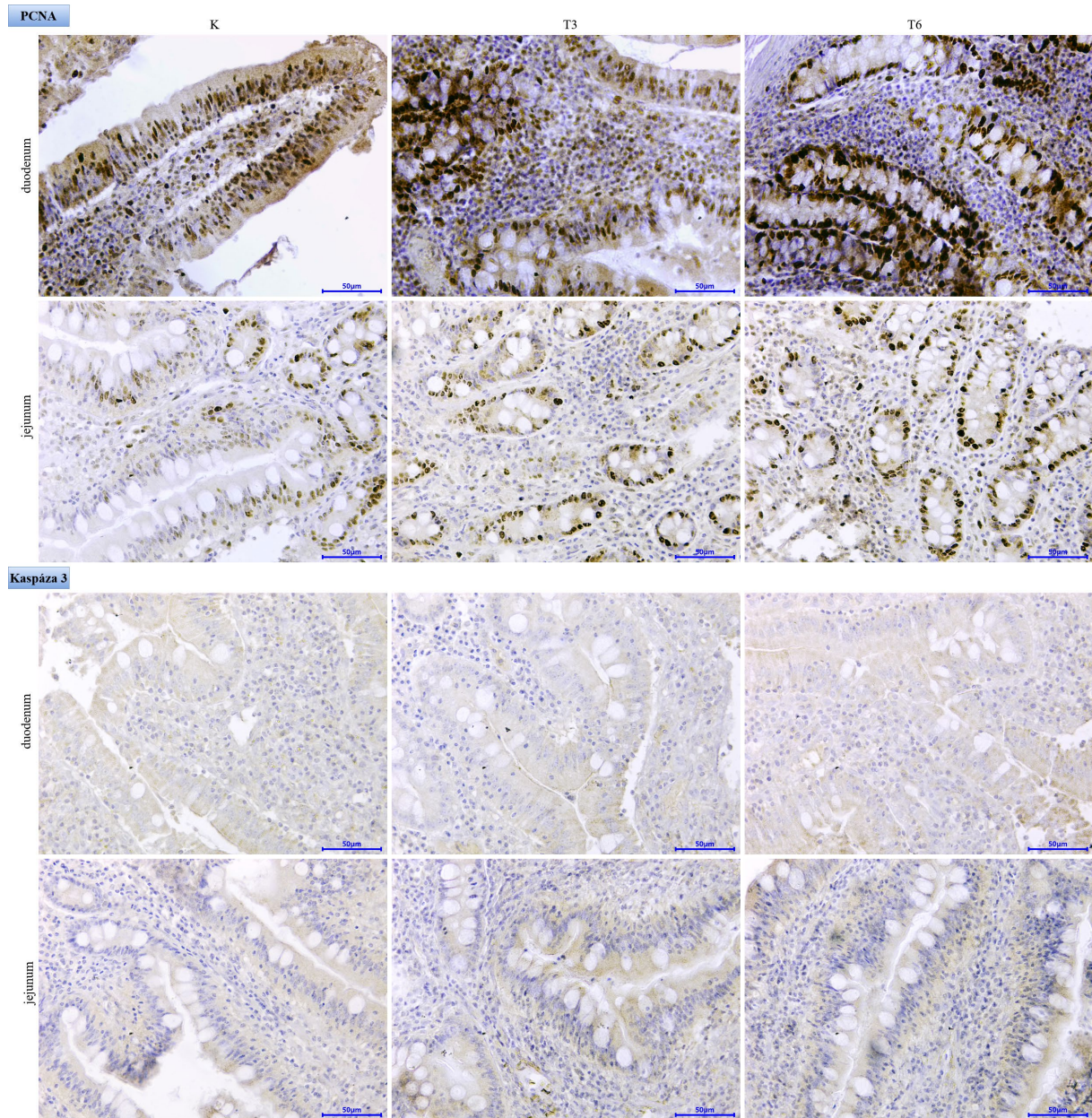
Ľanové semeno má blahodarné účinky na zdravie zvierat a ľudí, čo bolo dokázané v mnohých štúdiách (4-6). Mechanizmus akým pôsobí na črevo zvierat je stále aktuálnou otázkou, ktorou sme sa zaoberali aj v našej štúdií. Pozorovali sme vybrané markery proliferácie a apoptózy buniek duodena a jejuna ošípaných. Z nameraných výsledkov vyplýva (Obr. 1), že aplikácia ľanu po dobu 6 týždňom stimulovala expresiu PCNA v duodene aj jejune ošípaných v porovnaní s kontrolou ($p < 0,01$) alebo s 3-týždňovou aplikáciou ($p < 0,05$).



Obr. 1 Intenzita imunohistochemickej reakcie (ROD) v duodene a jejune výkrmových ošípaných. K - kontrolná skupina; T3 - skupina s prídavkom ľanu po dobu 3 týždňov; T6 - skupina s prídavkom ľanu po dobu 6 týždňov; PCNA - proliferačný nukleárny antigén; cas 3 - kaspáza 3; priemerné hodnoty (Mean ± SEM) sú štatisticky významné pri * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Na druhej strane expresia kaspázy 3 nebola ani v jednej z experimentálnych skupín významne ovplyvnená, aj keď hodnota ROD bola vyššia oproti kontrole. Reprezentatívne fotografie oboch markerov sú uvedené na Obr. 2, kde aj vizuálne môžeme zhodnotiť, že výraznejšia reakcia PCNA bola najmä v skupine T6 oproti ostatným skupinám. Čo sa týka kaspázy 3, tam rozdiely bolo možné odčítať iba hodnotením ROD. Pri PCNA pozitívna (hnedá) reakcia bola situovaná v jadrách žľazových buniek a pri kaspáze 3 bola reakcia sústredená na črevný epitel rovnako v duodene aj jejune. Zhu a kol. (11) pozorovali črevný epitel u prasidiat s navodeným poškodením čreva pomocou lipopolysacharidu (LPS), kde zistili, že n-3 PNMK, špeciálne kyselina EPA a DHA pochádzajúca z ľanu, majú protektívny účinok na črevo prasidiat cestou modulácie nekroptózy a TLR4/NOD signálnej dráhy. Czech a kol. (12) sledovali ošípané vo výkrme, ktorým podávali ľan v 2, 4 a 6% koncentracii. Autori konštatovali že 4% podiel ľanu sa zdá byť optimálny pre zdravie ošípaných a výživové vlastnosti bravčového mäsa, pretože pri vyššom podiele ľanu v krmive nastáva potreba pridať antioxidanty do krmiva

zvieratám. Tento experiment trval počas celého výkrmu ošípaných, t.j. 90 – 100 dní. V našej štúdií aplikácia ľanu trvala 3 a 6 týždňov pred porážkou na bitúnku, preto sa dá konštatovať, že kratšia doba skrmovania má lepšie účinky na zdravie ošípaných.



Obr. 2 Vybrané fotografie IHC farbenia v duodene a jejune výkrmových ošípaných. K - kontrolná skupina; T3 - skupina s prídavkom ľanu po dobu 3 týždňov; T6 - skupina s prídavkom ľanu po dobu 6 týždňov; PCNA - proliferačný nukleárny antigén; cas 3 -kaspáza 3.

Súhrn

Z výsledkov vyplýva, že 6-týždňová aplikácia ľanu v krmive ošípaných zvýšila proliferáciu, ale neovplyvnila apoptózu buniek črevného epitelu.

Literatúra

1. Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K. et al.: J Pharm Bioallied Sci, 2012; 4(2):307-309.
2. González-Magaña, A., Blanco, F.J.: Biomolecules, 2020; 10(4):570.
3. Becker, C., Watson, A.J., Neurath, M.F.: Gastroenterology, 2013; 144(2):283-293.
4. Bommareddy, A., Zhang, X., Schrader, D. et al.: Nutr Cancer, 2009; 61:276-283.
5. Babu, R.S., Jurgoński, A.: Molecules, 2025; 30(13):2738.
6. Andrejčáková, Z., Vlčková, R., Sopková, D. et al.: SJBS, 2021; 28(7):3789-3798.
7. Bartkovský, M., Sopková, D., Andrejčáková, Z. et al.: Animals, 2022; 12:1087.
8. Gou, Z.Y., Cui, X.Y., Li, L. et al.: Animal, 2020; 14(11):2414-2422.
9. Okrouhlá, M., Stupka, R., Čítek, J. et al.: Czech J. Anim. Sci., 2013; 58(6):279-288.
10. Smolen, A.J.: Methods in Neurosciences, 1990; Academic Press: New York, USA, 208-229.
11. Zhu, H., Wang, H., Wang, S. et al.: Mol Nutr Food Res, 2018; 62(9):e1700814.
12. Czech, A., Klimiuk, K., Sembratowicz, I.: Sci Rep, 2023; 13(1):13312.

Táto práca sa uskutočnila v rámci riešenia projektu Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky VEGA 1/0414/23.

VPLYV N-3 PNMK A ENTEROLAKTÓNU NA RECEPTORY PROTEÍNOV TEPELNÉHO ŠOKU V BUNKÁCH MATERNICE MYŠÍ

THE EFFECT OF N-3 PUFA AND ENTEROLACTONE ON HEAT SHOCK PROTEIN
RECEPTORS IN THE MOUSE UTERUS

**Diana Babjáková¹, Zuzana Šefčíková², Janka Babel'ová², Zuzana Andrejčáková¹,
Drahomíra Sopková¹, Dušan Fabian², Radoslava Vlčková¹**

¹ *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

² *Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Centrum Biovied SAV, v.v.i., Šoltésovej 4-6,
Košice, SR*

dianastefancova@gmail.com

Abstract

Omega-3 PUFAs, especially docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), are known for their numerous health benefits, primarily due to their anti-inflammatory effects. Enterolactone (EL) also exerts protective effects against certain types of cancer. This study aimed to determine the potential protective effects of DHA, EPA, and EL on the uterus. Uterine horns were collected, cultured, and subjected to immunohistochemical analysis of heat shock proteins (HSPs). HSP 70 expression was lower in the surface epithelium of the DHA group, while it was higher in the stroma of the EL group and the myometrium of the DHA group. EPA did not significantly affect any of the uterine structures.

Úvod

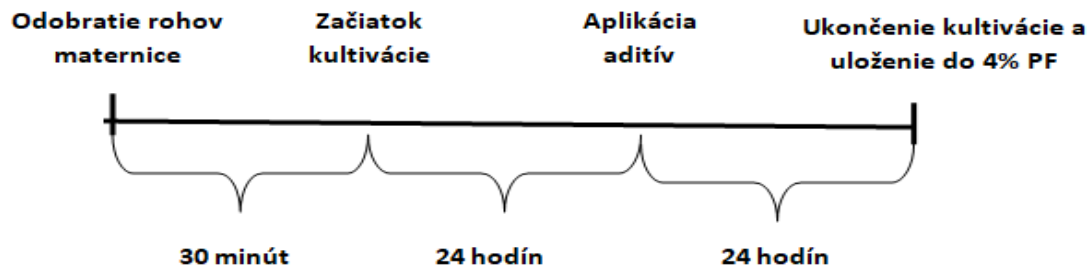
Kyselina dokozahexaénová (DHA) a kyselina eikozapentaénová (EPA) sú omega-3 polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK), ktorých suplementácia počas gravidity má priaznivý účinok na neurologický vývoj plodu, vývoj reči, pamäti, udržanie pozornosti či zrakovú ostrosť. Prídavok DHA a EPA vykazuje protizápalový účinok a môže znížiť riziko preeklampsie, predčasného pôrodu či popôrodnej depresie (1). Zároveň tieto kyseliny podporujú fertilitu tým, že zlepšujú hormonálnu rovnováhu, kvalitu oocytov a implantáciu zárodka (2). Rôzne štúdie preukázali, že potrava bohatá na n-3 PNMK podporuje plodnosť samíc, zatiaľ čo ich nedostatok v kombinácii s nadmerným príjmom n-6 PNMK je spojený so zvýšeným rizikom predčasného pôrodu a abortu (3, 4). Konzumácia n-3 PNMK rastlinného pôvodu navyše vykazuje protektívny účinok voči rozvoju rakoviny endometria (5). Enterolaktón (EL) patrí medzi

fytoestrogény a má mnoho prospešných vlastností, ako je inhibícia proliferácie rakovinových buniek a metastáz. Zároveň má antioxidantný účinok, čím bráni poškodeniu DNA a peroxidácii lipidov pri rakovine. Jeho antikarcinogénny účinok bol preukázaný pri rakovine prsníka a vaječníkov (6, 7, 8). Proteín tepelného šoku 70 (HSP 70) plní dôležitú úlohu pri kontrolovanej zápalovej reakcii, a to indukovaním produkcie cytokínov, tumor nekrotizujúceho faktora alfa, interleukínu 1-beta a interleukínu 6 v bunkách imunitného systému (9). Cieľom tejto štúdie je preto stanovenie možného protektívneho a protizápalového účinku DHA, EPA a EL na maternicu myši ako modelového zvierat'a.

Materiál a Metódy

V štúdiu boli použité 6-8 týždňové samice myši (BALB/c; Velaz s.r.o., ČR; n=12), ktorým boli odobraté rohy maternice (n=24). Rohy materníc boli do 30 minút transportované (pri 4 °C) vo fosfátovom pufovanom roztoku (PBS) na kultiváciu. Následne boli umiestnené do sterilnej 24-jamkovej platničky (1 roh na jamku) s kultivačným médiom (DMEM/F12 1:1, Sigma-Aldrich; 1 ml) obohateným o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS; Sigma) a 1% antibioticko-antimykotického roztoku (ATB-ATM; Sigma). Vzorky boli inkubované 24 hod pri 37 °C. Na druhý deň bolo kultivačné médium nahradené čerstvým (DMEM + 10% FBS + 1% ATB-ATM) s aditívami DHA (10 mg/ml), EPA (10 mg/ml), EL (1 IU/ml) a bez pridania aditív (kontrola; K). Po 24-hodinovej kultivácii (37 °C) boli excízie rohov materníc fixované v 4% paraformaldehyde, dehydratované vzostupnou radou alkoholov a xylénov, zaliate do paraplastu a narezané sánkovým mikrotómom (Reichert, Rakúsko) na poloténké rezy (3 – 5 µm). Po histologickom spracovaní boli rezy materníc deparafinizované, rehydratované, s následným odkrytím väzbových miest, blokovaním aktivity endogénnej peroxidázy a nešpecifického viazania. V ďalšom kroku prebehla aplikácia primárnych protilátok anti-HSP 70 (1:250; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). Po uplynutí inkubácie (4 °C, cez noc) boli rezy premyté s následnou aplikáciou sekundárnych protilátok (goat anti-mouse secondary antibodies; Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), ready-to-use, Dánsko). Na vizualizáciu bol použitý diaminobenzidín (Dako REAL™ DAB+ Chromogen, Dako). Rezy boli kontrastne podfarbené hematoxylínom, dehydratované radou alkoholov a xylénov, následne zaliate do Pertexu (Histolab Products AB, Švédsko). Zobrazovacou technikou (NIS Elements Br k mikroskopu Nikon Eclipse E200 s digitálnou kamerou ProgResCapture Pro 2.7.7) boli po vysušení preparátov vytvorené mikrofotografie. Prostredníctvom ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA) sa vyhodnotila intenzita imunoreakcie. Pozitívna hnedá DAB+ reakcia sa hodnotila v sivej škále (grey level, GL) a bola vyjadrená indexom relatívnej

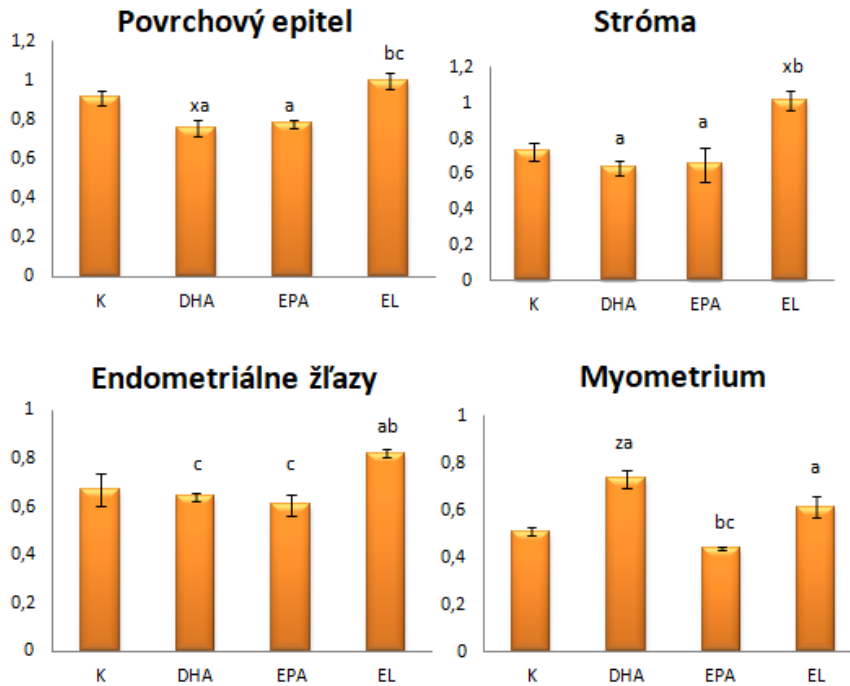
optickej denzity (ROD). Výsledky boli štatisticky spracované v programe GraphPad Prism 3 (USA) s uvedením priemeru a štandardnej chyby (Mean±SEM). Štatistická významnosť rozdielu medzi skupinami bola hodnotená Tukeyho *post hoc* testom a je uvedená na úrovni $p<0,05$, $p<0,01$ a $p<0,001$.



Obr. 1 Schéma pokusu

Výsledky

Vplyv aditív DHA, EPA a EL na prítomnosť markera HSP 70 (proteín tepelného šoku 70) v bunkách materníc myší bol kvantitatívne vyjadrený prostredníctvom relatívnej optickej denzity (ROD) a je znázornený na obrázku 2. Pozitívna imunohistochemická (IHC) reakcia sa prejavila tmavohnedým sfarbením v cytoplazme. Prítomnosť HSP 70 v bunkách povrchového epitelu bola v DHA skupine nižšia v porovnaní s kontrolou ($p<0,05$). V EPA a EL skupine neboli v porovnaní s kontrolnými myšami zaznamenané žiadne signifikantné zmeny. EL v porovnaní s DHA ($p<0,001$) a EPA ($p<0,01$) zvýšil ROD HSP 70. Rozdiel medzi efektom PNMK (DHA, EPA) bol nesignifikantný. V oblasti strómy iba EL zvýšil ROD HSP 70 oproti kontrole ($p<0,05$) aj DHA a EPA (obidva $p<0,01$), pričom medzi PNMK nebol významnejší rozdiel zaznamenaný. Expressia HSP 70 v oblasti endometriálnych žliaz nebola v porovnaní s kontrolou významne ovplyvnená žiadnym z aditív. Efekt EL bol zvýšený v porovnaní s DHA ($p<0,05$) aj EPA ($p<0,01$). V oblasti myometria samíc myší bola IHC reakcia silnejšia v DHA skupine ($p<0,001$) v porovnaní s kontrolnými myšami, kde nebol zaznamenaný výraznejší vplyv EPA ani EL (obidva ns). Expressia HSP 70 však bola výrazne potlačená prídavkom EPA, a to v porovnaní s DHA ($p<0,001$) a EL ($p<0,01$).



Obr. 2 Vplyv DHA, EPA a EL na expresiu HSP 70 (vyjadrené v ROD) v bunkách maternice myši; xyz – porovnanie s kontrolou, abc – porovnanie medzi experimentálnymi skupinami, kde $x, a - p < 0,05$; $y, b - p < 0,01$; $z, c - p < 0,001$.

Diskusia

Maternica, podobne ako aj ďalšie orgány, podlieha transformácii vplyvom pôsobenia rôznych chemických či environmentálnych faktorov alebo stresu. Preto je na mieste skúmať účinok prídavných látok, u ktorých sa predpokladá ich protektívne pôsobenie voči určitému toxickému agensu. Tepelný stres negatívne ovplyvňuje reprodukčný aparát samíc a je príčinou aj ich sezónnej neplodnosti. Hypertermia vyvolaná prostredím spôsobuje zvýšenie hladiny proteínov tepelného šoku (HSP). U prasičiek vystavených tepelnému stresu v periimplantačnom období bola ohrozená životaschopnosť embryí (10). Zároveň HSP plní dôležitú úlohu pri kontrolovanej zápalovej reakcii, ktorá je potrebná pri implantácii oplodneného vajíčka a rast trofoblastu (11). HSP70 spôsobuje zápalovú reakciu indukovaním produkcie cytokínov, tumor nekrotizujúceho faktora alfa, interleukínu 1-beta a interleukínu 6 v bunkách imunitného systému (9).

V našej práci sme zaznamenali, že po podaní DHA došlo v povrchovom epiteli maternice k zníženiu expresie HSP 70. Tento nález naznačuje, že DHA v tejto vrstve tlmí nadmernú stresovú a zápalovú signalizáciu. Zníženie expresie HSP 70 v povrchovom epiteli tak môže predstavovať ochranný mechanizmus, ktorý bráni rozvoju lokálneho zápalu a vytvára stabilnejšie mikroprostredie. V povrchovom epiteli sa prejavil protizápalový a protektívny potenciál DHA.

Mnohé vedecké štúdie naznačujú, že bunky maternice obsahujú množstvo HSP27, HSP60, HSP70 a HSP90, čo naznačuje ich možné zapojenie v procese gravidity. Je známe, že HSP je úzko prepojený s decidualizáciou, implantáciou, placentáciou a zároveň s dysreguláciou pri zlyhaní implantácie a inými feto-maternálnymi komplikáciami (11). Práve tento fakt poskytuje dôležitý kontext pre interpretáciu našich výsledkov. Zistili sme, že aplikácia DHA v oblasti myometria a EL v stróme maternice viedla k zvýšenej expresii HSP 70 namiesto očakávaného potlačenia. Tento jav možno vysvetliť tak, že sledované látky nepôsobia len pasívne protektívne, ale aktívne stimulujú prirodzenú obranyschopnosť tkaniva. Zvýšená expresia HSP 70 po podaní DHA a EL tak môže predstavovať mechanizmus posilnenia maternice, kedy sa tkanivo stáva odolnejším voči potenciálnym stresovým faktorom. Zaujímavým zistením však je, že na rozdiel od DHA suplementácia EPA nemala na expresiu HSP 70 v sledovaných štruktúrach maternice významný vplyv. Tento rozdiel v pôsobení dvoch príbuzných n-3 PNMK naznačuje vysokú mieru selektivity v bunkovej odpovedi maternice.

Súhrn

Výsledky našej práce preukázali, že suplementácia DHA vykazuje tkanivovo špecifický účinok na expresiu HSP 70 v maternici. V oblasti povrchového epitelu bolo zistené signifikantné potlačenie expresie HSP 70, čo naznačuje výrazný antiinflamačný potenciál. Naopak, v oblasti myometria DHA expresiu HSP 70 podporila. Podávanie EL zvýšilo expresiu HSP 70 v oblasti strómy, zatiaľ čo prídavok EPA nevyvolal žiadne signifikantné zmeny. Endometriálne žľazy na prídanie aditív nereagovali. Zvýšená expresia HSP 70 v stróme a myometriu pravdepodobne odzrkadľuje prítomnosť týchto proteínov, nakoľko sú súčasťou fyziologického prostredia maternice.

Literatúra

1. Amza, M., Hamoud, B.H., Sima, R.M.: *Biomedicines*, 2024; 12(7):1471.
2. Hammiche, F., Vujkovic, M., Wijburg, W.: *Fertil. Steril.*, 2011; 95(5):1820-1823.
3. Lass, A., Belluzzi, A.: *Reprod. Biomed. Online.*, 2019; 38(1): 95-99.
4. Safarinejad, M.R., Hosseini, S.Y., Dadkhah, F. et al.: *Clin. Nutr.*, 2010; 29(1): 100-105.
5. Yamine, S.G., Huybrechts, I., Biessy, C. et al.: *BMC Cancer*, 2023; 23(159).
6. Ilbeigi, D., NourBakhsh, M., Khaghani, S. et al.: *Cell J.*, 2017; 19(1): 37- 43.
7. Liu, H., Liu, J., Wang, S. et al.: *J Ovarian Res.*, 2017; 10 (49).
8. Prasad, K.: *Int J Angiol.*, 2000; 9:220–225.
9. Asea, A.A.A., De Maio, A.: Springer, 2007.
10. Adur, M.K., Seibert, J.T., Romoser, M.R. et al.: *J. Anim. Sci.*, 2022; 100(7).
11. Jee, B., Dhar, R., Singh, S. et al.: *Front Cell Dev. Biol.*, 2021; 9.

Táto práca vznikla za podpory projektov APVV-22-0071 a VEGA 1/0414/23.

HISTOLOGICKÉ ZMENY V PEČENI STARNÚCICH POTKANOV PO EXPOZÍCII IONIZUJÚCIM ŽIARENÍM

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER OF AGING RATS AFTER EXPOSURE TO IONIZING RADIATION

Soňa Báľentová¹, Júlia Barboráková¹, Dagmar Kalenská², Peter Muríň³, Ivan Kecskés³

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, Malá Hora 4, Martin, SR

²Ústav anatómie JLF UK v Martine, Malá Hora 4, Martin, SR

³Onkologické centrum MFN, Kollárova 2, Martin, SR

sona.balentova@uniba.sk

Abstract

In our study, we investigated how older age influences and modifies the response of the liver parenchyma in rats after exposure to fractionated whole-brain radiation (fWBI). Young adult male Wistar rats (4 months old) received fWBI with a total dose of 32 Gy administered in 4 fractions (dose 8 Gy per fraction) once a week on the same day for 4 consecutive weeks. Six months after fWBI, we detected an increase in inflammatory markers by analyzing of immunofluorescent stained slides. The influence of older age as a possible radioprotective factor in the development of radiation-induced changes cannot be ruled out.

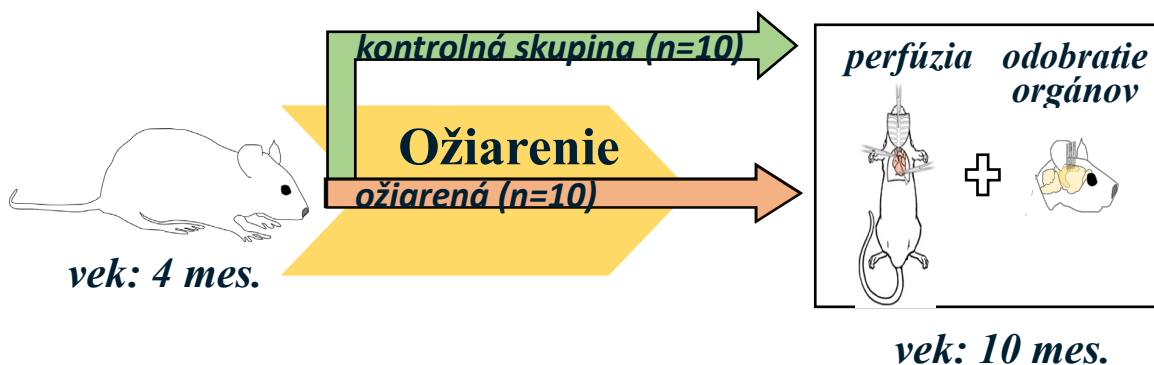
Úvod

V klinickej rádioterapii sa u pacientov s metastázujúcimi nádormi mozgu a nádormi hlavy a krku najviac používa kraniálne frakcionované ožiarovanie. Vedľajšie účinky žiarenia sú zmiernené alebo eliminované technikou tvarovania ožarovacieho poľa pomocou tieniacich blokov okolo zdravých tkanív a orgánov. V experimentálnych štúdiách na animálnych modeloch sa uvedená technika často nepoužíva, preto sú zdravé orgány nechránené a exponované voči žiareniu. Hoci absorbovaná dávka žiarenia je nižšia, vyvoláva široké spektrum odpovedí aj vo vzdialenejších orgánoch, napr. v pečeni (1, 2). Po ožiarení dochádza v pečeni k rýchlejšiemu starnutiu a apoptóze alebo nekróze hepatocytov, Kupferových a Itoových buniek, zmenám endotelových buniek (napr. edém, zúženie lúmenu, kongescia a hemorágia sínusoidálnych kapilár) a ukladaním kolagénu v Disseho priestore vedúce k zvýšenej fibrotizácii a následne cirhóze pečene (1, 2, 3). V klinických a predklinických štúdiách bola po expozícii terapeutickými dávkami ionizujúceho žiarenia popísaná zvýšená regeneračná

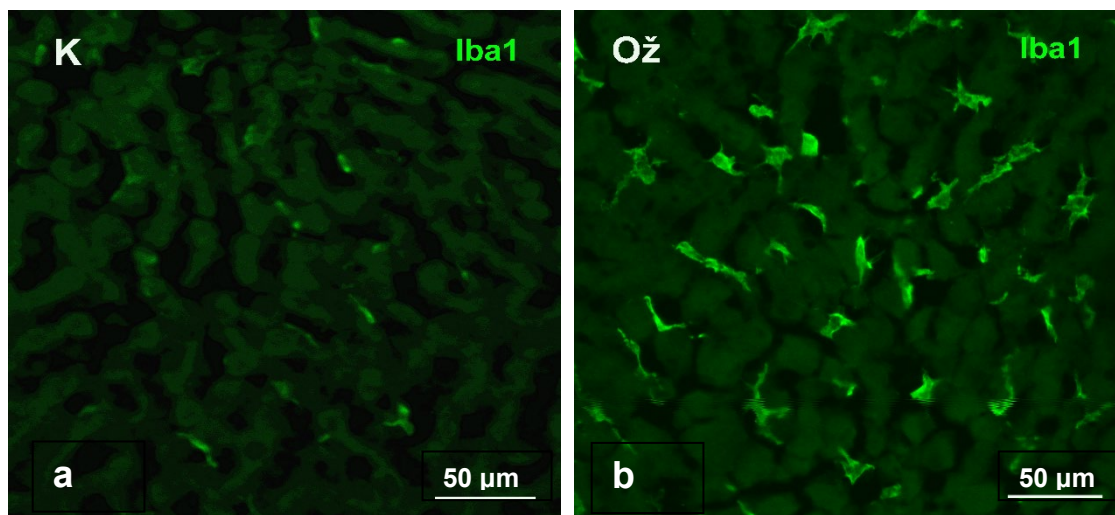
schopnosť vedúca ku kompenzačnej hypertrofii pečenevého parenchýmu (4, 5). Jedným z faktorov, ktorý ovplyvňuje odpoveď organizmu je aj vyšší vek v čase ožiarenia (6) Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť ako dlhodobjšie prežívanie potkanov po kraniálnom frakcionovanom ožiarení ovplyvní pečenevý parenchým, najmä z hľadiska prejavov zápalu.

Materiál a metódy

V experimente sme použili staršie dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=20), ktoré mali na začiatku experimentu vek štyri mesiace (Obr. 1). Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=10) a druhú skupinu (n=10) sme ožarovali frakcionovanou dávkou (cD=32 Gy, rozdelenou na 4 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. Po šiestich mesiacoch sme u oboch skupín vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4 % paraformaldehydu. Po dekapitácii a vybratí pečeni sme narezali sériové, sagitálne kryorezy, ktoré sme farbili imunofluorescenčne. V preparátoch sme identifikovali marker Kupferových buniek-ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1) a fotili na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Japonsko). Pomocou obrazovej analýzy (program Image J; Bethesda, MD, USA) sme hodnotili počet Iba1-imunoreaktívnych (Iba1-IR) (celkový počet IR-buniek/cm²). Keďže analýza preparátov ešte nie je ukončená, vo výsledkovej časti uvádzame len orientačné nálezy.



Obr. 1 Schéma experimentálneho dizajnu.



Obr. 2 Mikrofotografie kryorezov z pečeni kontrolných (K) a ožiarených (Ož) potkanov vyšetovaných šesť mesiacov po frakcionovanom ožiarení celkovou dávkou $cD=32$ Gy. Pečene boli farbené imunofluorescenčne na identifikovanie markera Kupferových buniek-ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1). Po ožiarení došlo k zvýšeniu počtu Iba1-IR Kupferových buniek.

Výsledky a diskusia

Kupferove bunky sú veľmi citlivé na ožiarenie a po expozícii dochádza k ich aktivácii, ktorá vedie k uvoľneniu mediátorov zápalu, napr. interleukínu-6 (IL-6) a tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). Produkujú aj growth factor-beta 1 (TGF- β 1) aktivujúci Itoove bunky, ktoré začnú nadmerne tvoriť zložky extracelulárnej matrix, resp. dochádza ku zvýšenej fibrotizácii (7). V našom experimente sme predbežne zistili nárast Kupferových buniek po ožiarení, ktorý môžeme interpretovať ako zvýšenú zápalovú odpoveď (8, 9) (Obr. 2). Výsledky vyšetrenia krvnej plazmy ukázali, že po ožiarení došlo k zmenám parametrov oxidačného stresu, napr. poškodeniu mitochondrií, zvýšenou potrebou energie a poklesom proteosyntézy. Možno predpokladať, že po ožiarení došlo k poklesu proliferačnej a následne regeneračnej schopnosti pečeneového parenchýmu. Na konkrétnejšie závery je potrebné vykonať detailnejšiu morfometrickú analýzu preparátov a výsledky korelovať s ďalšími vyšetreniami, napr. magnetickou rezonančnou spektroskopiou.

Súhrn

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. Nakajima, T., Ninomiya, Y., Neno, M.: *Int J Mol Sci*, 2018; 19(12):3855.
2. Yakubu, A., Abdulazeez Okene, I., Frank, C.A., et al.: *Radiation*, 2025; 5(4):27.
3. Zhu, W., Zhang, X., Yu, M. *Cell Death Discov*, 2021; 7(1):244.
4. Coskun, N., Yildirim, A., Yuksel, A.O., et al.: *Nucl Med Mol Imaging*, 2022; 6(6):291-298.
5. Páramo, M., Santamaría, E., Idoate, M.A., et al.: *Sci Rep*, 2022; 12(1):1777.
6. O'Donovan, A., O'Hanlon, S.: *Ageing Cancer Res Treat*, 2025; 2:202508.
7. Sun, J., Lu, H.R., Wu, J.H., et al.: *J Hepatocell Carcinoma*, 2025;12:2045-2054.
8. Tello, K., Christiansen, H., Gürleyen, H., et al.: *Radiat Environ Biophys*, 2008; 47(3):389-397.
9. Báľentová, S., Hnilicová P., Kalenská, D., et al.: *Neurochem Int*, 2024;105726.

MNEMOTECHNICKÉ POMÔCKY A KREATIVITA AKO NÁSTROJE NA ZEFEKTÍVNIENIE UČENIA SA

MNEMONICS AND CREATIVITY AS TOOLS FOR ENHANCING LEARNING EFFICIENCY

Adriana Boleková, Ingrid Hodorová

Ústav anatómie, LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice, SR

adriana.bolekova@upjs.sk

Abstract

Anatomy is one of the most important subjects in medical schools. The key to learning is to improve long-term retention of the most important knowledge. Students' memory and imagination can be improved by using mnemonics and creativity. Mnemonics and creativity are a combination of memory techniques with creative thinking, which significantly improves both memory and comprehension of the material. Mnemonics are strategies that help to remember information better by linking it to something familiar, meaningful, or fun. Creativity in learning means the ability to create new connections and ideas. It helps in learning by making information more interesting and personal.

Úvod

Mnemotechnické pomôcky spolu s kreativitou tvoria silný nástroj na učenie sa. Najčastejšími typmi mnemotechnických pomôcok sú akronymy (rozpamätanie sa pomocou prvých písmen slov), rýmy a básničky (učivo v rytmickej forme), vizualizácia (predstava rôznych aj neobvyklých obrazov), asociácie (prepájanie nových informácií s už známymi). Ich výhodou je, že znižujú náročnosť učenia a udržiavajú dlhodobú pamäť. Najviac používanými kreatívnymi pomôckami sú: kreslenie a vizuálne poznámky, vymýšľanie príbehov k učivu, dramatizácia, učenie sa cez hry alebo simulácie. Výhodou kreatívnych pomôcok je, že podporujú hlbšie pochopenie, nie len memorovanie. Najlepší efekt však vzniká, keď sa tieto dve oblasti spoja. Prepojenie mnemotechník a kreativity, vytváranie vlastných mnemotechnických pomôcok, používanie fantázie pri tvorbe asociácií alebo zapájanie emócií a humoru má značný význam pre efektívne učenie. Používanie týchto nástrojov zlepšuje pamäť a koncentráciu, skraca čas učenia, zvyšuje motiváciu a podporuje kritické myslenie. Namiesto pasívneho memorovania umožňujú aktívne zapojenie mozgu, čo vedie k lepším a trvácnejším výsledkom (1).

Učenie sa a anatómia

Anatómia je predmet, ktorý má nezastupiteľné miesto na lekárskech fakultách, má študentom poskytnúť informácie o anatomických štruktúrach a vzťahoch v ľudskom tele. Študenti musia rozpoznať a pomenovať časti a štruktúry ľudského tela použitím presnej anatomickej nomenklatúry. Podrobná systematická anatómia a topografické vzťahy orgánov a štruktúr sú pre študentov dôležité, pomáhajú im úplne pochopiť ľudské telo. Tradičný prístup k výučbe anatómie sa vplyvom informačných technológií postupne mení, i keď stále platí, že klasická pitva je najlepším spôsobom, ako sa ju naučiť. Povaha anatómie sa za posledné desaťročie zmenila v dôsledku obrovského pokroku v anatomickom zobrazovaní a výučbe, ale aj novou generáciou študentov, ktorí sa učia inak ako študenti minulých rokov. V súlade s novými trendami vo výučbových metódach je potrebné venovať väčšiu pozornosť kvalite, hĺbke a efektívnosti vzdelávania. Moderné nástroje určené na podporu vzdelávacieho procesu ponúkajú možnosti, ktoré umožňujú učiteľom efektívnejšie prezentovať výučbu. Keďže predstavivosť je veľmi dôležitým aspektom pri učení sa anatómie, na oživenie výučby sa používajú aj simulačné a virtualizačné metódy. Pomocou 3D virtuálnych modelov si študenti môžu predstaviť anatomické štruktúry tak, ako sú uložené v skutočnom tele a dosiahnuť veľmi vysokú presnosť zobrazenia (2). Štúdium je proces, ktorý určuje, čo sa naučíme a čo si zapamätáme tak, aby sme si to vedeli neskôr vybaviť. Nie je to jednorazová záležitosť, ale systematická činnosť zahrňujúca plánovanie, čítanie, tvorbu poznámok a hlavne opakovanie. Cieľom učenia sa je uložiť informácie do dlhodobej pamäte. Skutočné učenie sa preukazuje schopnosťou získané informácie neskôr použiť a reprodukovať. V kontexte pamäti sa tento prístup zhoduje s princípmi, ako sú koncentrácia, organizácia, elaborácia a pravidelné opakovanie.

Teoretické aspekty učenia sa

Bloomova taxonómia je jednoduchý spôsob, ako rozdeliť úrovne učenia a myslenia od najľahších po najnáročnejšie: zapamätať si (niečo len zopakovať), pochopiť (rozumieť, vysvetliť vlastnými slovami), použiť (v praxi), analyzovať (rozdeliť informácie na časti a skúmať ich), hodnotiť (posúdiť, čo je správne alebo lepšie), tvoriť (vytvoriť niečo nové). Bloomova taxonómia ukazuje, ako sa z obyčajného zapamätania dostať až k tvorivému mysleniu. Je použiteľná aj v anatómii, a to na kategorizáciu cieľov výučby predmetu a na hodnotenie kognitívnych objektívnych kompetencií a afektívneho cieľa (3). Kompetencia *vedomosti* sa získava pozorovaním a vybavovaním si informácií. Otázky pre študentov môžu začínať slovami: vymenujte, definujte, opíšte, identifikujte, ukážte, označte, pomenujte... čo, kde atď. Táto kompetencia je v anatómii najdôležitejšia, pretože opis orgánov a ich častí je

hlavným obsahom tohto predmetu. Kompetencia *porozumenie* sa preukazuje porozumením informácií, interpretáciou faktov, porovnávaním, kontrastovaním, usporiadaním alebo zoskupovaním. Študenti si môžu túto kompetenciu precvičovať otázkami začínajúcimi sa na: zhrňte, porovnajte, spojte, rozlíšte, odhadnite, diferencujete... Treťou Bloomovou kompetenciou používanou v anatómii je *aplikácia*, ktorá sa preukazuje zručnosťami: používanie informácií, riešenie problémov a používanie požadovaných zručností alebo vedomostí. Študenti preukazujú svoje vedomosti odpoveďami na otázky začínajúcimi sa slovami: demonštrujte, doplňte, znázornite, nakreslite, riešte, klasifikujte... Afektívnym cieľom z Bloomovej taxonómie je *vnímanie javov* s vedomím, ochotou počúvať a selektívnou pozornosťou, napr. keď študent učí ostatných študentov a ukazuje im anatomicke štruktúry. Všeobecným problémom pri učení sa anatómie je, že si vyžaduje veľa memorovania zdanlivo komplikovanej anatomickej nomenklatúry. Tento problém sa týka asociatívneho učenia, ktoré vedie k presnej reprodukcii alebo vybavovaniu si informácií. Rozlišuje učenie sa na dva typy: hĺbkové a povrchové učenie. Hĺbkovým prístupom sa vedomosti stávajú osobnými a relevantnými pre reálne využitie. Povrchový prístup k učeniu sa spolieha na memorovanie a nevedie k hlbšiemu porozumeniu. Oba tieto typy učenia sa môžu používať pri učení sa anatómie. Hĺbkové učenie je dôležité pre pochopenie problematických detailov a vzájomných vzťahov medzi orgánmi a ich štruktúrami. Povrchové učenie vedie k rýchlemu zapamätaniu si anatomických pojmov, je to spôsob, akým sa dá ľahšie naučiť zložitá nomenklatúra (4).

Diskusia

Je dôležité si uvedomiť, že žiadny študent nemá zlú pamäť, pretože „zlá pamäť“ je len výsledkom nedostatočnej pozornosti. Väčšina študentov má naozaj dobrú pamäť, ale ju nepoužíva efektívne. Nikto študentov nenaučil, ako pamäť používať. Včasné opakovanie nových vecí je najlepší spôsob učenia sa. Pamäť funguje na základe asociácií, takže študenti by mali aktívne pracovať na vytvorení nejakej šikovnej asociácie medzi dvoma alebo viacerými faktami tak, aby si danú vedomosť mohli zapamätať. Cieľom je byť kreatívny, vymyslieť si napr. obrázok, ktorý spája jednotlivé fakty, najlepšie niečo nezvyčajné alebo kuriózne, aby sa to dalo lepšie zapamätať (5).

Fox sa zaoberal dimenziami štýlu výučby. Predpokladal, že neexistuje jeden univerzálny spôsob, a tak vytvoril koncept štyroch rôznych osobných teórií. Pre anatómiu je použiteľná jeho teória transferu. Podľa tejto teórie je výučba o poskytovaní informácií študentom, pričom kritickým prvkom je nájdenie najlepšieho spôsobu štruktúrovania informácií. Používanie

mnemotechnických pomôcok je veľmi dobrý spôsob, ako podporovať predstavivosť a zlepšovať zapamätávanie prostredníctvom asociácií (6).

Vysokoškolské vzdelávanie kladie dôraz na individuálne učenie sa a individualizované hodnotenie. Hlavným problémom vysokoškolského vzdelávania je absencia výučby všeobecných učebných zručností ako sa učiť. Učenie sa je pritom nevyhnutná a prirodzená ľudská činnosť. Je dôležité učiť sa spôsobom, ktorý maximalizuje učenie, ale minimalizuje čas trávený učením sa. Ideálny študent je ten, ktorý má flexibilitu prispôbiť sa rôznym prístupom pri stretnutí sa s novou situáciou alebo problémom. Podľa Hirani a Varin je učenie najefektívnejšie vtedy, keď študent pociťuje uspokojenie z hľadiska zvládnutia zručností, seba-rozvoja a sebaúcty (7).

Súhrn

Hlavnou výzvou výučby anatómie je zabezpečiť si dlhodobé uchovanie vedomostí. Mnemotechnické pomôcky a stimulácia predstavivosti spolu s hĺbkovým učením zlepšujú pamäť počas procesu učenia sa. Spomenuté metódy pomáhajú študentom naučiť sa štruktúry ľudského tela zaujímavejším spôsobom. Môže to byť užitočné nielen pre učiteľov a študentov anatómie, ale aj pre iné predmety, najmä cudzie jazyky. Hra so slovami je osvedčený spôsob, ako si dlhodobo uchovať terminológiu v pamäti. Zábavné je aj zlepšovanie pamäti pomocou predstavivosti. Aktivita a kreativita spolu so skúsenosťami posilňujú proces učenia sa, študenti sa učia bez stresu, pomáha im to pri učení sa a zapamätávaní si.

Literatúra

1. Copley, A., Knapper, Ch. Lifelong Learning in Higher Education, 2021.
2. Majerník, J., Kačmariková, A.: Introduction to MS Access. Databases not only for medical students, 2025.
3. Bloom, B., S.: Taxonomy of Educational Objectives: The Classification of Educational Goals. 1956.
4. Biggs, J.: Teaching for Quality Learning at University, 1999.
5. Tepperwein, K.. Die Kunst mühelosen Lernens: Neue Lernmethoden machen es Ihnen leicht, 2004.
6. Fox, D.: Personal theories of teaching. Studies in Higher Education, 1983; (2):151-163.
7. Hirani, Ch., Varin, C.: Supporting Adult Learners through Games and Interactive Teaching, 2022.

Grantová podpora KEGA č. 006UPJS-4-2024.

**PRIAMY ODSŤUP A. CIRCUMFLEXA FEMORIS LATERALIS Z A. FEMORALIS:
ANATOMICKÁ VARIÁCIA ARTÉRIOVÉHO VETVENIA V PROXIMÁLNEJ ČASTI
STEHNA**

DIRECT ORIGIN OF THE LATERAL CIRCUMFLEX FEMORAL ARTERY FROM THE
FEMORAL ARTERY: AN ANATOMICAL VARIATION OF ARTERIAL BRANCHING IN
THE PROXIMAL THIGH

Tomáš Borza¹, Šimon Kentoš¹, Marko Vrzgula², Natália Hvizdošová², Ingrid Hodorová²

¹ Študent všeobecného lekárstva, LF UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP 1, Košice, SR

² Ústav anatómie, LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice, SR

marko.vrzgula@upjs.sk

Abstract

The femoral artery, the main arterial trunk of the thigh, exhibits clinically relevant branching variations. This report describes a direct origin of the lateral circumflex femoral artery from the femoral artery, identified during routine anatomical dissection of a 70-year-old male cadaver. In contrast to its usual origin from the profunda femoris artery, the variant vessel arose directly from the femoral artery on the left side, 45 mm distal to the inguinal ligament. Awareness of this anatomical variation may support anatomical orientation in the inguinofemoral region and may help reduce the risk of inadvertent vascular injury during diagnostic and surgical procedures.

Úvod

A. femoralis (AF) predstavuje hlavnú tepnu stehna a je priamym pokračovaním *a. iliaca externa* distálne od *lig. inguinale* (1). AF sa z hľadiska priebehu delí na tri úseky. Proximálny úsek sa nachádza v *trigonum femorale* a *fossa iliopectinea*, stredný úsek prebieha za *m. sartorius* a distálny úsek je lokalizovaný v *canalis adductorius* (2, 3). Z kmeňa AF odstupujú viaceré vetvy, ktoré zabezpečujú vaskularizáciu príslušných oblastí. Medzi hlavné vetvy patrí *a. epigastrica superficialis*, ktorá pokračuje kraniálne k pupku, *a. circumflexa ilium superficialis* smerujúca k *spina iliaca anterior superior*, *aa. pudendae externae* zásobujúce vonkajšie pohlavné orgány, *a. genus descendens* podieľajúca sa na tvorbe *rete articulare genus*, a *a. profunda femoris* (APF), ktorá zostupuje do hlbších vrstiev stehna (4). Z kmeňa APF štandardne odstupujú *a. circumflexa femoris medialis*, ktorá pokračuje mediálne a delí sa na *r.*

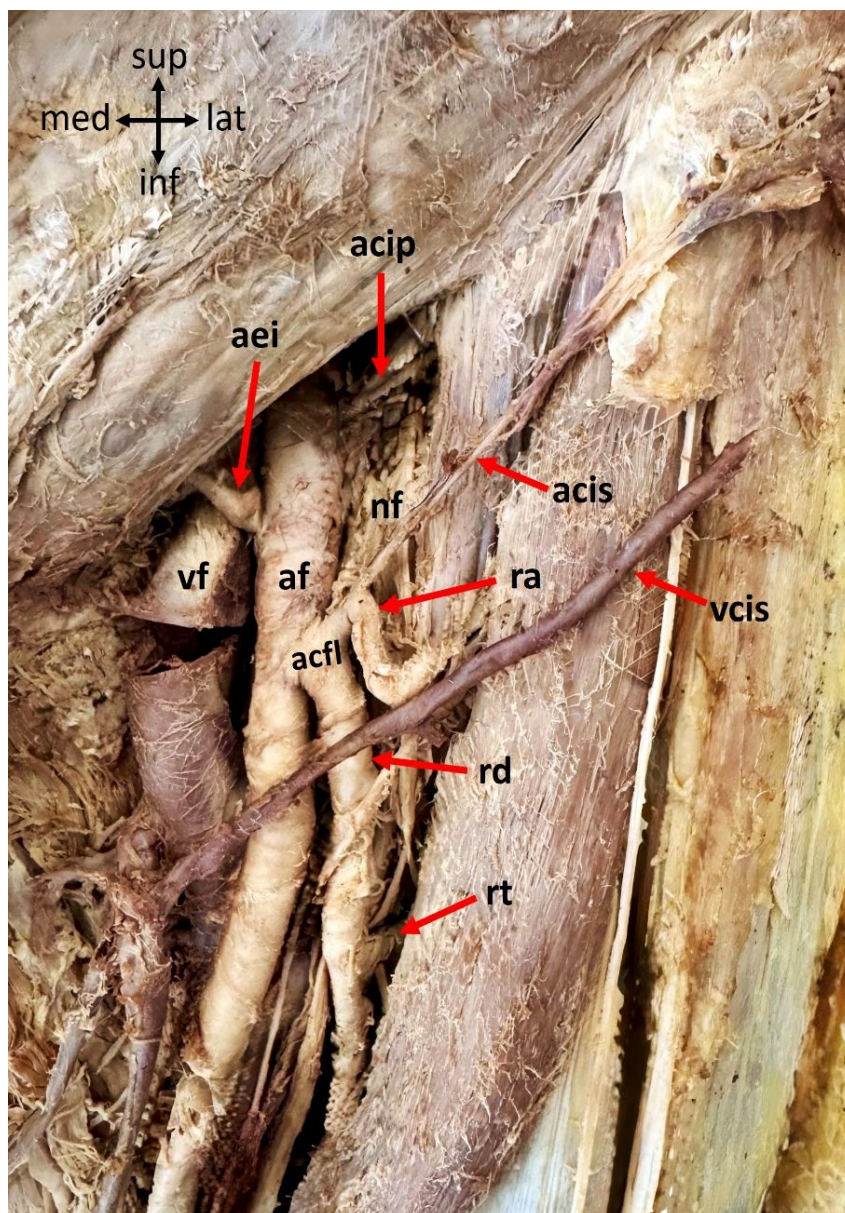
superficialis, *r. profundus*, *r. ascendens*, *r. descendens* a *r. acetabularis*, a *a. circumflexa femoris lateralis* (ACFL), ktorá smeruje laterálne a delí sa na *r. ascendens*, *r. descendens* a *r. transversus* (5). Topografické pomery a vetvenie AF sú klinicky významné pri diagnostických, chirurgických a intervenčných výkonoch v oblasti dolnej končatiny. Napriek typickému anatomickému usporiadaniu sa v priebehu a vetvení AF môžu vyskytovať variácie, ktorých znalosť je dôležitá pre správnu anatomickú orientáciu a minimalizáciu rizika iatrogénneho poranenia. Jednou z takýchto variácií je aj priamy odstup ACFL z AF, ktorý bol identifikovaný pri anatomickej pitve.

Materiál a metódy

Na Ústave anatómie LF UPJŠ v Košiciach bola na výučbové účely v súlade s platnými inštitucionálnymi predpismi realizovaná anatomická pitva kadáveru mužského pohlavia vo veku 70 rokov. Kadáver nevykazoval známky zjavnej vonkajšej patológie a bol krátko po smrti fixovaný roztokom na báze alkoholu. Pri disekcii z ventrálneho prístupu bola bilaterálne v oblasti proximálneho stehna odpreparovaná koža a podkožné tkanivo. Následne boli identifikované hlavné nervovocievne štruktúry, a to *v. saphena magna*, *a. et v. femoralis* a *n. femoralis*. V ďalšom kroku boli vypreparované vetvy odstupujúce z proximálneho úseku AF. Tým istým prístupom bola následne vykonaná aj disekcia APF na oboch dolných končatinách. Na záver boli pomocou posuvného meradla zmerané vzdialenosti odstupu jednotlivých vetiev, pričom ako referenčný bod slúžil stred *lig. inguinale*. Zároveň bola zhotovená fotodokumentácia anatomickej variácie.

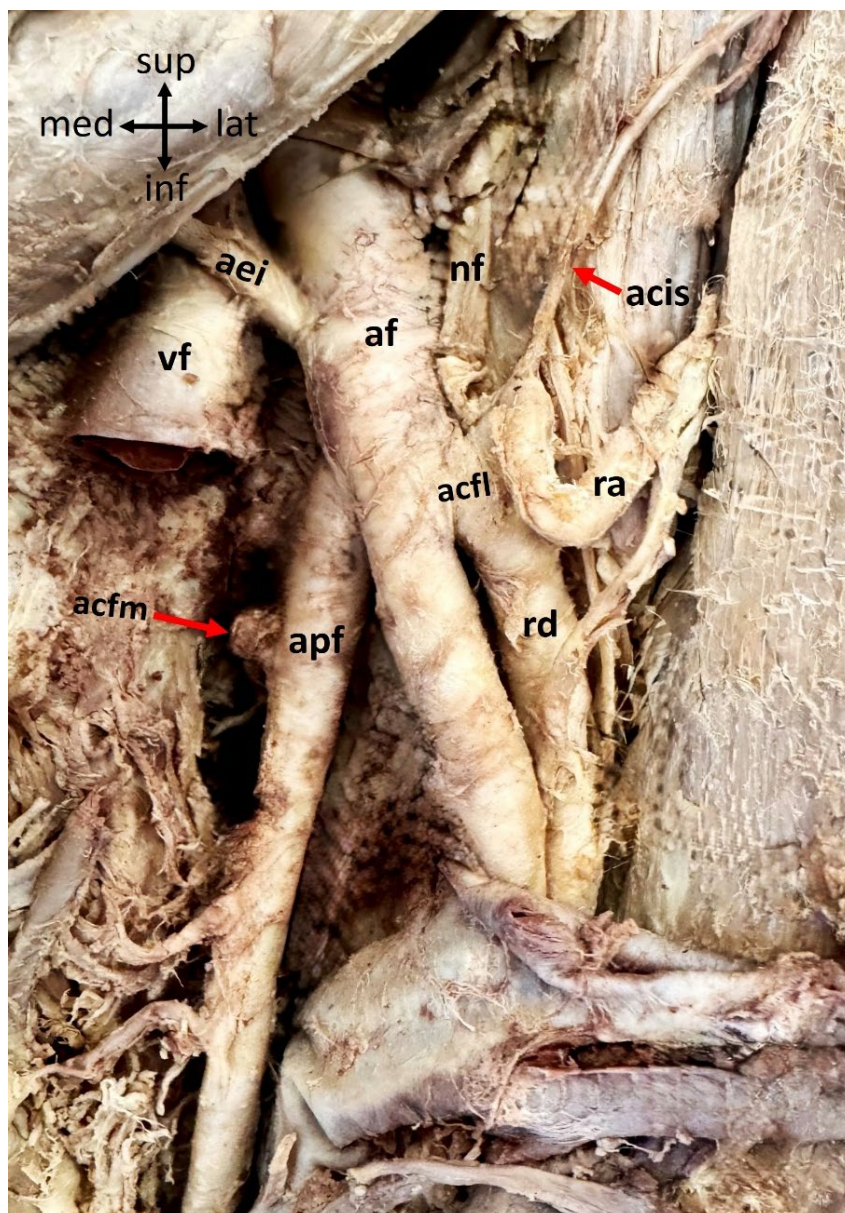
Výsledky

Pri anatomickej pitve bol v oblasti proximálneho stehna vľavo identifikovaný priamy odstup ACFL z AF. ACFL odstupovala z laterálnej steny AF 45 mm distálne od *lig. inguinale* a po krátkom priebehu (5 mm) sa rozdelila na *r. ascendens* a *r. descendens*. Z proximálnej časti *r. ascendens* odstupovala po 15 mm tenšia vetva smerujúca pozdĺž *lig. inguinale* laterokraniálne k *spina iliaca anterior superior*, ktorá topograficky zodpovedala priebehu *a. circumflexa ilium superficialis*. Z *r. descendens* odstupoval po 48 mm *r. transversus* (Obr. 1).



Obr. 1 Atypický odstup ACFL z AF, pohľad spredu na proximálnu časť ľavého stehna; af: a. femoralis, acfl: a. circumflexa femoris lateralis, ra: ramus ascendens, rd: ramus descendens, rt: ramus transversus, acis: a. circumflexa ilium superficialis, aei: a. epigastrica inferior, acip: a. circumflexa ilium profunda, vf: v. femoralis, nf: n. femoralis, vcis: v. circumflexa ilium superficialis; vcis je mierne odtiahnutá nadol pre lepšiu prehľadnosť.

APF odstupovala z AF mediodorzálne v rovnakej výške ako ACFL a vydávala a. circumflexa femoris medialis, pričom vetva zodpovedajúca ACFL z jej kmeňa neodstupovala (Obr. 2). Pravé stehno bolo bez nálezu cievnych variácií.



Obr. 2 Odstup APF z AF, pohľad spredu na proximálnu časť ľavého stehna; af: a. femoralis, apf: a. profunda femoris, acfm: a. circumflexa femoris medialis, acfl: a. circumflexa femoris lateralis, ra: ramus ascendens, rd: ramus descendens, acis: a. circumflexa ilium superficialis, aei: a. epigastrica inferior, vf: v. femoralis, nf: n. femoralis, af je mierne odtiahnutá laterálne, vf je preťatá a odtiahnutá nadol a laterálne pre lepšiu prehľadnosť

Diskusia

V dostupnej literatúre je priamy odstup ACFL z AF popisovaný ako jedna z anatomických variácií artériového vetvenia v oblasti proximálneho stehna; jeho frekvencia sa v jednotlivých súboroch líši. Podľa dostupných údajov sa frekvencia odstupe ACFL z AF uvádza v rozmedzí 4,6–25 %, čo poukazuje na značnú variabilitu medzi jednotlivými štúdiami a populáciami (6,7).

Manjappa a Prasanna v kadaveróznej štúdií na 40 dolných končatinách v indickej populácii zistili odstup ACFL z AF v 22,5 % prípadov, pričom priemerná vzdialenosť odstupe od *lig. inguinale* bola 55 mm (8). Siddharth a kol. zaznamenali priamy odstup tejto tepny z AF v 16 % prípadov v súbore 100 dolných končatín severoamerickej populácie, avšak priemerná vzdialenosť odstupe od *lig. inguinale* nebola v danej štúdií uvedená (9). Vasquez a kol. zistili tento typ anatomickej variácie v 4,6 % prípadov v kadaveróznom súbore z Anglicka (439 dolných končatín), pričom údaj o priemernej vzdialenosti odstupe od *lig. inguinale* taktiež nebol uvedený (6). Z klinického hľadiska má táto anatomická variácia význam najmä preto, že ACFL môže byť pri odstupe z AF počas chirurgických a iných intervenčných výkonov mylne považovaná za APF (8). Variácie priebehu a topografických vzťahov ACFL môžu tiež zvyšovať riziko neúmyselného cievneho poškodenia pri blokádach *n. femoralis* (10). Znalosť tejto variability preto prispieva k presnejšej orientácii v inguinofemorálnej oblasti a môže znížiť riziko iatrogénneho poranenia pri diagnostických a terapeutických výkonoch. Perspektívou ďalšieho výskumu je rozšírenie súboru dolných končatín s cieľom presnejšie určiť frekvenciu tejto anatomickej variácie a vytvoriť podklad pre štatistické zhodnotenie jej výskytu v slovenskej populácii.

Súhrn

Priamy odstup ACFL z AF predstavuje neobvyklý typ arteriálneho vetvenia v oblasti stehna. Dokumentácia takýchto nálezov rozširuje poznatky o variabilite cievneho riečiska a má praktický význam pre anatomicкую orientáciu, interpretáciu zobrazovacích vyšetrení aj realizáciu invazívnych výkonov v oblasti proximálneho stehna.

Literatúra

1. Mráz, P., Binovský, A., Holomáňová, A. et al.: *Anatómia ľudského tela 1*, 2012, 509 s.
2. Borovanský, L., Hromada, J., Kos, J. et al.: *Soustavná anatomie člověka II*, 1976; 472 s.
3. Čihák, R., Grim, M.: *Anatomie 3*, 2016; 832 s.
4. Waschke, J., Böckers, T.M., Paulsen, F.: *Sobotta Anatomy Textbook*, 2019; 824 s.
5. Dauber, W.: *Feneisův obrazový slovník anatomie*, 2018; 536 s.
6. Vasquez, M.T., Murillo, J., Maranillo, E. et al.: *Clin Anat*, 2007; 20(2):180-5.
7. Troupis, T., Michalinos, A., Markos, L. et al.: *Artery Res*, 2012; 7(2):106-8.
8. Manjappa, T., Prasanna, L.C.: *Indian J Surg*, 2014; 76(4):288-92.
9. Siddharth, P., Smith, N.L., Mason, R.A. et al.: *Anat Rec*, 1985; 212(2):206-9.
10. Goel, S., Arora, J., Mehta, V. et al.: *World J Clin Cases*, 2015; 3(1):85-8.

IZOLÁCIA PRIMÁRNEJ KULTÚRY Z NÁDORU MLIEČNEJ ŽĽAZY PSA

ISOLATION OF PRIMARY CULTURE FROM CANINE MAMMARY GLAND TUMOR

Simona Čobejová, Natália Nosálová, Mykhailo Huniadi, Alexandra Kešel'áková, Blažej Kalinaj, Daša Čížková

Laboratórium experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, Klinika malých zvierat,

UVLF v Košiciach, Komenského 73, 040 01 Košice

simona.cobejova@uvlf.sk

Abstract

This study focuses on the isolation of primary cell cultures derived from canine mammary gland tumors. Tumor samples were collected under sterile conditions and processed using enzymatic and mechanical dissociation methods to obtain viable cells. The isolated cells were cultured in appropriate growth media to support their proliferation and maintenance. The establishment of primary cultures provides a valuable *in vitro* model for studying tumor biology, including cell behavior, drug response, and molecular mechanisms. These models may contribute to improved understanding and treatment strategies for canine mammary tumors.

Úvod

Nádory mliečnej žľazy patria medzi najčastejšie diagnostikované neoplázie u feniek, pričom ich biologické správanie je veľmi variabilné – od benígnych lézií až po vysoko agresívne malígne formy so schopnosťou metastázovať. Vzhľadom na ich výskyt a podobnosť s karcinómom prsníka u ľudí predstavujú významný model nielen vo veterinárnej, ale aj v komparatívnej medicíne. Štúdium týchto nádorov si vyžaduje detailné poznanie bunkových a molekulárnych mechanizmov, ktoré sa podieľajú na ich vzniku, raste a progresii (3). Jednou z dôležitých metód výskumu je izolácia primárnych bunkových kultúr priamo z nádorového tkaniva. Proces izolácie zahŕňa mechanické a enzymatické spracovanie tkaniva s cieľom získať životaschopné bunky, ktoré sú následne kultivované v kontrolovaných podmienkach *in vitro*. Takto pripravené primárne kultúry poskytujú cenný nástroj na skúmanie biologických vlastností nádorových buniek, testovanie účinnosti liečiv a analýzu signálnych dráh. Zároveň umožňujú lepšie pochopenie patogenézy nádorov mliečnej žľazy u psa a môžu prispieť k vývoju nových terapeutických prístupov a diagnostických metód (4).

Materiál a metódy

Odber vzorky tkaniva z nádoru mliečnej žľazy psa

Chirurgické odstránenie nádorového tkaniva mliečnej žľazy u psov predstavuje základný a najúčinnjší spôsob liečby. V prípade malých, solitárnych a dobre ohraničených nádorov je možné pristúpiť k lokálnej excízii, pri ktorej sa odstraňuje samotný nádor spolu s bezpečnostným lemom zdravého tkaniva. Ak je postihnutá jedna mliečna žľaza, vykonáva sa jednoduchá mastektómia. Častejšie sa však pristupuje k regionálnej mastektómii, pri ktorej sa odstraňuje niekoľko anatomicky súvisiacich mliečnych žliaz spolu s príslušnou lymfatickou uzlinou, najmä ak existuje podozrenie na malignitu. Pri viacerých nádoroch alebo pri rozsiahlejšom postihnutí mliečnej lišty sa indikuje radikálna mastektómia, ktorá môže byť jednostranná alebo obojstranná.

Izolácia primárnych bunkových kultúr

Po odstránení nádorového tkaniva, ktoré sa ponorí v PBS, nasleduje proces jeho spracovania. Časť tkaniva sa použila na histologické vyšetrenie nádoru. Izolácia primárnych bunkových kultúr bola vykonaná v biologickom bezpečnostnom boxe za sterilných podmienok, aby sa predišlo kontaminácií. Zvyšné tkanivo bolo mechanicky disociované pomocou chirurgických nástrojov na malé kúsky a celý proces sa začal natrávením prostredníctvom enzymatickej digescie. Použilo sa 4,5 ml Earlovho vyváženého soľného roztoku 0,5 ml 1% kolagenázy IV (Gibco, USA), 0,1 ml antibioticko-antimykotického roztoku (ATB/ATM) a 0,01 ml gentamicínu (Sigma, USA). Trávenie trvalo 1-2 hodiny v inkubátore za teploty 37 °C. Po tomto čase bol enzým neutralizovaný rovnakým objemom fetálneho bovinného séra (FBS; Sigma, USA), teda v pomere 1:1. Natrávené tkanivo sa presítkovalo cez bunkové sitko s veľkosťou pórov 100 µm. Falkónka s roztokom sa vložila do centrifúgy na 7 minút pri 1200 ot/min. Bunkový sediment bol následne resuspendovaný v 1 ml kultivačného média Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose (DMEM s vysokým obsahom glukózy; Sigma, USA). Bunky budú nasadené do kultivačnej fľaše s plochou 25 cm² (T25) a udržiavané v zvlhčenej atmosfére obsahujúcej 5 % CO₂ pri 37 °C.

Morfológia, kultivácia a kryokonzervácia primárnych bunkových kultúr

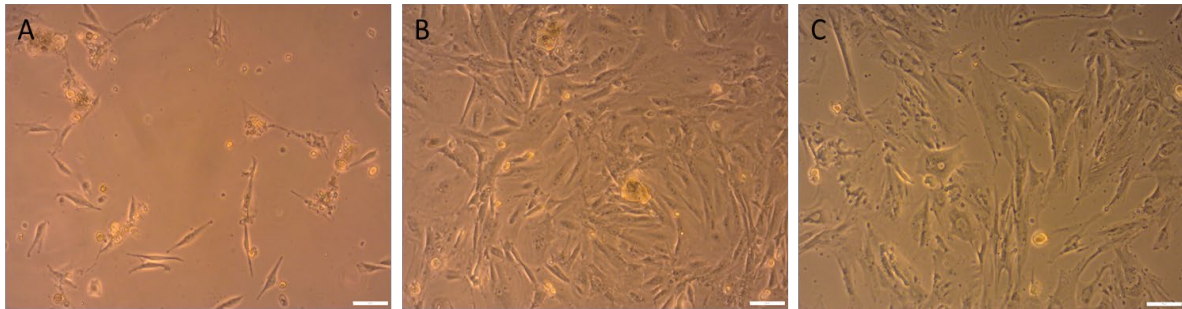
Nádorové bunky mliečnej žľazy boli kultivované v médiu DMEM s vysokým obsahom glukózy suplementovanom 10 % FBS, 2 % roztokom ATB/ATM, 0,1 % gentamicínom a 1 % L-glutamínom za štandardných kultivačných podmienok (5 % CO₂ pri 37 °C) až do vytvorenia monovrstvy. Kultivačné médium bolo vymieňané každé 2–3 dni inkubácie. Adhezívne

vlastnosti, morfológia a expanzná kapacita buniek, boli hodnotené 48 hodín po izolácii, 7. deň po izolácii a v pasáži P1, pomocou inverzného mikroskopu Zeiss Axiovert 200 vybaveného digitálnym systémom záznamu obrazu. Po dosiahnutí konfluencie buniek na úrovni 80–90 % boli bunky primárnej kultúry pasážované s cieľom založenia pasáže 1 (P1). Pasážovanie prebehlo vyliatím média z kultivačnej fľaše, premytím PBS a pridaním 1 ml 0,05% trypsínu (Sigma, USA). To malo za následok enzymatickú disociáciu adherentných buniek, ktorá prebehla počas 3-5 minút v inkubátore pri teplote 37°C. Po tomto čase sme bunky skontrolovali pod mikroskopom, či sú dostatočne uvoľnené. K uvoľneným bunkám sme pridali 1 ml FBS alebo rovnaké množstvo kultivačného média s obsahom FBS, čo spôsobí deaktiváciu enzýmu. Následne sme bunky preniesli do falkónky a vložili do centrifúgy po dobu 7 minút pri 1200 ot/min. Supernatant bol odstránený a na resuspendovanie bunkového sedimentu bol pridaný 1 ml kultivačného média DMEM s vysokým obsahom glukózy. Následne boli bunky počítané v 4 % roztoku trypanovej modrej pomocou hemocytometra pod inverzným mikroskopom. Časť bunkového sedimentu bola nasadená do kultivačnej fľaše s plochou 75 cm² (T75) na ďalšie experimenty. Zvyšná časť bunkového sedimentu bola opätovne centrifugovaná (1200 ot./min počas 7 minút) a resuspendovaná v zmrazovacom médiu zloženom z 50 % DMEM High Glucose, 40 % FBS a 10 % dimetylsulfoxidu (DMSO). Bunky v kryogénnych skúmavkách boli zmrazované rýchlosťou 1 °C/min v zmrazovacom kontajneri Mr.Frosty pri –80 °C počas 24 hodín a následne skladované v tekutom dusíku.

Výsledky a diskusia

Histologické vyšetrenie potvrdilo prítomnosť karcinosarkómu, teda nádoru tvoreného kombináciou epitelovej aj mezenchýmovej zložky. Z karcinosarkómu mliečnej žľazy u psa sa úspešne podarilo izolovať primárne bunkové kultúry. Izolované bunky vykazovali schopnosť adhérencie, rastu a proliferácie v podmienkach *in vitro*, čo potvrdzuje ich životaschopnosť a vhodnosť na ďalšie experimentálne využitie. Po 48 hodinách sme pozorovali, že izolované bunky karcinosarkómu psa boli riedko rozptýlené a prevažne adherované jednotlivito alebo v malých zhlukoch. Mali pretiahnutý až vretenovitý tvar s nízkou hustotou (Obr. 1A). Následne bunky vykazovali zvýšenú proliferáciu a vytvárali hustejšiu, čiastočne konfluentnú vrstvu. Dominovali vretenovité morfológie so začínajúcou organizáciou do zväzkov a kontaktmi medzi bunkami (Obr. 1B). Pri konfluencii buniek 80-90 % sme bunky pasážovali na subkultúru, kde na Obr. 1C môžeme vidieť bunky v pasáži 1 (P1) po 24 hodinách inkubácie za štandardných podmienok, pričom sme zaznamenali kompaktnú monovrstvu buniek, ktoré sú zväčšené, heterogénne a tvoria usporiadané štruktúry. Pozorovaná morfológická rôznorodosť buniek

zároveň odrážala heterogénny charakter pôvodného nádoru. Získané kultúry tak predstavujú vhodný model na ďalšie štúdium biologických vlastností tohto typu nádoru a jeho správania.



Obr. 1 Morfológia primárnych bunkových kultúr psieho karcinosarkómu v rôznych časových bodoch kultivácie. A - 48 hodín po izolácii buniek; B - 7 dní po izolácii buniek; C - bunky v pasáži P1 po 24 h kultivácii.

Postup izolácie buniek bol podobný aj pri zdravom tkanive mliečnej žľazy, kde boli bunky izolované kombináciou mechanickej fragmentácie a enzymatickej digescie, pričom na rozklad extracelulárnej matrix bola použitá kolagenáza. Získaná bunková suspenzia bola následne resuspendovaná a kultivovaná v médiu (DMEM s vysokým obsahom glukózy) doplnenom o fetálne bovinné sérum, inzulín, hydrokortizón a epidermálny rastový faktor (EGF). Takto nastavené podmienky umožnili selektívnu podporu rastu epitelových buniek a súčasne obmedzili proliferáciu fibroblastov (3). Pri izolácii buniek z nádoru mliečnej žľazy bolo tkanivo najskôr mechanicky disociované na malé fragmenty a následne podrobené enzymatickej digescii kolagenázou pri 37 °C počas niekoľkých hodín. Po ukončení trávenia bol enzým inaktivovaný pridaním média obsahujúceho fetálne bovinné sérum. Následne bola bunková suspenzia prefiltrovaná cez bunkové sitká (zvyčajne 70–100 µm) a centrifugovaná. Získaný bunkový sediment bol resuspendovaný v štandardnom kultivačnom médiu (napr. DMEM alebo RPMI-1640) doplnenom o 10 % fetálneho bovinného séra a antibiotiká a bunky boli kultivované za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂). Výsledkom bola heterogénna populácia buniek odrážajúca zloženie nádorového tkaniva (4). Veľmi podobný postup bol využitý aj pri ďalšej izolácii buniek z nádorového tkaniva mliečnej žľazy, kde prebiehala mechanická fragmentácia a následná enzymatická digescia kolagenázou. Opakovanou kultiváciou a adaptáciou na *in vitro* podmienky došlo k postupnej selekcii stabilných bunkových línií s homogénnejšími vlastnosťami, ktoré boli následne využité na ďalšiu morfológickú a molekulárnu charakterizáciu (1).

Súhrn

Izolácia primárnych bunkových kultúr z nádoru mliečnej žľazy u psa spočíva v odbere tkaniva, jeho mechanickom a enzymatickom rozrušení a následnom kultivovaní uvoľnených buniek v vhodnom médiu za sterilných podmienok. Takto získané bunky si zachovávajú vlastnosti pôvodného nádoru, čo umožňuje ich využitie na výskum biologického správania nádoru aj testovanie terapeutických prístupov.

Literatúra

1. Dominiquez L. et al.: *Animals*, 2025, 6.
2. Nosalova N. et al.: *Front Vet Sci*, 2025; 12.
3. Nosalova N. et al.: *Int J Mol Sci*. 2024; 25(5): 2891.
4. Petroušková P. et al.: *J Vet Res*, 2025, 159–168.

Práca bola podporená grantovými projektami: APVV-24-0026, VEGA 1/0236/23.

SÚČASNÉ ZOBRAZOVACIE A FARBIACE METÓDY POUŽÍVANÉ NA HISTOLOGICKÚ VIZUALIZÁCIU KOSTNÉHO TKANIVA

ADVANCED IMAGING AND STAINING METHODS USED FOR HISTOLOGICAL VISUALIZATION OF BONE TISSUE

Kristína Čurgali, Štefan Tóth, Zuzana Fagová

Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice, SR

kristina.curgali@upjs.sk

Abstract

Bone tissue is a mineralized supporting connective tissue characterized by high mechanical strength and an essential role in structural support, protection, and mineral homeostasis. Due to the complex composition of bone tissue, various histological staining methods are required for selective visualization of different components of bone tissue. In this study, several staining techniques were compared, each method provides specific diagnostic advantages in evaluating bone morphology, mineralization and ossification, contributing to accurate histomorphological observation and description.

Úvod

Kostné tkanivo je tvrdé oporné spojivové tkanivo, ktoré sa vyznačuje vysokým stupňom mineralizácie. Je zdrojom a zásobárňou vápnika a minerálnych látok. Kostné tkanivo poskytuje pevnú oporu pre mäkké tkanivá, má protektívnu funkciu a podieľa sa na udržiavaní homeostázy minerálnych látok. Dekalcifikácia predstavuje základný krok pri histologickom spracovaní tvrdých tkanív, pri ktorom sa chemickým odstránením vápenatých solí pomocou kyselín alebo chelatačných činidiel (najmä EDTA) dosiahne zmäkčenie vzorky umožňujúce jej rezanie mikrotómom na tenké histologické rezy pri súčasnom zachovaní organickej zložky tkaniva (1). Kolagén typu I predstavuje dominantnú časť vláknitej organickej zložky extracelulárneho matrixu kostného tkaniva. Je syntetizovaný predovšetkým osteoblastami a zabezpečuje mechanickú integritu, pevnosť v ťahu a architektonickú oporu kostného matrixu, pričom zároveň vytvára substrát pre ukladanie anorganickej zložky medzibunkovej hmoty kostného tkaniva, predovšetkým kryštálikov hydroxyapatitu. V primárnom (nezrelom, vláknitom) kostnom tkanive sú kolagénové vlákna usporiadané nepravidelne, s dezorganizovanou priestorovou orientáciou, čo je charakteristické pre rýchlu tvorbu kostného tkaniva počas rastu,

reparácie alebo patologických procesov. Naopak, v sekundárnom (lamelárnom, zrelom) kostnom tkanive sú kolagénové vlákna usporiadané vysoko organizovane v paralelne orientovaných mikroskopických kostných lamelách (*lamellae osseum*), pričom ich presná architektonická distribúcia podmieňuje optimálne biomechanické vlastnosti, vyššiu rezistenciu voči mechanickému zaťaženiu a fyziologickú remodeláciu kostného tkaniva (2).

Z hľadiska rôznorodosti a komplexnosti zloženia kostného tkaniva je nevyhnutné využiť rôzne selektívne histologické metódy farbenia, ktoré umožňujú vizualizáciu špecifických štruktúr, ako sú kolagénové vlákna, osteoid, mineralizovaný matrix, osteocyty, osteoblasty, osteoklasty či zložky amorfnej medzibunkovej hmoty, čím poskytujú detailné informácie o morfológii, stupni mineralizácie, remodelácii a patologických zmenách kostného tkaniva. Kombinácia konvenčných histologických, histochemických a imunohistochemických metód je preto zásadná pre presnú a detailnú histomorfologickú analýzu a správnu interpretáciu fyziologických aj patologických procesov v kostnom tkanive.

Materiál a metódy

Vzorky boli fixované v 10 % neutrálnom pufrovanom formalíne pri laboratórnej teplote. Po fixácii boli vzorky dekalifikované v 25% roztoku EDTA (CentralChem, Slovensko). Ukončenie dekalifikácie bolo overované mechanickým testovaním (ihla/pinzeta). Po dekalifikácii boli tkanivá spracované vo vzostupnom rade etanolu, prečistené v xyléne a zaliate do parafínu (1).

Farbiaca metóda podľa Schmorla

Schmorlovo farbenie patrí medzi špeciálne histologické metódy používané na vizualizáciu kompaktného kostného tkaniva, najmä lakún osteocytov, kostných kanálikov a lamelárnej organizácie osteónov v brúsených kostných rezoch. Metóda je založená na použití dvoch farbiacich zložiek – amoniakálneho thionínu a nasýteného vodného roztoku kyseliny pikrovej. Thionín precipituje v lakúnach a kanálikoch a farbí ich tmavohnedo až čierno, zatiaľ čo kyselina pikrová vytvára pikráty v kostnom matrixe, ktorý získava žltohnedé až hnedožlté sfarbenie. Lakúny osteocytov a kostné kanáliky sú zobrazené tmavohnedo až čierno, lamely kompaktného kostného tkaniva nadobúdajú hnedé až tmavohnedé sfarbenie, pričom kostný matrix sa farbí žltohnedo až hnedožlto. Kontrastné odlíšenie umožňuje detailné histomorfologické hodnotenie osteónov, Haversových systémov a celkovej mikroarchitektúry kostného tkaniva (3).

Farbiaca metóda Massonov modrý trichróm

Massonov modrý trichróm patrí medzi trichrómové histologické metódy farbenia využívané na diferenciáciu spojivového a kostného tkaniva. Umožňuje zvýraznenie kolagénových vlákien, osteoidu a kostného matrixu, ktoré sa farbja modro vďaka väzbe anilínovej modrej na kolagénové vlákna, zatiaľ čo cytoplazma a svalové štruktúry sa farbja červeno a jadrá buniek tmavo, až modročierne. Metóda farbenia je vhodná najmä na hodnotenie organizácie kostného matrixu, remodelácie a novotvorby kostného tkaniva (4).

Základná farbiaca metóda H-E

Farbenie hematoxylínom a eozínom (H&E) predstavuje štandardnú metódu rutinného histologického hodnotenia morfológie tkanív. Táto kombinácia farbív umožňuje jasnú vizualizáciu bunkových aj extracelulárnych štruktúrnych detailov. Jadrá bunkových štruktúr sa farbja bázickým farbivom hematoxylín tmavomodro až fialovo - bazofilne. Kolagén typu I, ktorý tvorí hlavnú organickú zložku kostného matrixu sa farbja intenzívne ružovo až červeno – eozinofilne/acidofilne. Osteoid sa farbja homogénne eozinofilne, pričom býva menej intenzívne sfarbený ako mineralizovaná kosť. V primárnom kostnom tkanive je osteoid často prítomný vo väčšom množstve a jeho nepravidelné usporiadanie spolu s dezorganizovanou orientáciou kolagénových vlákien odráža rýchlu novotvorbu kosti. Mineralizovaný kostný matrix sa farbja intenzívnejšie eozinofilne, pričom umožňuje odlišenie od osteoidu a hodnotenie stupňa mineralizácie. H&E farbenie tak poskytuje základné informácie o štruktúre primárneho kostného tkaniva, celkovej bunkovej aktivite, osteogenéze a priebehu kostnej remodelácie (5).

Farbiaca metóda podľa Ráliša

Farbiaca metóda podľa Ráliša je modifikovanou tetrachrómovou metódou, poskytuje dobré výsledky na čerstvo fixovanom, dekalifikovanom kostnom tkanive zaliatom do parafínu. Osteoid sa znázorňuje intenzívne modro a mineralizované kostné tkanivo sa farbja na červeno. Nedostatočne alebo čiastočne mineralizovaná kosť sa farbja svetlomodro alebo ružovo a bunková populácia je jasne kontrastná a identifikovateľná. Schopnosť odlišiť osteoid od mineralizovanej kosti, spojivového tkaniva a chrupky umožňuje jednoduchú diagnostiku priebehu procesu osifikácie, osteomalácie alebo osteoidných nádorov (1).

Farbiaca metóda podľa Kossa

Farbiaca metóda podľa Kossa slúži na dôkaz vápnika v kostnom tkanive na základe impregnácie v soliach dusičnanu strieborného. Výrazne mineralizované časti kostného tkaniva

obsahujúce vápenaté soli - uhličitany a fosforečnany sa impregnujú na čierno. Bunkové jadrá a organické zložky medzibunkovej hmoty a nekalcifikované kostné tkanivo sa znázorňujú ružovo-červeno (1).

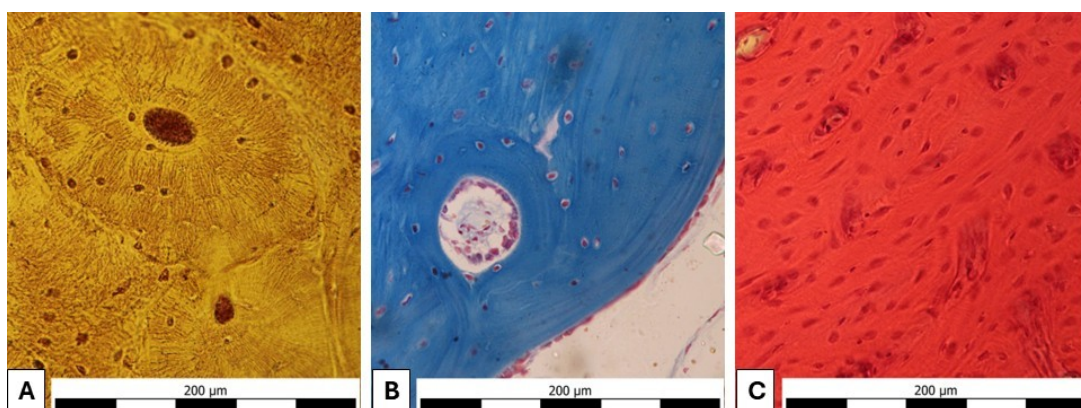
Farbiaca metóda AZAN

AZAN trichróm predstavuje trichrómovú histologickú metódu využívanú na diferenciáciu buniek a extracelulárneho matrixu. V kostnom tkanive umožňuje zvýraznenie kolagénových vlákien, osteoidu a kostného matrixu, ktoré sa farbia modro, zatiaľ čo cytoplazma a bunkové elementy nadobúdajú červené až oranžové odtiene. Metóda farbenia je vhodná najmä na hodnotenie organizácie kostného matrixu a štruktúry spojivových zložiek kostného tkaniva (6).

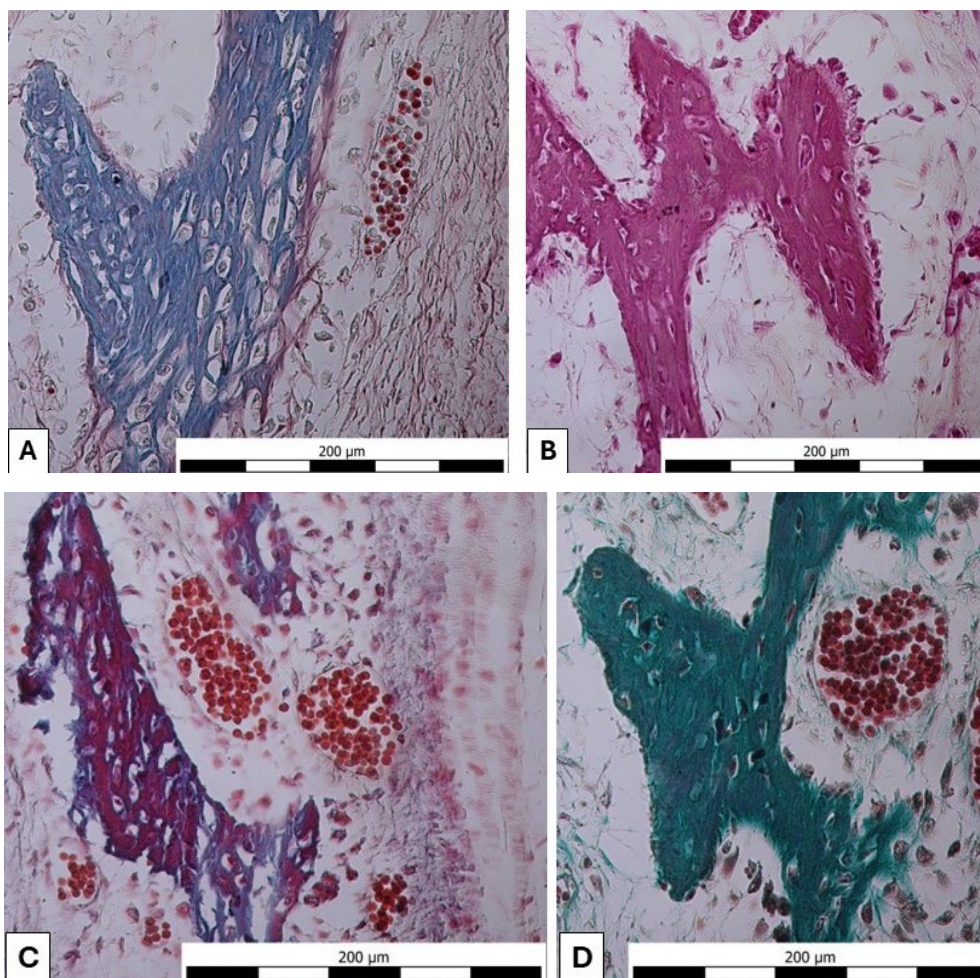
Farbiaca metóda Goldnerov zelený trichróm

Goldnerov zelený trichróm predstavuje trichrómovú histologickú metódu využívanú najmä pri analýze kostného tkaniva a umožňujúcu spoľahlivé rozlíšenie mineralizovaného kostného matrixu od osteoidu. Ide o modifikáciu Massonovho trichrómu, pri ktorej sa mineralizované kostné tkanivo a kolagénové vlákna farbja zeleno, zatiaľ čo osteoid, cytoplazma a svalové štruktúry nadobúdajú červené až oranžovočervené sfarbenie. Bunkové jadrá sa zobrazujú tmavohnedo kvôli použitiu Weigertovho železitého hematoxylínu. Metóda je vhodná najmä na hodnotenie osteogenézy, remodelácie kostného tkaniva, stupňa mineralizácie a na diferenciáciu novotvoreného ešte nemineralizovaného matrixu od zrelého mineralizovaného kostného tkaniva (7).

Výsledky



Obr. 1 Reprezentatívne mikrofotografie kompaktného kostného tkaniva. A. Schmorl, B. Modifikovaný Massonov modrý trichróm, C. Hematoxylín-eozín. Zväčšenie 40x.



Obr. 2 Reprezentatívne mikrofotografie primárneho kostného tkaniva a osteoidu počas embryonálnej osifikácie. A. Farbenie podľa Ráliša, B. Farbenie podľa Kossa, C. Farbenie AZAN, D. Farbenie Goldnerov zelený trichróm. Zväčšenie 40x.

Súhrn

Histologické farbiace metódy predstavujú nevyhnutný nástroj pri hodnotení kostného tkaniva, keďže umožňujú detailnú vizualizáciu jeho komplexnej mikroštruktúry, zahŕňajúcej mineralizovanú aj organickú zložku, bunkové elementy a špecializovaný extracelulárny matrix. Kombinácia rôznych farbiacich metód umožňuje komplexné hodnotenie morfológických, štruktúrnych ale aj funkčných zmien kostného tkaniva a predstavuje základný predpoklad pre správnu interpretáciu fyziologických aj patologických procesov v experimentálnom aj klinickom výskume.

Literatúra

1. Čunderlíková, M., Balážová, V.: Vybrané kapitoly z histologickej techniky: učebný text Inštitútu pre ďalšie vzdelávanie stredných zdravotníckych pracovníkov v Bratislave. Martin: Osveta, 1990; 51-54.
2. Wolf, J.: Histologie. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1966; 205-234.

3. Allison R.T.: Br J Biomed Sci, 1995; 52(2):162-4.
4. <https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/musculoskeletal-research/core-services/histology/documents/CMSR-Masson-s-trichrome.pdf>
5. <https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/musculoskeletal-research/core-services/histology/documents/CMSRH-E.pdf>
6. <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-azan-heidenhain.php>
7. Gruber, H. E.: Biotechnic & Histochemistry, 1992; 67(1), 30–34.

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

TRANSPLANTÁCIA ČREVNEJ MIKROFLÓRY A INTEGRITA ČREVNEJ BARIÉRY PRI PORUCHÁCH AUTISTICKÉHO SPEKTRA

FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION AND GUT BARRIER INTEGRITY IN AUTISM SPECTRUM DISORDER

**Marianna Danková¹, Miroslava Juríková¹, Zuzana Sirkovská¹, Ivan Varga¹, Aleksandra
Tomová², Mária Lorencová¹**

¹ *Ústav histológie a embryológie, LF UK v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR*

² *Fyziologický ústav, LF UK v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR*

miroslava.jurikova@fmed.uniba.sk

Abstract

This study aimed to assess how faecal microbiota transplantation (FMT) from different donors affects the gut barrier. Specifically, we evaluated the impact of microbiota derived from healthy children and children with autism spectrum disorder (ASD) on the intestinal mucosa of adult male mice, both with and without a genetic predisposition to ASD (Shank3b^{-/-}). We observed changes in goblet cell (GC) distribution suggesting an adaptive response to microbial alterations. This was most pronounced in the colon, indicating its higher sensitivity to ASD-associated microbiota and a compensatory effort to maintain epithelial integrity. Although the ileum showed milder changes, these consistent effects suggest that microbial influences extend throughout the gastrointestinal tract and may contribute to the gastrointestinal symptoms commonly seen in autism.

Úvod

ASD je heterogénna porucha neurovývinu s multifaktoriálnou etiológiou, ktorá zahŕňa interakcie medzi génmi a prostredím a vyznačuje sa deficitmi v sociálnej komunikácii a obmedzeným, repetitívnym správaním, ako je definované v DSM-5-TR (1–3). Jedinci s ASD častejšie vykazujú selektivitu v stravovaní a gastrointestinálne (GI) symptómy, pričom až 70% z nich trpí problémami, ako sú zápcha, hnačka a bolesti brucha (4–9), ako aj zvýšeným bakteriálnym prerastaním v tenkom čreve (10–12). Tieto poruchy sú čoraz viac spájané s dysbiózou črevnej mikrobioty a jej interakciami v rámci osi črevo–mozog, čo prispieva k zhoršenej črevnej priepustnosti, imunitnej dysregulácii a zápalu (13, 14).

Črevná epitelová bariéra je kľúčová pre udržanie homeostázy tým, že reguluje priepustnosť a zabraňuje translokácii škodlivých látok (15, 16). Pri ASD môže jej narušenie, často spojené s dysbiózou, umožniť vstup endotoxínov, do krvného obehu, čo spúšťa imunitnú aktiváciu a prispieva k gastrointestinálnym aj neurobehaviorálnym symptómom (17–19).

FMT je nová terapia, ktorá obnovuje mikrobiálnu rovnováhu prenosom mikrobioty od zdravých darcov. Ukázalo sa, že zlepšuje zloženie črevnej mikrobioty, posilňuje bariérovú funkciu a znižuje zápal (20–22), čo z nej robí sľubný prístup k ASD, hoci jej špecifické účinky na integritu črevnej bariéry zostávajú nedostatočne preskúmané (21, 23, 24).

Táto štúdia preto hodnotí vplyv FMT na integritu črevnej bariéry u osôb s ASD, pričom sa zameriava na štruktúru sliznice čreva a produkciu hlienu pohárikovitými bunkami.

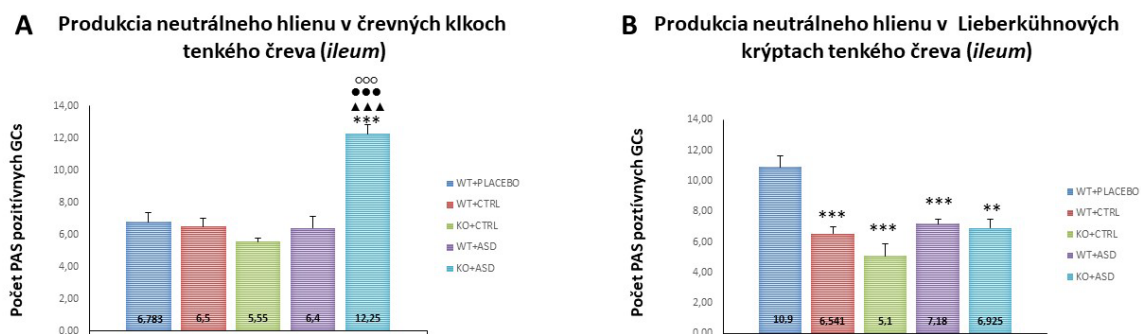
Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených päť experimentálnych skupín laboratórnych zvierat (myš), ktoré boli definované na základe genotypu a podmienok manipulácie. Zvieratá boli rozdelené do skupín bez predispozície k ASD (WT) a skupín s predispozíciou k ASD, knockoutom Shank3b^{-/-} (KO). V rámci každého genotypu boli vytvorené podskupiny podľa manipulácie: skupina s placebom (WT + PLACEBO), skupiny, ktoré dostali FMT od neurotypických detí (WT + CTRL; KO + CTRL) a skupiny s FMT od detí s ASD (WT + ASD; KO + ASD). Tento dizajn umožnil posúdenie genetického pozadia (divoký typ vs. knockout) aj vplyvu FMT asociovanej s ASD na morfológiu čreva.

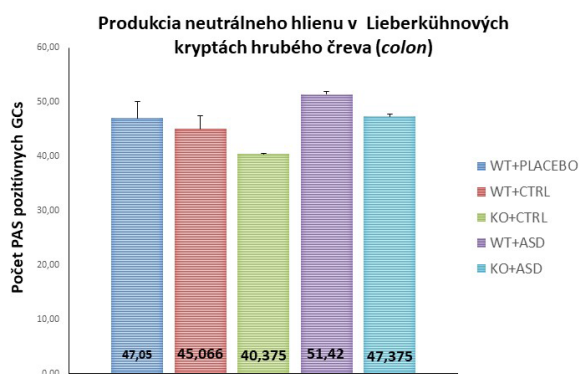
Na detekciu neutrálnych mukózných látok a mucínov bola použitá PAS reakcia s kontrastným farbením jadier Mayerovým hematoxylínom, pričom pohárikové bunky a glykokalyx sa zafarbili fuchsiovo a jadrá tmavomodro.

Výsledky a diskusia

Táto štúdia skúmala vplyv FMT s ASD a FMT s CTRL na produkciu mucínu črevnými GCs u myší WT aj KO. Počet GCs obsahujúcich (produkujuúcich) celkovo neutrálne mucíny sa v ileu medzi všetkými experimentálnymi skupinami štatisticky významne líšil (Graf č. 1), avšak v hrubom čreve nedošlo k štatisticky významným zmenám (Graf č. 2). Výrazný nárast počtu PAS-positívnych GCs bol zistený iba v epitely črevných klkov ilea skupiny KO + ASD, a to nielen v porovnaní so skupinou WT + PLACEBO, ale aj so skupinou WT + ASD a KO + CTRL (Graf č. 1 A). Naopak, vo všetkých experimentálnych skupinách (WT + CTRL, KO + CTRL, WT + ASD, KO + ASD) bolo v porovnaní so skupinou WT + PLACEBO pozorované významné zníženie počtu PAS-positívnych GCs v epitely Lieberkühnových krýpt ilea (Graf č. 1 B).



Graf č. 1 Grafy znázorňujúce priemerný počet PAS-pozitívnych pohárikových buniek (GCs) v ileu pre jednotlivé skupiny. **A:** Počet PAS-pozitívnych GCs bol signifikantne zvýšený v klkoch ilea v skupine KO + ASD v porovnaní so skupinami WT + PLACEBO, WT + CTRL, WT + ASD a KO + CTRL (***) označuje štatisticky významný rozdiel oproti ileu WT + PLACEBO pri $p < 0,001$; *** označuje štatisticky významný rozdiel oproti ileu WT + CTRL pri $p < 0,001$; ▲▲▲ označuje štatisticky významný rozdiel oproti ileu WT + ASD pri $p < 0,001$; ○○○ označuje štatisticky významný rozdiel oproti ileu KO + CTRL pri $p < 0,001$). **B:** Naopak, pozorovali sme pokles PAS-pozitívnych GCs v Lieberkühnových krýptách vo všetkých experimentálnych skupinách (WT + CTRL, KO + CTRL, WT + ASD a KO + ASD) v porovnaní so skupinou WT + PLACEBO (***) označuje štatisticky významný rozdiel oproti ileu WT + PLACEBO pri $p < 0,001$). Údaje sú vyjadrené ako $M \pm S.E.M.$; na štatistickú analýzu bol použitý ANOVA test a Tukey–Kramerov post hoc test.



Graf č. 2 Graf znázorňujúci priemerný počet PAS-pozitívnych GC v hrubom čreve pre každý stav. Údaje sú uvedené ako $M \pm S.E.M.$. Použili sa ANOVA a Tukeyho–Kramerov test.

Naša histopatologická analýza odhalila, že sliznica ilea v skupine WT + PLACEBO zostala z veľkej časti neporušená, zatiaľ čo skupina KO + ASD vykazovala najvýraznejšie poškodenie

sliznice, vrátane odlupovania epitelu, sploštenia klkov a infiltrácie leukocytov. Analýza GCs ukázala znížený počet PAS-pozitívnych buniek v kryptách vo všetkých experimentálnych skupinách v porovnaní so skupinou WT + PLACEBO. Myši KO + ASD však vykazovali zvýšený počet PAS-pozitívnych buniek v epitelu klkov, čo naznačuje možnú kompenzačnú produkciu mucínu. Podobná kompenzačná hyperplázia GCs bola zaznamenaná pri chronických zápalových stavoch (25). Naše výsledky však naznačujú, že tento mechanizmus nemusí byť úplne účinný, keďže zvýšený počet GCs v klkoch nezabránil poškodeniu sliznice. Mucinózna bariéra je dynamicky regulovaná nielen prostredníctvom nepretržitého uvoľňovania mucínu z GCs, ale aj prostredníctvom degradácie komenzálnymi aj patogénnymi baktériami (26).

Za fyziologických podmienok sa GCs vo veľkom množstve nachádzajú v kryptách, kde prispievajú k obnovovaniu hlienu. Pri narušení mikrobioty dochádza k posunu rovnováhy, čo vedie k zvýšenému výskytu GC v črevných klkoch, ako bolo pozorované v tejto štúdií. Hyperplázia a redistribúcia GCs sú dobre známe ochranné mechanizmy pri mikrobiálnej nerovnováhe a zápale (25). Primárnou funkciou GCs v črevných klkoch je ochrana epitelového povrchu pred mikrobiálnymi útokmi, zatiaľ čo krypty sú špecializované na regeneráciu buniek a vyžadujú menej hlienu. Táto epitelová hlienová vrstva predstavuje prvú líniu obrany proti bakteriálnej invázii a zabraňuje priamym interakciám medzi mikróbmi v lúmene čreva a epitelovými bunkami (27).

Súhrn

Výsledky získané z prezentovaného experimentu podporujú myšlienku, že mikrobiomové intervencie, ako FMT, môžu ovplyvniť integritu črevnej bariéry a GI symptómy spojené s ASD. Na objasnenie mechanizmov črevnej permeability a ich úlohy v ASD je však potrebný ďalší výskum. Lepšie pochopenie týchto procesov môže viesť k novým terapiám obnovujúcim črevnú homeostázu a zmiernujúcim GI dysfunkcie pri ASD.

Literatúra

1. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSM-5-TR).
2. Lord C., Brugha T.S., Charman T. et al.: *Nat Rev Dis Primers*, 2020; 6(1):5.
3. Bjørklund G., Pivina L., Dadar M., et al.: *Neurosci Biobehav Rev*, 2020; 118:111–120.
4. Korteniemi J., Karlsson L., Aatsinki A.: *Acta Psychiatr Scand*, 2023; 148(3):242–254.
5. Leader G., Abberton C., Cunningham S. et al.: *Nutrients*, 2022; 14(7):1471.
6. Buie T., Campbell D.B., Fuchs G.J. et al.: *Pediatrics*, 2010; 125(1):1–18.
7. Gorrindo P., Williams K.C., Lee E.B. et al.: *Autism Res*, 2012; 5:101–108.
8. Chaidez V., Hansen R.L., Hertz-Picciotto I.: *J Autism Dev Disord*, 2014; 44:1117–1127.
9. Madra M., Ringel R., Margolis K.G.: *Psychiatr Clin North Am*, 2021; 44(1):69–81.
10. Wang L., Yu Y.M., Zhang Y.Q. et al.: *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2018; 27(2):233–240.
11. Fattorusso A., Di Genova L., Dell'Isola G.B. et al.: *Nutrients*, 2019; 11(3):521.

12. Bu W., Chen Z., Liu B. et al.: *Front Cell Infect Microbiol*, 2025; 15:1687691.
13. Kandpal M., Indari O., Baral B., et al.: *Metabolites*, 2022; 12:1064.
14. Hsiao E.Y., McBride S.W., Hsien S. et al.: *Cell*, 2013; 155(7):1451–1463.
15. Groschwitz K.R., Hogan S.P.: *J Allergy Clin Immunol*, 2009; 124(1):3–20.
16. Adak A., Khan M.R.: *Cell Mol Life Sci*, 2019; 76:473–493.
17. Lewandowska-Pietruszka Z., Figlerowicz M., Mazur-Melewska K.: *Int J Mol Sci*, 2023; 24(23):16660.
18. Eshraghi R.S., Davies C., Iyengar R. et al.: *J Clin Med*, 2020; 10(1):27.
19. Alharthi A., Alhazmi S., Alburae N. et al.: *Int J Mol Sci*, 2022; 23(3):1363.
20. Anand N., Gorantla V.R., Chidambaram S.B.: *Cells*, 2022; 12(1):54.
21. Huang C., Yi P., Zhu M. et al.: *J Autoimmun*, 2022; 130:102844.
22. Bakhshandi A.K., Minasazi A., Yeganeh O. et al.: *Arch Dermatol Res*, 2025; 317:561.
23. Zhang J., Zhu G., Wan L. et al.: *Front Psychiatry*, 2023; 14:1123658.
24. Dargenio V.N., Dargenio C., Castellaneta S. et al.: *Nutrients*, 2023; 15(7):1620.
25. Birchenough G.M., Johansson M.E., Gustafsson J.K. et al.: *Mucosal Immunol*, 2015; 8(4):712–719.
26. Allaire J.M., Morampudi V., Crowley S.M. et al.: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017; 314(3):360–377.
27. Iacob S., Iacob D.G., Luminos L.M.: *Front Microbiol*, 2018; 9:3328.

Táto štúdia bola podporená Ministerstvom školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky na základe zmluvy č. VEGA 1/0062/21.

IMUNOHISTOCHEMICKÉ HODNOTENIE ANGIOGENÉZY A BIOKOMPATIBILITY BIOMATERIÁLU POMOCOU *EX OVO* CAM MODELU

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF ANGIOGENESIS AND BIOCOMPATIBILITY OF A BIOMATERIAL USING AN *EX OVO* CAM MODEL

Zuzana Demčišáková¹, Lenka Luptáková², Lubomír Medvecký^{1,3}, Eva Petrovová¹

¹*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

³*Ústav materiálového výskumu, SAV, Watsonova 47, Košice, SR*

zuzana.demcisakova@uvlf.sk

Abstract

The study evaluated angiogenesis and biocompatibility of a polyhydroxybutyrate–chitosan (PHB/CHIT) scaffold using the chorioallantoic membrane of quail embryos. The material was implanted onto the CAM under different experimental modifications. Immunohistochemical analysis (WGA, SNA, QH1, α -SMA, PHH3) revealed vascular ingrowth into the scaffold and active cellular proliferation. Early endothelial interaction occurred at the scaffold interface, while QH1 confirmed endothelial cell infiltration. VEGF-A induced the strongest angiogenic response. Increased α -SMA indicated tissue remodelling, and PHH3 confirmed proliferative activity. Results demonstrate that PHB/CHIT supports vascularization and shows promise for tissue engineering applications.

Úvod

Chorioalantoická membrána (CAM) vtáčieho embrya predstavuje alternatívny animálny model, ktorý tvorí medzistupeň medzi jednoduchými *in vitro* a komplexnými *in vivo* modelovými systémami (1). Uplatnenie nachádza najmä v oblasti bioinžinierstva, štúdiá tkanivových transplantátov, nádorovej biológie a genomiky (2). CAM model je vhodný na hodnotenie angiogénneho potenciálu a biokompatibility inovatívnych materiálov, pričom kľúčovým aspektom hodnotenia je identifikácia bunkových procesov prebiehajúcich na rozhraní materiálu a hostiteľského tkaniva (3). Imunohistochemická analýza umožňuje s vysokou mierou presnosti monitorovať formovanie ciev, migráciu buniek a procesy hojenia prostredníctvom špecifických markerov, čím poskytuje detailný pohľad na mechanizmy, ktorými implantovaný materiál ovplyvňuje okolité mikroprostredie (3, 4). V rámci štúdie sme hodnotili angiogénnu odpoveď

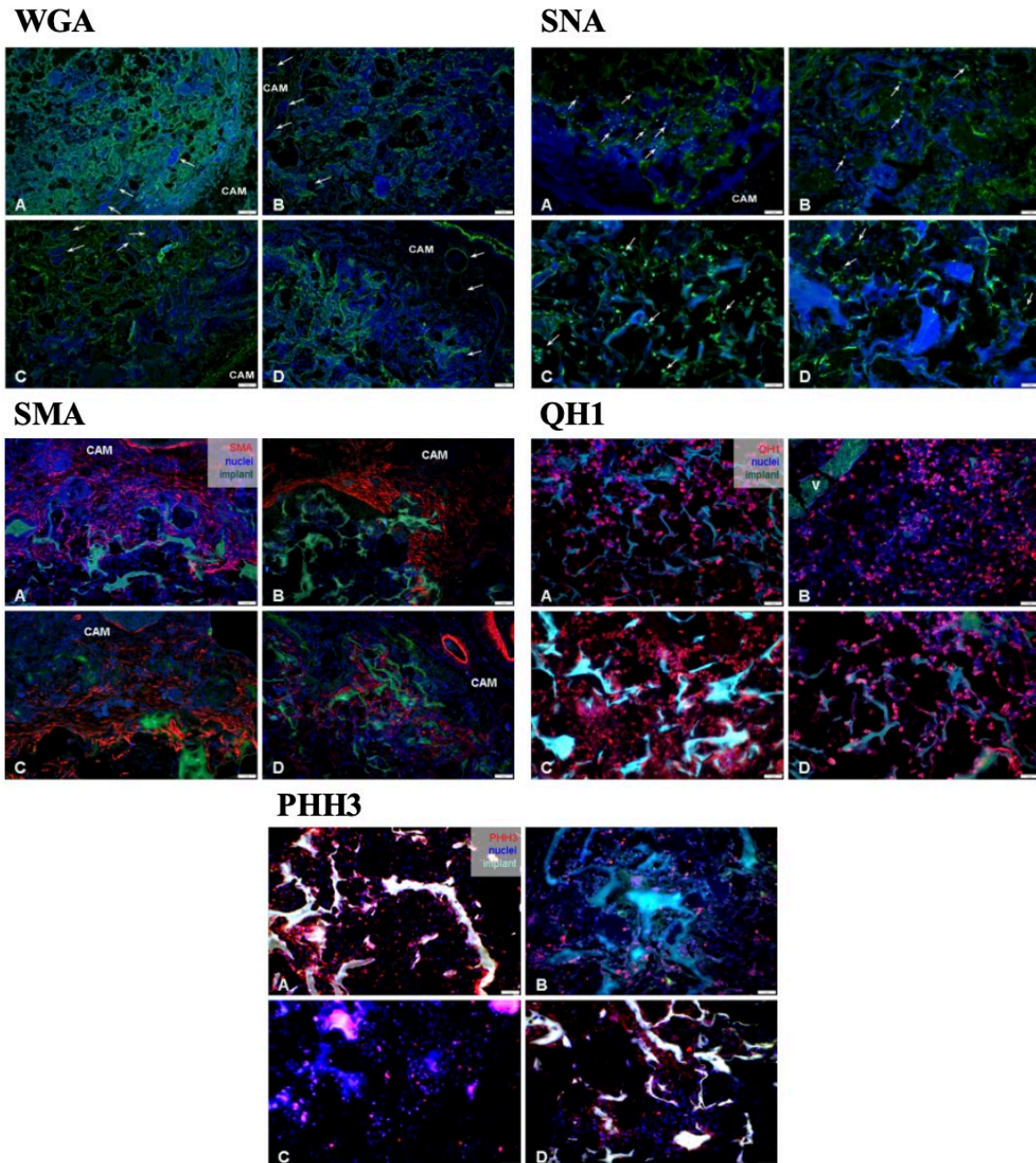
CAM prepeličieho embrya po implantácii acelulárneho materiálu na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu (PHB/CHIT), určeného pre klinické využitie v regenerácii tvrdých tkanív, ako nevyhnutný predpoklad stanovenia jeho biokompatibility.

Materiál a metódy

Polyhydroxybutyrát-chitosanový kompozit (PHB/CHIT) bol pripravený podľa metódy Medvecký a kol. (5). Oplodnené vajcia prepelice japonskej (*Coturnix coturnix japonica*, n = 158) boli získané a transportované z farmy Malá Ida (Košice, Slovensko). Následne boli inkubované za štandardných podmienok ($38,2 \pm 0,5$ °C, 58 % relatívna vlhkosť) v liahni s núteným obehom vzduchu. Po 56 hodinách inkubácie boli embryá prenesené do sterilných 6-jamkových kultivačných platní (TPP, Švajčiarsko) pomocou techniky *ex ovo*. Embryá boli následne inkubované za upravených podmienok ($38,2 \pm 0,5$ °C, 60 % relatívna vlhkosť) až do dňa implantácie. Na embryonálny deň 6 (ED6) bol testovaný materiál implantovaný na povrch CAM v nasledovných experimentálnych variantoch: (i) bez úpravy (PHB/CHIT), (ii) ošetrený vo fyziologickom roztoku (PHB/CHIT+PHY; 0,9 % NaCl), (iii) s prídavkom rastového faktora VEGF-A (PHB/CHIT+VEGF-A; 25 ng/mL PBS; Sigma-Aldrich, USA) a (iv) s inhibítorom angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN; 47 µg/mL PBS; Human Angiostatin, Prolytix, USA). Testované materiály boli analyzované s cieľom zhodnotiť biokompatibilitu materiálu vo vzťahu k vaskulatúre CAM na ED9. Formácia ciev v okolí biomateriálu a invázia buniek do pórov implantátu boli hodnotené pomocou imunohistochemických markerov: WGA (*Wheat germ agglutinin*) a SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) pre embryonálny endotel, QH1 pre endotelové bunky a hemangioblasty, α -SMA (*Alpha smooth muscle actin*) pre myofibroblasty a PHH3 (*Phospho-Histone H3*) pre proliferačnú aktivitu buniek. Imunohistochemické farbenie bolo realizované na komplexe CAM-materiál. Primárne protilátky boli inkubované cez noc pri teplote 4 °C. Následne boli rezy premyté v roztoku PBS a inkubované s príslušnými sekundárnymi protilátkami v tme pri izbovej teplote. Jadrá buniek boli kontrastne dofarbené farbivom HOECHST (1:80 000; Sigma-Aldrich, USA) počas 10 minút. Po následnom premývaní v PBS boli rezy dehydrované v alkoholovom rade a uzavreté do média Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA). Fluorescenčne značené rezy prepeličej CAM s implantovaným PHB/CHIT boli analyzované a dokumentované pomocou fluorescenčného mikroskopu Olympus BX53 (Olympus, Tokio, Japonsko) a digitálnej kamery Olympus DP74 (softvér cellSense).

Výsledky

Imunohistochemickou analýzou angiogénnej odpovede CAM na implantovaný PHB/CHIT boli detegované markery súvisiace s angiogéznou a biokompatibilitou. WGA signalizoval skorú tvorbu cievnych štruktúr najmä na rozhraní biomateriálu, pričom pri skupine PHB/CHIT+VEGF-A bola vaskulárna invázia pozorovaná hlbšie v materiáli. SNA-pozitívne bunky indikovali pokročilejšie štádiá tvorby ciev a boli prítomné na periférii aj vnútri biomateriálu, najmä pri VEGF-A skupine. Lektínové značenie potvrdilo prebiehajúcu angiogézu a prítomnosť endotelových buniek na povrchu aj v póroch materiálu. V okolí biomateriálov bola detegovaná zvýšená expresia α -SMA, čo poukazuje na aktiváciu myofibroblastov a fibrotickú odpoveď CAM. PHH3-pozitívne bunky boli prítomné na povrchu aj vo vnútri pórov všetkých vzoriek, pričom najvyššia proliferácia bola zaznamenaná v neošetrenom PHB/CHIT, najnižšia v skupine PHB/CHIT+PHY. Marker QH1 potvrdil prítomnosť endotelových buniek a hemangioblastov v okolí aj vnútri materiálu, ako aj penetráciu vaskulárnych štruktúr do materiálu, čo naznačuje aktívnu vaskularizáciu (Obr. 1).



Obr. 1 Imunohistochemické hodnotenie angiogenézy a bunkovej odpovede CAM po implantácii PHB/CHIT. Reprezentatívne mikrofotografie znázorňujú expresiu markerov WGA, SNA, α -SMA, QH1 a PHH3 v CAM prepeličieho embrya po implantácii biomateriálu v experimentálnych skupinách: (A) PHB/CHIT, (B) PHB/CHIT+PHY, (C) PHB/CHIT+VEGF-A a (D) PHB/CHIT+ANGIOSTATIN; biele šípky označujú endotelové bunky; mierka: 1 mm.

Diskusia

CAM vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya predstavuje v súčasnosti ľahko dostupný a ekonomicky efektívny modelový systém, ktorý je vďaka svojej rozsiahlej vaskularizácii vhodný na štúdium angiogenézy a predklinické testovanie biokompatibility a funkčnosti biomateriálov (6, 7).

Umožňuje rýchlu verifikáciu prerastania krvných ciev do implantovaného materiálu ešte pred jeho testovaním v podmienkach *in vivo*, čím poskytuje dôležité informácie o jeho regeneračnom potenciáli z hľadiska angiogenézy a biokompatibility (3). V štúdií sme biokompatibilitu acelulárneho kompozitu PHB/CHIT hodnotili prostredníctvom analýzy angiogénnej odpovede CAM prepeličieho embrya, pričom sme sledovali vplyv rôznych úprav materiálu (fyziologický roztok, VEGF-A a angiostatín). Výsledky preukázali, že implantovaný biomateriál podporuje tvorbu cievnych štruktúr, pričom charakter a lokalizácia angiogenézy boli ovplyvnené prítomnosťou bioaktívnych faktorov. Vizualizácia novovzniknutých ciev v CAM modeli je limitovaná dostupnosťou druhovo špecifických markerov. V tejto práci sme preto využili kombináciu lektínov WGA a SNA, ktoré umožňujú detegovať skoré, resp. pokročilejšie štádiá diferenciácie endotelu. V súlade s našimi výsledkami bola WGA-pozitívna lokalizovaná najmä na rozhraní materiálu a tkaniva, čo naznačuje iniciálne fázy angiogenézy, zatiaľ čo prítomnosť SNA-pozitívnych buniek vo vnútri biomateriálu poukazuje na progresiu k zrelším cievnym štruktúram (8). Tieto pozorovania korešpondujú s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré dokumentujú postupnú maturáciu endotelu počas invázie do biomateriálov. Rozvoj vaskulatury vo vnútri biomateriálu bol jednoznačne potvrdený pomocou markera QH1, ktorý je špecifický pre endotelové bunky prepelíc. Detekcia QH1-pozitívnych buniek v póroch biomateriálu naznačuje aktívnu migráciu endotelových buniek a ich zapojenie do formovania cievnej siete. Zvýšená prítomnosť týchto buniek zároveň podporuje hypotézu, že do implantátu migrujú aj hemangioblasty, čo poukazuje na súčasný priebeh procesov angiogenézy aj vaskulogenézy. Zvýšená expresia α -SMA v okolí implantovaných skafoldov indikuje prítomnosť aktivovaných myofibroblastov. Táto bunková populácia zohráva kľúčovú úlohu v remodelácii extracelulárnej matrix a hojení tkanív, pričom jej aktivácia môže byť spojená so zápalovou odpoveďou na implantovaný materiál (9). Proliferačná aktivita buniek, hodnotená pomocou markera PHH3, bola výrazná vo všetkých experimentálnych skupinách, pričom najvyššia bola pozorovaná pri neošetrenom PHB/CHIT. Prítomnosť PHH3 pozitívnych buniek na povrchu aj vo vnútri pórov biomateriálu poukazuje na aktívnu bunkovú proliferáciu sprevádzajúcu proces integrácie materiálu. Úloha PHH3 ako spoľahlivého markera mitotickej aktivity bola potvrdená viacerými štúdiami, ktoré sú v súlade s našimi zisteniami (10).

Súhrn

Prostredníctvom imunohistochemického farbenia a detekcie markerov (WGA, SNA, α -SMA, PHH3 a QH1) bolo preukázané vrastanie ciev do materiálu PHB/CHIT, pričom rozsah invázie bol ovplyvnený úpravou materiálu, najmä aplikáciou fyziologického roztoku a pro-

angiogénneho faktora VEGF-A. Tieto zistenia potvrdzujú, že proces neovaskularizácie prebieha priamo vo vnútri biomateriálu, čo poukazuje na jeho potenciál podporovať angiogénu a integráciu s hostiteľským tkanivom.

Literatúra

1. Chen, L., Wang, S., Feng, Y. et al.: Cells, 2021; 10(2):463.
2. Liu, M., Xie, S., Zhou, J.: Exp Anim, 2017; 67(1):1-6.
3. Mangir, N., Dikici, S., Claeysens, F. et al.: ASC Biomater Sci Eng, 2019; 5(7):3190-3200.
4. Makanya, A.N., Dimova, I., Koller, T. et al.: Plos One, 2016; 11(4): e0152821.
5. Medvecky, L., Giretova, M., Stulajterova, R.: J Mater Sci Mater Med, 2013; 25(3):777-789.
6. Baiguera, S., Macchiarini, P., Ribatti, D.: J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012; 100(5):1425-1434.
7. Maina, J.N., Springer International Publishing, New York, 2017; 219-247.
8. Nanka, O., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. et al.: Anat Embryol (Berl), 2001; 204(5):407-411.
9. Ribatti, D.: Reprod Toxicol, 2017; 70:97-101.
10. Zhu, P., Zhang, C-B., Yang, P. et al.: Oncotarget, 2016; 7(29):45005-45014.

Publikácia vznikla za finančnej podpory APVV-20-0073, VEGA 1/0074/24 a IGA-ESGV/07/2024 „Hodnotenie angiogénneho potenciálu vybraných inovatívnych pórovitých biomateriálov vyvíjaných pre regeneráciu kostného tkaniva s využitím alternatívnych in vitro a in vivo metód.“ Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V05-00017.

ANALÝZA REZERVNÝCH LIPIDOV V ORGÁNOCH MODELOVÉHO ORGANIZMU *NEOCARIDINA DAVIDI* PO EXPOZÍCII ACETAMIPRIDOM

ANALYSIS OF RESERVE LIPIDS IN ORGANS OF THE MODEL ORGANISM *NEOCARIDINA DAVIDI* AFTER EXPOSURE TO ACETAMIPRIDE

Richard Galajda¹, Viera Almášiová²

¹ *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

² *Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

richard.galajda@uvlf.sk

Abstract

Based on the results of our previous research on the effect of the insecticide acetamiprid on the digestive system of the shrimp *Neocaridina davidi*, we performed a histochemical analysis of the midgut and hepatopancreas with a focus on evidence of accumulation of reserve lipids in these organs. The occurrence of a stressor in the aquatic environment leads to an increase in the reserve materials that the organism needs to maintain energy homeostasis in the cells, which was also proven by the results of our experiment, where we observed a significant increase of lipids in the organs of the exposed group of shrimp compared to the control group.

Úvod

S rastúcim stupňom znečistenia prostredia sa zvyšuje záujem o dôsledky pôsobenia rôznych druhov cudzorodých látok na živé systémy, čo si vzhľadom na legislatívne a etické obmedzenia vyžaduje zavedenie nových druhov modelových organizmov pre vedecké účely. Neonikotinoidy (NE) sú novou generáciou široko používaných insekticídov. Pôsobia na postsynaptické nikotínové acetyl-cholinergné receptory hmyzu ako agonisti týchto receptorov, ktoré sa výhradne nachádzajú v CNS. Zapríčiňujú opakujúce sa spazmy a následnú paralýzu hmyzu, vzhľadom na úplné blokovanie šírenia nervových vzruchov (1).

NE sa vyznačujú vyššou afinitou k receptorom hmyzu ako u cicavcov, vysokou účinnosťou a jednoduchosťou aplikácie. V sladkovodných organizmoch ako je *N. davidi* sa môžu xenobiotiká dostať do tela cez epidermis a epitel strednej časti tráviaceho systému (2). Tráviaci systém *N. davidi* sa skladá z predného a zadného čreva ektodermového pôvodu a strednej časti tráviaceho traktu endodermového pôvodu, ktorá je diferencovaná na stredné črevo a hepatopankreas. Črevo - intestinum má rúrkovitý tvar a zo stredného čreva sa po resorpcii rozličné xenobiotiká

môžu distribuovať prostredníctvom telových tekutín do celého tela (3, 4). Štrukturálne a ultraštrukturálne zmeny na tejto časti tráviaceho traktu sa považujú za užitočné ukazovatele priameho účinku rôznych xenobiotík na tieto organizmy a sú dobrými markermi environmentálnych stresorov (5, 6). Cieľom práce bolo pozorovať vplyv acetamipridu v prípravku Mospilan® 20 SP pri koncentrácii 1 mg/l vo vodnom prostredí na akumuláciu rezervných lipidov v hepatopankrease a čreve *N. davidi*.

Materiál a metódy

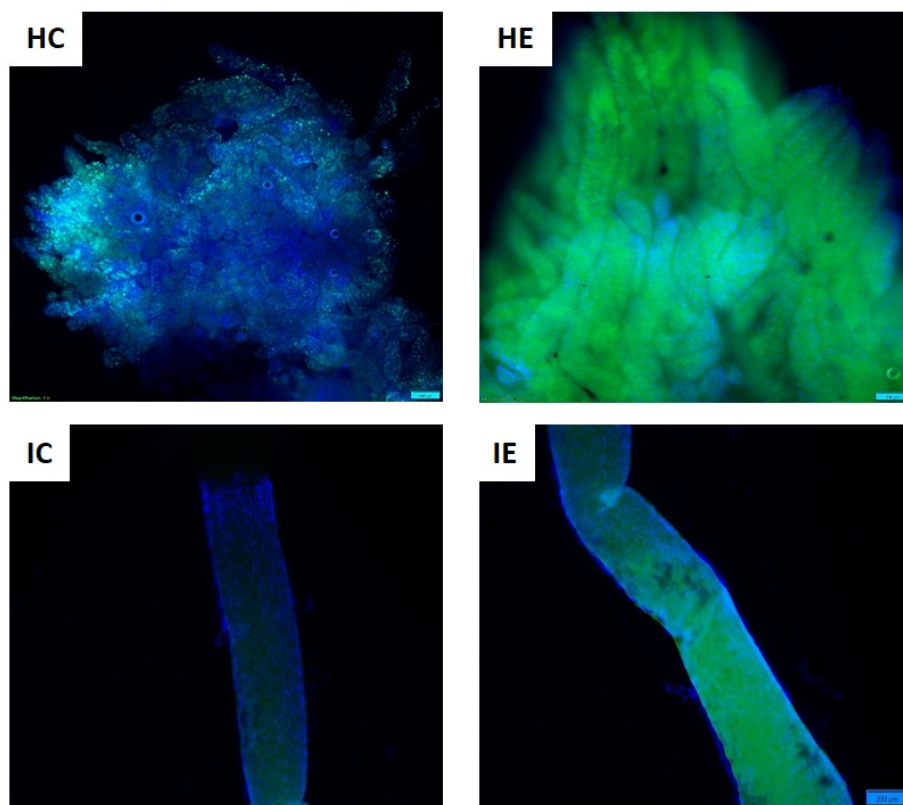
V experimente boli použité sladkovodné krevety druhu *Neocaridina davidi*. Jedince v experimentálnej skupiny sme vystavili 96 hodinovej expozícii 1 mg/l Mospilanu® 20 SP vo vodnom prostredí. Krevety z kontrolnej skupiny (n=6) ako aj zo skupiny s pridaním Mospilanu® 20 SP (n=6) sme po 96 hodinovej expozícii šetrne usmrtili ponorením do 10% fixačného roztoku formalínu, izolovali hepatopankreas a črevo a preniesli do roztoku TBS. Následne sme pridali zmes BODYPI, DAPI, TBS (čas farbenia 40 min, v tme). V ďalšom kroku sme odstránili zmes zo skúmaviek a premyli vzorky po farbení pridaním roztoku TBS po dobu 2 x 5 minút. Po odstránení TBS sme pridali 1 kvapku roztoku Vectashield a prekryli sklíčka krycím sklíčkom. Následne sme pozorovali tkanivá konfokálnym mikroskopom: pri 405 nm (detekcia DAPI) a 559 nm (BODYPI) (5).

Výsledky a diskusia

Jasná korelácia medzi autofágiou a akumuláciou rezervných materiálov bola opísaná v orgánoch rôznych článkonožcov (7, 8). V experimente s pesticídom dimetoát bolo pozorované, že u jedincov vystavených dimetoátu sa lipidy akumulovali v cytoplazme D-buniek čreva, a B-bunkách hepatopankreasu, zatiaľ čo u jedincov v kontrolnej skupine sa rezervný materiál neakumuluje (5). Rovnaký efekt sme pozorovali aj v našom experimente, kde po 96 hodinovej expozícii acetamipridom sme zaznamenali signifikantný nárast ukladania lipidových kvapiek oproti kontrolnej skupine (Obr.1). Ukladanie rezervných materiálov môže súvisieť so skutočnosťou, že v organizmoch žijúcich v znečistenom prostredí alebo vystavených akýmkoľvek stresorom sa zvyšuje energetický výdaj zvierat'a, čo súvisí s detoxikáciou a vylučovaním škodlivých látok (9). Môže to viesť k akumulácii zásobných materiálov v orgánoch, ktoré sa môžu využiť na udržanie energetickej homeostázy v bunkách (10). Niektoré analýzy súvisiace s energetickou bilanciou (akumulácia lipidov, bielkovín a polysacharidov) boli vykonané na niekoľkých vodných živočíchoch (11, 12) Hromadenie rezervných látok v D-bunkách čreva, kde sa bežne neukladajú, so zvyšujúcim sa počtom degenerovaných

mitochondrií a ich štiepením u *N. davidi* teda naznačuje zvládanie stresu spôsobeného výdajom energie a vyrovnanie energetického rozpočtu (10, 13). Poškodenia, ku ktorým dochádza v bunkách a tkanivách pod vplyvom toxických látok, sa ľahšie regenerujú v prípade zvýšeného energetického výdaja (14, 15).

Akumulácia zásobného materiálu v bunkách, ktoré nie sú na tento účel určené, naznačuje výrazne zvýšenú spotrebu energie organizmom. Hromadenie lipidov v B-bunkách hepatopankreasu a D-bunkách čreva u jedincov *N. davidi* vystavených pesticídu túto skutočnosť potvrdzuje (5). U rôznych živočíchov boli opísané rôzne a individuálne zdroje energie a spôsoby distribúcie energie (16). U *N. davidi* sú materiálom akumulovaným v čreve a hepatopankrease lipidy, čo naznačuje zvýšenú lipogenézu a zvýšený energetický výdaj. Môžeme konštatovať, že pod vplyvom stresoru a intenzívnej spotreby energie (napr. autofágia, mitochondriálne štiepenie) sa rezervné materiály môžu akumulovať v bunkách, ktoré nie sú typickými zásobnými bunkami (6, 10, 17, 18).



Obr. 1 Hepatopankreas - kontrolná skupina (HC), hepatopankreas - skupina po expozícii acetamidridom (HE), črevo - kontrolná skupina (IC), črevo - skupina po expozícii acetamidridom (IE), modrá farba pri tomto farbení predstavuje bunkové jadrá, zelená kvapky lipidov.

Súhrn

Xenobiotiká, predovšetkým pesticídy môžu vstupovať do vodného prostredia a pôsobiť tak toxicky na rozličné necieľové organizmy. Vzhľadom na obmedzený výber modelových organizmov vhodných na testovanie vplyvu akútnej aj dlhodobej expozície týchto látok vo vodnom prostredí sa javí druh sladkovodnej krevety *Neocaridina davidi* vhodným pre použitie v akvatických biotestoch. V štúdiách uskutočnených za posledné roky boli identifikované štruktúry tráviaceho traktu *N. davidi*, reagujúce zmenami na štruktúrálnej aj ultraštruktúrálnej úrovni ako vhodné ukazovatele toxického účinku rôznych pôvodcov enviromentálnej kontaminácie vodného prostredia. Črevo a hepatopankreas predstavujú kľúčové miesto pre absorpciu živín a tiež vstupnú bránu pre xenobiotiká z vodného prostredia. Akumulácia rezervných materiálov (lipidov) v týchto orgánoch je spojená s vysokým energetickým využitím súvisiacim s procesmi podporujúcimi prežitie (napr. autofágia, mitofágia, mitochondriálne štiepenie).

Literatúra

1. Goulson, D.: J Appl Ecol, 2013; 50: 77-87.
2. Kozłowska, M., et al.: Dev Biol, 2021, 478(2): 50–59.
3. Sonakowska, L., et al.: PLOS ONE, 2015; 5.
4. Sonakowska-Czajka, L., et al.: J Morph, 2020; 282: 48–65.
5. Siregar P. et al.: Antioxidants 2021; 10: 391.
6. Ostrozka A. et al.: Micron 2022; 155: 103162.
7. Rost-Roszkowska, M. et al.: Zoomorphology, 2018; 4: 501–509.
8. Tettamanti, G. et al.: Eur Zool J, 2019; 86: 113–131.
9. Sibly, R.M., Calow, P.: Biol J Linn Soc Lond, 1989; 37: 101–116.
10. Bednarska, A.J., Stachowicz, I., Kurianska, L.: Environ Sci Poll Res, 2013; 20: 390–398.
11. De Coen, W.M., Janssen, C.R.: Environ Toxicol Chem, 2003; 22: 2195–2201.
12. Smolders, R., De Boeck, G., Blust, R.: Environ Toxicol Chem, 2003; 22: 890–899.
13. Calow, P.: Comp Biochem Physiol, 1991; 100C: 3–6.
14. Maryanski, M., et al.: Ecotoxicol, 2002; 11: 127–139.
15. Knigge, T., Kohler, H.R.: Environ Pollut, 2000; 108 (2): 209–217.
16. Arrese, E.L., Soulages, J.L.: Annu Rev Entomol, 2010; 55: 207–225.
17. Rost-Roszkowska, et al.: Microsc Microanal, 2019; 25: 1004–1016.
18. Sonakowska L., et al.: PLOS ONE, 2016; 11(2): e0147582.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0240/25.

**EFEKT PRÍDAVKU KONDICIONOVANÉHO MÉDIA NA OSTEOGÉNNE
VLASTNOSTI KALCIUM FOSFÁTOVÉHO/ KALCIUM SULFÁT
HEMIHYDRÁTOVÉHO BIOCEMENTU - IN VITRO ŠTÚDIA**

EFFECT OF CONDITIONED MEDIUM ADDITION ON OSTEOGENIC PROPERTIES OF
CALCIUM PHOSPHATE/CALCIUM SULFATE HEMIHYDRATE BIOCEMENT - AN IN
VITRO STUDY

**Giretová Mária¹, Medvecký Lubomír¹, Štulajterová Radoslava¹, Tibor Sopčák¹, Eva
Székiová²**

*¹ Divízia funkčných a hybridných systémov, Ústav materiálového výskumu SAV, v.v.i.,
Watsonova 47, 04 001 Košice, Slovakia*

*² Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Šoltsovej 4–6, 040 01 Košice, Slovakia
mgiretova@saske.sk*

Abstract

The aim of the study was to investigate the effect of conditioned medium addition to biocement extract on the osteogenic properties of the rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs). Briefly, MSCs were cultured for 7 and 17 days in extracts derived from the basic tetracalcium phosphate/monetite/calcium sulfate hemihydrate biocement (CAS) and from CAS extract supplemented with 5% (v/v) of concentrated conditioned medium CM. The CM was obtained from rat bone marrow MSC cultures after a 48h conditioning period. The results showed that the addition of CM had a significant positive impact on the osteoblastic differentiation of MSCs. The improvement in osteogenic properties was due to the synergistic effect between the higher concentration of calcium ions in extracts released from the calcium sulfate hemihydrate-containing cement and the bioactive molecules supplied by the CM.

Úvod

Riešenie kostných defektov vznikajúcich v dôsledku úrazov (zlomenín), patologických stavov (nádory, infekcie) alebo vývojových porúch predstavuje významný klinický problém v ortopédii aj v ústnej a maxilofaciálnej chirurgii. Rozsiahle kostné lézie sa nedokážu spontánne zahojiť, a preto si vyžadujú externý zásah (1). Atraktivita používania kalcium fosfátových cementov (CPC) spočíva v ich bioaktivite, netoxicite a najmä v schopnosti biodegradácie,

vd'aka ktorej dochádza k postupnému nahradeniu implantátu v mieste kostného defektu novovytvoreným kostným tkanivom. Vlastnosti týchto biocementov je možné cielene upravovať pridaním rôznych látok. Patria sem prírodné materiály, ako sú chitosan, alginát, želatína, aminokyseliny, celulóza a kolagén, ako aj syntetické polyméry, napríklad poly(laktid-ko-glykolid), polykaprolaktón, poly(L-mliečna kyselina) a polyetylénglykol (2). Síran vápenatý vo forme hemihydrátu (CSH) je lacná a ľahko dostupná surovina. Hoci má určité nevýhody ako kostný náhradný materiál napr. horšiu manipulovateľnosť, nízku mechanickú pevnosť a v niektorých prípadoch príliš rýchlu resorpciu – jeho výhodou je schopnosť ovplyvňovať expresiu génov súvisiacich s osteoblastmi a zároveň slúžiť ako nosič rastových faktorov a antibiotík (3). Kondicionované médium (KM) z kultivácie mezenchymových kmeňových buniek (MKB) predstavuje kultivačné médium bez prídavku živočíšneho séra, v ktorom kmeňové bunky proliferujú a prostredníctvom rôznych mechanizmov uvoľňujú doň biologicky aktívne látky. Toto médium tak obsahuje súbor prospešných sekkrétov produkovaných bunkami. MKB-KM sa v súčasnosti čoraz viac považuje za bezpečnejšiu alternatívu k priamej transplantácii buniek, pričom si zachováva vysokú terapeutickú účinnosť, môže dosahovať regeneračný účinok porovnateľný s transplantáciou samotných buniek (4, 5). MKB-KM, ako nosič biologicky aktívnych molekúl, preukázalo svoj terapeutický potenciál v širokej škále ochorení. Medzi tieto aplikácie patria ischemické ochorenia (napríklad cievna mozgová príhoda či infarkt myokardu), neurodegeneratívne poruchy, diabetes mellitus 2. typu, poranenia miechy, alopecia, akútne aj chronické rany, mužská infertility, ako aj poškodenia pečene, pľúc, parodontálnych tkanív a muskuloskeletálneho systému (6,7,8,9). KM je možné jednoducho získať, skladovať pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, lyofilizovať, baliť a transportovať. Keďže neobsahuje živé bunky, nie je potrebná autológna zhoda medzi darcom mezenchymálnych kmeňových buniek a príjemcom KM (10). Kondicionované médium kmeňových buniek predstavuje bohatý zdroj dôležitých rastových faktorov a cytokínov, ako sú napr. vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), fibroblastový rastový faktor (bFGF), makrofágový stimulačný proteín (MSP), keratinocytový rastový faktor (KGF) a inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF-1). Tieto bioaktívne zložky zohrávajú kľúčovú úlohu pri regenerácii buniek a angiogenéze, teda tvorbe nových krvných ciev (11,12).

Cieľom našej štúdie bolo overiť, či prídanie KM do extraktov cementu pozitívne ovplyvní proliferáciu a osteogénnu diferenciáciu potkaních mezenchymálnych kmeňových buniek (MKB) in vitro. Zároveň sme sa zamerali na hodnotenie vplyvu prídania KM do extraktu biocementu na báze CAS na osteogénne vlastnosti MSC získaných z kostnej drene potkana v porovnaní s bunkami kultivovanými v extrakte bez prídavku KM.

Material a metódy

Príprava biocementu

Prášková zmes cementu na báze tetrakalciumfosfátu/monetitu/síranu vápenatého hemihydrátu (TTCPM/CSH) bola pripravená in situ reakciou TTCP s riedeným roztokom zmesi kyseliny ortofosforečnej (86 %, analytická čistota, Merck, Darmstadt, Nemecko) a kyseliny sírovej (96 %, analytická čistota, Merck) v 80 obj. % etanole (reakčný roztok). Reakcia prebiehala v planetárnom guľovom mlyne s achátovými guľami a nádobou počas 30 minút pri laboratórnej teplote. Výsledný biocement CAS obsahoval 5 hmotnostných % síranu vápenatého hemihydrátu (CSH).

Kultivácia buniek a príprava kondicionovaného média

Mezenchymové kmeňové bunky potkana (MKB) v pasáži 2 boli nasadené do jamiek 48-jamkovej kultivačnej platničky (Brand, Wertheim, Nemecko) v hustote 2×10^4 buniek v 400 μL kultivačného média na jamku. Bunky boli inkubované 24 hodín pri 37 °C, 95 % vlhkosti a 5 % CO_2 v kult. médiu s prídavkom 10 % fetálneho bovinného séra (FBS), až kým nevytvorili semikonfluentnú monovrstvu. Po uplynutí tejto doby bolo pôvodné médium (odstránené a nahradené príslušnými extraktmi. Všetky experimenty boli realizované v troch opakovaníach. Ako negatívna kontrola (NK) slúžili bunky kultivované v kompletnom médiu bez prídavku extraktu.

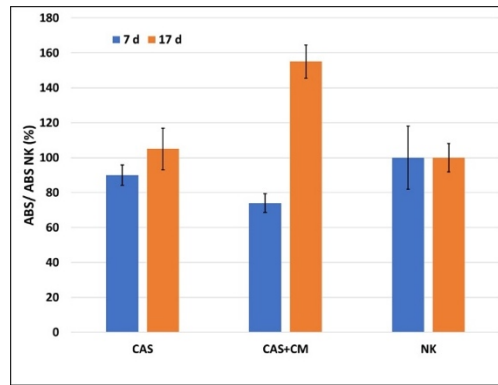
Pre prípravu extraktov boli vzorky kalciumfosfátového cementu s CSH (CAS) inkubované v kompletnom kultivačnom médiu, ktoré pozostávalo z α -modifikovaného Eagleovho minimálneho esenciálneho média (EMEM; Biosera, Marikina, Filipíny), doplneného o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS), 1 % antibioticko-antimykotického roztoku a osteogénnych stimulátorov. Osteogénny koktail obsahoval L-askorbovú kyselinu (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dexametazón (50 nM) a β -glycerofosfát (10 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pomer materiálu k médiu bol 0,1 g/mL a inkubácia prebiehala 24 hodín pri 37 °C. Dlhodobé sledovanie cytotoxicity a hodnotenie osteogénnej diferenciácie buniek prebiehalo počas 17 dní kultivácie. Kondicionované médium (KM) bolo pripravené z kultúry MKB potkana (pasáž 2), ktoré boli pestované v kultivačných fľaškách s plochou 75 cm^2 (10 mL média na banku) v médiu bez FBS a bez fenolovej červene (DMEM s nízkym obsahom glukózy; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) počas 48 hodín. Následne bolo médium centrifugované (400 g, 10 minút), prefiltrované cez filtre s veľkosťou pórov 0,22 μm (Merck Millipore, Tullagreen, Írsko) a skoncentrované 10-násobne pomocou filtračných jednotiek Amicon 3 kDa (Merck, Darmstadt, Nemecko) podľa pokynov výrobcu. Takto pripravené kondicionované médium bolo pridané do extraktu v koncentrácii 5 % (v/v) z celkového objemu (označené ako CAS + CM). Médium bolo

obnovované dvakrát týždenne súčasne s kompletnou výmenou extraktu. Cytotoxicita bola hodnotená po 7 a 17 dňoch kultivácie MKB potkana v extraktoch s prídavkom kondicionovaného média (CAS + KM) a bez jeho prídavku (CAS) pomocou MTS testu (CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA). Absorbancia formazánu - vzniká v živých, enzymaticky aktívnych bunkách, bola meraná UV/VIS spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 490 nm (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Proliferácia buniek bola vyjadrená ako percentuálny podiel absorbancie experimentálnych skupín (ošetrené bunky) vo vzťahu k negatívnej kontrole (NK; bunky kultivované v kompletnom médiu s osteogénnymi doplnkami, bez extraktu a bez KM). Počet, morfológia a hustota buniek kultivovaných v jednotlivých extraktoch boli sledované pomocou fluorescenčného farbenia živých a mŕtvych buniek. Fluoresceín diacetát farbí životaschopné bunky na zeleno, zatiaľ čo propídium jodid preniká cez poškodené membrány mŕtvych buniek a spôsobuje ich červené zafarbenie. Fotografie boli získané pomocou fluorescenčného mikroskopu (Leica DM IL LED, modrý filter, Heerbrugg, Švajčiarsko). Kolagén produkovaný osteoblasticky diferencovanými bunkami bol detegovaný metódou picosiriová červená a prítomnosť depozitov hydroxyapatitu bola vizualizovaná farbením alizarinovou červenou. Tieto analýzy boli vykonané po 17 dňoch kultivácie MKB v extraktoch biocementu s prídavkom KM aj bez neho. Po odstránení farbiaceho roztoku a premytí buniek boli vzorky pozorované pomocou svetelného mikroskopu (Leica DM IL LED, Heerbrugg, Švajčiarsko).

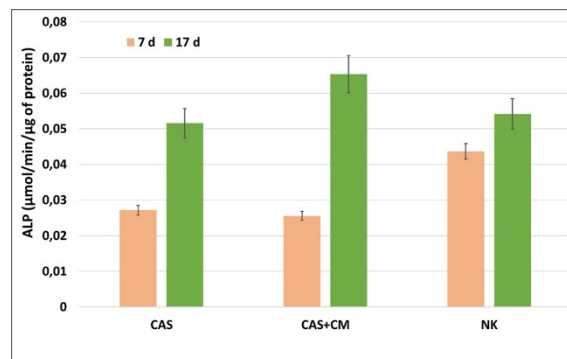
Výsledky a diskusia

Proliferácia, farbenie živé/mŕtve, aktivita ALP, kalciové depozity a farbenie kolagénu I

Po 7 dňoch kultivácie bola vo všetkých testovaných skupinách pozorovaná znížená proliferácia buniek v porovnaní s negatívnou kontrolou (NK) (Obr. 1). Pri predĺženej kultivácii však došlo k nárastu proliferácie buniek v testovaných extraktoch. Po 17 dňoch bola vyššia proliferácia v porovnaní s NK aj skupinou CAS zaznamenaná v extrakte CAS + KM, čo naznačuje synergický účinok zvýšenej koncentrácie vápenatých iónov a bioaktívnych faktorov prítomných v CM na bunky kultivované v tomto extrakte. V prípade aktivity alkalickéj fosfatázy (ALP) diferencovaných buniek vo všetkých cementových extraktoch (Obr. 2) bol po 7 dňoch zaznamenaný pokles priemerných hodnôt ALP v porovnaní s NK. Po 17 dňoch kultivácie došlo k zvýšeniu aktivity ALP, najvýraznejšie v extrakte CAS + CM.

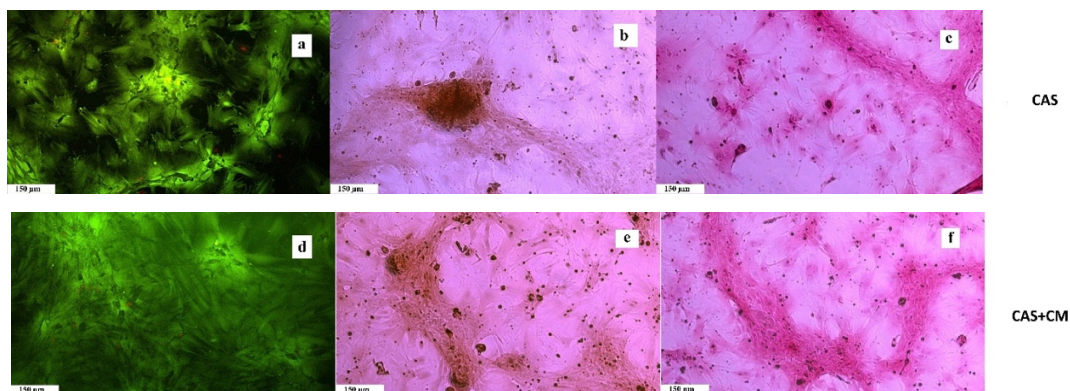


Obr. 1 Proliferácia MKB v cementových extraktoch po 7 a 17 dňoch kultivácie.



Obr. 2 ALP aktivita MKB v cementových extraktoch po 7 a 17 dňoch kultivácie.

Farbenie živých/mŕtvych buniek nám potvrdilo naše zistenia z testu proliferácie buniek. Hustejšia populácia navzájom prepojených buniek, bez viditeľných červených-mŕtvych buniek v prípade populácie buniek v extrakte cementu CAS+CM. Kvalitatívne sme dokázali produkciu kalciových depozitov a kolagénu bunkami kultivovanými v oboch typoch cementových extraktov. Zistili sme, že prídavok kondicionovaného média výrazne ovplyvňuje osteoblasticky diferencované MSC kultivované v extraktoch biocementu CAS v porovnaní s extraktmi samotného CAS cementu. Po 17 dňoch kultivácie bol pozorovaný nárast aktivity ALP, ako aj zvýšenie životaschopnosti buniek. Tento efekt je pravdepodobne sprostredkovaný rastovými faktormi a bioaktívnymi molekulami prítomnými v kondicionovanom médiu. Ukázalo sa, že už 5 % (v/v) prídavok 10-násobne koncentrovaného CM do extraktu biocementu významne zlepšuje osteogénne vlastnosti in vitro, vrátane správania buniek a zloženia extracelulárnej matrix, najmä v skupine CAS + CM. Tento pozitívny účinok možno pripísať synergickému pôsobeniu vápenatých iónov uvoľňovaných z cementu s obsahom CSH a bioaktívnych látok prítomných v KM na kultivované MSC.



Obr. 3 Farbenie “živé/mŕtve” buniek v cementových extraktoch po 17d kultivácie - živé bunky-zelené, mŕtve bunky-červené (a,d), farbenie kalciových depozitov alizarínovou červenou po 17d kultivácie (b, e), farbenie kolagénu pikrosíriovou červenou po 17d kultivácie (c, f).

Záver

V in vitro modeli použitím mezenchymových kmeňových buniek potkana sme pozorovali zlepšenie osteogénneho potenciálu buniek pri kombinácii koncentrovaného kondicionovaného média s extraktmi biocementu CAS. Kľúčovým zistením je, že už prídavok 5 % (v/v) 10-násobne koncentrovaného KM do CAS extraktov výrazne zlepšuje výsledky po 17 dňoch kultivácie. Tento efekt sa prejavil najmä zvýšenou aktivitou ALP, vyššou životaschopnosťou buniek a intenzívnejšou syntézou zložiek extracelulárnej matrice. Účinok je pravdepodobne dôsledkom synergického pôsobenia vápenatých iónov uvoľňovaných z CAS cementu a rastových faktorov či bioaktívnych molekúl prítomných v KM. Možno predpokladať, že využitie synergického účinku predstavuje perspektívny nový prístup v oblasti kostnej regenerácie, čím môže prispieť k urýchleniu hojenia a skráteniu doby rekonvalescencie v kostnom tkanivovom inžinierstve. Tento predpoklad je však potrebné overiť na in vivo modeli.

Literatúra

1. Benavides-Castellanos, M.P., Garzón-Orjuela, N., Linero, I.: Cell Regen, 2020; 9.
2. Varga, M., Kresakova, L., Danko, J. et al.: Int J Mol Sci, 2023; 24: 15690.
3. Woo, K.M., Yu, B., Jung, H.M. et al.: J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009; 91, 545–554.
4. Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P. et al.: Int. J. Mol. Sci, 2019; 20, 1656.
5. Giuliani, A., Sena, G., Tromba, G. et al.: Appl. Sci, 2020; 10, 2336.
6. Székiová, E., Michalová, Z., Blaško, J. et al.: Growth Factors, 2023; 41, 57–70.
7. Zhang, Z.Z., Wang, S.J., Zhang, J.Y. et al.: Am J Sports Med, 2017; 45, 1497–1511.
8. Widyaningsih, W., Putra, A., Priyantini, S. et al.: Trends Sci, 2024; 21, 7278.
9. Katagiri, W., Watanabe, J., Toyama, N. et al.: Implant. Dent, 2017; 26, 607–612.
10. Humenik, F., Jegó, S., Hornakova, L. et al.: Gen Physiol Biophys, 2021; 40, 551–559.
11. Noverina, R., Widowati, W., Ayuningtyas, W. et al.: Clin Nutr Exp, 2019; 24, 34–44.
12. Nakano, N., Nakai, Y., Seo, T.B. et al.: Neurosci Lett, 2010; 483, 57–61.

Táto práca bola podporená projektom APVV 20-0184 a projektom VEGA 2/0038/25.

EMBRYOTOXICKÝ A TERATOGENNÝ ÚČINOK ALBENDAZOLU A FENBENDAZOLU U LABORATÓRNYCH KRÁLIKOV

EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC EFFECTS OF ALBENDAZOLE AND FENBENDAZOLE IN LABORATORY RABBITS

Katarína Hajovská¹, Bettencourt Capece², Marco Alves²

¹*Ústav histológie a embryológie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice, SR*

²*Departamento de para – clínicas, Faculdade de Veterinária, UEM, Maputo, Moçambique*

katarina.hajovska@upjs.sk

Abstract

Albendazole and its primary active metabolite sulfoxide, as well as fenbendazole are broad-spectrum antiparasitics (antihelminthics) of the benzimidazole group, which are used in veterinary medicine for the treatment of worm infections in various animal species. Albendazole is also commonly used drug for humans. Fenbendazole is primarily used in veterinary medicine, although its potential in oncology treatment in humans is being investigated. In order to analyze the embryotoxic and teratogenic effects of this antiparasitics in ruminants, is necessary to conduct preliminary studies in laboratory animals. Knowledge of the embryotoxic and teratogenic effects of these drugs helps to reduce adverse reactions resulting from their use in pregnant females and in this way production can be increased.

Úvod

Albendazol (ABSZO) a jeho primárny aktívny metabolit sulfoxid, ako aj fenbendazol (FBZ) sú širokospektrálne antiparazitiká (antihelminťiká) zo skupiny benzimidazolov používaných vo veterinárnej medicíne na liečbu infekcií spôsobených červami (hlístovce, pásomnice, pľúcne červy) u rôznych druhov zvierat. Albendazol je bežne používaným liekom aj pre ľudí. Fenbendazol sa primárne používa vo veterinárnej medicíne, hoci sa skúma jeho potenciál v onkologickej liečbe u ľudí. Veľkým problémom domácich zvierat sú endo- a ektoparazitózy, ktoré majú negatívny dopad na živočíšnu výrobu, okrem toho, negatívne ovplyvňujú životné podmienky, prosperitu a zdravie zvierat. V boji proti parazitózam sa používajú adekvátne farmaká (1) a rôzne profylaktické schémy (2). ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites) je najuznávanejšou organizáciou v Európe, ktorá vypracováva podrobné smernice pre prevenciu (profylaxiu) parazitov u psov, mačiek a iných spoločenských

zvierat a ich schémy zahŕňajú pravidelné odčervovanie a preventívne používanie ektoparazitík. Kontrolu endo- a ektoparazitóz je možné vykonávať rôznymi liekmi patriacimi do rôznych farmakologických skupín, z ktorých jednou z nich sú benzimidazoly, kde patrí albendazol, aj fenbendazol (3). Jedným z aspektov, ktoré je potrebné zohľadniť pred podávaním určitých liekov je fyziologický stav samíc, pretože niektoré lieky majú schopnosť prechádzať placentárnou bariérou a môžu spôsobiť malformácie a aj smrť embrya (4). Chemoterapia parazitárnych infekcií má dva ciele. Prvý zahŕňa liečbu infikovanej osoby/zvieraťa s cieľom eliminovať infekciu a druhý súvisí s verejným zdravím a je zameraný na zníženie prenosu parazitárnej infekcie (5). Albendazol a jeho metabolit sulfoxid, rovnako ako aj fenbendazol sa vo vysokej miere používajú vo veterinárnej medicíne, hlavne u prežúvavcov. Kvôli analyzovaniu embryotoxického a teratogénneho účinku tohto antiparazitika je potrebné urobiť predchádzajúce štúdie u laboratórnych zvierat. Znalosti embryotoxických a teratogénnych účinkov týchto liekov pomáha znižovať nežiaduce reakcie vyplývajúce z ich užívania u gravidných samíc a týmto spôsobom možno zvýšiť produkciu. Pri užívaní benzimidazolov, sa môžu vyskytnúť niektoré nežiaduce účinky, ako sú embryotoxicita a teratogenita (6, 7, 8, 9, 10, 11). Podľa Schulza a kol. (12), existujú 2 skupiny faktorov, ktoré môžu spôsobovať malformácie. Ide o exogénne, alebo enviromentálne faktory (fyzikálne, chemické vrátane liečiv, hormonálne, výživové a iné). Druhé sú endogénne faktory dedičného pôvodu. Malformácie spôsobené exogénnymi faktormi sú výsledkom vývojových porúch počas ontogenézy. Neexistuje jediný chemický produkt, ktorý by mal teratogénne vlastnosti rovnakej intenzity pre všetky druhy zvierat. Nie všetky zložky farmakologickej skupiny benzimidazolov vykazujú embryotoxické a teratogénne účinky. Napríklad Triclabendazol nepreukázal žiadne embryotoxické a teratogénne účinky u potkanov, a to ani pri použití dávky 200 mg/kg, čo zodpovedá 20-násobku odporúčanej dávky (10).

Materiál a metódy

V štúdiu boli použité perorálne suspenzie liekov: Sulfoxid albendazol (Ricobendazol Oral), Fenbendazol (Ecomintic 50, Eco Animal Health Southern Africa Ltd). Do pokusu bolo zaradených 36 samíc novozélandského kráľika vo veku 4 mesiacov s hmotnosťou 1,8 – 2,4 kg. Zvieratá boli kŕmené denne 200 g komerčnej kŕmnej zmesi (Comercial C1) a dostávali vodu *ad libitum*. Zvieratá boli rozdelené do 5 skupín:

Experimentálne skupiny:

1. skupina: 7 samíc, podávaný Sulfoxid albendazolu (ABZSO) v dávke 10 mg/kg
2. skupina: 7 samíc, podávaný Sulfoxid albendazolu (ABZSO) v dávke 20 mg/kg

3. skupina: 7 samíc, podávaný Fenbendazol (FBZ) v dávke 10 mg/kg

4. skupina: 7 samíc, podávaný Fenbendazol (FBZ) v dávke 20 mg/kg

Kontrolná skupina: 8 samíc

Deň pripustenia samíc k spáreniu so samcom sa v našom pokuse rátal ako prvý deň („Deň jedna“). Na 10. deň sa samiciam v pokusných skupinách podali liečivá v dávkach uvedených vyššie. Kontrolnej skupine sa nepodalo žiadne liečivo. Desiaty deň bol zvolený preto, lebo v pokuse by mal korešpondovať ešte s prvým trimestrom gravidity u králikov a podľa Aiellon a kol. (3) sú niektoré benzimidazoly sú teratogénne a v závislosti od podanej dávky sú počas tohto obdobia kontraindikované. Liečivá boli podané *per os* a samice králika boli ustajnené do 28. dňa gravidity, kedy boli samice usmrtené eutanáziou. Po usmrtení sa vykonala laparotómia, pri ktorej sa odobrali plody incíziou maternice a analyzovali sa aj vaječníky. Incízia maternice umožnila preskúmanie maternice kvôli štúdiu embryotoxického účinku lieku, kde sa veľký dôraz kládol na prítomnosť neskorých embryonálnych absorpcií a to prostredníctvom analýzy miesta implantácie. Včasné embryonálne absorpcie nie je možné pozorovať, ale možno ich vypočítať z rozdielu medzi počtom žltých teliesok prítomných vo vaječníkoch a súčtom plodov a neskorých absorpcií prítomných v rohoch maternice. Odobrané plody boli eutanazované a podstúpili pitvu. Postupovalo sa podľa upravenej metodológie Staplesa a Schnella (13):

1. Najprv sa previedla fixácia plodov v 70% etylalkohole, v trvaní 10 dní.
2. Následne sa z hydroxidu draselného (KOH) pripravil 2% roztok v ktorom sa nechali plody 24 hodín, aby prebehla parciálna macerácia mäkkých tkanív.
3. Plody sa nechali 24 hodín pod tečúcou vodou a následne za pomoci pinzety sa odstránili, niekedy len uvoľnili tkanivá, ktoré už boli čiastočne oddelené.
4. Plody boli umiestnené na 24 hodín do 1% roztoku KOH s farbivom Alizarín Red S (6 mg/ml).
5. Priesvitnosť plodov sa dosiahla v roztoku obsahujúcom glycerol, 70% etylalkohol a benzylalkohol v pomere 2:2:1. V roztoku sa plody nechali počas niekoľkých dní, aby sa dosiahla úplná transparentnosť. Po niekoľkých dňoch tento roztok bol silno sfarbený, takže sa roztok v rovnakom pomere zložiek vymenil za nový až kým sa nedosiahla priesvitnosť plodov.
6. Na zachovanie (konzerváciu) plodov sa použil roztok glycerínu a 70% etylalkoholu v pomere 1:1 s pridaním niekoľkých kryštálikov Thymolu, ktorý má silné antiseptické vlastnosti, na zabránenie rastu húb a plesní.

Výsledky

Z 2 liečiv používaných v tomto experimente Sulfoxid albendazolu (ABZSO) v dávke 20 mg/kg vykazoval vyšší počet úplných absorpcií plodov a dosiahol 65,98% v jednom vrhu. Pri dávke

20 mg/kg Fenbendazolu (FBZ) sa dosiahlo 38,17% absorpcií plodov v jednom vrhu. Pri dávke 10 mg/kg ABZSO dosiahol 18,45% absorpcií a FBZ len 7,14%. Pri porovnaní hmotnosti plodov, tak neboli zaznamenané markantné rozdiely ani v jednej zo 4 experimentálnych skupín s rôznym dávkovaním ABZSO a FBZ. Pri porovnaní externých malformácií sa nenašli žiadne externé malformácie v skupine s dávkovaním 10 mg/kg ABZSO. Pri dávke 10 mg/kg FBZ sa našlo 17,43% externých malformácií. Pri dávke 20 mg/kg ABZSO sa pozorovalo 60,71% externých malformácií a pri dávke 20 mg/kg s FBZ sa pozorovalo len 7,22% externých malformácií. Výrazné rozdiely boli zistené v skupine s dávkou ABZSO 10 mg/kg a 20 mg/kg. Zvýšením dávky sa zvýšilo aj percento externých malformácií v porovnaní s liečivom FBZ, kde sa externé malformácie vyskytovali vo vyššom percente pri nižších dávkach (10 mg/kg). Pozorované externé malformácie boli skrátenie chvosta (Obr. 2) a nevyvinutie chvosta (Obr. 1).



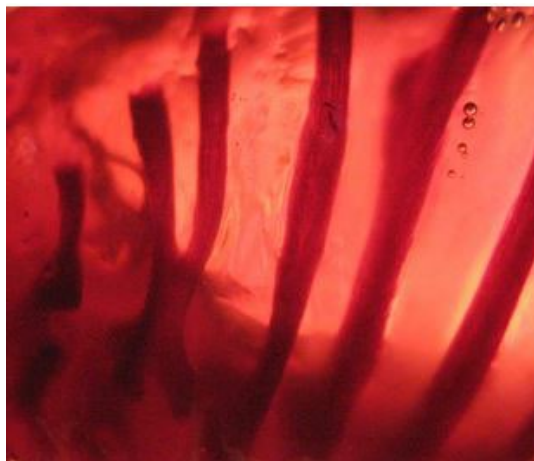
Obr. 1 Externá malformácia – nevyvinutie chvosta po podaní 20 mg/kg ABZSO.



Obr. 2 Externá malformácia – skrátenie chvosta po podaní 20 mg/kg ABZSO.

Malformácie rebier sa vo väčšej miere 28,57% vyskytovali v skupine s dávkou 20 mg ABZSO, v rovnakej dávke FBZ to bolo len 5,00%. Pri dávke 10 mg/kg to bolo 19,62% pri ABZSO a 12,16% pri FBZ. Hlavnými malformáciami rebier boli celkové nevyvinutie rebier, nevyvinutie hlavic rebier (*caput costae*) (Obr. 4), parciálne nevyvinutie tela rebier a fúzia –

zrastenie rebier medzi sebou (Obr. 3). Zaujímavosťou bolo, že pri zvýšenej dávke FBZ sa ukázal znížený počet malformácií rebier. Boli pozorované aj malformácie stavcov. Zvýšený počet malformácií stavcov bol dokázaný pri dávkach 20 mg/kg ako u ABZSO, tak aj u FBZ. Vyššie percento - 75% malformácií stavcov bolo pri dávke 20 mg/kg ABZSO, pri rovnakej dávke FBZ to bolo 15,17%. Medzi hlavné malformácie stavcov, ktoré boli pozorované patrili zrastené stavce, zrastené *processus transversus* a rozdvojené telá stavcov (Obr. 4). Boli tiež pozorované malformácie hrudnej kosti a článkov hrudnej kosti.



Obr. 3 Fúzia rebier medzi sebou po podaní 10mg/kg ABZSO.



Obr. 4 Rozdvojené telo stavca a nevyvinutá caput costae po podaní 10mg/kg ABZSO.

Diskusia

Zvýšenie počtu absorpcií, ktoré sa vyskytli pri podaní oboch liečiv vo zvýšených dávkach sú totožné v porovnaní výsledkov od Capece a kol. (6), kedy bol aplikovaný ABZSO u potkanov. Rovnako súhlasia s výsledkami Montovani a kol. (9), ktorý aplikoval albendazol u potkanov a Yoshimura a kol. (10), ktorý aplikoval flubendazol tiež u potkanov. Prítomnosť ABZSO v krvi plodov u potkanov a oviec, ukazuje že tieto zlúčeniny majú schopnosť prechádzať placentárnou bariérou (6). Zvýšenie počtu absorpcií nájdených a potvrdených pri zvýšených

dávkach možno zdôvodniť aj dlhším časovým obdobím, počas ktorého sú vyššie koncentrácie v kontakte s embryami. V našej práci neboli zaznamenané markantné rozdiely v hmotnosti plodov ani v jednej zo 4 experimentálnych skupín s rôznym dávkovaním ABZSO a FBZ, tak ako vo svojej štúdiu opisuje Capace a kol. (6). V štúdiu Capece a kol. (6) ABZSO nespôsoboval malformácie stavcov v krčnej oblasti ani stavcov a rebier v kraniálnej časti hrudnej oblasti, čo je v rozpore s tým, čo uviedol Navarro a kol. (7) pri použití NTB (netobimínu). To naznačuje, že teratogénny účinok ABZSO nevykazuje špecifickosť pre určité typy kostí. V našom experimente sa nevyskytli žiadne malformácie stavcov v krčnej oblasti a malformácie rebier sa vyskytli v kraniálnej, tak v kaudálnej časti hrudnej oblasti. Rozdiely v lokalizácii malformácií stavcov a rebier, ako aj v type malformácií pravdepodobne súvisia so štádiom embryonálneho vývoja, v ktorom liek prichádza do kontaktu s embryom. Piscopo a Smoak (14) zistili, že embryá hovädzieho dobytku a potkanov sú citlivé na ABZSO, pretože prítomnosť tohto lieku znižuje ich schopnosť delenia a vedie k morfológickým abnormalitám. Štatisticky významné rozdiely sú pri vonkajších malformáciách iba medzi skupinami s dávkou 20 mg/kg ABZSO a 10 mg/kg ABZSO. Okrem toho, v skupine s dávkou ABZSO 20 mg/kg niektoré vrhy vykazovali 100% embryonálnu absorpciu, čo ďalej znížilo počet analyzovaných vrhov kvôli absencii plodov v týchto prípadoch. Nárast teratogénnej účinnosti so zvyšujúcou sa dávkou lieku bola pozorovaná u potkanov (6, 9). Moreno a kol. (15) v štúdiu o dávkovo závislej aktivite albendazolu zistili, že zvýšené koncentrácie lieku, alebo jeho metabolitov v plazme korelujú so zvýšenou účinnosťou proti niektorým druhom ovčích nematód rezistentných na benzimidazoly. Pri celkových malformáciách skeletu, hoci sa medzi skupinami nezistili štatisticky významné rozdiely, ABZSO v dávke 20 mg/kg vykazoval najvyššiu hodnotu malformácií – 75%. Capece a kol. (6) dosiahli podobné výsledky u potkanov – 90,9%. Dôležitým aspektom, ktorý treba zvážiť je, že pri hodnotení celkových malformácií skeletu sa berú do úvahy malformácie rebier aj stavcov a v skupine liečenej ABZSO 20 mg/kg sa pozorovala prítomnosť plodov s oboma typmi malformácií. Pri analýze parametrov v našom experimente sa nezistili štatisticky významné rozdiely medzi kontrolnou skupinou a skupinami s rôznymi dávkami FBZ. Tieto výsledky sú v súlade so štúdiou Baroon a kol. (16), kde u potkanov použitých v štúdiu nepozorovali malformácie, nemali dôkazy o úmrtnosti pri narodení a dospeli k záveru, že FBZ je účinný a relatívne bezpečný na antihelmintickú liečbu v reprodukčných chovoch. Jedným z mechanizmov účinku benzimidazolov je inhibícia mitotického procesu v dôsledku ich väzby na β -tubulín v parazitárnych bunkách, čím blokujú polymerizáciu tubulínu do mikrotubulov (17, 18, 19). Je možné, že nedochádza k bunkovej selekcii, pričom rovnaký proces prebieha aj

vo vzťahu k iným bunkám, čo vedie k malformáciám, problémom v embryonálnom vývoji a spôsobuje absorpcie embryí.

Súhrn

V našej práci sme potvrdili, že ABZSO má vyšší embryotoxický a teratogénny účinok ako FBZ. Analyzované účinky boli evidentné pri dávke 20 mg/kg ABZSO, čo vykazuje účinok závislý od výšky dávky. V budúcich štúdiách by sa mohla použiť stredná dávka medzi 10 mg/kg a 20 mg/kg, keďže najvyšší počet malformácií a resorpcií sa vyskytol pri najvyššej dávke. Bolo by zaujímavé študovať rôzne malformácie v rôznom štádiu embryonálneho vývoja. V budúcnosti by sa mohli vypracovať štúdie na iných druhoch zvierat, napríklad tých, ktoré sú určené na konzum, s cieľom maximalizovať mieru produkcie a zároveň sa vyhnúť podávaniu ABZSO v prvej tretine gravidity, keďže jeho embryotoxický a teratogénny účinok je zrejmý.

Literatúra

1. Spaulding, C.E.: Guia veterinário para criadores. 2ª Edição; Publicações Europa – América, Lda; Portugal, 2000; 9-14.
2. Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.: Parasitologia Veterinária. 2ª Edicao; Guanabara Koogan; Rio de Janeiro – Brasil, 1998; 29-30.
3. Aiellon, S.E.: The Merck Veterinary Manual. 8th Edition; Merck & Co. Inc.; Philadelphia - United States of America, 1998; 1807-1809.
4. Booth, N.H., McDonald, L.E.: Farmacologia Y Terapeutica Veterinaria –Volumen II. 1ª Edição; Editorial Acribia S.A.; Zaragoza – España, 1988; 127-148.
5. Smith, C.M., Reynard, A.M.: Farmacología. Editorial Médica Panamericana S.A.; Buenos Aires – Argentina, 463, 1993; 466-468.
6. Capece, B.P.S., Navarro, M., Arcalis, T.: Vet J, 2003; 165:266-275.
7. Navarro, M., Canut, L., Cristofol, C.: Reprod Toxicol, 1999; 13:295-302.
8. Navarro, M., Cristofol, C., Ccarreteno, A.: Vet Rec, 1998; 142:86-90.
9. Montovani, A., Ricciardi, C., Stazi, A.: ReprodToxicol, 1995; 9:265-273.
10. Yoshimura, H.: Toxicol, 1987; 43:133-138.
11. Yoshimura, H.: Toxicol, 1987; 43:283-287.
12. Schulz, L., Dahme, E., Drommer, W.: Tratado de Anatomia Patologica General para Veterinarios y estudiantes de Veterinaria. Editorial Labor, S.A.; Barcelona – España, 1985; 389-406.
13. Staples, R.E., Schnell, V.L., 1964: Strain Technol, 1964; 39:61-63.
14. Piscopo, S.E., Smoak, I.W., 1997: Am J Vet Res, 1997; 58:1038-1041.
15. Moreno, L., Echavarría, F., Muñoz, F.: Exp Parasitol, 2004; 106: 150-157.
16. Barron, S., Baseheart, B.J., Segar, T.M.: Neurotoxicol Teratol, 2000; 22:871-877.
17. Lacey, E.: Parasitol Today, 1990; 6:112-115.
18. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S.: As bases farmacológicas da terapeutica. 8ª Edição; Editora Guanabara Koogan S.A.; Rio de Janeiro – Brasil, 1990; 637-638.
19. Lankas, G.R., Nakatsuka, T., Ban, Y.: Food Chem Toxicol, 2001; 39:367-374.

This study was supported by the research project Fundo aberto para investigação, Faculdade de Veterinária, UEM, Maputo, Moçambique (05/2019 – 05/2024).

PREHĽAD IMUNOHISTOCHEMICKÝCH METÓD: HISTÓRIA, SÚČASNÝ STAV A PERSPEKTÍVA V BUDÚCNOSTI

REVIEW OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUES: HISTORY, CURRENT
STATUS, AND FUTURE PERSPECTIVES

Monika Holodová

Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice, SR

monika.holodova@upjs.sk

Abstract

Currently, immunohistochemistry (IMCH) is considered a valuable laboratory method used mainly in histology and pathology. It is used for the detection of specific antigens in the cells of a tissue section, therefore it is an integral part of biopsies diagnostics. However, if we look at its history, initially, as one of the modern methods, it was based on histochemistry, when the regularities of immunological reactions began to be introduced to routine laboratory practice. The original histochemistry began to appear in the early 1940s thanks to Albert H. Coons, who developed immunofluorescence techniques for the labeling of antibodies. Today, this method is the cornerstone of medical diagnostics and ongoing research.

História imunohistochemie

Základy IMCH, ktoré používame aj dnes sa dajú od roku **1890**, kedy **Von Behring** objavil sérové protilátky a použil ich na liečbu záškrtu a tetanu. **Dr. Kraus** v roku **1897** prispel k základom imunológie a nepriamo aj k vývoju imunohistochemie vývojom **precipitačného testu**. Hoci priamo nevizualizoval antigény v tkanive pod mikroskopom (čo prišlo neskôr s Coonsom v roku 1941), ukázal, že protilátky sa dajú použiť na detekciu špecifických látok, čo je podstata modernej imunohistochemie. Neskôr v roku **1923 Dr. Michael Heidelberger** kvantifikoval túto reakciu pomocou farbív pripojených k antigénom a **Dr. John Marrack** vizualizoval reakciu pripojením farbív k protilátkam. V roku **1941 Dr. Albert H. Coons** vyvinul prvé fluorescenčné protilátkové značenie, čím oficiálne spustil imunohistochemiu pomocou svetelnej mikroskopie (SM). Imunoelektrónová mikroskopia (EM) bola oficiálne spustená v roku **1959 Dr. SJ Singerom**. Chrenovú peroxidázu (HRP), objavili **Nakano a Pierce v 60. rokoch 20. storočia**, kedy sa zistilo, že komplex peroxidáza-antiperoxidáza zvyšuje signál protilátok. Lekári **Faulk a Taylor v roku 1971** pripojili koloidné zlaté značky k protilátkam a

Dr. Roth, Bendayan a Orci modifikovali tento EM protokol v roku **1978** s použitím proteínu A. Koloidné zlato sa stalo imuno-EM technikou, ktorá sa dodnes široko používa. V roku **1982** **Dr. S.-M. Hsu** pridal väzby avidín-biotín, čo zvýšilo citlivosť a umožnilo spoľahlivú detekciu antigénnych miest, ktoré bolo ťažké zachovať. Najvýznamnejším míľnikom v modernej medicíne a diagnostike bol objav monoklonálnych protilátok (**mAb**) **Césarom Milsteinom, Georgesom Köhlerom a Nielsom Kaj Jerneom**, ocenený Nobelovou cenou za fyziológiu a medicínu v roku **1984**. Táto technológia zásadným spôsobom transformovala IMHC na precízny diagnostický nástroj používaný denne v patologickej anatómii po celom svete. **César Milstein** sa nikdy nepokúsil svoj objav patentovať, pretože veril, že je duševným vlastníctvom ľudstva. Neskôr, v **90. rokoch 20. storočia**, objavil **Roger Y. Tsien** a jeho spolupracovníci modrý fluorescenčný proteín (**BFP**), zatiaľ čo v roku **2000 Shimomura, Chalfie a Tsien** klonovali zelený fluorescenčný proteín (**GFP**) a získali Nobelovu cenu. O najnovší objav v oblasti konjugácie protilátok Proximity Ligation Assay (PLA) sa zaslúžil **Simon Fredriksson a kolektív** v roku **2002**. Táto technika využíva dve primárne protilátky, z ktorých každá je schopná rozpoznať rovnaký antigén-proteín.

Imunohistochemia „dnes“

IMHC má v klinickej praxi a to hlavne v histopatológii a onkológii nezastupiteľný význam. Jej široké spektrum sa využíva na identifikovanie typu rakoviny, určenie jej pôvodu a jej štádia, na klasifikáciu podtypu, diagnostiku autoimunitných ochorení, identifikáciu infekčných ochorení a samozrejme je neodmysliteľnou súčasťou výskumu.

Rozdelenie typov imunohistochemických metód

Princíp IMHC je založený na špecifickej väzbe medzi antigénom, čím sa rozumie cieľová látka a protilátkou v tkanivovom reze. V praxi rozlišujeme niekoľko špecifických metód.

Priama metóda (jednostupňová)

Patrí medzi najjednoduchšiu metódu. Pri tomto type je primárna protilátka značená napr. fluorescenčným farbivom, enzýmom alebo kovom priamo proti hľadanému antigénu.

Nepriama metóda (dvojstupňová)

Ide komplikovanejší typ, ktorý sa vyznačuje vyššou citlivosťou. Pri tejto metóde sa využíva primárna protilátka, čím sa rozumie neoznačená protilátka (immunoglobulín) alebo sérum a druhá sekundárna protilátka, ktorá je značená fluorochrómom alebo enzýmom.

Trojstupňová nepriama metóda

Tento typ sa vyznačuje zvýšenou citlivosťou pomocou komplexu enzým-protilátka. Medzi značené komplexy patria napr.: **PAP - peroxidázovo-antiperoxidázový komplex**. K ďalším trojstupňovým metódam patria **ABC- avidín-biotínové metódy**, ktoré využívajú veľmi silnú afinitu medzi avidínom a biotínom na značenie. Najmodernejšie metódy, ktoré využívajú polymérne reťazce sú **polymérové metódy**, prostredníctvom ktorých sa naviaže veľké množstvo enzýmu, čím sa dosiahne maximálna citlivosť.

Spôsob získavania protilátok

Podľa spôsobu získavania protilátok môžeme protilátky rozdeliť na monoklonálne alebo polyklonálne protilátky. Monoklonálne protilátky sú imunoglobulíny, ktoré pochádzajú z jedného klonu plazmatickej bunky. Majú tú istú primárnu štruktúru, špecifickosť väzbových miest a rovnaké výkonné funkcie. Polyklonálne protilátky tvorí heterogénna zmes imunoglobulínov, ktoré sú produkované viacerými klonmi B-lymfocytov. Tieto protilátky sú schopné rozpoznať a viazať sa na viacero rôznych epitopov na tom istom mieste. Vyrábajú sa imunizáciou zvierat.

Detekcia protilátok

Samotná väzba antigénu s protilátkou v tkanivách prebieha bez viditeľnej reakcie. Na jej vizualizáciu v svetelnom mikroskope slúžia najpoužívateľnejšie metódy ako **imunofluorescencia** a **imunoenzýmové metódy**. **Imunofluorescencia** využíva fluorescenčné farbivá ako napr. FITC (fluoresceín izotiokyanát), TRITC (*tetrametylrhodamín izokyanát*), DANSYL (5-naftalén-1-sulfonylchlorid) za použitia fluorescenčného mikroskopu. **Imunoenzýmové metódy** sú vysokocitlivé diagnostické techniky, ktoré na detekciu interakcie medzi antigénom a protilátkou využívajú enzýmy ako napr. HPR-chrenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, D-galaktozidáza.

Perspektíva imunohistochemie

Budúcnosť IMHC má "vzrušujúce" vyhliadky, nakoľko technologický pokrok a výskum naďalej formujú túto nenahraditeľnú techniku v laboratórnej diagnostike. Jedným z významných smerov pre budúcnosť IMHC je integrácia digitálnej patológie a umelej inteligencie (AI). Digitálna patológia umožňuje skenovanie a analýzu celých tkanivových rezov, čo umožňuje vysokokapacitné získavanie obrazu. Algoritmy umelej inteligencie preukázali značný potenciál v patológii pri presnej diagnostike a kvantifikácii IMHC markerov.

Záver

Záverom môžeme konštatovať, že umelá inteligencia postupne zasahuje do všetkých odvetví nevyvímajúc medicínu. Jej doteraz vyvinuté algoritmy slúžia lekárske špecialistom a to hlavne v patológii na presnú diagnostiku tkanivových rezov a IMHC markerov. Netreba mať však obavy z toho, že nahradí prácu patológa a laboratórnych pracovníkov, pretože za samotným výsledkom stojí celý tím vysokoodborných ľudí, ktorí nesú zodpovednosť nad celým procesom.

Literatúra

1. Im, K., Mareninov, S., Yong, W., et al: Methods Mol Biol, 2019; 1897:299–311.
2. Mebratie, D.Y., Dagnaw, G.G.: Semin Diagn Pathol, 2024; 41(3):154-160.
3. Ambrosius H., Lippa H.: Immunohistochemie. Springer Verlag, Berlin, 1987; 3-05 500316-0.
4. Hidalgo, O.: Methods Mol Biol, 2022; 2422:17-31.
5. Lukáš Z., Dráberová E., Feit J. et al.: Acta Facultatis Medicae Universitatis Masarykianae Brunensis, 1997; 80-210-0620-X.
6. Ramos-Vara, J.A.: methods Mol Biol, 2011; 691:83-96.

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

ŠTRUKTÚRA LUMBOSAKRÁLNEJ OBLASTI U KURACIEHO EMBRYA NA 14. EMBRYONÁLNY DEŇ

STRUCTURE OF THE LUMBOSACRAL REGION IN THE CHICKEN EMBRYO ON EMBRYONIC DAY 14

Katarína Holovská, Sandra Andrašková, Patrícia Hudáková, Viera Almášiová

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

katarina.holovska@uvlf.sk

Abstract

The aim of our work was to observe the structure of the lumbosacral region in the chick embryo on embryonic day 14. In this area, we observed well-developed cartilage models of the vertebrae. The notochord was still present within the vertebral body. The spinal canal was significantly widened in this area. The developing spinal cord exhibited well-developed dorsal and ventral horns. On the dorsal side, we observed an intensely stained PAS-positive glycogen body. Both the spinal cord and its surface were covered by a fibrous layer of pia mater.

Úvod

Vtáky používajú dva rôzne druhy pohybu, a to lietanie a chôdzu. Z toho dôvodu má ich telo množstvo špecifických znakov. Patria medzi dvojnohé zvieratá (bipedálne), u ktorých sa predné končatiny zmenili na krídla. Výrazné zmeny sa týkajú aj panvových končatín, ktorých tvar závisí od druhu. Telo vtákov sa člení na 6 základných častí (1). Z morfológického hľadiska sme sa zamerali na oblasť trupu. Dorzálna strana trupu, označená ako chrbát, pozostáva zo stavcov, ktoré v dôsledku funkčných nárokov zrástli v rôznom rozsahu. Kaudálna časť trupu, tzv. synsacrum, vzniká zrastom posledných hrudných, bedrových, krížových a predných chvostových stavcov. Miecha prebieha celým stavcovým kanálom. Je v nej lokalizovaných viac koordinačných a reflexných funkcií než u cicavcov (1). Anatomická stavba tela vrátane kostry a svalstva je adaptovaná na chôdzu po zadných končatinách. Keďže ťažisko u vtákov sa nachádza rostrálne od miesta úponu zadných končatín, kladie to špeciálne nároky na udržiavanie rovnováhy. Predpokladá sa, že útvary v lumbosakrálnej oblasti fungujú ako zmyslový orgán rovnováhy, ktorý sa podieľa na riadení chôdze (2). Aj keď bola štruktúra tejto oblasti sledovaná u mnohých druhov vtákov, ako sú kurčatá (3), japonské prepelice (4), holuby

(5), morky (6) a rôzne druhy voľne žijúcich vtákov (7), o jeho ontogenetickom vývoji je stále málo informácií.

Cieľom našej práce bolo sledovať štruktúru lumbosakrálnej oblasti u kuracieho embrya na 14. embryonálny deň (ED).

Materiál a metódy

V práci boli použité oplodnené kuracie vajcia z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra). Vajcia boli inkubované v inkubátore (ET 49 automatic, River Systems, Campodarsego, Italy) pri štandardných inkubačných podmienkach (37,5 °C a vlhkosti vzduchu 60 %) po dobu 14. dní. Na 14. embryonálny deň boli vzorky odobrané a fixované v mDF (Modified Davidson's fluid) a zaliate do parafínu. Následne 5-10 µm rezy boli ofarbené metódou Massonov trichróm a na dôkaz glykogénu bola použitá histochemická metóda PAS. Vzorky boli následne fotodokumentované pomocou mikroskopu Olympus CX 43 (Olympus, Japonsko) a kamery Promicra (Česká republika).

Výsledky a diskusia

Na 14. ED sme v lumbosakrálnej oblasti kuracieho embrya pozorovali dobre vyvinutý chrupkový model stavcov. V tele vyvíjajúcich sa stavcov bola zachovaná notochorda. V tejto časti chrbtice sme nezaznamenali žiadne známky osifikácie. Osifikácia bola pozorovaná v blízkosti notochordy na stavcoch nachádzajúcich sa kraniálne. Z literatúry je známe, že stavce sa začínajú osifikovať kraniokaudálnym smerom. Primárne osifikačné centrum sa objaví v tele stavcov, ďalšie sú v oblúkoch stavca (8). Necker a kol. (9) pozorovali začínajúcu osifikáciu stavcov u embryí holubov na 14. ED. Tento proces pokračoval ešte prvý týždeň po ich vyliahnutí. Až na 3. týždeň boli všetky stavce u holubov osifikované. Ďalšie morfológické zmeny stavcov (súvisiace s pneumatizáciou kostí) prebiehali naďalej a až na 12. týždeň po vyliahnutí bola ich štruktúra podobná štruktúre u dospelých jedincov (9).

U kuracích embryí sme na 14. ED pozorovali výrazne rozšírený stavcový kanál v lumbosakrálnej oblasti. Vyvíjajúca sa miecha mala dobre vyvinuté dorzálne a ventrálne rohy. V tejto oblasti miechy sme v jej dorzálnej časti pozorovali dobre vyvinuté glykogénové teliesko (*corpus gelatinosum*). Teliesko pozostávalo z veľkých, intenzívne sa farbiacich PAS-pozitívnych buniek. Jeho povrch, ako aj povrch miechy, bol pokrytý väzivovou vrstvou *pia mater*. Vonkajší obal, *dura mater* spolu s arachnoideou oddeľovali epidurálny priestor od subarachnoideálneho priestoru. Bolo zistené, že bunky glykogénového telieska majú neurogliový pôvod. Ide o astrocyty (10, 11), ktorých štruktúra je odlišná od astrocytov

vyskytujúcich sa v mozgu a v mieche (12). Bunky v zrelom glykogénovom teliesku majú polygonálny tvar, rôznu veľkosť a jadro uložené na periférii. Ich centrálna časť obsahuje PAS-pozitívny materiál, glykogén (6, 13, 14, 15). Bunky na periférii glykogénového telieska sú pravidelne usporiadané, veľké, s periférne uloženým jadrom (11, 15). Bunky v centrálnej časti telieska majú rôznu veľkosť a nepravidelné usporiadanie (16). Raja a kol. (7) sledovali štruktúru glykogénového telieska u dospelých brojlerov. Teliesko pozostávalo z dorzálnej a ventrálnej časti. Ventrálna časť uzatvárala centrálny kanál miechy a dorzálna časť telieska bola v centrálnej časti intenzívne vaskularizovaná. V teliesku sa nevyskytovalo takmer žiadne spojivové tkanivo. To bolo pozorované len na periférii ciev. Stanchak a kol. (17) uvádzajú, že glykogénové teliesko úplne obklopuje centrálny kanál miechy. Je plne integrované do štruktúry miechy a nejde o samostatný orgán nervového systému ani o žľazu ležiacu na jej povrchu.

Súhrn

Aj napriek mnohým výskumom úloha glykogénového telieska ešte nie je úplne objasnená. Existujú rôzne hypotézy o jeho funkcii (17, 18). Medzi najčastejšie uvádzaný predpoklad patrí, že glykogénové teliesko je orgán slúžiaci na uskladnenie energie. Táto hypotéza však bola na základe experimentov vyvrátená (17, 19).

Literatúra

1. Černý, H.: Brno, Metoda, 2005; 25-36.
2. Necker, R.: J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2006; 192(5):439-448.
3. De Gennaro, L. D.: Growth, 1959; 23:235-249.
4. De Gennaro, L. D., Benzo, C. A.: J Morphol, 1987; 194:209-217.
5. Schroeder, D. M.: Anat Rec, 1987; 218:121.
6. Vukovic, S., Lucic, H.: Veterinarski Arhiv, 2005; 75:101-110.
7. Raja, K., Ushakumary, S., Kannan, T. A. et al.: JEZS, 2019; 7(1):1567-1570.
8. Kapeller, K., Pospíšilová V.: Osveta, Martin. 2001; 199-201.
9. Necker, R.: Anat Embryol (Berl). 2005; 210(1):59-74.
10. De Gennaro, L. D.: Growth Dev Aging, 1993; 57:275-281.
11. Ebraheim, L.: J Cytol Histol, 2016; 7(1):1-4.
12. Lee, K., Makino, S., Imagawa, T., et al: Poult Sci, 2001; 80:1736-1742.
13. Lyser, K. M.: Acta Anat (Basel), 1973; 85:533-549.
14. De Gennaro, L. D.: Growth, 1974; 38:1-15.
15. Gokul, S, Akhil, A. S.: J Oral Maxillofac Pathol, 2012; 16:251-255.
16. Uehara, M., Ueshima, T.: Jpn J Vet Sci, 1982; 44: 31-38.
17. Stanchak, K. E., Miller, K. E., Shikiar, D. et al: Integr Comp Biol, 2023; 63(2):474-483.
18. Stanchak, K. E., French, C., Perkel, D. J. et al: Integr Org Biol, 2020; 1-16.
19. De Gennaro, L. D.: Avian biology. New York (NY), Academic Press, 1982; 341-71.

Táto práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0036/22.

**POUŽITIE IMUNOHISTOCHEMICKÝCH METÓD NA DIAGNOSTIKU
NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ ČLOVEKA A V
EXPERIMENTÁLNYCH ZVIERACÍCH MODELOCH**

USE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL REACTIONS IN THE DIAGNOSTICS OF
NEURODEGENERATIVE HUMAN DISEASES AND IN EXPERIMENTAL ANIMAL
MODELS

Nataliia Hryntsova^{1,2}, Tomas Smolek¹, Norbert Zilka¹

*¹Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, 84510,
Bratislava, SR*

*²Morphology Department, Sumy State University, Medical Institute, Rimsky Korsakov 2, Sumy
40007, Ukraine*

natalia.gryntsova@gmail.com, natalia.hryntsova@savba.sk

Abstract

Immunohistochemistry is a powerful technique that is used in many areas of pathology research, including the study of neurodegeneration. The Brain Bank's work on postmortem diagnostics of human neurodegenerative diseases is based primarily on immunohistochemical methods for diagnosing neurodegenerative diseases (p62, AT8, 4G8, TDP-43, 4D6, FUS, iba-1 and GFAP antibodies).

Introduction

Immunohistochemistry is a powerful technique that is used in many areas of pathology research, including the study of neurodegeneration. Immunohistochemistry has become an important ancillary technique with the advent of antigen retrieval techniques that allow it to be conveniently performed on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue (1). The Institute of Neuroimmunology (SAS) is a leading research center in the field of fundamental neurosciences and immunology in Slovakia. The institute specializes in studying the interactions between the central nervous system and the immune system. Its primary focus is on neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, etc.). In 2011, the Institute of Neuroimmunology established a Brain Bank, which, guided by ethical principles, closely collaborates with patients and clinicians to donate brain tissue for clinical diagnostics and experimental scientific research (2). The bank houses a registered collection of

postmortem brain tissue samples from patients (fixed in 4% paraformaldehyde, as histological blocks, frozen at 80°C). Based primarily on immunohistochemical methods for diagnosing neurodegenerative diseases, the Brain Bank's work helps establish definitive diagnoses for deceased patients. The Brain Bank is open and accessible to the public, healthcare providers, and researchers, hoping to contribute to society and encourage more people to become donors.

Material and methods

When performing immunohistochemical reactions, we use the standard protocol we described previously (3). When using different antibodies, the concentration of formic acid and the incubation time of samples in it, the dilution of primary antibodies, and the type of secondary antibodies may vary depending on the manufacturer's protocols.

Results

Our work presents immunological markers used in the Institute of Neuroimmunology laboratory (SAS) for postmortem diagnosis of human neurodegenerative diseases. Specifically, antibodies such as p62, AT8, 4G8, TDP-43, 4D6, FUS, iba-1, and GFAP are widely used in the diagnosis of neurodegenerative diseases.

Antibody p62 (SQSTM1/sequestosome-1) is a multifunctional scaffolding protein crucial for selective autophagy, which targets misfolded or aggregated proteins for degradation in neurodegenerative diseases. In the context of neurodegeneration, p62 accumulates and is often found co-localized with pathological inclusions (such as tau, TDP-43, and α -synuclein) in human diseases and mouse models. p62 is a component of neurofibrillary tangles and neuropil threads in human Alzheimer's Disease brains where it interacts with phosphorylated tau. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration: p62 is a hallmark of inclusions containing phosphorylated TDP-43 (pTDP-43). Parkinson's Disease/Lewy Body Disease: p62 is involved in microglia activation and is a component of ubiquitin-positive inclusions in Lewy body diseases (4) (Fig.1).

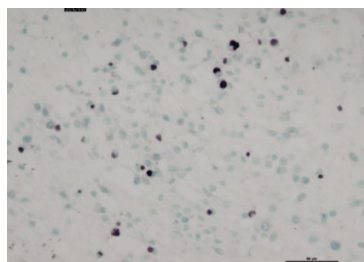


Fig. 1 P-62 protein aggregates in dentate gyrus (Hippocampus anterior) of the patient with Alzheimer's disease. Staining: immunohistochemical staining p62. Magnification 200x.

The AT8 antibody is a widely used mouse monoclonal antibody (IgG1 κ) that detects hyperphosphorylated tau protein, a hallmark of neurodegenerative diseases known as tauopathies, including Alzheimer's disease. It recognizes tau phosphorylated at serine 202 and threonine 205 (pS202/pT205). AT8 in neurodegenerative research is the standard tool for identifying tau pathology in human postmortem Alzheimer's brain tissue. Its usage in research includes: Alzheimer's Disease: it stains neurofibrillary tangles and dystrophic neurites in human brains. Mouse Models: AT8 is essential for characterizing tau pathology in transgenic mice that express human tau mutations, such as the P301S model, which are used to study frontotemporal dementia and other tauopathies (5) (Fig.2).

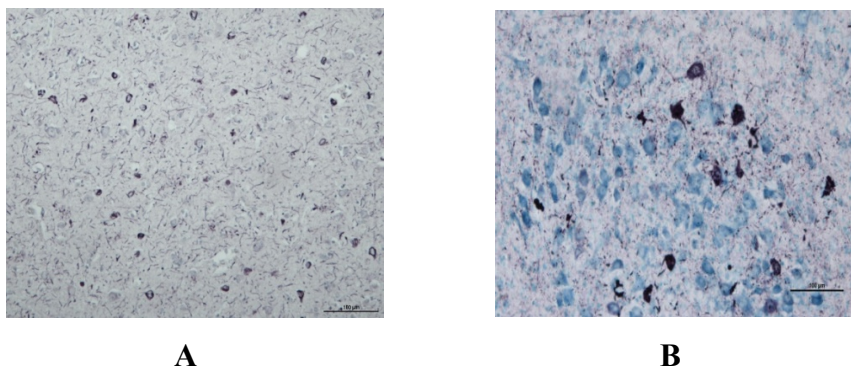


Fig. 2 *Hyperphosphorylated tau protein AT8 in the frontal brain cortex of a patient with Alzheimer's disease (A) and in brainstem of mouse brain with experimental form of Alzheimer's disease. A - AT8 protein aggregates in pyramidal neurons of the frontal cortex; B - AT8 protein aggregates in neurons of the brainstem. Staining: immunohistochemical staining AT8. Magnification 200x (for A); 400x (for B).*

The 4G8 antibody (clone 4G8) is a widely used monoclonal antibody in neuroscience research designed to detect amyloid-beta (A β), a protein central to neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's disease. It binds specifically to the amino acid residues 17-24 (VFFAE) of the amyloid-beta peptide. 4G8 is extensively used in immunohistochemistry to visualize amyloid deposits, parenchymal mature plaques, and vascular deposits in human brain with Alzheimer's disease. It is useful for detecting plaques in formalin-fixed and paraffin-embedded human brain tissue. 4G8 has been shown to cross-react with amyloid fibrils formed by other proteins, such as alpha-synuclein (associated with Parkinson's disease) (6) (Fig.3).

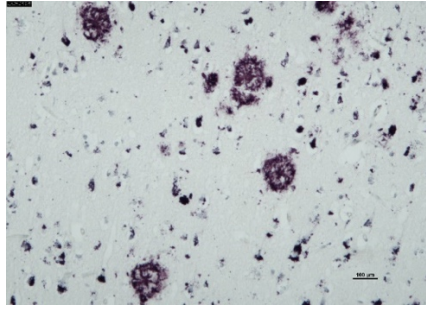


Fig. 3 Cerebral plaques with amyloid beta peptides in the frontal brain cortex of a patient with Alzheimer's disease. Staining: immunohistochemical staining 4G8. Magnification 400x.

The 4D6 antibody is a widely used mouse monoclonal antibody that specifically recognizes human alpha-synuclein. It is crucial in neurodegenerative disease research-particularly in alpha-synucleinopathies like Parkinson's disease and Dementia with Lewy Bodies - due to its ability to detect both monomers and aggregated forms of the protein. The 4D6 antibody binds to alpha-synuclein, a protein that misfolds and aggregates to form Lewy bodies and Lewy neurites, which are the pathological hallmarks Parkinson's disease and dementia with Lewy Bodies (7) (Fig. 4).

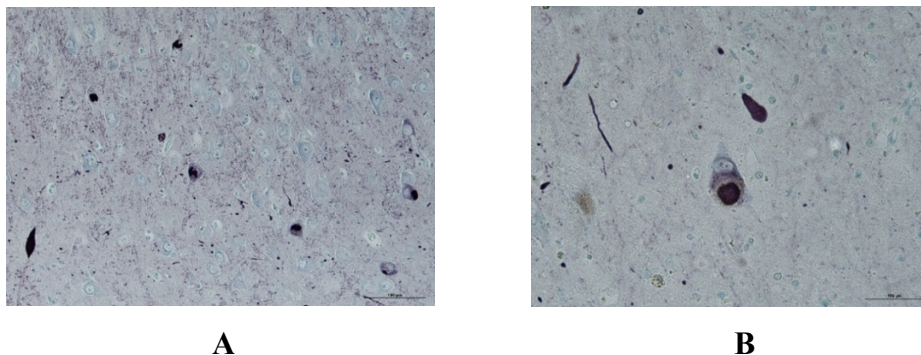


Fig. 4 α -Syn aggregates in hippocampus anterior and midbrain patient with Parkinson's disease: A - Lewy bodies in neurons of the multiform layer's dentate gyrus (hippocampus anterior); B - Lewy bodies in neurons of s. nigra. Staining: immunohistochemical staining 4D6. Magnification 200x (for A); 400x (for B).

TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) is a major pathological protein found in the central nervous system of humans suffering from several neurodegenerative diseases (Amyotrophic Lateral Sclerosis, Frontotemporal Dementia, as co-pathology in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, Chronic Traumatic Encephalopathy, Huntington's Disease). Its mislocalization from the nucleus to the cytoplasm, leading to the formation of harmful,

hyperphosphorylated, and ubiquitinated aggregates, defines a group of conditions known as TDP-43 proteinopathies (8) (Fig.5).

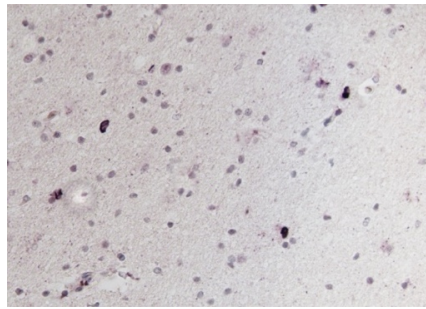


Fig. 5 Pathological TDP-43 aggregates in hippocampus of the patient with Frontotemporal Dementia. Staining: immunohistochemical staining TDP-43. Magnification 200x.

Iba1 antibodies (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1) is widely recognized as a marker for microglia and macrophages in the human central nervous system. In human neurodegenerative diseases, Iba1 antibodies are used extensively in research to visualize, count, and evaluate the morphology of activated microglia, as their expression is up-regulated during neuroinflammation and pathological processes. In immunohistochemistry anti-Iba1 antibodies (polyclonal and monoclonal) are standard tools to analyze microglia in post-mortem human brain samples (9) (Fig.6).

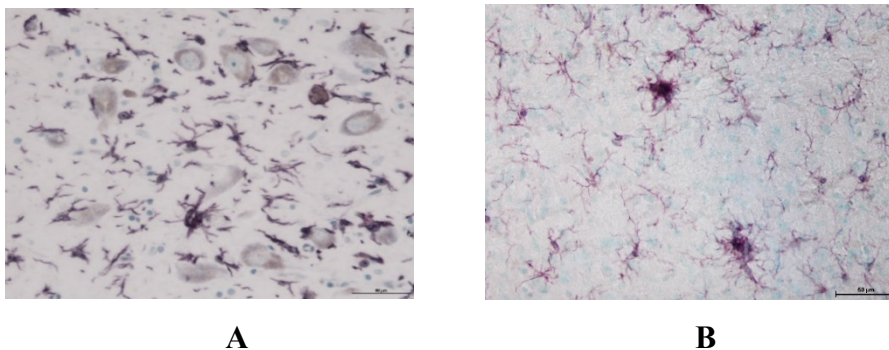


Fig. 6 Distribution of I (IBA1)-immunoreactive (IR) cells: **A** - in the human midbrain; **B** - in the brainstem mouse brain with experimental form of Alzheimer's disease. Staining: immunohistochemical staining iba-1. Magnification 400x.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an intermediate filament protein found in astrocytes. In neurodegenerative diseases, GFAP expression is upregulated as part of the reactive astrogliosis process, a common response to central nervous system damage. Anti-GFAP antibodies are valuable diagnostic tools that have been used to identify biochemically modified forms of GFAP in human disease and related animal models (10) (Fig.7).

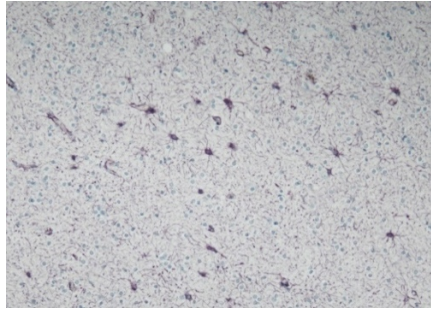


Fig. 7 Expression GFAP in astrocytes in the frontal brain cortex of a patient with Alzheimer's disease. Staining: immunohistochemical staining GFAP. Magnification 200x.

Discussion

Immunohistochemistry often plays a decisive role in the modern diagnosis of human neurodegenerative diseases and is essential for accurate pathological confirmation of patient diagnoses. Immunohistochemistry allows the identification of specific protein aggregates and the differentiation of diseases with similar clinical presentations but different pathological markers.

Summary

Immunohistochemical markers used at the Institute of Neuroimmunology (SAS) reveal the molecular basis of human neurodegenerative diseases, translating clinical phenotypes into meaningful pathological findings. Using immunohistochemistry, we combine fundamental knowledge from pathology with applied research to have the way for more effective treatments and a healthier future.

Literature

1. Magaki, Sh., Hojat, SA., Wei, B., et.al.: Humana Press, 2019; 25: 289-298.
2. Hryntsova, N.: Materials of the Conference 28. Kosicky Morphologic. Den, 2025:78-82.
3. Hryntsova, N., Smolek, T., Zilka, N.: 27. Kosicky Morphologic. Den, 2024:97-102.
4. Shifan, M., Insiya, Y., Attarwala, X.: Chem Neurosci, 2019; 10(5): 2094–2114.
5. Allen B., Ingram, E., Takao, M., et.al.: J Neurosci, 2002; 22(21):9340–9351.
6. Baghallaba, I., Reyes-Ruizb, J., Abulnajak, K.: J Alzheimer's Dis, 2018; 66:1235–1244.
7. Düchs, M., Blazevic D., Rechtsteiner, P.: J Parkinson's Dis, 2023; 91:1-15.
8. Jo, M., Lee, Sh., Jeon, Y., et al.: Experim. & Molec Medic, 2020; 52:1652–1662.
9. Hopperton, KE., Mohammad, D., Trépanier, M., et al.: Molec. Psych, 2018; 23: 177–198.
10. Bandara, E., Asih, P., Pedrini, S., et al.: Molec. Neurob, 2025; 62:15576–15608.

The work was carried out with the support of the grant APVV-23-0420 "Gut-Brain Axis communication during formation of tau neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: Is the immune system mediator of this process?"

HISTOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA DIFERENCIÁCIE ORGÁNOV KURACIEHO EMBRYA NA 9.DEŇ INKUBÁCIE

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ORGAN DIFFERENTIATION IN THE CHICKEN EMBRYO ON DAY 9 OF INCUBATION

Patricia Hudáková, Viera Almášiová, Sandra Andrašková, Katarína Holovská

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

patricia.hudakova@student.uvlf.sk

Abstract

The chicken embryo is considered an important experimental model. The ninth day of incubation represents a stage of intensive organogenesis, during which differentiated organ systems can be identified histologically. This study aimed to characterize the micromorphological organization of tissues in the chicken embryo on day 9, focusing on the differentiation of major organ structures. Histological analysis revealed advanced differentiation of the central nervous system, cardiovascular system, hepatic parenchyma, mesonephros, and limb buds. The observed morphological features confirm that day 9 of incubation is suitable for evaluating the developmental histology of embryonic tissues.

Úvod

Kuracie embryo je považované za významný experimentálny model v biologickom, medicínskom aj farmakologickom výskume. Medzi jeho výhody patrí jednoduchá dostupnosť počas celého roka, nízke náklady a požiadavky na realizovanie experimentu či podobnosť s ľudským embryom na molekulovej, anatomickej a bunkovej úrovni (1, 2). Vývoj prebieha mimo tela matky a trvá iba 21 dní čo umožňuje zrýchlený zber údajov počas experimentu (3, 4). Kombinácia týchto vlastností robí z kuracieho embrya flexibilný, efektívny a perspektívny experimentálny model (1, 2). Kuracie embryo prechádza v priebehu inkubácie sériou presne definovaných morfológických zmien. V deviatom dni inkubácie môžeme pozorovať intenzívnu diferenciáciu, počas ktorej sú už histologicky identifikovateľné viaceré orgány a postupne prebieha ich ďalšia maturácia. V telovej dutine je možné rozlíšiť jednotlivé orgány podľa ich topografie, tvaru a histologickej štruktúry, ktorá sa v priebehu diferenciácie stále postupne mení. Prostredníctvom histologického vyšetrenia embryonálnych tkanív môžeme detailne posúdiť stupeň bunkovej diferenciácie a organizácie vyvíjajúcich sa orgánov a tkanív (5).

Cieľom práce bolo charakterizovať stupeň diferenciácie tkanív a orgánov kuracieho embrya na 9. deň inkubácie z histologického hľadiska, a to vo vybraných orgánových systémoch.

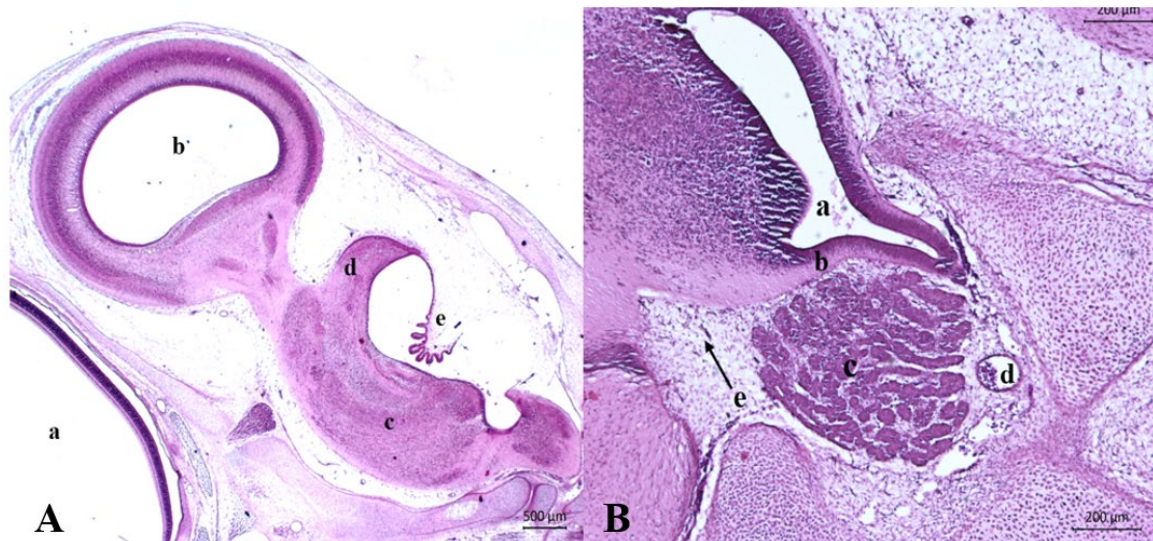
Materiál a metódy

V práci boli použité oplodnené vajcia Kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) pochádzajúce z certifikovaného chovu Párovské Háje v Nitre. Inkubácia prebehla v inkubátore River system ET49 automatic, za štandardných podmienok pri teplote 37,5 °C a vlhkosti vzduchu 60 %. Na 9. deň inkubácie boli kuracie embryá odobraté, usmrtené cervikálnou dislokáciou a fixované v modifikovanom Davidsonovom roztoku (mDF). Vzorky boli následne spracované štandardným histologickým postupom a fotodokumentované svetelným mikroskopom Zeiss Axio Lab A1 s kamerou Axio Cam ERc 5.

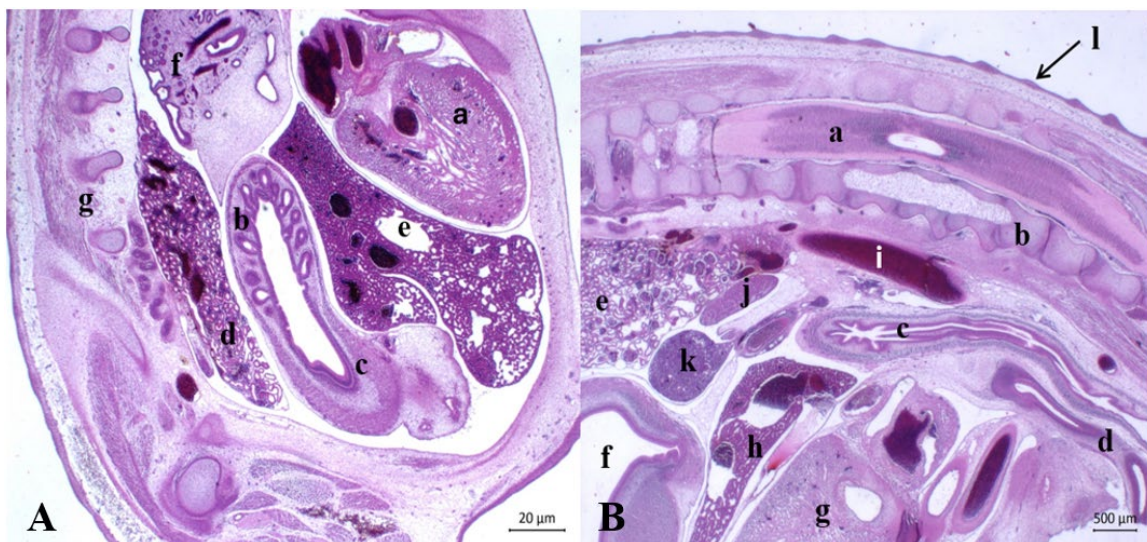
Výsledky a diskusia

Prostredníctvom svetelnej mikroskopie bolo v rámci vývoja nervového systému kuracieho embrya možné pozorovať štruktúry formujúceho sa mozgu ako *lobus opticus*, *myelencephalon*, *metencephalon* a *cerebellum*. V hlavovej oblasti bolo možné ďalej študovať diferenciáciu oka ako aj hypofýzy (Obr. 1 A, B). V telovej dutine (Obr. 2 A, B) bolo možné rozoznať srdce tvorené dobre vyvinutým myokardom s výraznou trabekularizáciou komorovej steny. Endokard bol tvorený jednovrstvovým plochým epitelom a tenkou vrstvičkou väziva a v okolí srdca boli prítomné veľké cievne kmene. Intenzívnu vaskularizáciu srdca môžeme pripisovať vysokým metabolickým nárokom rastúceho organizmu (5). V kaudodorzálnej časti telovej dutiny bol zreteľný mezonefros s dobre diferencovanými mezonefrickými telieskami a kanálikmi, ktoré boli obklopené bohato vaskularizovaným mezenchýmom. Kranioventrálne od mezonefrosu sa vyskytovali gonády v nízkom štádiu diferenciácie. Pod gonádami bola prítomná slezina takisto s nízkym stupňom diferenciácie. Parenchým pečene bol organizovaný do hepatálnych povrazcov, medzi ktorými sa nachádzali sinusoidné kapiláry. Prítomnosť hematopoetických buniek v pečeni poukazovala na význam pečene ako dočasného krvotvorného orgánu počas embryogenézy (5). V oblasti medzi pečeňou a obličkou mezonefros sa vyskytoval dvojkomorový žalúdok s výraznou dutinou a relatívne vysoko diferencovanými štruktúrami jeho steny. Kraniálne od žalúdka boli uložené pľúca, kde bolo možné rozoznať primárne a sekundárne bronchy, z ktorých sa formovala séria terciárnych priedušiek – parabronchov /pľúcnych jednotiek vtákov. Stena priedušnice aj pažeráka mala tak isto relatívne dobre vyvinuté charakteristické vrstvy typické pre zrelý orgán. V chrupkovom modeli spinálneho kanála sa vyskytovala miecha s dobre viditeľnou sivou a bielou hmotou a centrálnym kanálom.

Na povrchu 9. dňového embrya sa vyskytovala koža s dobre diferencovanými vrstvami epidermis a dermis a v dorzálnnej oblasti tela aj s prítomnosťou prekursorov perových folikulov.



Obr. 1 **A** Pozdĺžny rez hlavou kuracieho embrya na 9. deň inkubácie (Hematoxylin-eozín) 100×, a – oko, b – lobus opticus, c – myelencephalon, d – cerebellum, e – metencephalon; **B** Pozdĺžny rez hypofýzy kuracieho embrya na 9. deň (Hematoxylin-eozín) 100×, a – recessus infundibularis, b – neurohypofýza, c – adenohypofýza, d – cieva, e – mezenchým.



Obr. 2 **A** Pozdĺžny rez telovou dutinou kuracieho embrya na 9. deň inkubácie (Hematoxylin-eozín) 40×, a – srdce, b – žľaznatý žalúdok, c – svalnatý žalúdok, d – mezonefros, e – pečeň, f – pľúca, g – formujúce sa stavce; **B** Šikmý rez telovou dutinou kuracieho embrya na 9. deň inkubácie, (Hematoxylin-eozín) 40 ×, a – miecha, b – stavce, c – pažerák, d – priedušnica, e – mezonefros, f – sv. žalúdok, g – srdce, h – pečeň, i – cieva, j – gonáda, k – slezina, l – koža.

Súhrn

Histologickým vyšetrením kuracieho embrya v 9. dni inkubácie sme potvrdili vysoký stupeň diferenciácie u väčšiny vyšetovaných embryonálnych orgánov. Relatívne nízky stupeň diferenciácie sme naopak zaznamenali v gonáde a slezine, čo korešponduje s danou periódou vývinu embrya. Deviaty deň inkubácie kuracieho embrya možno považovať za ideálne obdobie z pohľadu vyhodnocovania vplyvu rôznych faktorov vonkajšieho prostredia, ktoré majú potenciál celkovo ovplyvniť organogézu. Histologické vyšetrenie predstavuje dôležitý základ pre následné imunohistochemické alebo molekulové analýzy vývinových procesov v embryonálnych tkanivách.

Literatúra

1. Kain, K. H., et al.: Dev Dyn, 2014; 243(2):216–228.
2. Kaplan-Arabaci, O., Dančišinová, Z., Paulsen, R. E.: Pharmacol Res Perspect, 2025; 13(2):e70086.
3. Vitorino Carvalho, A., et al.: PLoS One, 2020; 15(1):e0227700.
4. Wallis, J. W., et al.: Nature, 2004; 432(7018):761–764.
5. Bellairs, R., Osmond, M.: The Atlas of Chick Development, 3rd ed., Elsevier, 2014.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0036/22.

**ROZSAH SYMPATICKEJ DENERVÁCIE PO TRAUMATICKOM PORANENÍ
MIECHY AKO DETERMINANT SIGNALIZÁCIE RECEPTOROV ANGIOTENZÍNU
II V OSI HYPOTALAMUS–HYPOFÝZA–NADOBĽIČKY**

EXTENT OF SYMPATHETIC DENERVATION AFTER SPINAL CORD INJURY AS A
DETERMINANT OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR SIGNALING
IN THE HYPOTHALAMIC–PITUITARY–ADRENAL AXIS

Kellerová Erika¹, Snopková Jana¹, Hvozdíková Erika¹, Pavel Jaroslav¹

¹Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, v.v.i., Šoltésovej 4, Košice

kellerova@saske.sk

Abstract

Spinal cord injury (SCI) disrupts descending sympathetic control of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. Angiotensin II modulates this axis via AT₁ and AT₂ receptors. We investigated morphological and receptor-level changes following Th9 SCI in rats. We found that Th9 SCI (partial sympathoadrenal denervation) induces transient adrenal gland enlargement associated with zona fasciculata hypertrophy. Autoradiography revealed time-dependent alterations in receptor expression over 28 days. Comparison with Th1 injury at 3 days post-injury showed that the extent of sympathetic denervation critically determines angiotensin receptor signaling and neuroendocrine responses.

Úvod

Nadobličky predstavujú významný orgán neuroendokrinného systému. Ich činnosť je regulovaná viacerými vzájomne prepojenými regulačnými mechanizmami, najmä hypotalamo-hypofýzo-adrenálnou osou, renín-angiotenzín-aldosterónovým systémom a sympatickým nervovým systémom (1, 2, 3). Prostredníctvom týchto regulačných dráh dochádza ku koordinácii hormonálnej odpovede organizmu na stres a k udržiavaniu vnútorného prostredia organizmu v stave homeostázy. Traumatické poranenie miechy (TPM) vedie k prerušeniu zostupných sympatických dráh a k narušeniu autonómnej regulácie viacerých orgánov vrátane nadobličiek. Strata sympatickej inervácie môže významne ovplyvniť ich funkciu, čo sa môže prejavovať zmenami v histomorfologickej organizácii jednotlivých kortikálnych zón. Angiotenzín II predstavuje významný regulačný faktor HPA osi. Prostredníctvom receptorov AT₁ a AT₂ ovplyvňuje sekréciu kortikotropín-uvolňujúceho hormónu v hypotalame (4),

adrenokortikotropného hormónu v hypofýze (4) a steroidogézu (5, 6) v kôre nadobličiek. Okrem toho sa podieľa aj na regulácii syntézy a uvoľňovania katecholamínov z drene nadobličiek (7).

Cieľom práce bolo analyzovať histomorfologické zmeny nadobličiek a expresiu receptorov angiotenzínu II v komponentoch HPA osi po TPM u potkanov a zhodnotiť ich vzťah k rozsahu sympatickej denervácie.

Materiál a metódy

Experiment bol realizovaný na dospelých samiciach potkana kmeňa Wistar (3 mesiace; 250–320 g) chovaných v štandardných laboratórnych podmienkach s voľným prístupom k potrave a vode. Traumatické poranenie miechy (TPM) bolo navodené kompresným modelom podľa publikovaných metód (8, 9, 10). Po dorzálnej laminektómii bolo na miechu aplikované závažie 40 g počas 15 minút na úrovni hrudného segmentu Th9 alebo Th1. Lézia na úrovni Th9 spôsobila parciálnu sympatoadrenálnu denerváciu, zatiaľ čo lézia na úrovni Th1 viedla k takmer úplnej strate sympatickej inervácie nadobličiek. Experiment zahŕňal intaktné kontroly, sham-operované zvieratá (laminektómia bez kompresie miechy) a zvieratá s TPM na úrovni Th9 alebo Th1 (n = 6 v každej skupine). Pri lézii Th9 boli analyzované časové body 1, 3, 7, 14, 21 a 28 dní po poranení. V prípade lézie Th1 bolo prežívanie obmedzené na 3 dni po poranení.

Objem nadobličiek a jednotlivých kortikálnych zón bol stanovený stereologickou metódou podľa Cavalieriho (11). Kryoprotektované nadobličky boli spracované metódou systematického náhodného výberu (každý šiesty rez; interval 150 μ m). Rezy boli následne farbené hematoxylínom a eozínom podľa štandardného protokolu. Expresia receptorov angiotenzínu II bola analyzovaná autorádiografickou receptorovou väzbovou metódou podľa Tsutsumiho a Saavedru (1991) (12), ktorá umožňuje selektívne stanovenie väzby AT₁ a AT₂ receptorov v jednotlivých štruktúrach HPA osi. Endokrinný profil HPA osi bol hodnotený stanovením koncentrácií kortikotropín-uvoľňujúceho hormónu, adrenokortikotropného hormónu, kortikosterónu, aldosterónu a katecholamínov pomocou ELISA testov podľa protokolov výrobcu.

Výsledky

Po TPM boli v nadobličkách pozorované výrazné morfológické zmeny. Počas prvého týždňa po poranení sa prejavilo ich prechodné zväčšenie sprevádzané zmenou zafarbenia. Morfometrická analýza potvrdila zvýšenie objemu nadobličiek, čomu zodpovedal aj nárast ich hmotnosti. Detailná stereologická analýza jednotlivých kortikálnych zón ukázala, že zväčšenie

nadobličiek bolo spôsobené predovšetkým hypertrofiou zona fasciculata kôry nadobličiek. Autoradiografická analýza receptorovej väzby preukázala časovo závislé zmeny expresie receptorov angiotenzínu II počas 28-dňového posttraumatického obdobia v jednotlivých komponentoch HPA osi. Porovnanie lézií na úrovni Th9 a Th1 zároveň ukázalo, že rozsah sympatickej denervácie významne ovplyvňuje receptorový profil. Parciálna sympatoadrenálna denervácia po lézii Th9 bola charakterizovaná dynamickými zmenami receptorovej expresie, zatiaľ čo takmer úplná denervácia pri lézii Th1 viedla k výraznej redukcii receptorov AT₁ aj AT₂ v centrálnych aj periférnych komponentoch HPA osi.

Diskusia

Prechodná zmena zafarbenia a zväčšenie nadobličiek patrili medzi najvýraznejšie zmeny pozorované po závažnom nízkotorakálnom TPM. Morfometrická analýza ukázala, že zväčšenie nadobličiek bolo spojené s hypertrofiou zona fasciculata. Zvýšené hladiny adrenokortikotropného hormónu naznačujú aktiváciu osi HPA a pravdepodobne prispievajú k hypertrofii buniek tejto zóny (13), pričom stabilné hladiny kortikosterónu poukazujú na prítomnosť kompenzačných mechanizmov v regulácii glukokortikoidovej odpovede. Zmeny v expresii receptorov angiotenzínu II zároveň naznačujú, že sympatická inervácia zohráva dôležitú úlohu pri regulácii citlivosti HPA osi na túto signalizáciu po poranení miechy. Narušenie zostupnej sympatickej regulácie tak môže meniť spôsob, akým jednotlivé štruktúry HPA osi reagujú na angiotenzín II, pričom rozsah sympatickej denervácie predstavuje determinant charakteru tejto odpovede od adaptačných zmien receptorovej expresie až po jej celkové utlmenie.

Súhrn

Naše výsledky poukazujú na kľúčovú úlohu sympatickej inervácie pri regulácii receptorovej signalizácie angiotenzínu II v HPA osi a jej vplyv na neuroendokrinnú odpoveď organizmu po traumatickom poranení miechy.

Literatúra

1. Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S. et al.: *Compr Physiol*, 2016; 6: 603–621.
2. Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G.: *Annu Rev Physiol*, 2005; 67: 259–284.
3. Correa, B.H.M., Becari, L., Fontes, M.A.P. et al.: *Curr Neuropharmacol*, 2022; 20: 1212–1228.
4. Saavedra, J.M.: *Clin Sci*, 2012; 123: 567–590.
5. Carey, R.M.: *Am J Hypertens*, 2017; 30: 339–347.
6. Saavedra, J.M., Armando, I.: *Cell Mol Neurobiol*, 2018; 38: 85–108.
7. Harada, K., Matsuoka, H., Fujimoto, N. et al.: *J Histochem Cytochem*, 2010; 58: 585–593.
8. Fedorova, J., Kellerova, E., Bimbova, K. et al.: *Cell Mol Neurobiol*, 2022; 42:173-193.

9. Fedorova, J., Pavel, J.: J Neurotrauma, 2019; 36:2665-2675.
10. Hamamoto, Y., Ogata, T., Morino, T. et al.: Spine, 2007; 32:1955-1962.
11. Gundersen, H.J., Jensen, E.B.: J Microsc, 1987; 147: 229–263.
12. Tsutsumi, K., Saavedra, J.M.: Am J Physiol, 1991; 261: R209–216.
13. Ulrich-Lai, Y.M., Figueiredo, H.F., Ostrander, M.M. et al.: Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006; 291: 965-73.

*Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-22-0248)
a vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV (VEGA 2/0123/23).*

HISTOLOGICKÉ HODNOTENIE NOVVOYTVORENEJ SUBCHONDRÁLNEJ KOSTI PO APLIKÁCII CFG BIOCEMENTU

HISTOLOGICAL EVALUATION OF NEWLY FORMED SUBCHONDRAL BONE AFTER
APPLICATION OF CFG BIOCEMENT

**Filip Korim¹, Katarína Vdoviaková¹, Lenka Krešáková¹, Filip Humeník¹, Ján Danko¹,
Kristína Čurgali², Zuzana Fagová², Mária Giretová³, Ľubomír Medvecký³**

¹*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice*

²*Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, 041 80 Košice*

³*Ústav materiálového výskumu, SAV, Watsonova 47, 040 01 Košice*

filip.korim@student.uvlf.sk

Abstract

Osteochondral defects represent a significant clinical challenge due to their limited healing capacity. This study aimed to evaluate the regenerative potential of CFG bio cement in the treatment of osteochondral defects. Histomorphological analysis was performed to assess tissue regeneration. Treated defects showed organized subchondral bone formation with progressive trabecular maturation and bone marrow development, whereas untreated defects exhibited disorganized fibrous tissue and incomplete regeneration. In conclusion, CFG bio cement demonstrated promising osteoinductive and osteoconductive properties, supporting its potential application in osteochondral defect repair.

Úvod

Defekty chrupkového tkaniva často postihujú nielen samotné chrupkové tkanivo, ale aj subchondrálnu kosť, čo vedie k rozvoju osteoartrózy postihnutého kĺbu (1, 2). Poškodenie subchondrálnej kosti vedie nielen k rozvoju osteoartrózy, ale môžu sa vyskytnúť aj ďalšie ochorenia spojené s poškodením kĺbovej chrupky, ako je osteochondróza, jej fragmentácia (chip fraktúry) a kondylárne zlomeniny (3). Regenerácia chrupky, ale aj samotnej subchondrálnej kosti pri osteochondrálnej defektoch/poraneniach, je veľkou výzvou pre chirurgov a materiálových inžinierov. Medzi známe a používané techniky patrí stimulácia kostnej drene, mikrofraktúry, subchondrálne vŕtanie a abrazívna artroplastika (4, 5). V súčasnosti sa do popredia dostávajú techniky bioinžinierstva a regeneratívnej medicíny s cieľom vytvoriť ideálne „natívne“ tkanivo pomocou rôznych transplantátov (autografty, alotransplantáty,

xenografty), lešení (scaffoldov) a biocementov, ktoré je možné obohatiť o rôzne bunkové zložky a biologicky aktívne molekuly (6, 7).

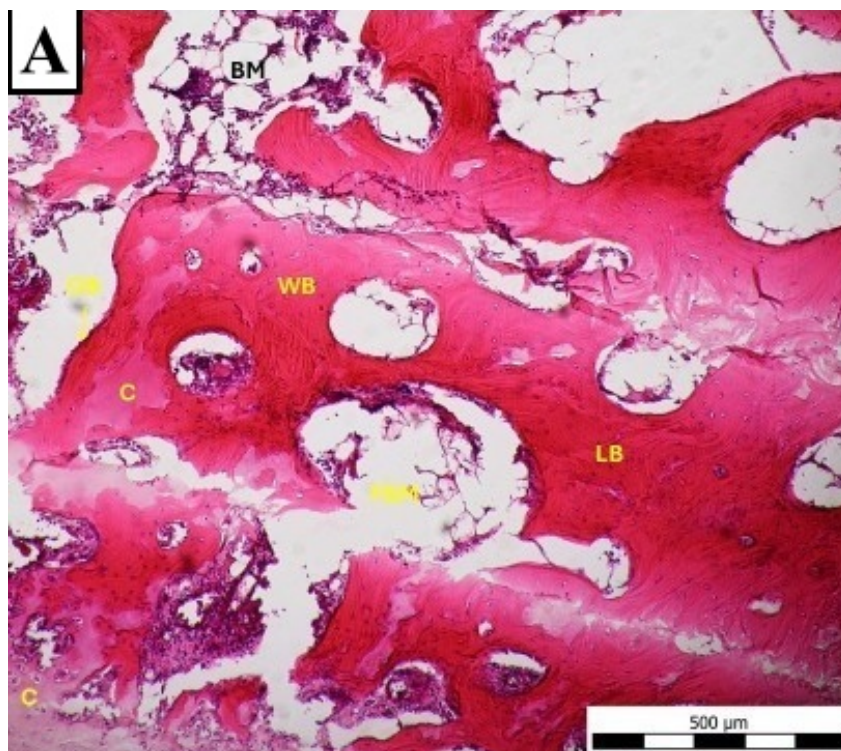
Cieľom našej práce bolo zhodnotiť terapeutický efekt tetrakalcium fosfátového/monetit biocementu s prídavkom zložiek medu (glukóza a fruktóza) – CFG v osteochondrálnej defektoch *condylus medialis* stehennej kosti u animálneho modelu svine domácej.

Materiál a metódy

V našej práci sme sa zamerali na kvalitatívne histologické zhodnotenie regenerátov subchondrálnej kosti 6 mesiacov po artificálnom osteochondrálnom defekte *condylus medialis* stehennej kosti o rozmeroch 10x10 mm, ktorý bol u 5 sviň vyplnený CFG biocementom a u zvyšných 5 sviň boli osteochondrálne defekty ponechané na spontánne vyhojenie. Reprezentatívne vzorky boli fixované v 10% neutrálnom formalíne, dekalifikované v 25% roztoku EDTA a následne spracované rutinou histologickou metodikou, zaliate do parafínu, narezané na podložné sklíčka a farbené pomocou hematoxylín-eozínu a vyšetované pod svetelným mikroskopom Olympus BX50.

Výsledky

Vo vzorkách z defektov ošetrených biocementom sme pozorovali v oblasti subchondrálnej kosti novotvorbu vláknitého kostného tkaniva s ložiskovými oblasťami lamelárneho kostného tkaniva. V intertrabekulárnych priestoroch bolo možné pozorovať krvné cievy a prítomnú kostnú dreň. Rezy vykazovali typické celulárne usporiadanie pre kostné tkanivo. Naopak, v defektoch ponechaných na spontánne vyhojenie sme pozorovali dezorganizovanú sieť vláknitej kosti so sporadickými oblasťami lamelárneho kostného tkaniva. Intertrabekulárne priestory boli čiastočne vyplnené vaskularizovaným spojivovým tkanivom s početnými krvnými cievami, čo naznačuje tvorbu granulačného tkaniva. Taktiež sme nepozorovali jasné osteochondrálne rozhranie u tejto experimentálnej skupiny. Histomorfologické nálezy po terapii osteochondrálnych defektov pomocou CFG biocementu poukazovali na regeneráciu kostného tkaniva sprevádzanou postupnou maturáciou trabekulárnej kosti a tvorbou kostnej drene po implantácii biocementu.



Obr. 1 Mikrofotografia subchondrálnej kosti po aplikácii CFG biocementu. Subchondrálna kosť pozostáva z oblastí vláknitej kosti (WB) a oblastí zrelšej lamelárnej kosti (LB). Intertrabekulárne priestory sú vyplnené kostnou dreňou (BM). Prilahlá chrupka (C) je prítomná na osteochondrálnom rozhraní.

Diskusia

Kalcium fosfátové biocementy sa dlhodobo používajú v zubnom lekárstve, implantológii, maxilofaciálnej chirurgii a ortopedickej rekonštrukčnej chirurgii (8). Podľa dos Santosa a kol. (9) tieto cementy poskytujú niekoľko výhod, ako je možnosť prípravy finálnej cementovej pasty počas operácie, vynikajúci kontakt medzi kosťou a cementom a čo je najdôležitejšie, materiál je biokompatibilný a bioaktívny, čo umožňuje jeho široké použitie. Okrem iných výhod môžu tieto cementy slúžiť ako nosiče rôznych látok vrátane iónov, liekov, bioaktívnych zlúčenín a buniek (10, 11). Obohatenie kalcium fosfátových cementov rôznymi anorganickými a organickými zložkami často modifikovalo a zvyšovalo ich regeneračný potenciál v štúdiách *in vitro* a *in vivo* (12, 13, 14). Regeneračný potenciál kalcium fosfátových biocementov bol sledovaný v artifiálnych osteochondrálnych defektoch u sviní a oviec. Bernstein a kol. (15) testovali účinok β -TCP obohateného autológnyimi chondrocytmi na animálnom modeli ovce. U miniprasiat Gotterbram a kol. (16) overovali regeneračný potenciál β -TCP+kolagénu a tiež obohateného o rastové faktory. Tieto biocementy boli porovnávané s neliečenými defektmi. Oba autori opisovali v prípade neošetrených defektov nepravidelný vzhľad neochrupky, ktorá

vykazovala napríklad známky fibrilácie. Z hľadiska histológie autori opisujú fibroartilaginózne tkanivo a nie plnohodnotnú hyalínnu chrupku. Regenerácia subchondrálnej kosti bola, podobne ako v našom prípade, len čiastočná. Ošetrované defekty obohatenými biocementmi úspešne regenerovali chrupkové a subchondrálne kostné tkanivo, ktoré vykazovalo svoj typický lamelárny vzhľad, ktorý sme pozorovali aj my po použití CFG biocementu u našich zvierat. Oba biocementy, či už CFG alebo β -TCP, ktorý bol použitý v predmetných štúdiách mali výborné osteoindukčné a osteokonduktívne vlastnosti a stimulovali tvorbu nového kostného tkaniva. Autori štúdií tiež pozorovali podobne ako my, že proces novotvorby kostného tkaniva začínal z periférie a pokračoval do centra defektu.

Súhrn

Použitie CFG biocementu pri liečbe osteochondrálnych defektov viedlo k výraznejšej regenerácii subchondrálnej kosti v porovnaní so spontánnym hojením na základe kvalitatívneho histologického vyšetrenia. Výsledky potvrdzujú vysoký regeneračný potenciál kalcium fosfátových biocementov vďaka ich osteoinduktívnym a osteokonduktívnym vlastnostiam, a podporujú ich využitie v regeneračnej medicíne tvrdých tkanív.

Literatúra

1. Fisher, M.B., Belkin, N.S., Milby, A.H. et al.: Tissue Eng Part A, 2015;21(3-4):850–860.
2. Heir, S., Nerhus, T.K., Røtterud, J.H. et al.: Am J Sports Med, 2010; 38(2):231–237.
3. Stewart, H.L., Kawcak, C.E.: Front. Vet Sci, 2018; 5.
4. Orth, P., Cucchiari, M., Kohn, D. et al.: Eur Cell Mater, 2013; 25:299–316.
5. Höger, S.A., Cong, T., Hall, A.J. et al.: Ann Jt, 2025; 10:27.
6. Medvecký, L., Giretova, M., Stulajterova, R. et al.: Materials, 2021; 14(2):436.
7. Petrovova, E., Tomco, M., Holovska, K. et al.: Polymers, 2021; 13(8):1232.
8. Carrodeguas, R.G., De Aza, S.: Acta Biomater, 2011; 7(10):3536–3546.
9. dos Santos, L.A., Carrodeguas, R.G., Rogero, S.O. et al.: Biomaterials, 2002; 23(9):2035–2042.
10. Yu, D., Wong, J., Matsuda, Y. et al.: J Pharm Sci, 1992; 81(6):529–531.
11. Tomco, M., Petrovova, E., Giretova, M. et al.: Anat Sci Int, 2017; 92(4):569–580.
12. Vdoviaková, K., Danko, J., Krešáková, L. et al.: Front Mater, 2021; 8.
13. Gaddam, V., Podarala, V., Rayaduram Venkata, S.K. et al.: J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2022; 110(4): 806–816.
14. Medvecký, L., Giretova, M., Jevinova, P. et al.: Int J Biol Macromol, 2026; 340:150235.
15. Bernstein, A.; Niemeyer, P.; Salzmann, G. et al.: Acta Biomater, 2013; 9(1):7490–7505.
16. Gotterbarm, T., Richter, W., Jung, M. et al.: Biomaterials, 2006; 27(18): 3387–3395.

Práca bola podporená grantom APVV-20-0184 a VEGA 2/0038/25.

MORFOLOGICKÝ OBRAZ HEPATO-SPLENICKÉHO LYMFÓMU U KOŇA

MORPHOLOGICAL PICTURE OF THE HEPATO-SPLENIC LYMPHOMA IN HORSE

Filip Korim¹, Viera Almášiová¹, Veronika Šimaiová¹, Michaela Karamanová², Zuzana Čriepoková², Igor Valocký²

¹*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

²*Klinika koní, Univerzitná veterinárna nemocnica, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

filip.korim@student.uvlf.sk

Abstract

Equine lymphoma is neoplastic disease with variable clinical and morphological presentation. A 16-year-old Arabian gelding presented with cachexia, chronic diarrhea, and dyspnoea was euthanized due to poor prognosis. Necropsy revealed multiple well-demarcated nodules in the liver. Histologically, there was diffuse infiltration of neoplastic lymphocytes in the liver and spleen, with destruction of normal tissue architecture and a high mitotic index. Findings confirmed a lymphoma with multiorgan involvement.

Úvod

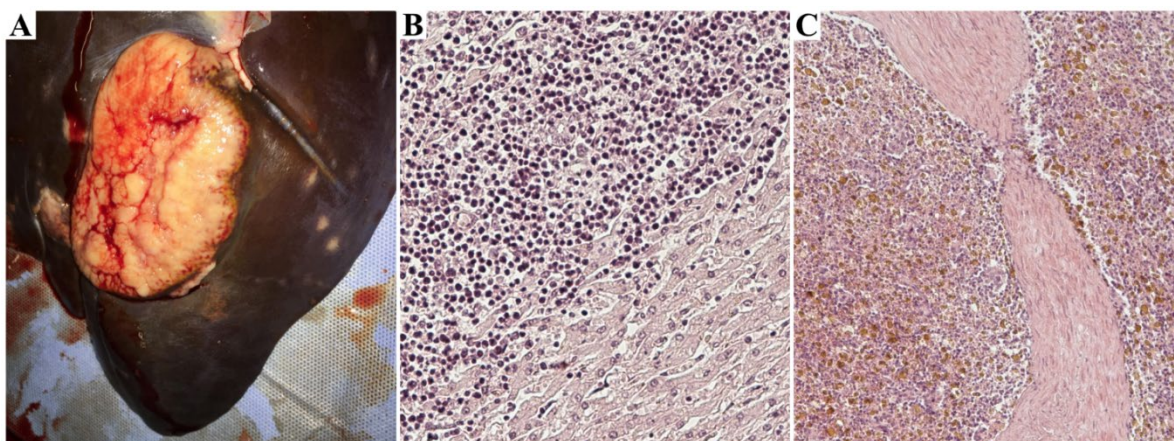
Lymfóm je najčastejší malígný nádor hematopoetického systému, ktorý vzniká z rôznych foriem lymfocytov a jeho prevalencia je u koní 1-3% a postihuje všetky vekové kategórie (1, 2). Pre lymfómy je typické ich rýchle metastázovanie do okolitých tkanív a orgánov z dôvodu cirkulácie neoplastických lymfocytov v obehu, a kvôli tomu je náročné identifikovať primárne ložisko ochorenia (2). Z toho dôvodu je u väčšiny koní lymfóm diagnostikovaný v pokročilom štádiu, prípadne až *post mortem*. Symptómy tohto ochorenia závisia od poškodenia konkrétnych orgánov. Medzi časté, no nešpecifické biochemické a hematologické indikátory patrí neutrofilia, cytopénia, erytrocytóza, hypoalbuminémia, hyperglobulinémia a hyperkalcémia. Medzi nový biomarker patrí enzým tymidínkináza (1, 2). Intravitálna diagnostika lymfómov je založená na vyšetrení suspektných lézií a výpotkov. Definitívna diagnóza je potvrdená histopatologickým a imunohistochemickým vyšetrením (2). Histopatologická klasifikácia lymfómov je založená na fenotypizácii podľa CD znakov a charakteristických zmien v cytoplazme buniek. Knottenbelt (2) delí lymfómy na: difúzny malobunkový B/T – lymfóm, difúzny veľkobunkový B - lymfóm, ktorý môžeme rozdeliť do podkategórií (TCR B - lymfóm,

mixoidný lymfóm, veľkobunkový imunoblastický lymfóm, lymfoidná granulomatóza), difúzny veľkobunkový T – lymfóm, difúzny veľkobunkový lymfóm vznikajúci z T lymfocytov, intravaskulárny lymfóm a veľký granulárny lymfóm (2).

Prezentácia prípadu

Na Kliniku koní UVLF v Košiciach bol prijatý 16 ročný valach Arabského plnokrvníka sfarbenia beluš. Pacient bol prijatý z dôvodu dlhotrvajúcej kachexie, dva mesiace trvajúcej profúznej hnačky a dyspnoe. BCS pacienta po prijatí bolo 2. Na základe výsledkov klinického, rektálneho a ultrasonografického vyšetrenia brušnej dutiny doplneného o biochemické a hematologické vyšetrenie sme sa rozhodli pre eutanáziu pacienta. Po eutanázii bola vykonaná probatórna laterálna laparatómia a torakotómia. Na všetkých lalokoch pečene boli prítomné mnohopočetné noduly, ktoré boli dobre ohraničené a na reze homogénne. Priemer týchto nodulov varíroval od 1-5 cm. Slezina, ako hematopoetický a sekundárny lymfatický orgán bola dôkladne vyšetrená a narezaná, ale nebola zistená žiadna zmena v makroskopickej štruktúre. Excízie z patologicky zmenených orgánov sme fixovali v 10% neutrálnom formalíne (Mikrochem Trade s.r.o., Slovensko). Po fixácii sme vzorky spracovali rutinnou metódou zaliatím do parafínu. Histologické preparáty boli farbené hematoxylínom – eozínom a vyšetované pod svetelným mikroskopom Zeiss Axio Lab. A1 (Carl Zeiss AG, Nemecko) s adaptérom Axio Cam ICc 5 (Carl Zeiss AG, Nemecko) pre digitalizáciu obrazu.

V pečeni sme pozorovali difúznu infiltráciu neoplastických lymfocytov, najmä v sínusoidoch. Niektoré hepatocyty boli deštruované a bola nájdená aj ich vakuolizácia. V okolí *v. centralis* boli nachádzané lymfocytárne perivaskulárne infiltráty. Slezina nebola makroskopicky patologicky zmenená, avšak v histopatologickom obraze nebolo možné odlíšiť členenie sleziny na červenú a bielu pulpu z dôvodu masívnej infiltrácie lymfocytov. Zároveň sme aj pozorovali početné siderofágy. V predmetných orgánoch boli nájdené difúzne infiltrácie neoplastických lymfocytov s vysokým mitotickým indexom. Tento nález korešponduje s lymfómom. Multiorgánové postihnutie potvrdilo multicentrický lymfóm.



Obr. 1 Morfológický obraz lymfómu u koňa. Detailný záber na neoplastický nodul pečenevého parenchýmu (A). Mikrofotografia pečenevého parenchýmu s infiltráciou neoplastických lymfocytov v sinusoidách (B). Mikrofotografia sleziny s infiltráciou neoplastických lymfocytov a prítomnosťou siderofágov (C).

Diskusia

Vo vyšetrovaných orgánoch sme pozorovali výrazné neoplastické lymfocytárne infiltrácie, ktoré boli prestúpené tenkými okrskami fibrovaskulárnej strómy. Na presnejšiu diagnostiku foriem neoplastických buniek je potrebné imunohistochemické vyšetrenie, ktoré sme nevykonali z dôvodu materiálnych a finančných obmedzení. Hepato – splenické lymfómy sú vzácne a existuje len malý počet prípadov u koní (3, 4). U týchto koní najčastejšie perzistuje paraneoplastický syndróm (3). V našom prípade sme zaznamenali rovnaký histopatologický nález v pečeni aj slezine, avšak makroskopicky bola slezina bez výrazných patologických zmien. Z hľadiska imunohistochemickej diagnostiky sa popisujú oba typy lymfómov (B a T) postihujúcich pečeň a slezinu. Hananeh a kolektív (4) popísali primárny B – lymfóm (CD20+, CD3-) sleziny vážiaci 51 kg. U tohto koňa neboli popísané metastázy na ďalších orgánoch. Naopak T-lymfóm (CD3+) bol popísaný u 21 ročnej kobyly plemena Holandský teplokrvnik. Pečeň a slezina boli zväčšené a homogénne s prítomnými nodulmi. Z hľadiska intravitálnej diagnostiky lymfómu je v súčasnosti vhodné zaradiť vyšetrenie enzýmu tymidínkináza. Tymidínkináza (TK) je onkomarker, ktorý sa používa pri diagnostike lymfómu ľudí, psov a mačiek (5, 6). Predstavuje cytosólový enzým, ktorý je zodpovedný za bunkovú proliferáciu. Enzým sa v organizme vyskytuje v dvoch formách izoenzýmov, a to TK1 a TK2. Zvýšená aktivita TK1 je počas bunkového cyklu v G1 a S fáze. V podstate, TK1 je markerom neoplastického vzplanutia buniek, a zároveň prognostickým a terapeutickým markerom. Pacienti s veľmi vysokou sérovou hladinou majú často horšiu prognózu, ako pacienti s nižšími

hodnotami. Meranie hladín TK1 môže referovať o efektívnosti liečby. Treba však podotknúť, že nie len neoplázie sú spojené so zvýšenou proliferáciou buniek. Zápal sa tiež vyznačuje zvýšenou proliferáciou buniek (5). V štúdií Larsdottera a kolektívu (6), ktorá sa zaoberala využitím TK ako prognostického markeru u koní bolo zistené, že u 23 koní s diagnostikovaným lymfómom boli sérové hladiny TK signifikatne zvýšené v porovnaní s koňmi s inou neopláziou, zápalom a zdravými koňmi. Priemerná sérová hodnota TK u koní s lymfómom bola 26,5 U.l-1. U koní postihnutých zápalom a zdravých koní bola priemerná sérová hodnota TK 1,5 U.l-1.

Súhrn

U nášho pacienta sme boli nútení pristúpiť k eutanázii pre rapidne sa zhoršujúci stav a pokročilé štádium ochorenia. Prognóza lymfómov závisí najmä od štádia ochorenia a topografickej lokalizácie lézie. V prípade metastázovania a formovania obrovských más je liečba len paliatívneho charakteru a majiteľom je odporúčaná eutanázia. V súčasnosti existuje málo záznamov o úplnom vyliečení pacientov, avšak ranná diagnostika tohto ochorenia doplnená práve použitím onkomarkerov, napríklad tymidínkinázy môže viesť k lepšej diagnostike a následnej efektívnejšej terapeutickú intervencii.

Literatúra

1. van den Hoven, R., Franken, P.: *Equine Vet J*, 1983; 15(1):49-53.
2. Knottenbelt, D., Patterson – Kane, J., Snalune, K.: Elsevier, New York, USA, 2015.
3. Roccabianca, P., Paltrinieri, S., Gallo, E., Giuliani, A.: *Vet Pathol*, 2002; 39(4):508-511.
4. Hananeh, W., Al Rukibat, R., Daradka, M.: *Vet Med*, 2021; 66(2):76-79.
5. von Euler, H., Einarsson, R., Olsson, U., et al.: *J Vet Intern Med*, 2004; 18(5):696-702.
6. Larsdotter, S., Nostell, K., von Euler, H.: *Vet J*, 2015; 205(2):313-316.

**POROVNANIE ÚČINNOSTI TERAPIE OSTEOCHONDRÁLNYCH DEFEKTOV PO
APLIKÁCII GAŠTANOVÉHO MEDU V DVOCH KONCENTRÁCIÁCH
V KOMBINÁCII S BIOMATERÁLOM**

COMPARISON OF THE EFFICACY OF THERAPY FOR OSTEOCHONDRAL DEFECTS
FOLLOWING THE APPLICATION OF CHESTNUT HONEY IN TWO
CONCENTRATIONS IN COMBINATION WITH A BIOMATERIAL

**Lenka Krešáková¹, Katarína Vdoviaková¹, Filip Humeník¹, Zuzana Hromjaková²
Roman Totkovič³, Pavol Rusnák³, Zuzana Andrejčáková⁴, Filip Korim¹, Marián
Kadáši⁵, Ľubomír Medvecký⁶**

¹*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Vaša Rehabilitácia s.r.o., FBLR amb, Bratislava, SR*

³*Nemocnica Agel Košice-Šaca, Lúčna 57, 040 15 Šaca, Košice, SR*

⁴*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

⁵*Klinika prežívavcov, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

⁶*Ústav materiálového výskumu SAV, Watsonova 47, 04 001 Košice, SR*

lenka.kresakova@uvlf.sk

Abstract

Given the well-known positive antioxidant, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antitumor effects of honey, in our study using a sheep model, we tested the effect of two concentrations of chestnut honey added to calcium phosphate-based biocements in the treatment of osteochondral defects. We evaluated the results macroscopically using a semiquantitative scoring system. The addition of honey in both concentrations positively affected the healing of osteochondral defects, achieving better results of the scoring system in numerical values, however, the differences between the individual concentrations of honey in the biocements were insignificant.

Úvod

Včelí med je jednou z najkomplexnejších prírodných potravín, ktorej hlavnou zložkou sú cukry (80 %), voda (20%) a ďalšie zložky zastúpené v menších množstvách : enzýmy, aminokyseliny, bielkoviny, flavonoidy, fenolové kyseliny, organické kyseliny, vitamíny a minerály (1).

Polyfenoly zahŕňajú širokú škálu fytochemikálií, ktorých potenciál v podpore zdravia vedci rozsiahlo študujú. Medzi polyfenoly nachádzajúce sa v mede patria flavonoidy (apigenín, pinocembrín, kaempferol, kvercetín, galangín, chryzín a hesperetín) a fenolové kyseliny (kyselina ellagová, kávová, p-kumarová, ferulová, 3-hydroxybenzoová, chlorogénová, rozmarínová, vanilková, gallová, benzoová a askorbová) (2). Väčšina týchto zlúčenín funguje vzájomnou interakciou a vytvára celý rad synergických antioxidačných vlastností. Protizápalové účinky medu spočívajú v inhibícii produkcie prozápalových mediátorov: NO, PGE2, TNF- α a IL-6 (3,4). Dôležitým faktorom je aj vysoká osmolarita (nízky obsah vody, vysoká koncentrácia cukrov), prítomnosť včelieho defenzínu-1 a metylglyoxalu (5). Pozitívne účinky medu boli sledované aj v rámci metabolizmu kostí, aktivity osteoblastov, osteoporózy a hojenia zlomenín kostí (6). V súčasnosti pretrváva záujem o nové terapeutické postupy v problematike terapie osteochondrálnych defektov a hľadani potenciálne úspešnejších možností liečby. Cieľom tejto práce bolo porovnať účinnosť terapie osteochondrálnych defektov po aplikácii dvoch rôznych koncentrácií gaštanového medu v kombinácii s biomateriálmi na báze tetrakalcium fosfátov na základe makroskopického hodnotenia pomocou semikvantitatívneho skórovacieho systému.

Materiál a metódy

In vivo štúdiu sme realizovali na 2 skupinách oviec po 6 kusov plemena Valaška/Merino vo veku 2 až 2,5 roka. Ovciam sme pomocou OATS kitu vytvorili v celkovej anestézii osteochondrálny defekt v kladke stehnovej kosti. Do vytvorených osteochondrálnych defetov sme aplikovali biomateriály CV25 a CV50 pripravené na Ústave materiálového výskumu SAV (skupina 1: CV25=TTCP/monetit/lekársky gaštanový med 5%, skupina 2: CV50=TTCP/monetit/lekársky gaštanový med 10%). Výsledok sme porovnali s defektmi liečenými biomateriálom C (TTCP/monetit /bez prídavku medu), neliečenými defektmi, ktoré sa vyhojili spontánne, bez aplikácie biomateriálu a s fyziologickou chrupkou (kontrola). Po 6 mesiacoch od aplikácie biocementov sme vzorky hodnotili makroskopicky s použitím semikvantitatívneho skórovacieho systému podľa Goebela a kol. (7) so sledovaním nasledovných parametrov:

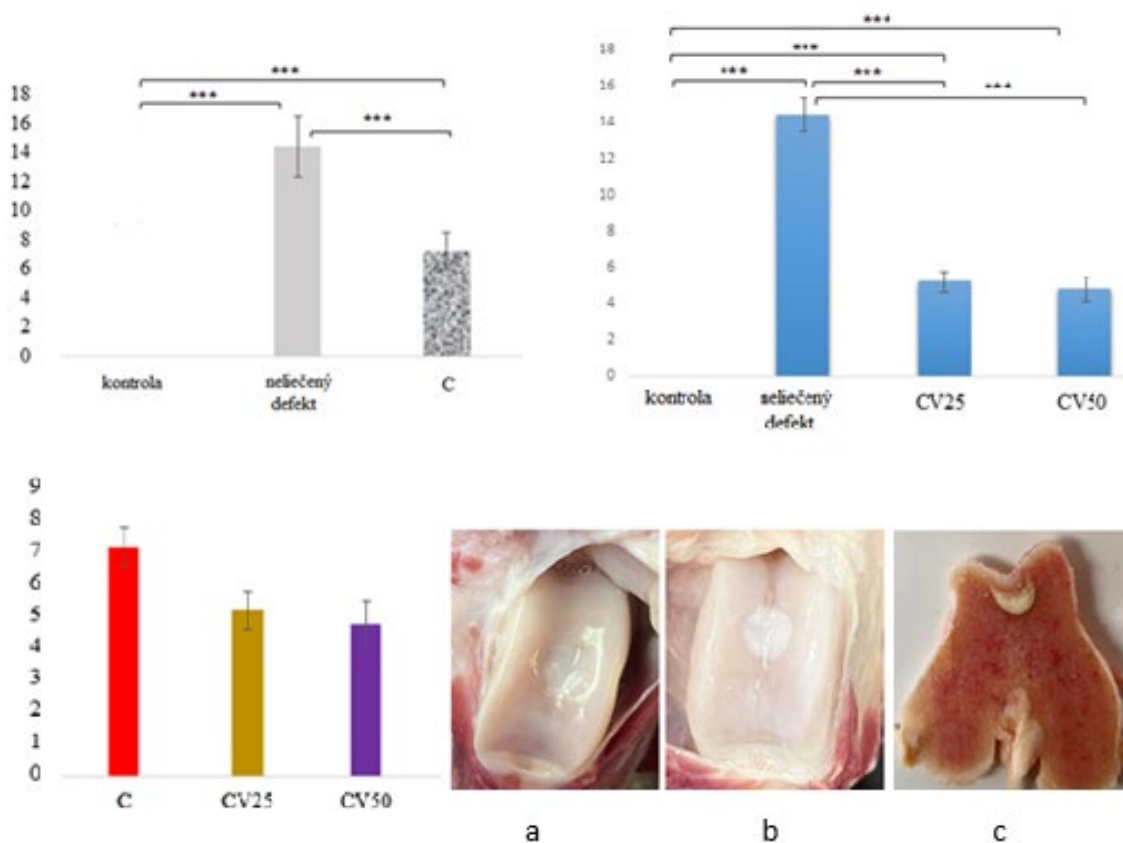
I. Farba tkaniva: Hyalínové alebo biele (0), Prevažne biele (>50 %) (1), Prevažne priesvitné (>50 %) (2), Priesvitné (3), Žiadne reparačné tkanivo (4). II. Prítomnosť krvných ciev v novovytvorenom tkanive: Nie (0), Menej ako 25 % (1), 25–50 % (2), 50–75 % (3), viac ako 75 % (4). III. Povrch novovytvoreného tkaniva: Hladký, homogénny (0), Hladký, heterogénny (1), Fibrilovaný (2), Nekompletné nové tkanivo (3), Žiadne reparačné tkanivo (4). IV. Výplň defektu: na úrovni s príľahlou chrupkou (0), > 50 % hĺbka defektu alebo hypertrofia (1), úplná

hlbka defektu (2), poškodenie subchondrálnej kosti (3), žiadne zreparované tkanivo (4). V. Degenerácia priľahlej kĺbovej chrupky: Normálna (0), Trhliny a/alebo fibrilácie v integračnej zóne (1), Difúzne osteoartrótické zmeny (2), Rozšírenie defektu do priľahlej chrupky (3), poškodenie subchondrálnej kosti (4).

Najlepší celkový výsledok je 0 bodov, za najhorší možný celkový výsledok môžeme považovať dosiahnutie 20 bodov. Výsledky skórovacích systémov sme vyhodnotili pomocou One-way ANOVA s Tukey's post hoc analýzou.

Výsledky

Po 6 mesiacoch od aplikácie biocementov bola kĺbová dutina bez známok zápalu, nezistili sme prítomnosť voľných intrartikulárnych teliesok, ani formáciu osteofytov. Demarkačná línia, ktorá oddeľovala novovytvorené tkanivo od okolitého tkaniva zdravej chrupky, bola detekovateľná. Synoviálna tekutina bola číra a v obvyklom množstve. Integrácia novovytvoreného tkaniva bola kvalitná, nové tkanivo nebolo separované od priľahlej fyziologickej chrupky. Povrch novovytvoreného tkaniva bol hladký až jemne nerovný, farebne mierne odlišiteľný od zdravej prirodzenej chrupky. Neliečené, spontánne vyhojené osteochondrálne defekty vykazovali signifikantne horšie známky obnovy a len čiastočnú reparáciu vláknitým, bielym alebo červenkastým tkanivom s trhlinami, hlbokými priehlbunami alebo hrboľmi. Osteochondrálne defekty ošetrené biocementom CV25 a CV50 mali makroskopicky kvalitnejšie vyhojený povrchový vzhľad a farbu, ako aj jednotnejšiu štruktúru a hladší povrch v porovnaní s defektmi ošetrenými biocementom C bez gaštanového medu. Napriek tomu rozdiely v celkovom skóre podľa semikvantitatívneho makroskopického bodovacieho systému (7) medzi liečenými skupinami CV25, CV50 a C neboli signifikantné. Signifikantný rozdiel bol pozorovaný vo všetkých prípadoch medzi liečenými defektmi a kontrolou ($p < 0,001$), medzi liečenými defektmi a neliečenými defektami ($p < 0,001$). Najpriaznivejšie hodnoty v skórovacom systéme boli sledované pre biocementy s prídavkom gaštanového medu CV50 s hodnotou $4,8 \pm 1,48$. Celkové skóre po aplikácii biocementu CV25 činilo $5,2 \pm 1,30$, po aplikácii biocementu C $7,2 \pm 1,30$. Neliečený defekt vykazoval hodnotu $14,4 \pm 2,07$, kontrolné vzorky zdravej chrupky hodnotu 0 (Obr. 1).



Obr. 1 Grafy zobrazujú dosiahnuté bodové hodnoty v makroskopickom skórovacom systéme a rozdiely medzi skupinami. a) Osteochondrálny defekt ošetrovaný biomateriálom CV25; b) Osteochondrálny defekt ošetrovaný biomateriálom CV50; c) prierez distálnou epifýzou stehnovej kosti po aplikácii biocementu CV50, *** $p < 0,001$.

Diskusia

Zápalové mediátory sa považujú za kritické faktory zohrávajúce dôležitú úlohu pri deštrukcii chrupky a synovitíde s následným rozvojom osteoartritídy (8). Vysoké hladiny IL-1 β v kĺbe indukujú génovú expresiu matrixových metaloproteináz (MMP), dezintegrínu a metaloproteinázy ADAM, ako aj génovú expresiu metaloproteinázy s trombospondínom (ADAMTS) v chondrocytoch a synoviocytoch, čím sa urýchľuje rozvoj osteoartritídy v dôsledku primárnej degradácie kolagénových fibríl v chrupke (9). Z týchto dôvodov niektorí autori skúmali vplyv medu na aktivitu zápalových mediátorov. Štúdia Candiracci a kol. (10) uvádza, že medový flavonoidový extrakt významne potlačil sekréciu prozápalových cytokínov vrátane TNF- α a interleukínu IL-1 β . In vivo štúdia na potkanoch, uskutočnená Husseinom a kol. (11) uvádza, že med znižuje edém a hladinu zápalových mediátorov, prostaglandínu E2, TNF- α , oxidu dusnatého a IL-6 v plazme. Rôzne *in vitro* a *in vivo* štúdie naznačujú sľubný účinok medu v homeostáze chrupky, a to prevažne inhibíciou zápalu a oxidačného stresu.

Štúdia Martineza (12) sledovala účinok manukového medu v polymérnom substráte v regenerácii chrupky a uvádza, že začlenenie manukového medu do hydrogélu podporuje chondrogenézu prostredníctvom zvýšenia expresie COL2A1, ako aj syntézy GAG a proteoglykánov; zároveň nezaznamenali žiadny cytotoxický účinok biomateriálu. V našej štúdii sme sledovali a porovnali 2 rôzne koncentrácie gaštanového medu pridaného k biocementom aplikovaným za účelom terapie osteochondrálnych defektov. Nezaznamenali sme patologické zmeny alebo iritáciu okolitého chrupkového tkaniva po aplikácii biocementov s prídavkom gaštanového medu v oboch koncentráciách. Osteochondrálne defekty ošetrené biocementmi s prídavkom medu preukázali priaznivejšie hodnoty makroskopického skórovacieho systému v porovnaní s osteochondrálnymi defektami ošetrenými biomateriálom C bez prídavku medu. Najlepšie výsledky v rámci hodnôt makroskopického skórovacieho systému sme zaznamenali v skupine CV50 s vyššou koncentráciou medu. Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sme zaznamenali iba v numerických hodnotách makroskopického semikvantitatívneho skórovacieho systému, avšak štatistické rozdiely medzi použitými biomateriálmi C, CV25 a CV50 neboli významné.

Súhrn

Aplikované biocementy CV25 a CV50 predstavujú vhodné biomateriály v riešení problematiky regenerácie osteochondrálnych defektov. Pridanie gaštanového medu v 5% alebo 10% koncentracii k biocementom z makroskopického pohľadu pozitívne ovplyvňuje hojenie osteochondrálnych defektov, ale bez významného rozdielu medzi jednotlivými skupinami.

Literatúra

1. Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., et al.: *Mediterr J Nutr Metab*, 2010; 3(1):15–23.
2. Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, et al.: *Food Chem*, 2016; 196:309–323.
3. Kassim, M., Achoui, M., Mansor, M., et al.: *Fitoterapia*, 2010; 81(8):1196–1201.
4. Hussein, S. Z., Yusoff, K. M., Makpol, S., et al.: *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012; 2012:109636.
5. Martinotti, S., Razato, E.: *J Funct Biomater*, 2018; 9(2):34.
6. Kamaruzzaman, M.: *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019; 2019:8543618.
7. Goebel, L., Orth, P., Müller, A. et al.: *Osteoarthritis Cartilage*, 2012; 9:1046–1055.
8. McAlindon, T. E., Bannuru R.R., Sullivan, M.C. et al.: *Osteoarthritis Cartilage*, 2014; 22(3):363–388.
9. Struglics, A., Larsson, S., Pratta, M. A., et al.: *Osteoarthritis Cartilage*, 2006; 14(2):101–113.
10. Candiracci, M., Piatti, E., Dominguez-Barragán, M. et al.: *J Agric Food Chem*, 2012; 60(50):12304–12311.
11. Hussein, S. Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. et al.: *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012:109636.
12. Martineza, C.: *Front Pharmacol*, 2021; 12:642836.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0694/25.

HODNOTENIE IRITAČNÉHO POTENCIÁLU SEKUNDÁRNE HYBRIDIZOVANÉHO JEDINCA RODU TRIMERESURUS

EVALUATION OF THE IRRITANT POTENTIAL OF A SECONDARILY HYBRIDIZED INDIVIDUAL OF THE GENUS TRIMERESURUS

**Adrián Krúpa¹, Vladimír Petrilla¹, Magdaléna Polláková¹, Eva Petrovová², Drahomíra
Sopková¹, Jaroslav Legáth^{3,4}**

¹ *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

² *Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

³ *Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

⁴ *Katedra biotechnológie a bioinformatiky, Fakulta chémie, Technická univerzita v Rzeszówe,
Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów, Poľsko*

Adrian.Krupa@student.uvlf.sk

Abstract

The aim of this study was to evaluate the irritant potential of the venom of a secondarily hybridized individual of the genus *Trimeresurus* using the HET-CAM test. The tested venom, at a concentration of 20,000 µg/ml, was applied to the chorioallantoic membrane of fertilized eggs in doses of 2, 3, and 5 µl, while vascular reactions - hyperemia, hemorrhage, and coagulation were monitored. In all experimental groups, a pronounced hemotoxic effect was observed, characterized by the rapid onset of hemorrhage and coagulation without the presence of hyperemia. A cumulative score ranging from 13 to 14, according to the Luepke classification, categorized the tested venom as a strongly irritant substance.

Úvod

Hybridizácia predstavuje dôležitý evolučný mechanizmus podieľajúc sa na vývoji mnohých skupín organizmov. Napriek pretrvávajúcim diskusiám o jej vplyve na biodiverzitu, súčasne genomické analýzy potvrdzujú jej výskyt naprieč širokým spektrom taxónov (1). Vznik hybridných jedincov v prírode je podmienený krížením príbuzných druhov alebo poddruhov, pričom významnú úlohu zohráva najmä prekryvanie ich areálov výskytu a environmentálne zmeny, ako sú klimatické výkyvy či zmeny habitatu (2). Dôležitá je aj genetická kompatibilita rodičovských jedincov, ako aj behaviorálne a antropogénne faktory, ktoré môžu podporovať medzidruhové párenie. V kontexte jedovatých hadov rodu *Trimeresurus* nadobúda štúdium

hybridizácie osobitný význam, keďže kombinácia genetických a fenotypových vlastností môže ovplyvňovať charakter jedu, vrátane jeho iritačného potenciálu. Hodnotenie týchto fenotypových vlastností u sekundárne hybridizovaných jedincov je dôležité pre lepšie pochopenie variability toxikologických účinkov jedov a ich významu v medicíne a veterinárnej praxi. Metóda HET-CAM sa využíva na hodnotenie iritačného potenciálu biologických látok vrátane hadích jedov. Vďaka bohato vaskularizovanej chorioalantoickej membráne (CAM), nízkym nákladom a menším etickým nárokom umožňuje CAM efektívne sledovať poškodenie cievnych štruktúr, čo ju predurčuje na hodnotenie účinkov jedu sekundárne hybridizovaného jedinca rodu *Trimeresurus*.

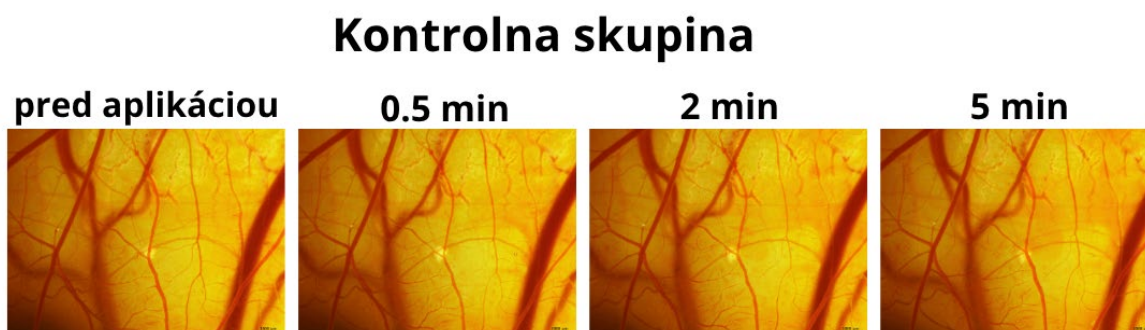
Materiál a metodika

Oplodnené vajcia nosníc plemena *Lohmann Brown* z Párovských Hájov pri Nitre boli transportované a skladované pri 15 °C. Po dekontaminácii 70 % etanolom boli inkubované (ET 49 ART 549) pri 37,5 °C a 60 % vlhkosti, ostrým koncom nadol, s automatickým otáčaním každé 3 hodiny. Tento moment bol definovaný ako ED0. Na ED3 bol cez malý otvor na ostrý pól asepticky odobratý približne 2 ml bielka, pričom otvor bol následne utesnený parafínom a vajcia boli vrátené do inkubátora (3). Na ED9 bola na tupom póle odstránená časť škrupiny na sprístupnenie CAM. Neoplozené vajcia boli vyradené. Po odstránení *membrana papyracea* bol hadí jed aplikovaný priamo na cievy CAM v objemoch 2, 3 a 5 µl, zatiaľ čo kontrolná skupina dostala 5 µl fyziologického roztoku. Reakcie boli sledované v časoch 0; 0,5; 2 a 5 minút a vyhodnotené podľa Luepkého skórovacieho systému (3). Princíp HET-CAM testu spočíva v sledovaní akútnych vaskulárnych reakcií (hyperémia, hemorágia, koagulácia) po aplikácii látky na CAM, pričom čas ich nástupu určuje výsledné skóre iritačného potenciálu (3).

Výsledky a diskusia

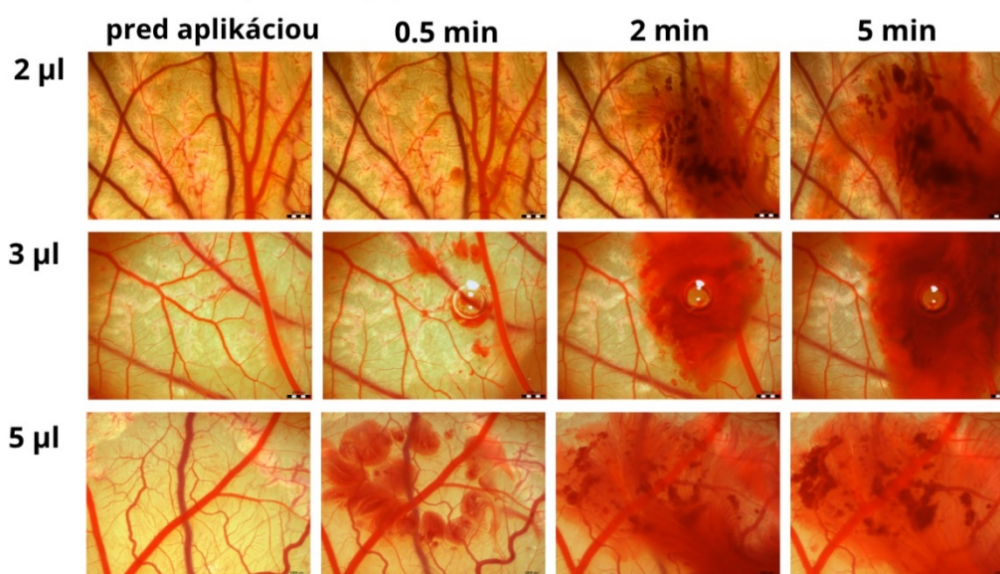
HET-CAM test umožnil priame hodnotenie vaskulárnej toxicity testovaných látok na chorioalantoickej membráne. Účinok bol posudzovaný na základe vzniku troch kľúčových reakcií – hyperémie, hemorágie a hemokoagulácie – a času ich nástupu po aplikácii. Jednotlivým prejavom boli priradené bodové hodnoty v závislosti od rýchlosti ich výskytu: skorý nástup do 30 sekúnd bol hodnotený najvyšším počtom bodov (hyperémia 5, hemorágia 7, hemokoagulácia 9), stredne rýchly nástup v intervale 30–120 sekúnd stredným skóre (3, 5, 7) a oneskorený nástup po 120 sekundách najnižším skóre (1, 3, 5). Súčet bodov pre jednotlivé reakcie predstavoval kumulatívne skóre, ktoré bolo následne použité na klasifikáciu iritačného potenciálu testovaných látok: hodnoty 9,0–21,0 indikovali silný iritačný účinok, 5,0–8,9

mierny, 1,0–4,9 slabý a hodnoty pod 1,0 zanedbateľný účinok (4). Na základe vyhodnotenia podľa Luepkeho klasifikačného systému bol stanovený iritačný potenciál jednotlivých dávok roztoku hadieho jedu sekundárne hybridizovaného jedinca rodu *Trimeresurus* aplikovaného na chorioalantoickú membránu. Počas experimentu boli sledované hlavné vaskulárne reakcie – hyperémia, hemorágia a hemokoagulácia, ktoré predstavujú základné ukazovatele poškodenia cievneho systému v HET-CAM teste. V kontrolnej skupine, kde bol aplikovaný fyziologický roztok neboli pozorované žiadne vaskulárne zmeny a kumulatívne skóre dosiahlo hodnotu 0, čo zodpovedá zanedbateľnému iritačnému potenciálu. Po aplikácii jedu boli vo všetkých testovaných dávkach (2 μ l, 3 μ l a 5 μ l) zaznamenané výrazné patologické zmeny, predovšetkým vznik hemorágií a hemokoagulácie, pričom hyperémia nebola pozorovaná. Pri dávkach 2 μ l a 3 μ l dosiahlo kumulatívne skóre hodnotu 13, zatiaľ čo pri najvyššej dávke 5 μ l bolo zaznamenané mierne zvýšenie na hodnotu 14. Na základe týchto hodnôt bol iritačný potenciál vo všetkých prípadoch klasifikovaný ako silný. Získané výsledky poukazujú na výrazný hemotoxický účinok testovaného jedu, ktorý sa prejavuje najmä indukciou krvácania a porúch koagulácie bez výraznej účasti hyperémie. Zároveň bol pozorovaný mierny nárast účinku v závislosti od dávky, čo naznačuje dávkovo podmienený charakter toxického pôsobenia.



Obr. 1 Výsledky HET-CAM testu kontrolnej skupiny.

Hybridný jedinec rodu *Trimeresurus*



Obr. 2 Výsledky HET-CAM testu pre jednotlivé dávky hadieho jedu o koncentrácii 20 000 µl/ml.

Jed C = 20 000 µg/ml	Dávka [µl]	Hyperémia	Hemorágie	Hemokoagulácia	Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
Kontrola	0	0	0	0	0	0
<i>Trimeresurus</i> Hybrid	2	0	7	6	13	Silný
	3	0	7	6	13	Silný
	5	0	7	7	14	Silný

Tab. 1 Hodnotenie iritačného potenciálu jednotlivých dávok roztoku hadieho jedu sekundárne hybridizovaného jedinca rodu *Trimeresurus* podľa Luepkého hodnotiaceho systému.

Získané výsledky poukazujú na výrazný hemotoxický charakter jedu sekundárne hybridizovaného jedinca rodu *Trimeresurus*, ktorý sa prejavil najmä rýchlym vznikom hemorágií a hemokoagulácie. Absencia hyperémie naznačuje, že účinok jedu je pravdepodobne spojený predovšetkým s priamym poškodením cievnej steny a ovplyvnením hemostatických procesov, čo je v súlade s publikovanými poznatkami o účinkoch hadích jedov (5). Hemoragické zmeny pozorované v rámci experimentu môžu súvisieť s prítomnosťou hadích venomových metaloproteináz (SVMP), ktoré sú známe schopnosťou degradovať zložky extracelulárnej matrix a narúšať integritu cievnych štruktúr. Tento mechanizmus vedie k zvýšenej permeabilite ciev a následnému krvácaniu, čo bolo popísané v viacerých štúdiách zameraných na patofyziológiu envenomácie (6). Okrem toho môžu zložky hadieho jedu

ovplyvňovať aj koagulačný systém, pričom ich účinok môže byť variabilný a zahŕňať aktiváciu aj inhibíciu jednotlivých faktorov zrážania krvi (7).

Súhrn

Cieľom práce bolo zhodnotiť iritačný potenciál jedu sekundárne hybridizovaného jedinca rodu *Trimeresurus* pomocou HET-CAM testu. Po aplikácii troch rôznych dávok jedu (2, 3 a 5 μ l) boli sledované vaskulárne reakcie chorioalantoickej membrány, konkrétne hemorágie, hemokoagulácia a hyperémia. Vo všetkých testovaných skupinách boli zaznamenané výrazné hemoragické zmeny a koagulácia bez prítomnosti hyperémie. Kumulatívne skóre (13–14) klasifikovalo jed vo všetkých prípadoch ako silne iritačný. Výsledky poukazujú na výrazný hemotoxický účinok jedu a naznačujú jeho vysokú biologickú aktivitu aj pri nízkych dávkach.

Literatúra

1. Taylor, S. A., Larson, E. L.: *Nat Ecol Evol*, 2019; 3(2), 170–177.
2. Campbell, N. A., Reece, J. B.: *Biology*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2005.
3. Knight, R. B. et al.: *Toxicon*, 2019; 158, 69–76.
4. Lüpke, N. P.: *Br J Dermatol*, 1986; 115, 31, 133–135.
5. Kini, R. M., KOH, C. Y.: *Toxins*, 2016; 8(10), 284.
6. Gutiérrez, J. M. et al.: *Toxins*, 2016; 8(4), 93.
7. Bernardoni, J.L et al.: *PLOS ONE*, 2014; 9(10), 109651.

Predkladaná práca bola realizovaná ako súčasť grantových úloh APVV-22-0101 a KEGA 04UVLF-4/2023 riešených na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

ENTERICKÝ NERVOVÝ SYSTÉM

ENTERIC NERVOUS SYSTEM

Alexandra Kunová

Ústav histológie a embryológie, LF UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice, SR

alexandra.kunova@upjs.sk

Abstract

Short review is focused on anatomy and physiology of enteric nervous system (ENS), the part of peripheral nervous system, which is involved in autonomic regulation of the activity of digestive system. The aim of this review is to describe the structure of nerve plexuses (submucosal and myenteric nerve plexus) and to classify types of neurons of ENS. Mechanisms of the motility control of gastrointestinal tract and the role of ENS in the regulation of transport of electrolytes and water are briefly described, as well as the relationship between the central nervous system and enteric nervous system.

Úvod

Funkcie gastrointestinálneho traktu sú riadené autonómnym nervovým systémom, ktorý je tvorený dvomi antagonisticky pôsobiacimi oddielmi – sympatikovým a parasympatikovým oddielom autonómneho nervového systému. Činnosť gastrointestinálneho traktu je regulovaná aj enterickým nervovým systémom (ENS), ktorý je tvorený dvomi navzájom prepojenými nervovými spleťami v stene orgánov tráviaceho traktu (1). ENS je samostatne fungujúcou časťou nervového systému, kontroluje motorické funkcie, lokálny prietok krvi, slizničný transport a sekréciu a ovplyvňuje imunitné a endokrinné funkcie (2).

Štruktúra enterického nervového systému

ENS pozostáva z *plexus myentericus Auerbachi*, ktorý je uložený vo vrstve hladkej svaloviny v stene tráviaceho traktu – *tunica muscularis externa* – medzi vnútornou cirkulárnou a vonkajšou longitudinálnou podvrstvou, a z *plexus submucosus*, ktorý sa nachádza v podslizničnom väzive – *tela submucosa* v stene tráviacej trubice. *Plexus submucosus* je ďalej rozdelený na tri samostatné zložky: vnútorný *plexus submucosus Meissneri*, uložený pod svalovou vrstvou sliznice – *lamina muscularis mucosae*, vonkajší *plexus submucosus Schabadaschi* lokalizovaný v tesnej blízkosti cirkulárnej svalovej podvrstvy *tunica muscularis*,

a stredný plexus nachádzajúci sa medzi nimi (3, 4). Viac než 2/3 neurónov myenterického plexu inervujú hladkú svalovinu tráviacej trubice, necelá 1/3 inervuje podslizničnú spleť a samotnú sliznicu tráviacej rúry. Podslizničná nervová spleť obsahuje menej neurónov než *plexus myentericus*, jeho nervové gangliá sú menšie a intergangliové spojenia slabšie. Väčšina týchto neurónov inervuje sliznicu a podslizničné väzivo, len 10% neurónov je prepojených s myenterickým plexom (5).

Typy neurónov v enterickom nervovom systéme

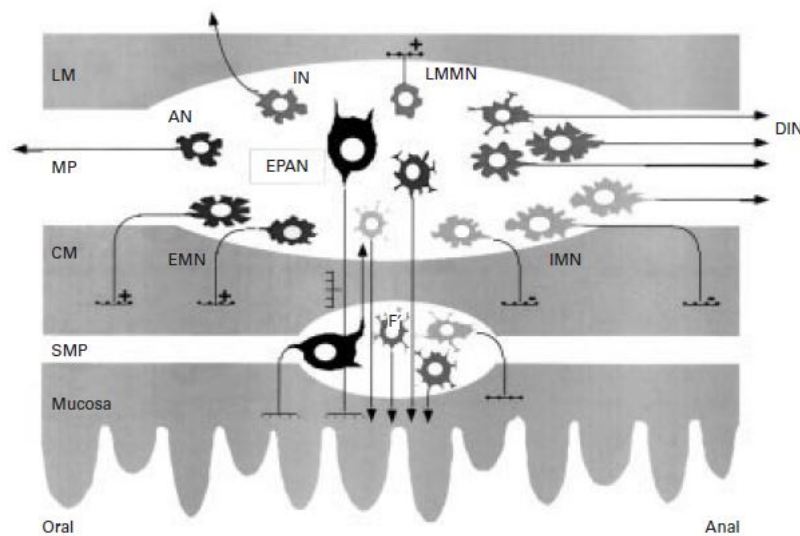
V ENS sa nachádzajú rôzne typy neurónov:

1. **Primárne aferentné neuróny** – tiež nazývané enterické primárne aferentné neuróny (EPANs). Nachádzajú sa v gangliách tvoriacich *plexus myentericus* aj *plexus submucosus*. Tieto neuróny reagujú na luminálne chemické podnety, na mechanickú deformáciu sliznice, a na rozpínanie tráviacej rúry a svalové napätie (6). Tvoria približne 30% myenterických neurónov a asi 14% neurónov *plexus submucosus*. Výbežky týchto neurónov zasahujú do črevných klkov a vetvia sa v rámci oboch nervových plexov. Časť týchto neurónov má dlhé descendentné vlákna, ktoré vytvárajú synapsy s aborálnymi myenterickými gangliami (7).
2. **Excitačné motorické neuróny cirkulárnej svalovej podvrstvy (14%)** – vysielajú finálny motorický impulz k cirkulárnej svalovine, prijímajú rýchle aj pomalé impulzy z okolitých primárnych aferentných neurónov, ako aj excitačné impulzy z descendentných interneurónov. Bohato sa vetvia v cirkulárnej podvrstve hladkej svaloviny *tunica muscularis*. Ich neurotransmitery acetylcholín a tachykinín pôsobia priamo na hladkú svalovinu (8, 9, 10).
3. **Inhibičné motorické neuróny cirkulárnej svalovej podvrstvy (17%)** – prijímajú impulzy z primárnych aferentných neurónov. Vetvia sa v cirkulárnej svalovej podvrstve *tunica muscularis*, kde sú ich axóny v kontakte s excitačnými motorickými neurónmi. Využívajú viacero mechanizmov inhibície – napr. oxid dusnatý, adenosíntrifosfát, vazoaktívny intestinálny peptid (VIP) pôsobiaci priamo na hladkú svalovinu alebo nepriamo prostredníctvom intersticiálnych buniek (8, 9, 10).
4. **Motorické neuróny longitudinálnej svalovej podvrstvy (25%)** – pomerne veľká skupina malých neurónov s krátkymi výbežkami vetviacimi sa v longitudinálnej podvrstve hladkej svaloviny. Prijímajú impulzy z enterických primárnych aferentných neurónov a z ascendentných a descendentných vlákien (11).
5. **Ascendentné interneuróny** – malá avšak veľmi dôležitá skupina neurónov ENS prijíma rýchle synaptické impulzy z viacerých ascendentných interneurónov, ktoré spolu vytvárajú ascendentnú excitačnú dráhu. Tiež prijímajú rýchle a pomalé impulzy z enterických primárnych

aferentných neurónov. Prebiehajú orálnym smerom spolu s *plexus myentericus* a vytvárajú synapsy s excitačnými motorickými neurónmi (12).

6. **Descendentné interneuróny** (7%) – sú rozdelené na niekoľko tried podľa prítomnosti rôznych neurotransmiterov (napr. acetylcholín, serotonín, oxid dusnatý, vazoaktívny intestinálny peptid) (13, 14).

7. **Sekretomotorické a vazomotorické neuróny** – existujú 2 malé skupiny sekretomotorických neurónov v *plexus myentericus* – cholinergné neuróny a ne-cholinergné neuróny s obsahom vazoaktívneho intestinálneho polypeptidu. Ich výbežky zasahujú až do sliznice tráviacej rúry. Podobné neuróny sa nachádzajú aj v *plexus submucosus*. Dosahujú až k myenterickým gangliám a pravdepodobne zodpovedajú za prepojenie sekrečných funkcií a motility čreva (14).



Obr. 1 Typy neurónov v ENS. LM – longitudinálna podvrstva tunica muscularis externa, CM – cirkulárna podvrstva tunica muscularis externa, MP – plexus myentericus, SMP – plexus submucosus, AN – ascendentné neuróny, DIN – descendentné interneuróny, EPAN – enterické primárne aferentné neuróny, EMN – excitačné motorické neuróny, IMN – inhibičné motorické neuróny, LMMN – motorické neuróny longitudinálnej podvrstvy (Costa et al., 1996)

Funkcia enterického nervového systému

ENS má mnoho úloh – zodpovedá za motilitu gastrointestinálneho traktu, kontroluje sekréciu žalúdočnej kyseliny, reguluje prestup tekutiny cez epitelovú výstelku a lokálny prietok krvi, ovplyvňuje spracovanie živín a má vplyv aj na imunitný a endokrinný systém čreva (15). ENS tiež prispieva k udržiavaniu súvislej epitelovej výstelky a bariéry medzi lúmenom čreva a tkanivami steny tráviacej rúry.

Kontrola činnosti gastrointestinálnej svaloviny

Pomer v akom je pri regulácii motility čreva zastúpený ENS a autonómny nervový systém závisí od konkrétnej časti tráviacej rúry. Pohyby pažeráka sú riadené z centrálného nervového systému (CNS), zatiaľ čo pomerne rozsiahly ENS má len pomocnú funkciu. Pohyby žalúdka sú primárne myogénne, no CNS má prostredníctvom mozgového kmeňa a ezofágogastrického a gastrogastického reflexu hlavnú úlohu v monitorovaní stavu žalúdka a následne v kontrole náplne žalúdka a sile kontrakcií, ako aj v sekrécii kyseliny chlorovodíkovej (16, 17). Naproti tomu, ENS dominuje v regulácii motility tenkého a hrubého čreva, s výnimkou defekácie, ktorá je riadená CNS z centier v lumbosakrálnej mieche (15). Úloha enterického nervového systému v rámci motility čreva spočíva predovšetkým v miestnych reflexoch, ako je reflex myenterický (lokálne rozťahnutie tráviacej rúry vyvolá v priebehu niekoľkých ms kontrakciu svaloviny) a reflex peristaltický (kontrakcia nad a dilatácia pod miestom mechanického alebo chemického podráždenia mukózy posúva tráveninu distálnym smerom). Oba reflexy sú zabezpečené prostredníctvom systému neuronálnych okruhov. Tieto pevne zapojené polysynaptické okruhy v ENS kontrolujú peristaltické pohyby čreva. Evokujú odpoveď na distenziu steny tráviacej rúry pozostávajúcu z kontrakcie nad miestom distenzie a descendentnú inhibíciu intestinálnej cirkulárnej svaloviny pod aktivačným bodom. Hlavnú úlohu v iniciácii peristaltického reflexu má 5-hydroxytryptamín – serotonín. Pri ochoreniach čreva môžu byť poškodené aj tieto reflexy ENS (18, 1). Napríklad u pacientov s obštipáciou bola oslabená najmä ascendentná kontrakcia hladkej svaloviny bez poruchy descendentnej inhibície (19).

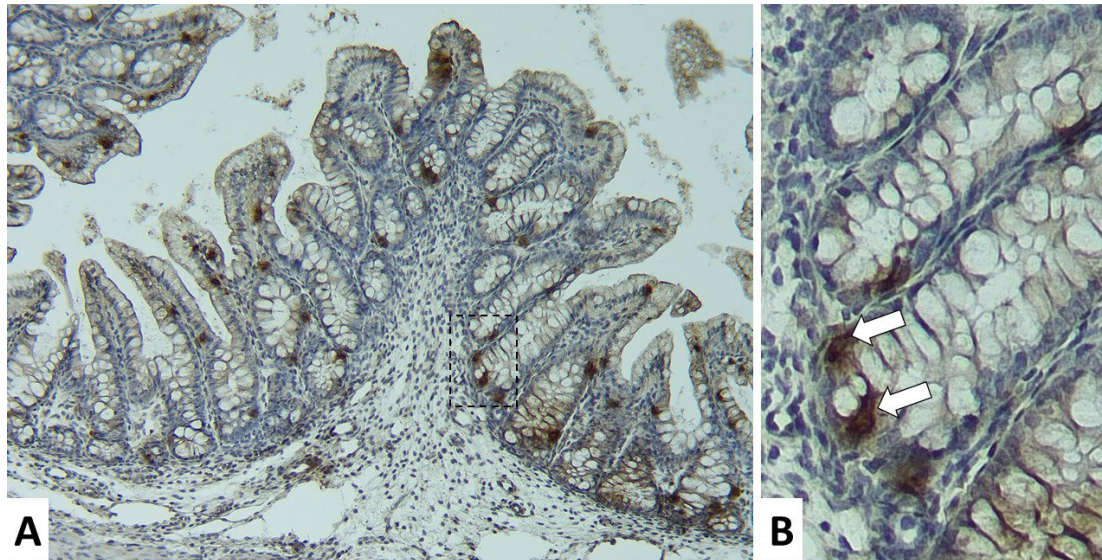
Regulácia transportu tekutiny

Prostredníctvom epitelovej výstelky čreva sa môže vstrebať viac tekutiny ako dvojnásobok celkového objemu krvi denne. Porucha regulácie tohto transportu, ako napríklad pri infekcii cholery, je život ohrozujúca. Jeden z dôvodov nadmerného prestupu vody z lúmenu čreva je aj absorpcia monosacharidov prostredníctvom symportu so sodíkovými iónmi. Týmto spôsobom sa vstrebáva napríklad glukóza. Absorpcia 100g glukózy následne spôsobuje absorpciu asi 1,8l vody (15, 20). Enterické reflexy, prostredníctvom aktivácie sekretomotorických neurónov, transportujú vodu a elektrolyty z interstícia slizničného väziva do lúmenu čreva. Voda a elektrolyty sa resorbujú z cirkulácie a absorbovanej tekutiny. Enterické sekretomotorické reflexy nepracujú izolovane, kontrolujú celkovú rovnováhu telesných tekutín. Detektory objemu krvi a tlaku krvi ovplyvňujú aktivitu sympatického nervového systému, vazokonstrikciu (15, 21). „Sweet taste receptor“, ktorý je enterickým receptorom pre glukózu, sa nachádza na membráne enteroendokrinných L buniek (22, 23). Stimuláciou týchto buniek

dochádza k vylučovaniu hormónov: glukagónu podobný peptid 1 a 2 (GLP 1, GLP 2), oxyntomodulín a peptid YY. Receptory pre GLP 2 sa nachádzajú na sekretomotorických neurónoch, ktoré sú týmto hormónom aktivované (23, 24). Aktiváciou enterického receptora pre glukózu samotnou glukózou alebo umelými sladidlami stimuluje sekretomotorické neuróny k spätnému transportu vody a elektrolytov do lúmenu čreva. Iné hormonálne produkty L buniek sa podieľajú na ďalších funkciách: modulácia sekrécie tekutín, inhibícia vyprázdňovania žalúdka, zvýšenie pocitu sýtosti, stimulácia obnovy epitelových buniek a regulácia sekrécie inzulínu (24, 25, 26). V regulácii rovnováhy telesných tekutín prostredníctvom miestnych (ENS) a systémových (sympatikových) reflexov nastáva chaos, keď je v lúmene čreva prítomné nadmerné množstvo patogénov alebo toxínov, ako napríklad cholera toxín, rotavírus alebo patogénne kmene *E. coli*, ktoré stimulujú enterické sekretomotorické neuróny. V takýchto prípadoch vznikajú rôzne závažné hnačkovité ochorenia, ktoré napomáhajú pri eliminácii patogénov a ich toxických produktov (27, 28).

Enteroendokrinný systém

Mnoho funkcií tráviaceho systému aj funkcií spojených s trávením, napríklad zabezpečenie pocitu sýtosti, vyžaduje spoluprácu ENS a endokrinných buniek tráviaceho systému (nazýva sa aj enteroendokrinný systém alebo gastroenteropankreatický hormonálny systém). Podobne ako ENS, enteroendokrinný systém je rozsiahly – pozostáva približne z 30-tich typov endokrinných buniek, ktoré produkujú okolo 100 rôznych mediátorov (29). Nervové zakončenia senzitívnych neurónov v sliznici steny tráviacej rúry nie sú v kontakte s črevným obsahom vďaka súvislej epitelovej výstelke. Črevný obsah je detegovaný receptormi prítomnými na povrchu enteroendokrinných buniek, ktoré následne vylučujú mediátory z ich bazolaterálneho povrchu a aktivujú enterické, vágové aj spinálne senzorické neuróny (23, 30, 31).



Obr. 1 Reprezentatívne mikrofotografie imunohistochemicky značených enteroendokrinných buniek produkujúcich serotonín v črevnej sliznici (Anti-serotonín). Prehľadné zväčšenie 20x (A), detail črevnej sliznice 60x (B).

Záver

ENS je autonómna sieť tvorená myenterickým a submukóznym nervovým plexom, ktorá riadi motilitu, sekréciu a prietok krvi v gastrointestinálnom trakte (1, 3). Prostredníctvom špecializovaných neurónov a reflexov zabezpečuje nezávislú reguláciu funkcií tenkého a hrubého čreva (15, 18).

Literatúra

1. Mysliveček, J.: Lékařská fyziologie, Praha: Grada, 2011: 800.
2. Furness, J.B.: Nat rev Gastroenterol hepatol, 2012; 9: 286-294.
3. Hoyle, CH., Burnstock, G.: J Anat, 1989; 166,7-22.
4. Vajner, L., Uhlík, J., Novotný, T.: Lékařská histologie II, Praha: Karolinum, 2017; 171.
5. Čihák, R. Anatomie 3, Praha: Grada, 2004; 692.
6. Furness, J.B., Kunze, W.A.A., Bertrand, P.P. et al.: Prog Neurobiol, 1998; 54, 1-18.
7. Brookes, S.J.H., Song, Z.M., Ramsay, Y.G. et al.: J Neurosci, 1995; 15, 5, 4013-4022.
8. Brookes, S.J.H., Steele, P.A., Costa, M.: Neurosci, 1991; 42, 3, 863-878.
9. Steele, P., Brookes, S.J.H., Costa, M.: Neurosci, 1991; 45, 227-239.
10. Brookes, S.J.H., Costa, M.: Innervation of the gut. Pathophysiological implications. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994; 237-248.
11. Brookes, S.J.H., Song, Z.-M., Steele, P.A. et al.: Gastroenterol, 1992; 103, 2, 961-973.
12. Brookes, S.J.H., MEEDENIYA, A.C.B., JOBLING, P. et al.: J physiol, 1997; 505, 2, 473-491.
13. Costa, M., Brookes, S.J.H., Steele, P.A. et al.: Neurosci, 1996; 75, 3, 949-967.
14. Song, Z.M., Brookes, S.J.H., Costa, M.: Cell tissue res, 1996; 285, 1, 149-156.
15. Furness, J.B.: The Enteric Nervous System, Blackwell, Oxford, 2006; 274.
16. Hasler, W.L.: Gastroenterology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003; 195-219.
17. Schubert, M.L., Peura, D.A.: Gastroenterol, 2008; 134, 7, 1842-1860.
18. Bjornsson, E.S., Chey, W.D., Ladabaum, U. et al.: Am J Physiol, 1998; 275, 3, 498-505.
19. Bjornsson, E.S., Chey, W.D., Hooper, F. et al.: Am J Physiol, 2002; 283, 400-407.
20. Wright, E.M., Loo, D. D.: Ann NY Acad Sci, 2000; 915, 54-66.
21. Sjövall, H., Abrahamsson, H., Westlander, G. et al.: Gut, 1986; 27, 913-918.

22. Young, R.L.: Front Neurosci, 2011; 5, 1-13.
23. Shirazi-Beechey, S.P., Moran, A.W., Batchelor, D.J. et al.: Proc Nutr Soc, 2011; 7, 2, 185-193.
24. Sigalet, D.L., Wallace, L.E., Holst, J. J. et al.: Am J Physiol, 2007; 293, 1, 211-221.
25. Estall, J.L., Drucker, D.J.: Ann Rev Nutr, 2006; 26, 391-411.
26. Cox, H.M.: Peptides, 2007; 28, 2, 345-351.
27. Lundgren, O.: Pharmacol Toxicol, 2002; 90, 3, 109-120.
28. Gwynne, R.M., Elis, M., Sjovall, H. et al.: Gastroenterol, 2009; 136, 1, 299-308.
29. Rehfeld, J.F.: Horm Metab Res, 2004; 36, 11/12, 735-741.
30. Bertrand, P.P., Kunze, W. A. A., Bornstein, J. C. et al.: Am J Physiol, 1997; 273, 422-435.
31. Raybould, H.E.: Curr Opin Pharmacol, 2007; 7, 6, 570-574.

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

**ANALÝZA EFEKTIVITY ZAVEDENIA INKLUZÍVNYCH PRVKOV DO VÝUČBY
HISTOLÓGIE A EMBRYOLÓGIE NA LEKÁRSKEJ FAKULTE UNIVERZITY
KOMENSKÉHO V BRATISLAVE**

ANALYSIS OF THE EFFECTS OF IMPLEMENTING INCLUSIVE ELEMENTS INTO
THE TEACHING OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY AT THE FACULTY OF
MEDICINE, COMENIUS UNIVERSITY IN BRATISLAVA

**Mária Lorencová, Marianna Danková, Zuzana Sirkovská, Ivan Varga, Miroslava
Juríková**

*Ústav histológie a embryológie, LF UK v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR
marianna.dankova@fmed.uniba.sk*

Abstract

The aim of this study was to analyze the impact of implementing inclusive elements into the teaching of Histology and Embryology at the Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava on student motivation, engagement, and perception. The newly introduced elements included the use of name tags, structured checklists, the opportunity for students to take on the role of a “mini teacher,” and the use of Kahoot quizzes for revision. Evaluation was conducted using a questionnaire based on a 5-point Likert scale (1 = strongly disagree, 5 = strongly agree), completed by 144 students (96 Slovak and 48 international). The most positively rated elements were checklists and Kahoot quizzes, which students perceived as highly useful and motivating. The mini-teacher role was more frequently utilized by international students. The findings suggest that the implementation of inclusive teaching elements has a positive effect on student engagement and the overall quality of teaching.

Úvod

Výučba histológie a embryológie patrí medzi náročné predmety pre študentov medicíny, a to najmä z dôvodu veľkého objemu nových informácií a potreby rozvoja mikroskopických identifikačných schopností. Tradičné formy výučby, založené na pasívnom prijímaní informácií, môžu viesť k nižšej miere zapojenia študentov a horším študijným výsledkom (1). Moderné pedagogické prístupy zdôrazňujú význam aktívneho učenia, spolupráce a spätnej väzby, ktoré vedú k lepšiemu porozumeniu učiva a vyššej motivácii študentov (2, 3). Inkluzívne vzdelávanie zároveň podporuje vytváranie prostredia, v ktorom sa študenti cítia viac zapojení

a akceptovaní, čo môže znižovať úzkosť a zlepšovať ich akademický výkon. Pred zavedením zmien prebiehali praktické cvičenia na Lekárskej fakulte UK v Bratislave formou domácej prípravy prostredníctvom videí, následného krátkeho testovania vedomostí pomocou platformy Socrative a následnej diskusie s učiteľom. Hlavná časť cvičení bola zameraná na mikroskopovanie preparátov a ich opis. Medzi identifikované problémy patrilo najmä podvádzanie pri testoch pomocou umelej inteligencie, nízka angažovanosť časti študentov a zvýšená miera stresu. Cieľom tejto práce bolo overiť, či zavedenie inkluzívnych a interaktívnych prvkov dokáže tieto problémy zmierniť a zlepšiť kvalitu výučby.

Materiál a metódy

Do výučby histológie a embryológie boli implementované nasledovné inkluzívne prvky:

- používanie menoviek na podporu personalizovanej komunikácie,
- využitie check-listov s kľúčovými štruktúrami preparátov,
- možnosť študentov prezentovať preparáty v role „mini učiteľa“,
- nahradenie Socrative testov interaktívnymi Kahoot testami.

Študenti si v rámci skupinovej práce rozdelili preparáty a samostatne ich spracovali s podporou check-listov. Na záver hodiny prebiehalo opakovanie formou Kahoot testu, ktorý mal súťaživý charakter. Na konci semestra bol realizovaný anonymný dotazník, ktorý vyplnilo spolu 144 študentov (96 slovenských a 48 zahraničných). Dotazník obsahoval otázky hodnotené na Likertovej škále (1 = úplne nesúhlasím, 5 = úplne súhlasím), a taktiež binárne otázky áno/nie. Výsledky boli následne kvantitatívne vyhodnotené.

Výsledky a diskusia

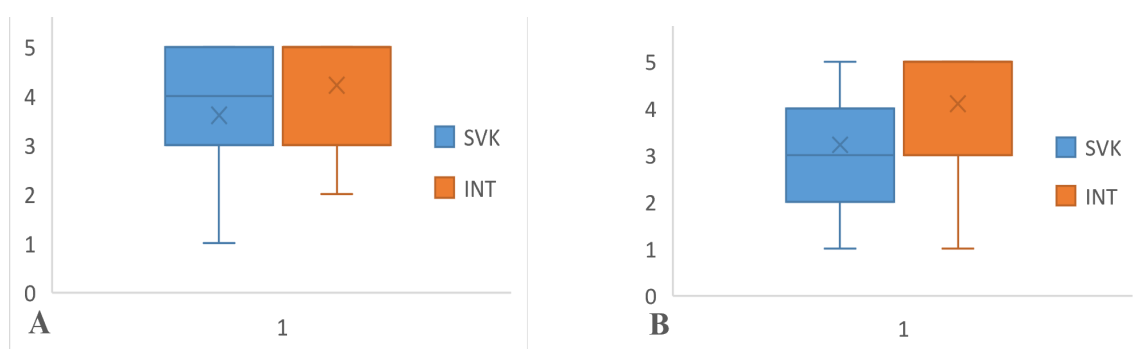
Výsledky ukázali rozdiely vo vnímaní jednotlivých prvkov, pričom väčšina z nich bola hodnotená pozitívne.

Používanie menoviek bolo hodnotené prevažne neutrálne, avšak študenti pozitívne vnímali oslovenie menom, čo prispievalo k zníženiu anonymity a zlepšeniu interakcie medzi študentom a učiteľom. Tento prvok má význam aj z pohľadu pedagóga, keďže uľahčuje zapamätanie si mien študentov. Najvyššie hodnotenia získali check-listy, ktoré študenti označili ako veľmi užitočné pri štúdiu preparátov. Ich efekt možno vysvetliť tým, že štruktúrované vedenie učenia znižuje kognitívne preťaženie a zlepšuje orientáciu v komplexnom učive. Možnosť vyskúšať si rolu mini učiteľa využilo 31 % slovenských a až 51 % zahraničných študentov. Vyššia aktivita zahraničných študentov môže súvisieť s ich motiváciou zapojiť sa do výučby alebo s odlišným vzdelávacím pozadím. Tento prvok sa ukázal ako efektívny nástroj na

podporu aktívneho učenia, ktoré podporuje hlbšie spracovanie informácií a rozvoj komunikačných schopností (3). Kahoot testy boli študentmi hodnotené veľmi pozitívne. Ich dynamický a súťaživý charakter zvyšoval motiváciu a zároveň sťažoval využitie nečestných praktík, napríklad použitie umelej inteligencie počas testovania. Tieto výsledky poukazujú na význam gamifikácie vo vzdelávaní, najmä z hľadiska zvýšenia motivácie a angažovanosti študentov.

Anketové tvrdenie	SVK median	INT median
Menovky prispeli k príjemnej atmosfére na praktiku.	3	3
Cítil som sa príjemnejšie, keď ma učiteľ oslovoval menom.	4	4
Check-listy boli pre mňa užitočné pri štúdiu preparátov.	5	5
Kahoot testy boli motivujúcim a príjemným spôsobom zopakovania učiva.	5	5
Pozitívne hodnotím nové prvky v učení.	4	4
Nové prvky v učení zväčšili môj záujem o predmet a zapojenie sa do aktivity počas praktika.	3	4

Tab.1 Výsledky ankety, kde sa slovenskí (SVK) aj zahraniční (INT) študenti vyjadrili k tvrdeniam podľa Likertovej škály: 1 = úplne nesúhlasím, 2 = skôr nesúhlasím, 3 = neutrálny postoj, 4 = skôr súhlasím 5 = úplne súhlasím



Obr.2 Celkové vnímanie nových prvkov v učení slovenskými (SVK) a zahraničnými (INT) študentami. A: pozitívne hodnotenie nových prvkov v učení, B: zvýšenie záujmu o predmet vďaka novým prvkom v učení (1 = úplne nesúhlasím, 2 = skôr nesúhlasím, 3 = neutrálny postoj, 4 = skôr súhlasím 5 = úplne súhlasím)

Celkovo možno konštatovať, že zavedené inkluzívne prvky prispeli k zvýšeniu aktivity študentov, ich motivácie a pozitívnejšiemu vnímaniu predmetu, čo podporuje aspoň časť záverov, že aktívne a inkluzívne metódy výučby vedú k lepším študijným výsledkom a vyššej spokojnosti študentov (1). Zároveň sa ukazuje, že samotné zavedenie jednotlivých aktivít nemusí byť postačujúce. Ako vo svojich širších reflexiách o internacionalizovanej a inovatívnej výučbe uvádzajú Pleschová (4) a Simon (5), zmysluplná transformácia vysokoškolského vzdelávania si vyžaduje nielen izolované prvky aktívneho učenia, ale najmä koherentný pedagogický dizajn zosúladený s potrebami študentov, kontextom študijného programu a inštitucionálnymi podmienkami.

Súhrn

Implementácia inkluzívnych prvkov do výučby histológie a embryológie na LF UK v Bratislave mala pozitívny vplyv na zapojenie a motiváciu študentov. Najvýznamnejší prínos bol zaznamenaný pri použití check-listov a interaktívnych Kahoot testov. Výsledky podporujú pokračovanie v aplikácii týchto prvkov a ich ďalší rozvoj. Inkluzívne a interaktívne prístupy predstavujú efektívny nástroj na zlepšenie kvality medicínskeho vzdelávania a zvládanie náročných predmetov.

Literatúra

1. Freeman S., Eddy S.L., McDonough M., et al.: Proc Natl Ac Sci. 2014;111(23):8410–8415.
2. Prince, M.: J Eng Educ, 2004;93(3), 223–231.
3. Michael J.: Adv Physiol Educ. 2006;30(4):159–167.
4. Pleschová, G.: Internationalising teaching and learning in central and eastern europe, 2022; In Pleschová, G. & Simon, A. (eds.) Internationalising teaching in higher education. Supporting peer learning. Delft: Delft University of Technology, pp. 9-14.
5. Simon A.: Internationalisation and innovative teaching as the future of higher education in central europe and beyond, 2022; In Pleschová, G. & Simon, A. (eds.) Internationalising teaching in higher education. Supporting peer learning. Delft: Delft University of Technology, pp. 183-188.

Táto štúdia bola podporená projektom Kultúrnej a edukačnej grantovej agentúry (KEGA) č. 100UK-4/2026.

VPLYV ŠALVIE LEKÁRSKEJ NA GÉNOVÚ EXPRESIU CYP1A5 V PEČENI KURACIEHO EMBRYA

THE IMPACT OF *SALVIA OFFICINALIS* ON THE GENE EXPRESSION OF CYP1A5 IN THE LIVER OF CHICKEN EMBRYOS

**Lenka Luptáková¹, Natália Mackaľová¹, Slavomíra Štefancová¹, Bronislava Pokorná¹,
Zuzana Demčišáková², Eva Petrovová²**

¹*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

lenka.luptakova@uvlf.sk

Abstract

Our study aimed to evaluate the effect of *Salvia officinalis* L. extract on the gene expression of CYP1A5 isoform in the livers of chicken embryos. The experiment was conducted using a chicken embryo model, in which various concentrations of an extract prepared from garden sage and the commercially available Leros extract were applied to fertilized eggs on the 4th embryonic day (ED). Liver samples were collected on the 9th embryonic day. Gene expression results demonstrated that sage extract modulated the expression of the selected genes. The CYP1A5 gene showed statistically significant induction at a lower concentration of the commercial extract. Differences in the intensity and profile of the effect were observed between the garden sage extract and the commercial extract.

Úvod

Salvia officinalis L. (šalvia lekárska) patrí medzi významné liečivé rastliny čeľade Lamiaceae, ktoré sú tradične využívané pre svoje protizápalové, antimikrobiálne, antioxidačné a adstringentné účinky. Biologická aktivita tejto rastliny je podmienená komplexným obsahom sekundárnych metabolitov, najmä silíc (tujón, gáfor, 1,8-cineol), diterpénov (karnosol, kyselina karnosová), fenolových kyselín (kyselina rozmarínová) a flavonoidov (1). Tieto zlúčeniny sa podieľajú na ochrane rastliny pred oxidačným stresom a zároveň sú zodpovedné za jej farmakologické účinky. Biosyntéza mnohých sekundárnych metabolitov v *S. officinalis* je sprostredkovaná enzýmovými systémami zahŕňajúcimi cytochrómy P450. Cytochrómy

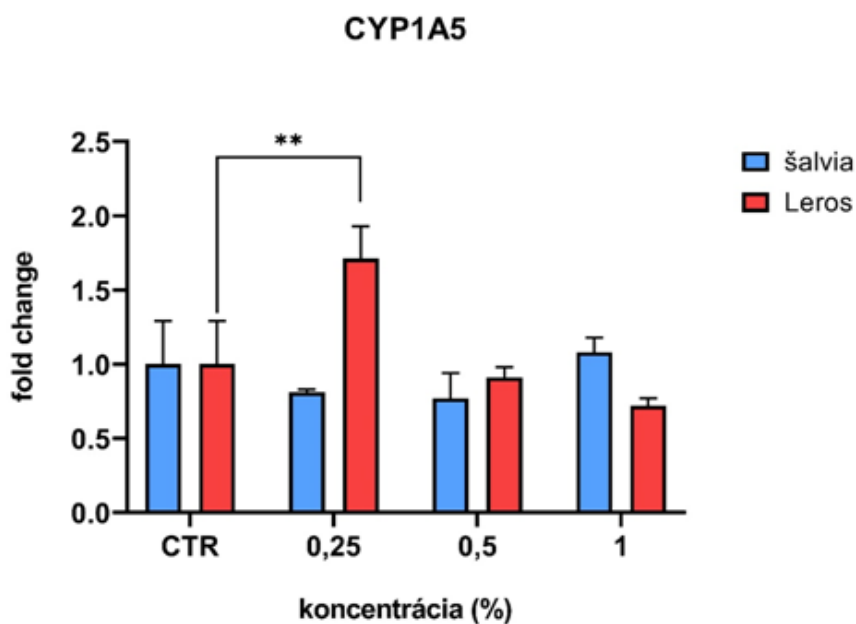
predstavujú hemoproteíny schopné katalyzovať oxidačno-redukčné reakcie, pričom v rastlinách zohrávajú zásadnú úlohu najmä pri syntéze terpenoidov a fenolových zlúčenín. Experimentálny dôkaz o účasti cytochrómov P450 na metabolizme monoterpénov v šalvii priniesla práca Funk a Croteau (2), ktorí izolovali a charakterizovali cytochróm P450-dependentnú gáfor-hydroxylázu z tkanivových kultúr *Salvia officinalis*. Autori preukázali, že hydroxylácia gáforu prebieha v mikrozomálnej frakcii za účasti NADPH-dependentného P450 systému.

Materiál a metódy

Extrakty sme vyhotovovali v troch koncentráciách (100 %, 50 % a 25 %) zo sušenej šalvie pozbieranej v záhrade a z komerčne dostupného čaju Leros. Oplodnené slepačie vajcia (*Gallus gallus domesticus*, n = 60) boli získané z certifikovaného liaharenského zariadenia (EN ISO 22000; Liaharenský podnik Nitra, as, Párovské Háje, Slovensko) a rozdelené do štyroch skupín ako pre záhradnú šalviu, tak aj pre Leros, podľa koncentrácie aplikovaného extraktu (K1, S1, S0,5, S0,25; K2, L1, L0,5, L0,25). Na 4. ED bola prevedená aplikácia extraktov šalvie lekárskej z univerzitnej záhrady, LEROS a kontrolného roztoku. Na ED9 bola z embryí odobratá pečeň, ktorá bola do extrakcie RNA uskladnená pri -70 °C. Celková RNA bola extrahovaná použitím komerčného kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Nemecko). Na prevod izolovanej RNA do komplementárnej DNA (cDNA) sme použili kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) so vstupnou koncentráciou RNA 1000 ng/μl. Na sledovanie zmeny génovej expresie CYP1A5 sme použili real time PCR so SYBR Greenom (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). Génová expresia bola hodnotená metódou 2-ΔΔCt s použitím génu GAPDH ako endogénnej kontroly. Štatistická analýza bola vykonaná v programe GraphPad Prism (dvojcestná ANOVA, Šídakov test), pričom rozdiely boli považované za štatisticky významné pri p < 0,01.

Výsledky

Pri analýze génovej expresie sme zaznamenali štatisticky významnú up-reguláciu v prípade extraktu zo šalviového čaju Leros v koncentrácii 0,25 % (1,71; p<0,01). Pri ostatných koncentráciách extraktu zo šalviového čaju (0,5 % a 1 %) sme zaznamenali nesignifikantnú miernu down-reguláciu. V prípade extraktu pripraveného zo záhradnej šalvie sme pri koncentráciách 0,25 % a 0,5 % pozorovali miernu nesignifikantnú down-reguláciu (Obr. 1).



Obr. 1 Porovnanie génovej expresie CYP1A5 medzi extraktom pripraveným zo sušenej šalvie a z komerčne dostupného čaju (Leros).

Diskusia

Bunky reagujú na stres predovšetkým prostredníctvom molekúl klasifikovaných ako stresové proteíny. Stresové proteíny sa často ďalej delia do dvoch všeobecných kategórií: proteíny aktivované iba stresom a proteíny podieľajúce sa na reakciách na stres, ako aj na normálnej funkcii buniek. Takmer identické stresové proteíny sa exprimujú v najjednoduchších prokaryotických bunkách, ako aj v najzložitejších eukaryotických bunkách. Bunková stresová reakcia je evolučne zachovaná vo všetkých živých organizmoch a hlavná úloha sa pripisuje indukovaným proteínom tepelného šoku a iným molekulám, ktoré poskytujú ochranu proti stresu. Molekulárne reakcie vyvolané bunkami určujú, či sa organizmus prispôsobí, prežije, alebo ak je poškodený nenapraviteľne, podstúpi smrť. Vo väčšine prípadov sú tieto reakcie pre organizmy prospešné, ale niekedy bunky, ako napríklad rakovinové bunky, vyvinú obranné mechanizmy, ktoré interferujú s terapiou. Hoci sú stresové reakčné cesty sprostredkované rôznymi spôsobmi v závislosti od stresového faktora, typu buniek atď., spoločnou charakteristikou mnohých ciest, ale najmä tých, kde je hlavným stresovým faktorom teplo, je to, že sú iniciované prítomnosťou a detekciou denaturovaných proteínov. Podmienky, ako sú vysoké teploty, často spôsobujú denaturáciu proteínov, čo je mechanizmus, ktorý umožňuje bunkám určiť, kedy sú vystavené vysokej teplote, bez potreby špeciálnych tepelne citlivých proteínov, pretože denaturované proteíny spúšťajú stresovú reakciu (3). V prípade vyvíjajúceho

sa kuracieho embrya môže mať šalvia (*Salvia officinalis*) aplikovaná *in ovo* (najmä vo vysokých koncentráciách) vplyv na vyvíjajúcu sa pečeň tým, že mení metabolické a antioxidantné dráhy, čo môže zahŕňať aj epigenetickú dráhu. Šalvia lekárska interaguje s enzýmami cytochrómu P450 (CYP) v pečeni, a to predovšetkým prostredníctvom modulácie metabolizmu fázy I. Hoci je často cenená pre svoje antioxidantné a hepatoprotektívne vlastnosti, štúdie ukazujú, že môže indukovať alebo inhibovať špecifické enzýmy CYP, najmä CYP2E1, CYP3A4 a CYP2C9 (1). Shang et al. (4) skúmali úlohu CYP1A4 a CYP1A5 pri metabolizme T-2 toxínu v embryonálnych hepatocytoch kurat'a. Hoci expozícia toxínu viedla k výraznej indukcii expresie oboch génov, samotnú hydroxyláciu T-2 toxínu katalyzoval výlučne CYP1A5. Tento výsledok poukazuje na funkčnú divergenciu týchto izoformiem a na dominantnú úlohu CYP1A5 v detoxikačných procesoch. Miernejšia odpoveď v našom experimente môže naznačovať, že rastlinné metabolity predstavujú slabší indukčný stimul v porovnaní s mykotoxínmi, ale fungujú ako bioaktívne látky, ktoré môžu aktivovať v hepatocytoch ochrannú reakciu u vyvíjajúceho sa embrya.

Súhrn

Z porovnania účinku extraktu zo záhradnej šalvie a komerčne dostupného extraktu Leros vyplýva, že oba typy extraktu boli schopné ovplyvniť expresiu sledovaného génu, avšak ich účinok sa líšil v závislosti od koncentrácie a konkrétnej izoformy cytochrómu P450. Komerčný extrakt Leros signifikantne ovplyvnil expresiu CYP1A5 (up-regulácia) pri nižšej koncentrácii (0,25 %). ostatné koncentrácie ani pri záhradnej šalvii ani pri čaju nemali signifikantný efekt na génovú expresiu CYP1A5.

Literatúra

1. Grzegorzcyk, I., Matkowski, A., Wysokińska, H.: *Chemistry*, 2007; 104(2), 536-541.
2. Funk, C., Croteau, R.: *Plant Physiol*, 1993;101(4): 1231-1237.
3. Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C.: *Food Chem Toxicol*, 2007;45(3): 456-64.
4. Shang, S., Jiang, J, Deng Y.: *Int J Mol Sci*, 2013;14(6): 10809-18.

Táto štúdia bola realizovaná vďaka grantovej podpore VEGA 1/0373/24.

PARAKERATÓZA AKO PRE-ULCERATÍVNE ŠTÁDIUM ŽALÚDOČNÝCH VREDOV U OŠÍPANÝCH

PARAKERATOSIS AS A PRE-ULCERATIVE STAGE OF GASTRIC ULCERS IN PIGS

Jaroslav Novotný¹, Zuzana Krepelková¹, Sandra Andrašková², Eubomír Čulka¹, Viera
Almášiová²

¹*Klinika ošípaných, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

zuzana.krepelkova@uvlf.sk

Abstract

This study focuses on the histomorphological analysis of the mucosa of the *pars esophagea* in pigs, with emphasis on parakeratosis as an early and potentially reversible stage in the pathogenesis of gastric ulcers. Parakeratosis was characterized by epithelial hyperplasia, thickening of the *stratum corneum* and retention of nuclei in keratinocytes, indicating impaired differentiation. In advanced stages, erosive lesions with epithelial loss and inflammatory response were observed. The results confirm that parakeratosis represents a critical pre-ulcerative stage that may regress after elimination of etiological factors but can progress to erosion and ulceration under persistent adverse conditions.

Úvod

Žalúdočné vtedy ošípaných predstavujú významný problém intenzívneho chovu s negatívnym dopadom na welfare zvierat aj ekonomiku produkcie. Najčastejšie postihujú *pars esophagea*, bezžľazovú časť žalúdka vystlanú viacvrstvovým plochým epitelom, ktorý je menej chránený proti pôsobeniu kyslého žalúdočného obsahu (1, 2). Ochranná funkcia *pars esophagea* je založená na integrite epitelu, keďže táto oblasť nedisponuje hlienovou ani bikarbonátovou bariérou. Narušenie celistvosti epitelu vedie k oslabeniu bariérovej funkcie a zvýšenej citlivosti na chemické poškodenie. Jedným z prvých histologických prejavov poruchy epitelu je parakeratóza, definovaná ako porucha terminálnej diferenciácie buniek epitelu so zachovaním jadier v patologicky zhrubnutej parakeratóznej vrstve epitelu (3). Tento proces vedie k narušeniu fyziologickej organizácie epitelu a zníženiu jeho mechanickej stability. Parakeratóza je považovaná za skoré pre-ulceratívne a potenciálne reverzibilné štádium, ktoré môže pri pretrvávaní nepriaznivých podmienok progredovať do erozívnych lézií a následnej ulcerácie (4,

5). Významnú úlohu pritom zohrávajú aj nutričné a environmentálne faktory, najmä jemná granulometria krmiva, nízky obsah vlákniny a stres (6).

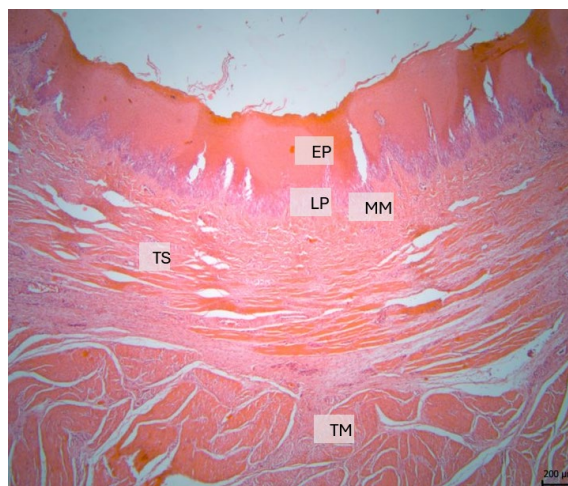
Cieľom práce bolo histologicky charakterizovať morfológické zmeny sliznice žalúdka ošípaných so zameraním na parakeratózu ako pre-ulceratívne štádium a analyzovať jej úlohu v patogenéze žalúdočných vredov.

Materiál a metódy

Vzorky žalúdočnej sliznice boli odobraté od 120 ošípaných z komerčného chovu počas *post mortem* vyšetrenia, pričom odber bol zameraný na oblasť *pars esophagea*. Po odbere boli vzorky fixované v 10 % pufrovanom formalíne a spracované štandardnou histologickou technikou zahŕňajúcou dehydratáciu, zalievanie do parafrínu a rezanie na rezy hrúbky približne 5 µm. Rezy boli farbené hematoxylínom a eozínom (H&E) a hodnotené svetelným mikroskopom. Sledovaná bola morfológická architektúra sliznice *pars esophagea* so zameraním na prítomnosť fyziologickej sliznice, parakeratózy a erozívnych zmien. Hodnotenie bolo realizované kvalitatívne na základe integrity epitelu, intraepiteliálnych zmien a charakteru zápalovej infiltrácie.

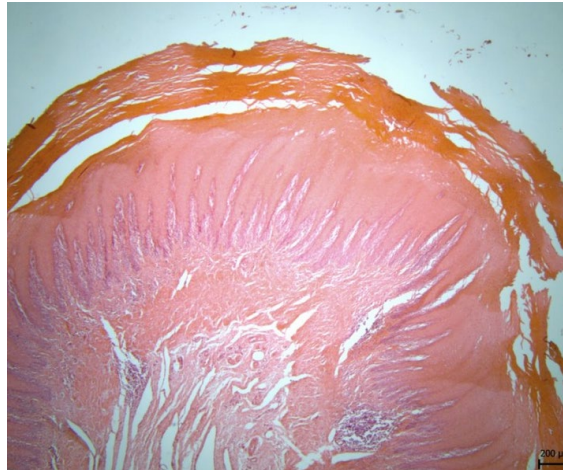
Výsledky

Na základe histologického vyšetrenia boli na sliznici *pars esophagea* identifikované tri morfológické stavy: fyziologická sliznica, parakeratóza a erózie. Fyziologická sliznica bola tvorená dobre diferencovaným viacvrstvovým plochým epitelom so zachovanou stratifikáciou bez známkov parakeratózy a *lamina propria mucosae* nevykazovala zápalové zmeny (Obr. 1).



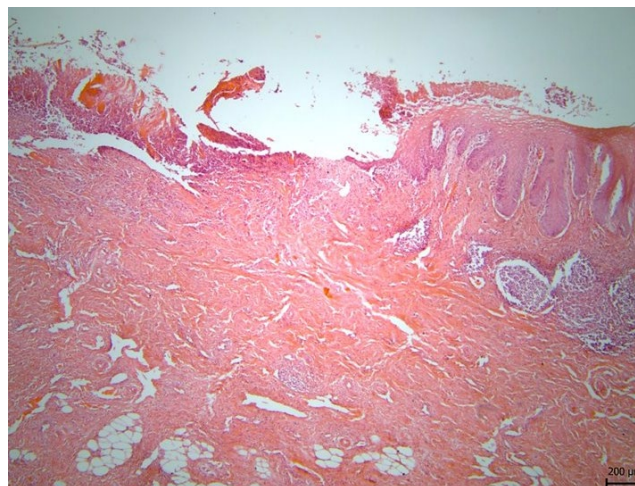
Obr. 1 Fyziologická sliznica *pars esophagea*. EP – viacvrstvový dlaždicovitý epitel, LP – lamina propria mucosae MM – lamina muscularis mucosae, TS – tela submucosa, TM – tunica muscularis.

Parakeratóza bola najčastejšie pozorovanou patologickou zmenou a prejavovala sa hyperpláziou viacvrstvého dlaždicového epitelu a zhrubnutím *stratum corneum* so zachovanou prítomnosťou jadier aj v povrchových vrstvách zmeneného epitelu. Typickým nálezom boli intraepitelové štrbiny rôznej hĺbky, naznačujúce poruchu medzibunkovej kohézie, miestami sprevádzané separáciou povrchových parakeratóznych vrstiev od podkladového epitelu, bez prítomnosti výraznej zápalovej infiltrácie (Obr. 2).



Obr. 2 Parakeratóza *pars esophagea*

Erozívne zmeny boli charakterizované stratou krycieho epitelu s expozíciou *lamina propria mucosae*, sprevádzané exfoliáciou buniek a fragmentáciou epitelu. Na spodine erózií bola prítomná akútna zápalová reakcia s dominanciou neutrofilných granulocytov, miestami aj lymfoidné agregáty (Obr. 3).



Obr. 3 Erózia *pars esophagea*.

Diskusia

Výsledky tejto štúdie potvrdzujú, že parakeratóza predstavuje významné počiatočné štádium v patogenéze žalúdočných vredov u ošipáných. Ide o dynamický a potenciálne reverzibilný proces, pri ktorom je morfológická kontinuita epitelu zachovaná, avšak jeho bariérová funkcia

je oslabená, čo zvyšuje náchylnosť sliznice na pôsobenie agresívnych faktorov žalúdočného prostredia. Retencia jadier v *stratum corneum* poukazuje na poruchu terminálnej diferenciácie epitelových buniek a vznik štrukturálne nezrelého epitelu so zníženou mechanickou odolnosťou (3). Narušenie medzibunkovej kohézie vedie k tvorbe intraepiteliálnych štrbín, ktoré umožňujú penetráciu kyslých komponentov žalúdočného obsahu. Porucha epitelovej bariéry vedie k zvýšenej permeabilite pre vodíkové ióny, čo prispieva k poškodeniu povrchových vrstiev sliznice (1, 7). Tento mechanizmus predstavuje kľúčový faktor prechodu k erozívnym léziám. Parakeratóza je považovaná za potenciálne reverzibilný stav, pričom po odstránení vyvolávajúcich faktorov, najmä úpravou nutričných a manažmentových podmienok, môže dôjsť k obnove epitelovej štruktúry a zlepšeniu bariérovej funkcie sliznice (4, 8). Pri ich pretrvávaní môže dochádzať k progresii do erozívnych a ulceratívnych lézií.

Erozívne lézie predstavujú pokročilé štádium charakterizované stratou epitelu a akútnou zápalovou reakciou s dominanciou neutrofilov, čo zodpovedá mechanizmom popísaným v predchádzajúcich štúdiách (2, 5). V niektorých prípadoch boli prítomné aj lymfoidné agregáty, naznačujúce sprievodnú imunitnú odpoveď. Prechod z parakeratózy k erózii predstavuje kritický bod v patogenéze ochorenia a odráža zlyhanie bariérovej funkcie epitelu (9). Významnú úlohu zohrávajú aj nutričné faktory, najmä fyzikálna štruktúra krmiva, ktorá ovplyvňuje kontakt kyseliny so sliznicou (6, 10). Úloha baktérií rodu *Helicobacter* v patogenéze gastrických ulcerácií ošipáných zostáva nejednoznačná a pravdepodobne má skôr kofaktorový význam (11, 12). Parakeratóza a erózie tak predstavujú kontinuum morfológických zmien vedúcich k postupnej deštrukcii bariérovej funkcie sliznice *pars esophagea*.

Súhrn

Parakeratóza sliznice *pars esophagea* predstavuje skoré a potenciálne reverzibilné štádium v patogenéze žalúdočných vredov u ošipáných. Ide o morfológický prejav narušenej diferenciácie epitelu, ktorý môže regresovať po odstránení vyvolávajúcich faktorov, najmä úpravou nutričných a manažmentových podmienok chovu. Pri pretrvávaní nepriaznivých podmienok dochádza k progresii poškodenia, zlyhaniu bariérovej funkcie epitelu a prechodu k erozívnym léziám sprevádzaným zápalovou odpoveďou. Výsledky potvrdzujú multifaktoriálny charakter vzniku žalúdočných vredov, pričom parakeratóza predstavuje kľúčový skorý morfológický marker zníženej odolnosti sliznice. Jej včasná identifikácia umožňuje implementáciu preventívnych opatrení a zníženie výskytu žalúdočných lézií v chove ošipáných.

Literatúra

1. Friendship, R. M.: J Swine Health Prod, 2004; 12(1):34–35.
2. Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., Palmer, N.: Elsevier, 2015.
3. Roels, S., Ducatelle, R., Broekaert, D.: Res Vet Sci, 1997; 62(2):165–169.
4. Cappai, M. G., Picciau, M., Pinna, W.: Vet Res, 2013; 9:36.
5. Doster, A. R.: Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2000; 16(1):163–174.
6. Cybulski, P., Woźniak, A., Larska, M. et al.: Porc Health Manag, 2024; 10:11
7. Argenzio, R. A., Eisemann, J. H.: Am J Vet Res, 1996; 57(4):564–573.
8. Tarnawski, A. S., Ahluwalia, A., Jones, M. K.: Cells, 2021; 10(8):1964.
9. Embaye, H., Thomlinson, J. R., Lawrence, T. L. J.: J Comp Pathol, 1990; 103(3):253–264.
10. De Witte, C., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.: Vet J, 2018; 236:56–61.
11. Zhang, G., Ducatelle, R., Mihi, B. et al.: Vet Res, 2016; 47:101.
12. Saha, A., Hammond, C. E., Beeson, C. et al.: Gut, 2010; 59(7):874–881.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0040/24: Výskum prevalencie, etiologických a predispozičných faktorov žalúdočných lézií u ošípaných.

VPLYV ŠALVIE LEKÁRSKEJ NA VÝVIN PEČENE

THE EFFECT OF SALVIA OFFICINALIS ON LIVER DEVELOPMENT

Eva Petrovová¹, Miriam Bačkorová², Zuzana Demčišáková¹, Katarína Holovská¹, Lenka Luptáková³, Alexandra Hošková¹

¹ *Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

² *Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

³ *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*
eva.petrovova@uvlf.sk

Abstract

Salvia officinalis L. is a traditionally used medicinal plant rich in biologically active compounds, but they may exhibit potential toxicity at higher doses. The aim of the study was to assess and compared the effect of extracts prepared from *Salvia officinalis* cultivated in the botanical garden and commercial herbal product (Leros) on embryonic liver development. The chicken embryo was used as an alternative *in vivo* animal model. Degenerative and necrotic changes of the liver parenchyma were observed after Leros product administration. The study contributes to the assessment of the safety of plant extracts during embryonic development and highlights the need for further research focused on isolated active plant compounds.

Úvod

Rastlinné extrakty sú široko využívané v tradičnej aj modernej medicíne. Mnohé bioaktívne látky rastlinného pôvodu vykazujú priaznivé farmakologické účinky, avšak pri vyšších koncentráciách môžu vykazovať aj toxické alebo embryotoxické účinky. V prípade *Salvia officinalis* je pozornosť venovaná najmä obsahu monoterpénu tujónu, ktorý je spájaný s potenciálnymi toxickými účinkami a môže ovplyvňovať rôzne fyziologické procesy organizmu (1). Pečeň patrí medzi kľúčové orgány pri hodnotení účinkov biologicky aktívnych látok na vyvíjajúci sa organizmus. Experimentálne štúdie naznačujú, že vyššie koncentrácie extraktov *Salvia officinalis* môžu ovplyvniť oxidačné parametre a histologickú štruktúru tkaniva pečene embryí, čo poukazuje na potrebu ďalšieho skúmania bezpečnosti týchto látok počas embryonálneho vývoja (2). Pri štúdiu embryotoxických účinkov biologicky aktívnych látok sa využíva *in vivo* alternatívny zvierací model model kuracieho embrya. Vďaka jednoduchej

manipulácii, časovej nenáročnosti a porovnateľnému vývinu s ľudským embryom, predstavuje kuracie embryo vhodný model spĺňajúci princípy 3R (Replacement, Reduction, Refinement; 3). Napriek širokému využívaniu liečivých rastlín stále existuje obmedzené množstvo experimentálnych údajov o ich účinku počas embryonálneho vývoja, najmä pokiaľ ide o možné morfológické a histologické zmeny orgánov. Táto práca je preto zameraná na experimentálne hodnotenie účinku vodného extraktu *Salvia officinalis*, získaného z rôznych zdrojov, na embryonálny vývin pečene kuracieho embrya.

Materiál a metódy

Na experiment bolo použitých 60 oplodnených kuracích vajec plemena Lohmann Brown z certifikovaného chovu Liaharenský podnik Nitra. Vajcia boli inkubované za štandardných podmienok pri teplote $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a 60 % relatívnej vlhkosti v automatickej liahni a rozdelené do kontrolnej skupiny a troch experimentálnych skupín. Kontrolnej skupine bol aplikovaný fyziologický roztok v množstve 100 μl /vajce. Rovnaký objem testovaných vzoriek vodného extraktu (vzorka vňate z univerzitnej botanickej záhrady a komerčný preparát Leros) bol aplikovaný v koncentráciách 1 %, 0,5 % a 0,25 %. Vzorky boli aplikované na podškrupinovú membránu (*membrana papyracea*) na 4. embryonálny deň. Na histologické vyšetrenie boli vzorky pečene odobraté na 9. embryonálny deň a spracované štandardným postupom pre prípravu histologických preparátov farbených hematoxilín-eozínom, s hrúbkou rezov 7 μm . Vzorky boli analyzované použitím svetelného mikroskopu Olympus CX 43 s kamerou.

Výsledky

V kontrolnej skupine pozostával parenchým z hepatocytov cylindrického tvaru, s okrúhlym euchromatickým jadrom. Bunky na periférii orgánu boli prevažne kubického tvaru. Hepatocyty boli usporiadané do acinov, alebo krátkych dvojvrstvových trámčov. V centrálnej časti acinov/trámčov sa vyskytovali žľčovú kapiláry. Pečeňové sínusoidy boli vystlané endotelovými bunkami. Sínusoidy na periférii orgánu mali širší lúmen, ako v centrálnej časti pečene. Povrch orgánu bol pokrytý dlaždicovým epitelom, mezotelom. **V experimentálnej skupine Šalvia 0,25 a 0,5 %** bol pečeňový parenchým bez výrazných morfológických zmien. Hepatocyty mali zachovanú veľkosť a tvar, bez zmien v usporiadaní acinov/trámčov. Len na niektorých miestach došlo k miernej dilatácii žľčovú kapilár. **V experimentálnej skupine Šalvia 1 %** bol pečeňový parenchým bez výrazných morfológických zmien. V niektorých častiach orgánu boli

pozorované ložiskové zmeny. Došlo k rozpadu acinov/trámcov, hepatocyty mali nepravidelný tvar. Pečeňové sinusoidy boli dilatované a v ich lúmene boli pozorované poškodené bunky. V experimentálnej skupine s použitím sypanej čajoviny **Leros 0,25 %**, bola pozorovaná zachovaná štruktúra parenchýmu pečene. Miestami bola pozorovaná mierna dilatácia žľčových kapilár. V **experimentálnej skupine Leros 0,5 %** boli zmeny v pečeni len v miernom rozsahu. Štruktúra acinov/trámcov bola zachovaná, miestami nastala mierna dilatácia žľčových kapilár. V centrálnej časti parenchýmu boli ložiská, s vakuolizovanými hepatocytmi a poškodenými acinmi/trámcami. Pri **experimentálnej skupine Leros 1 %** boli morfológické zmeny pozorované v celom parenchýme pečene. Štruktúra acinov/trámcov bola zastretá, pričom lokálne došlo aj k ich rozpadu. Mnohé hepatocyty boli dilatované s presvetlenou cytoplazmou. Na periférii orgánu mali prevažne kubický tvar s pyknotickým jadrom. V niektorých prípadoch sme pozorovali mierne dilatované žľčové kapiláry. Pôsobením vňate šalvie bola pozorovaná vo všetkých experimentálnych skupinách len mierna dilatácia žľčových kapilár. Avšak v skupine **Šalvia 1 %** bola pozorovaná dilatácia pečeňových sinusoid a rozpad acinov. Na druhej strane, vplyv sypanej čajoviny (**Leros**) bol výraznejší. Okrem dilatácie žľčových kapilár, boli v experimentálnej skupine **Leros 0,5 %** pozorované fokálne vakuolizované hepatocyty a poškodené aciny. Podobné morfológické zmeny boli pozorované aj v experimentálnej skupine **Leros 1 %**, avšak už v celom parenchýme pečene.

Diskusia

V súčasnosti sa model kuracieho embrya využíva nielen v oblasti vývojovej biológie, ale aj pri skríningu účinku liečiv, hodnotení embryotoxicity, angiogenézy, hepatotoxicity a štúdiu mechanizmov pôsobenia chemických látok. Dôležitým aspektom je aj skutočnosť, že do 13. dňa inkubácie nie je plne vyvinutý nervový systém schopný vnímania bolesti, čo umožňuje realizovať experimenty v súlade s princípmi 3R (Replacement, Reduction, Refinement; 4). Šalvia lekárska obsahuje široké spektrum sekundárnych metabolitov. Medzi hlavné zložky silice patria monoterpény, najmä α - a β -tujón, 1,8-cineol a gáfor. Okrem toho sú prítomné fenolické zlúčeniny, ako kyselina rozmarínová, diterpény (kyselina karnozová, karnosol) a triterpenoidy vrátane kyseliny ursolovej. Biologická aktivita extraktu je výsledkom synergického pôsobenia týchto látok (5). Tujón patrí medzi najviac diskutované zložky šalvie z hľadiska toxicity. Mechanizmus jeho účinku je spájaný s moduláciou GABA-A receptorov, čo môže viesť k neuroexcitácii pri vyšších dávkach. Regulačné dokumenty EMA upozorňujú na potrebu limitovania príjmu tujónu v potravinách a rastlinných prípravkoch. Prehľadové práce o esenciálnych olejoch poukazujú na potenciálnu embryu a fetotoxicitu niektorých

monoterpénov a odporúčajú opatrnosť pri ich užívaní počas gravidity (6). Hoci väčšina údajov pochádza zo štúdií na hlodavcoch, biologická aktivita týchto látok naznačuje možný vplyv aj na iné vývojové modely. Pečeň predstavuje v embryonálnom období kľúčový metabolický a hematopoetický orgán. V skorých štádiách vývoja je miestom intenzívnej proliferácie hepatoblastov a zároveň centrom embryonálnej hematopoézy (7). Pozorované nekrotické zmeny pečeňového parenchýmu môžu súvisieť s priamym cytotoxickým účinkom niektorých zložiek extraktu, prípadne s indukciou oxidačného stresu. Oxidačný stres je častým mechanizmom hepatotoxicity rastlinných sílic a môže viesť k narušeniu bunkových membrán, mitochondriálnej dysfunkcii a aktivácii apoptotických dráh. Al-Ghamdi et al. (2) sledovali účinok extraktu šalvie lekárskej na vyvíjajúcu sa pečeň kuracieho embrya, zaznamenali degeneratívne zmeny hepatocytov a poškodenie pečeňového tkaniva pri vyšších koncentráciách extraktu, pričom autori poukázali na úlohu oxidačného poškodenia ako hlavného mechanizmu.

Záver

Na základe zistených výsledkov môžeme konštatovať, že vodný extrakt šalvie lekárskej môže ovplyvniť embryonálny vývoj pečene kuracieho embrya. Extrakt z vňate šalvie lekárskej vykazoval miernejší toxický účinok na vývin kuracieho embrya v porovnaní s extraktom z komerčnej čajoviny Leros. Pri extrakte Leros boli pozorované výraznejšie degeneratívne zmeny pečeňového parenchýmu súvisiace s výskytom vakuolizácie hepatocytov a poškodenie acinov v celej štruktúre parenchýmu pečene. Naopak, pri extrakte z vňate šalvie lekárskej boli zaznamenané miernejšie morfológické zmeny (dilatácia žlčových kapilár a sínusoid). Výsledky práce poukazujú na potrebu ďalšieho výskumu zameraného na izolované bioaktívne zložky extraktu, kvantifikáciu ich koncentrácie a podrobnejšie hodnotenie mechanizmov pôsobenia.

Literatúra

1. Anjali, D., Garg., P., Varun, K., Dimple, M.: J Pharma Insight Res, 2024; 2(3): 146-154.
2. Al-Ghamdi, F.A., Aljarari, R.M., Albalawi, N.S.: J Biochem Technol, 2023; 14(3): 59-66.
3. Kundeková, B., Máčajová, M., Meta, M., Čavarga, I., Bilčík, B.: Biology (Basel), 2021; 10(4):301.
4. Kaplan-Arabaci, O., Dančišinová, Z., Paulsen, R.E.: Pharmacol Res Perspect, 2025; 13(2):e70086.
5. Ghorbani, A., Esmailizadeh, M.: J Tradit Complement Med, 2017; 7(4):433-440.
6. Dosoky, N.S., Setzer, W.N.: Int J Mol Sci, 2021; 22(5):2380.
7. Singh, R., Sugumar, K. Embryology, Hematopoiesis. [Updated 2025 May 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544245/>

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0074/24.

VYUŽITIE IMUNOHISTOCHÉMIE PRI HODNOTENÍ ANTIOXIDAČNÉHO STATUSU V EXPERIMENTÁLNYCH MODELOCH

THE USE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN THE ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT STATUS IN EXPERIMENTAL MODELS

Bronislava Pokorná¹, Slavomíra Štefancová¹, Eva Petrovová², Lenka Luptáková¹

¹Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

²Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

bronislava.pokorna@student.uvlf.sk

Abstract

Immunohistochemistry is a key method for the precise localization and visualization of specific proteins in tissue structure. The study of oxidative stress allows monitoring of antioxidant enzymes, especially superoxide dismutase isoforms (SOD), across different cell populations. This technique provides valuable information about cellular adaptation during embryonic development, tumour progression, and toxic organ damage. Thanks to the high specificity of the antibodies, it is possible to identify changes in protein levels that are related to the disruption of cellular homeostasis. Semi-quantitative evaluation of the intensity of colouring allows the interpretation of the level of the body's antioxidant response to adverse stimuli. The method thus combines morphological information with molecular data, which is essential for understanding disease mechanisms in experimental models. It is therefore considered an irreplaceable tool in modern biomedicine and toxicology.

Úvod

Reaktívne formy kyslíka (ROS) vznikajú ako prirodzený vedľajší produkt aeróbného metabolizmu, najmä v mitochondriách počas prenosu elektrónov v dýchacom reťazci. Ich nadmerná produkcia vedie k oxidačnému poškodeniu lipidov, proteínov a nukleových kyselín, čo narúša bunkovú homeostázu (1). Na ochranu pred týmto poškodením bunky využívajú antioxidantné obranné mechanizmy, medzi ktoré patrí aj superoxiddismutáza (SOD). Mitochondriálna forma SOD (MnSOD) katalyzuje premenu superoxidového aniónu na menej reaktívny peroxid vodíka (2). Imunohistochemické metódy umožňujú detekciu a semi-kvantitatívne hodnotenie expresie SOD priamo v tkanivových rezoch, čím poskytujú informácie o jej distribúcii a intenzite v jednotlivých bunkových populáciách (3). Viaceré štúdie

ukazujú zvýšenú expresiu MnSOD v nádorových tkanivách. Pri kolorektálnom karcinóme bola pozorovaná už v štádiu adenómu aj adenokarcinómu a súvisela s progresívnejšími znakmi ochorenia. Podobne sa zvýšená expresia MnSOD a katalázy preukázala aj pri žalúdočnom adenokarcinóme v porovnaní s nenádorovým tkanivom, čo môže súvisieť s adaptáciou buniek na zvýšený oxidačný stres a rozvojom intestinálneho typu nádoru (4, 2). Tieto poznatky potvrdzujú, že imunohistochemická analýza antioxidantných enzýmov predstavuje dôležitý nástroj na sledovanie adaptácie buniek na oxidačný stres a pochopenie molekulárnych mechanizmov progresie ochorení v experimentálnych modeloch.

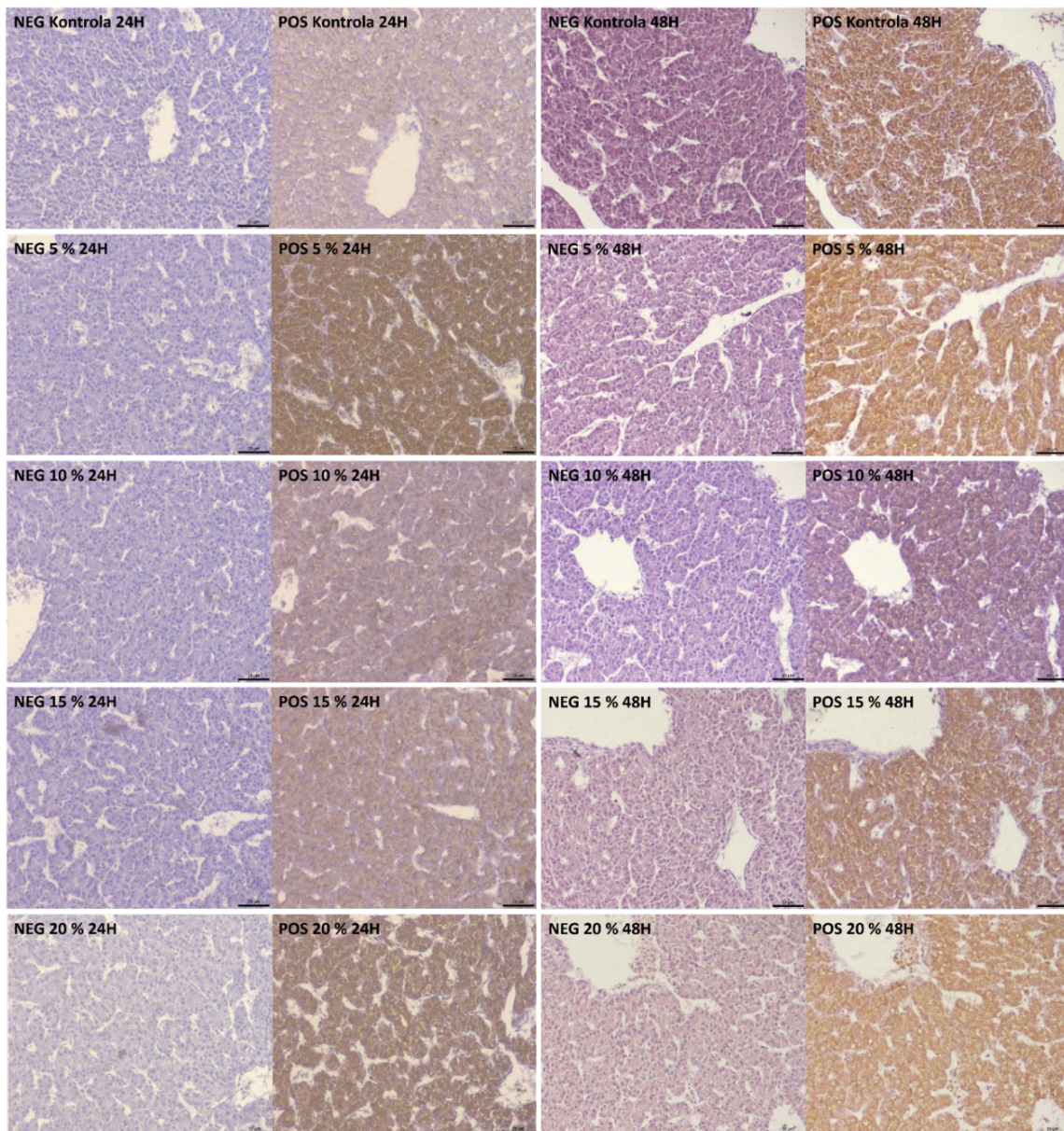
Využitie experimentálnych modelov v analýze antioxidantnej odpovede

Imunohistochemické (IHC) štúdie ukazujú, že expresia izoform SOD sa výrazne líši podľa typu tkaniva a bunkovej populácie. V ľudskom pankrease bola preukázaná výrazná prítomnosť SOD1 a SOD2 najmä v acinoch a vývodoch, zatiaľ čo SOD3 sa vyskytovala len minimálne (5). Táto tkanivová špecifita sa formuje už počas prenatálneho vývoja. Na myších modeloch bola potvrdená široká, no variabilná distribúcia SOD1 v rozvíjajúcich sa systémoch, od centrálnej nervovej sústavy až po endokrinné žľazy, pričom intenzita expresie korelovala s konkrétnym štádiom maturácie orgánov (6). Sledovanie antioxidantných enzýmov je dôležité aj pri patologických stavoch. V myších modeloch neurodegenerácie spojenej s deficitom SOD2 umožnila imunohistochemická analýza nielen identifikovať morfologické poškodenie neurónov, ako je vakuolizácia neuropilu, ale aj zachytiť sprievodnú gliovú odpoveď (7). Hladiny SOD sa ukazujú taktiež ako citlivý ukazovateľ akútneho metabolického stresu. Výskum Park et al. (8) preukázal výrazný pokles SOD1 a SOD2 v pečeni potkanov po zástave srdca spôsobenej nedostatkom kyslíka. Tento pokles naznačuje, že náhly oxidačný stres rýchlo vyčerpáva zásoby týchto enzýmov v tkanive.

Osobitnú kategóriu tvorí štúdium environmentálnych a exogénnych toxínov. Napríklad vystavenie kuracích embryí ťažkým kovom, ako je kadmium (Cd), spôsobilo výrazné zníženie hladín SOD2 a katalázy, čo potvrdzuje priamy negatívny vplyv xenobiotík na proteosyntézu antioxidantných enzýmov (9). V nadväznosti na tieto poznatky sme sa v našej štúdií zamerali na účinok etanolu v rovnakom modeli, pričom aj my sme využili imunohistochemickú metódu na sledovanie antioxidantného enzýmu SOD2 v pečeni kuracieho embrya. Embryá boli vystavené rôznym koncentráciám etanolu počas 24 a 48 hodín. Po 24 hodinách bola intenzita slabšia, pričom s rastúcou koncentráciou etanolu sa mierne zvyšovala. Po 48 hodinách bola imunoreaktivita SOD2 vo všetkých skupinách výraznejšia než pri kratšej expozícii. Rozdiely

medzi jednotlivými koncentraciami etanolu však už neboli výrazné, čo naznačuje, že dôležitejšiu úlohu než samotná koncentrácia zohráva dĺžka pôsobenia etanolu.

Obrázok č. 1 zobrazuje imunohistochemické farbenie SOD2 v pečeni kuracieho embrya po expozícii rôznymi koncentraciami etanolu (5 %, 10 %, 15 %, 20 %) a po dvoch expozičných časoch (24H a 48H). Pre každú skupinu je uvedená negatívna kontrola (NEG, vľavo) a príslušná experimentálna vzorka (POS, vpravo).



Obr. 1. Imunohistochemický dôkaz SOD2 v hepatálnom parenchýme kuracieho embrya. NEG – negatívna vzorka, POS – pozitívna vzorka, mierka 50 μ m.

Všetky uvedené štúdie sa zhodujú v metodickom prístupe, kde sa využíva vizualizácia pomocou chromogénneho systému diaminobenzidín–H₂O₂ (DAB), ktorý vytvára typické hnedé sfarbenie v mieste prítomnosti sledovaného antigénu. Bunkové jadrá boli následne kontrastne dofarbené hematoxylínom, čo umožňuje lepšiu orientáciu v tkanivovej architektúre. Tento postup umožňuje presnú topografickú analýzu antioxidačnej kapacity, čo je nevyhnutné pre pochopenie mechanizmov progresie ochorení v rôznych experimentálnych štúdiách.

Súhrn

Imunohistochemia predstavuje významný nástroj modernej medicíny, ktorý umožňuje lokalizáciu a detekciu špecifických proteínov priamo v tkanivách. Vďaka využitiu protilátok poskytuje cenné informácie o bunkových a molekulárnych procesoch, ktoré sa podieľajú na fyziologickom aj patologickom vývine organizmu.

Literatúra

1. Multani, P.K. et al.: Academic Press 2014; 983-1001.
2. Piecuch, A. et al.: Prz Gastroenterol, 2016; (11)4: 239-246.
3. Martin, R. C.G. et al.: Cancer Invest, 2010; (28)8: 813-819.
4. Hwang, T.S. et al.: Europ J Surg Oncol, 2007; (33)4: 474-479.
5. Vrzgula, M. et al.: Bratisl Med J, 2024; 125(9).
6. Yon, J.M. et al.: J Vet Sci, 2008; 9(3): 233-240.
7. Oh, S.S. et al.: Neurosci, 2012; 212: 201-21.
8. Park, Y. et al.: Acute Crit Care, 2020; 35(4): 286-295.
9. Doi, T. et al.: Reprod Toxicol, 2010; 30(2): 229-230.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore grantovej agentúry VEGA 1/0373/24.

HISTOLOGICKÁ CHARAKTERIZÁCIA POŠKODENIA CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY PO EXPOZÍCII JEDU „PĽUVAJÚCEJ KOBRY“ DRUHU *NAJA ASHEI*

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CHORIOALLANTOIC MEMBRANE INJURY INDUCED BY VENOM EXPOSURE FROM THE SPITTING COBRA *NAJA ASHEI*

**Magdaléna Polláková¹, Zuzana Demčíšáková², Adrián Krúpa¹, Vladimír Petrilla^{1,3},
Monika Petrillová⁴, Eva Petrovová², Drahomíra Sopková¹, Jaroslav Legáth^{5,6}**

¹ *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

² *Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

³ *Zoologické oddelenie, Zoologická záhrada, Široká 31, 040 06 Košice-Kavečany, SR*

⁴ *Katedra všeobecných kompetencií, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

⁵ *Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

⁶ *Katedra biotechnológie a bioinformatiky, Fakulta chémie, Technická univerzita v Rzeszówe, Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów, Poľsko.*

magdalena.pollakova@uvlf.sk

Abstract

“Spitting cobras” of the genus *Naja* constitute a distinct group of snakes capable of actively ejecting venom toward the eyes of a predator, where it can induce local tissue damage and irritation. This study aims to evaluate the vasotoxic, hemotoxic, and cytotoxic effects of *Naja ashei* venom using the chick chorioallantoic membrane (CAM) model, supported by histological analysis. Immediately following exposure, vascular alterations were observed, while subsequent histological examination revealed extensive tissue damage. The results confirm the presence of haemotoxins, vasotoxins and cytotoxins in *Naja ashei* venom and support similar pathophysiological effects following ocular exposure to the venom.

Úvod

„Pľuvajúce kobry“ predstavujú špecifickú skupinu hadov z rodu *Naja*, ktoré sú známe unikátnym obranným mechanizmom aktívneho vypudzovania jedu, cielene smerovaného na oblasť tváre a oči predátora. V zasiahnutom oku vyvoláva jed „pľuvajúcich kobier“ výrazné lokálne poškodenie tkanív sprevádzané silnou bolesťou, zápalom a poruchou integrity rohovky, čo môže v závažných prípadoch viesť až k trvalému poškodeniu zraku (1).

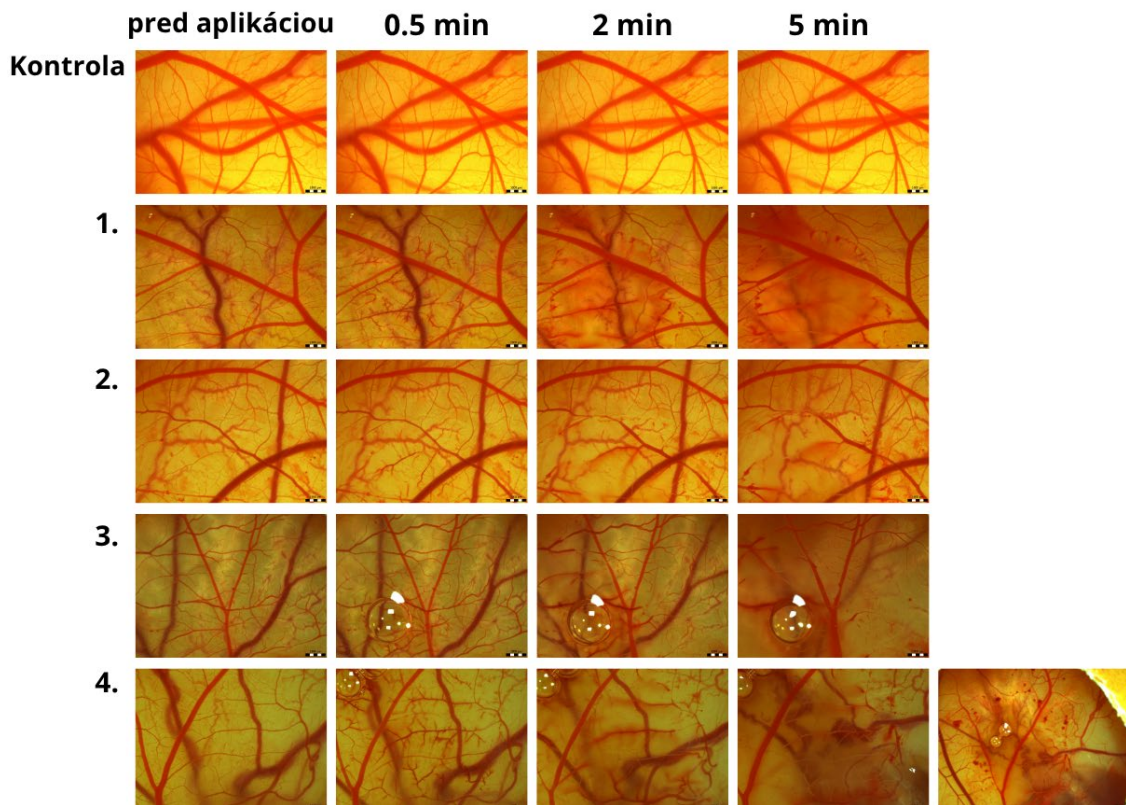
Cieľom tejto experimentálnej štúdie je nadviazať na náš predchádzajúci výskum jedov „plávajúcich kobier“. Pilotná štúdia využívajúca chorioalantoickú membránu (CAM) kuracích embryí na hodnotenie vazoaktivity a hemotoxicity jedov nám umožnila sledovať a zdokumentovať deštruktívny vplyv jedu hada druhu *Naja ashei* na cievy CAM. Bezprostredne po aplikácii roztokov jedu na CAM sme pozorovali odkrvenie a vymiznutie jedom zasiahnutých ciev, čo bolo dobre viditeľné vďaka výraznej farebnej zmene (1). Tento mechanizmus účinku jedu nebol okrem „plávajúcich kobier“ zaznamenaný pri žiadnej inej skupine hadov. Vzhľadom na to sme sa rozhodli postup zopakovať a doplniť morfológické hodnotenie pomocou histologickej analýzy, čo nám umožnilo detailnejšie posúdenie rozsahu poškodenia tkaniva.

Materiál a metódy

Experimentálny výskum bol realizovaný na oplodnených kuracích vajciach (Lohmann Brown, *Gallus gallus domesticus*) z certifikovaného chovu (Párovské Háje, Nitra, Slovensko). Inkubátor (ET 49, ART 549) zabezpečoval stabilné podmienky (37,5 °C; vlhkosť 60 %; automatické otáčanie) počas 240 hodín inkubácie. Deň začiatku inkubácie označujeme ako 0. embryonálny deň (0. ED). Na 3. ED boli z každého vajca asepticky odoberaté 2 ml bielka. Aplikácia jedu prebiehala na 9. ED. Z tupého konca každého vajca bola odstránená vrchná časť škrupiny spolu s podškrupinovou blanou, čím sa sprístupnili a odhalili cievy CAM. Natívny jed hada druhu *Naja ashei* bol aplikovaný do skupiny 4 vajec v dávke 5 µl. V kontrolnej skupine bolo do 4 vajec aplikovaných 5 µl *aqua pro injectione*. Bezprostredne po aplikácii jedu boli počas intervalu 5 minút sledované a fotograficky dokumentované (Olympus SZ61; Quick Photo Micro) novovznikajúce vaskulárne reakcie (hyperémia, hemorágie, hemokoagulácia) na cievach CAM. Pomocou bodovacieho systému podľa Luepkého boli jednotlivým reakciám pridelené hodnoty, z ktorých bolo následne vypočítané kumulatívne skóre a stanovený iritačný potenciál (2). Z CAM s najvýraznejším vaskulárnym poškodením, ako aj z kontrolnej skupiny, boli odoberaté vzorky na histologickú analýzu s cieľom detailného zhodnotenia jedom indukovaných patologických zmien. Vzorky tkanív boli fixované v Dentsovom roztoku, zalievané do parafínu, rezané na rezy hrúbky 7 µm pomocou mikrotómu a následne farbené hematoxylínom a eozínom (H&E). Preparáty boli montované do trvalého média a histologické zmeny vo vaskulárnej štruktúre a okolitých tkanivách boli hodnotené svetelným mikroskopom (Olympus CX43) vybaveným digitálnou kamerou (PROMICAM 3-5CP+) pri 20× zväčšení (3).

Výsledky

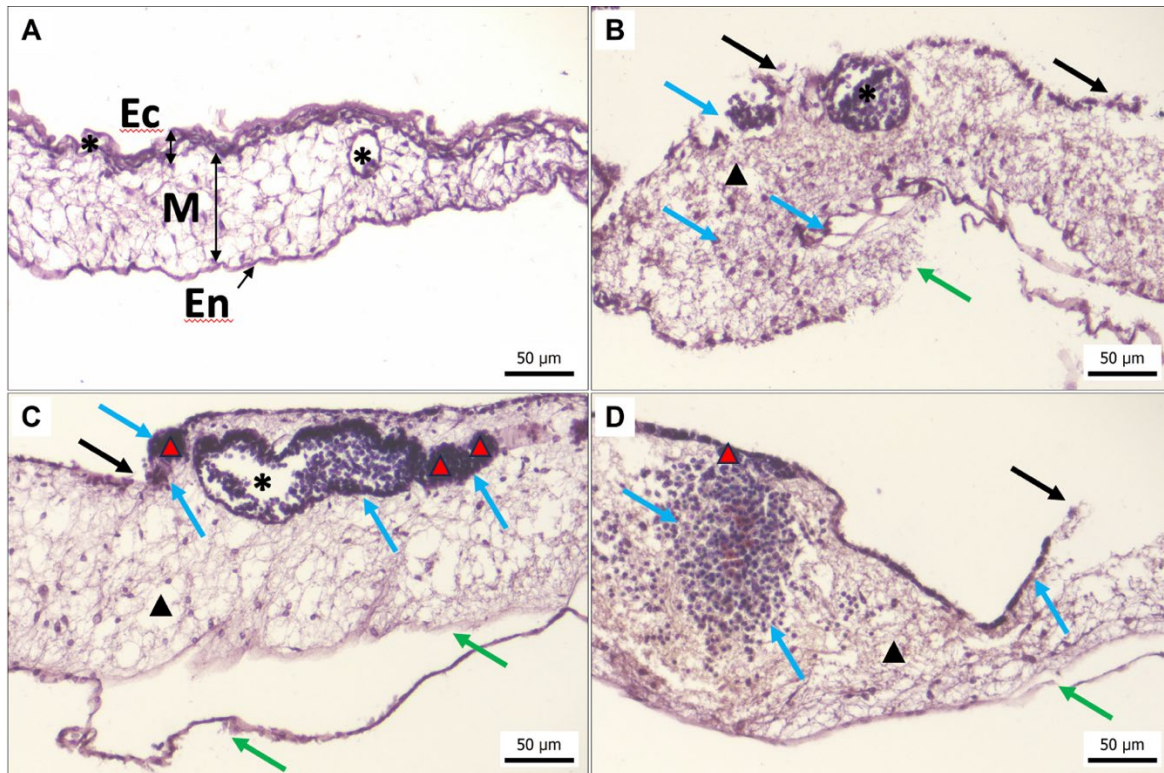
Už v prvých 30 sekundách po aplikácii 5 μ l jedu hada druhu *Naja ashei* na cievy CAM boli pozorované prejavy hyperémie a vazodilatácie jedom zasiahnutých ciev. V druhej minúte po aplikácii bolo možné v okolí týchto ciev pozorovať mierne krvácanie a postupnú stratu krvi z lúmenu ciev až po jej úplné vymiznutie, čo sa na pohľad prejavilo ako prítomnosť ciev bielo-priesvitnej farby. Jed sa po aplikácii postupne širil CAM, pričom na rozhraní medzi jedom zasiahnutou a jedom nezasiadnutou membránou bolo možné pozorovať jemnú hemoragickú líniu a miestami drobné krvné zrazeniny. Na základe stanoveného kumulatívneho skóre 14,75 bol výsledný iritačný potenciál pre dávku jedu *N. ashei* 5 μ l vyhodnotený ako silný. V jednom prípade došlo k vzniku výraznejších krvných zrazenín, ktoré však neboli viditeľné v nastavenom zornom poli a na ich zachytenie bolo potrebné použiť slabšie zväčšenie 0,63 (Obr. 1). Z tejto CAM bola následne odobratá vzorka na histologickú analýzu.



Obr. 1 Mikroskopické zmeny na CAM pozorované po aplikácii 5 μ l natívneho jedu hada druhu *Naja ashei* (1-4) v porovnaní s kontrolou; mierka 1 mm.

V porovnaní s fyziologickým obrazom kontrolnej CAM (intaktná trojvrstvová architektúra, Obr. 2A) vykazovala experimentálna vzorka výrazné histologické zmeny. Ektoderm bol fokálne poškodený až lokálne chýbajúci, pričom subektodermálne kapiláry mali narušenú cievnu stenu.

Mezoderm vykazoval výraznú degeneráciu s redukciou vláknitých štruktúr a stratou normálnej architektúry. Endoderm bol výrazne poškodený a lokálne oddelený od mezodermu. Prítomná bola extravazácia erytrocytov indikujúca hemorágiu, ako aj pravdepodobná zápalová infiltrácia. Difúzny výskyt oválnych buniek (endotelové a zápalové bunky – monocyty/makrofágy) poukazuje na poškodenie tkaniva (Obr. 2B-D).



Obr. 2 Histologická analýza CAM po pôsobení jedu *Naja ashei*: CTR (A) a experimentálne vzorky (B-D); Ec – ektoderm; M – mezoderm; En – endoderm; * – krvné cievy; ↓ – fokálne narušenie ektodermu; ↓ – vaskulárne zmeny: extravazácia erytrocytov, hemorágia, disrupcia cievnej steny; ↓ – disrupcia endodermu; ▲ – redukcia perivaskulárneho spojivového tkaniva; ▲ – mikrotromby; Farbenie H&E; mierka 50 µm.

Diskusia

Zloženie jedu hadov druhu *Naja ashei* bolo predmetom skúmania skorších analýz, kedy dvojrozmerná elektroforéza a hmotnostná spektrometria MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) odhalili prítomnosť zložiek zo skupín 3FTx (three-finger toxíny), PLA₂ (fosfolipázy A₂), v menšom zastúpení aj proteínov bohatých na cysteín, 5'-nukleotidáz, metaloproteináz a proteínov, ktoré doposiaľ neboli zistené v jede iných afrických pľuvajúcich kobier – konkrétne CVF (cobra venom factor) a VNGF (venom nerve growth factor) (4). Napriek prítomnosti neurotoxických komponentov boli po aplikácii jedu na

cievy CAM pozorované výrazné poškodenia ciev, vaskulárna iritácia a alterácie CAM, čo poukazuje na významný vazotoxický a cytotoxický efekt jedu hada druhu *N. ashei*. Tieto účinky sú pravdepodobne sprostredkované PLA₂ a metaloproteinázami, ktoré narúšajú integritu cievnej steny a extracelulárnej matrix. Vzhľadom na to, že sa jedná o jed tzv. „plávajúcej kobry“, pre ktoré je charakteristický lokálny okulotoxický efekt, je prítomnosť výrazných lokálnych tkanivových a vaskulárnych poškodení v súlade s očakávaným biologickým profilom tohto typu jedu. Fotografie zhotovené počas HET-CAM testu demonštrujú účinok jedu na cievy CAM a možno predpokladať, že podobný mechanizmus sa uplatňuje aj pri poškodení konjunktiválnych ciev po zasiahnutí oka jedom. Približne po 1-2 minútach od aplikácie jedu bolo možné pozorovať vznik drobných krvných zrazenín, najmä v oblastiach, kde dochádzalo k slabým hemorágiám. Výrazne prekrvené cievy sa postupne stávali priehľadnými a krv sa jemne rozptyľovala v ich okolí bez masívneho krvácania. Tento jav bol v literatúre popísaný ako tzv. ghost vessels, teda objavenie sa odkrvených bielo-priesvitných ciev, čo mohlo byť dôsledkom intravaskulárnej koagulácie, kedy enzýmy ako PLA₂ a ďalšie proteíny môžu narušiť hemostázu a zapríčiniť vznik trombov, čím sa zastaví prietok krvi v postihnutej oblasti. V našej predchádzajúcej práci bol hodnotený vplyv zriedeného jedu hadov druhu *Naja ashei* na cievy CAM (1), pričom charakter pozorovaných účinkov sa zhoduje aj s aktuálnymi výsledkami.

Súhrn

Získané výsledky potvrdzujú, že jed hada druhu *Naja ashei* vykazuje výrazný vazotoxický, hemotoxický a cytotoxický účinok. Vaskulárne zmeny pozorované na cievach CAM, vrátane hyperémie, hemorágií, hemokoagulácie, zmien cievneho tonusu a vzniku tzv. „ghost vessels“, poukazujú na významné narušenie integrity cievnej steny a mikrocirkulácie. Tieto účinky sú pravdepodobne sprostredkované PLA₂ a metaloproteinázami hadieho jedu, ktoré vedú k degradácii extracelulárnej matrix, poškodeniu endotelu a následným poruchám hemostázy, vrátane tvorby krvných zrazenín. Výsledky histologickej analýzy odhalili prítomnosť rozsiahlych štrukturálnych zmien CAM, ako sú degenerácia mezodermu, poškodenie epitelových vrstiev a extravazácia erytrocytov. Vzhľadom na známy okulotoxický charakter jedu „plávajúcich kobier“ možno predpokladať, že mechanizmy poškodenia pozorované na CAM modeli sa uplatňujú v lokálnych účinkoch na cievach jedom zasiahnutého oka. Štúdia tak rozširuje doterajšie poznatky o biologickej aktivite jedu hadov druhu *N. ashei* a potvrdzuje význam kombinovaného vaskulárneho, hemotoxického a cytotoxického pôsobenia jeho zložiek. Perspektívou ďalšieho výskumu je experimentálne overenie účinku jedu hadov druhu *N. ashei* po inaktivácii špecifickým antivenínom.

Literatúra

1. Polláková, M., Petrilla, V., Andrejčáková, Z. et al.: *Toxicon*, 2021; 189:79-90.
2. Knight, R.B., Dvorcakova, S., Luptakova, L. et al.: *Toxicon*, 2019; 158:69-76.
3. Demcisakova, Z., Luptakova, L., Tirpakova, Z. et al.: *Cancers (Basel)*, 2022; 14(17):4194.
4. Hus, K.K., Buczkowicz, J., Petrilla, V. et al.: *Molecules*, 2018; 23(3):609.

Výskum bol realizovaný ako súčasť grantových úloh APVV-22- 0101 a KEGA 004UVLF - 4/2023 riešených na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

POUŽITIE ULTRAZVUKU V DIAGNOSTIKE OCHORENÍ TEMPOROMANDIBULÁRNEHO KLĚBU

THE USE OF ULTRASOUND IN DIAGNOSTICS OF TEMPOROMANDIBULAR JOINT DISORDERS

Mirela Rozprávková¹, Marko Vrzgula¹

¹*Ústav anatómie, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, 040 01 Košice, SR*

mirela.rozpravkova@upjs.sk

Abstract

Ultrasound examination (USG) of the Temporomandibular Joint (TMJ) is an essential technique for the assessment of synovial changes and microvascularization changes, as well as dynamic examination of simultaneous movement of anatomical structures of TMJ. USG is suggested as an entry-level diagnostic screening tool. Patients found with TMJ alterations on USG need to be directed to second-level investigations, such as MRI and CT.

Úvod

Myofasciálny bolestivý dysfunkčný syndróm temporomandibulárneho kĺbu (TMK) (TMJD, Temporomandibular Joint Disorder, Costenov syndróm) je extrakapsulárny, multifaktoriálny a viacsymptómový. Pacienti sa sťažujú na bolesť v preaurikulárnej oblasti, rannú stuhnutosť žuvacích svalov, zmenenú pohyblivosť sánky, prítomné sú auskultačné fenomény a ušné symptómy (tinnitus, vertigo, otalgia) (1). Obvykle je liečba konzervatívna a používajú sa rozličné druhy náhrzových dláh s dočasným zvýšením zhryzu, mechanické vibrácie ultrazvukom, diadynamické prúdy, fyzioterapia žuvacích svalov, biostimulačný laser, magnetoterapia alebo akupunktúra a joga (2, 3). Niekedy je indikovaná injekčná aplikácia anestetík, chondroprotektív a glukokortikoidov do štruktúr kĺbu. Pri závažnejšom postihnutí kĺbu a morfológických zmenách na RTG je nutný chirurgický prístup s úplnou náhradou ektoprotézou (4). Otázkou je použitie ultrazvuku pri diagnostike ochorenia TMK.

Materiál a metódy

GE - LOGIQ 3 PRO, ultrazvukový prístroj na Ústave anatómie LF UPJŠ, je mnohostranný, praktický ultrazvukový systém vybavený dopplerom (PW, PDI (power doppler imaging), DPDI (directional power doppler imaging)). Ultrazvukové vyšetrenie bolo vykonané na dvoch

pacientoch. Žena (F) (40 r.), parafunkcia - zatína zuby. Muž (M) (41 r.) negatívna anamnéza. Poloha sondy US bola paralelná s Frankfurtskou horizontálnou líniou s otvorenými ústami.

Výsledky

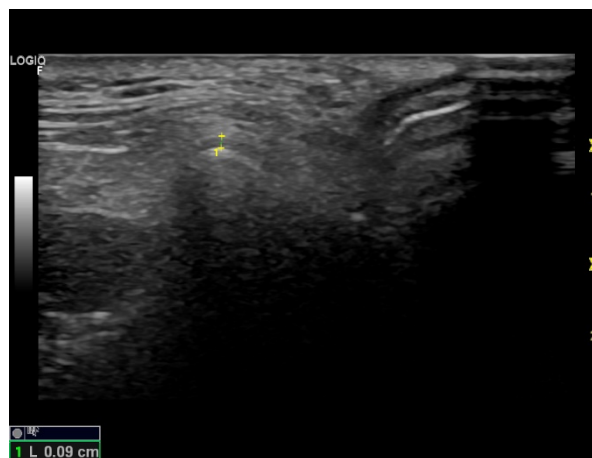
Vzhľad anatomických štruktúr na USG:

Kĺbová platnička, *discus articularis* - obrátená hypoechogénna C - tvarovaná štruktúra

Povrch kondylu, *condylus mandibulae* - hyperechogénny

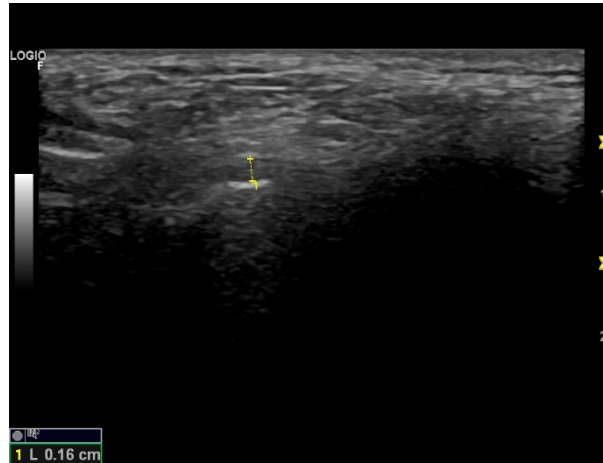
Spojivové tkanivá - kĺbový vak, retrodiskálne tkanivo a svaly (*m. pterygoideus lateralis* a *m. masseter*) – hypo- až hyperechogénne

F: Dynamické USG zobrazenie TMK (žena) – *condylus mandibulae* sa posúva dopredu – hrúbka *discus articularis* = 0,9 mm. Bez patologických zmien TMK a mäkkých tkanív. Koordinovaný pohyb *discus articularis* a *condylus mandibularis*. *Discus articularis* fyziologických rozmerov. Parafunkcia zatiaľ nemá morfológický ani fyziologický prejav v podobe bolesti TMK (Obr. 1). Preventívne odporúčanie: fyzioterapia, joga, zhotovenie náhryzovej dlahy.



Obr. 1 F: Dynamické USG zobrazenie TMK (žena) – hrúbka *discus articularis* = 0,9 mm.

M: Dynamické USG zobrazenie TMK (muž) – hrúbka *discus articularis* = 1,6 mm. Koordinovaný pohyb *discus articularis* a *condylus mandibulae*. *Discus articularis* fyziologických rozmerov (Obr. 2)



Obr. 2 M: Dynamické USG zobrazenie TMK (muž) – hrúbka *discus articularis* = 1,6 mm.

Diskusia

Zobrazovanie TMK pomocou USG je významné pomocné vyšetrenie pri skorom hodnotení zmien TMK. Zobrazovacie vyšetrenie TMK je tiež dôležité pri hodnotení progresie ochorenia a odpovede na terapeutické postupy (5). Konvenčné röntgenové snímky a CT skeny odhaľujú až pokročilé poškodenie TMK, ale neanalyzujú mäkké tkanivá ani zmeny kĺbovej platničky, *discus articularis* či dyskinetické pohyby TMK (6). CT poskytuje presné anatomické detaily, identifikuje potrebu chirurgického zákroku, ale postráda možnosti dynamického zobrazovania TMK (7). MRI je dnes považovaná za súčasný zobrazovací „zlatý štandard“ na hodnotenie zápalových procesov v patológii TMK (8, 9). Šírka kĺbového priestoru nad 1,950 mm u dospeljej populácie je patologická a odporúča sa podrobnejšie vyšetrenie MRI (10). Okrem toho je tento údaj rizikový faktor pre vznik bolesti TMK. *Discus articularis* vykazuje vo svojom tvare veľkú variabilitu. Disk môže predstavovať pomerne hrubá bikonkávna platnička alebo môže byť tvorený iba tenkou väzivovou, perforovanou vrstvou (10). Variabilita *discus articularis* je nezávislá od veku preparátu. Veľkosť disku sa pohybuje v rozsahu 21 – 22 mm × 15 – 18 mm. Hrúbka je po obvode 3 – 4 mm a v strede 1 – 2 mm (11).

Súhrn

Ultrazvukové vyšetrenie (USG) temporomandibulárneho kĺbu (TMK) je nenahraditeľné pri hodnotení synoviálnych zmien, zmien mikrovaskularizácie, ako aj dynamické vyšetrenie

koordinovaného a symetrického pohybu anatomických štruktúr TMK. USG sa odporúča ako diagnostický skriningový nástroj na vstupnej úrovni. Pacienti s patologickými nálezmi TMK na USG by mali byť nasmerovaní na druhostupňové vyšetrenie, CT alebo MRI.

Literatúra

1. Okeson J.P.: Management of Temporomandibular Disorders and Occlusion, 2026; 519.
2. Graber W.: Orthodontics: Current Principles and Techniques, 2022; 992.
3. Proffit W.: Contemporary Orthodontics, 2013; 2768.
4. Lovásová, K. a Kluchová, D.: Topografická anatomia ťažko prístupných a klinicky významných oblastí hlavy, 2010; 183.
5. Uz Zaman, M., Alam, M., Alghtani, N., et al.: J Oral Rehabil, 2025; 52(2): 243-253.
6. Mallya, S.M., Mansur, A., Cohen, J., et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2022; 134(2):639-648.
7. Karabulut, I., Diracoglu, D., Capan, N., et al.: Cranio, 2025; 43(2): 339-352.
8. Luo, D., Cheng, Qiu, Ruizhi, Zhou, et al.: Dentomaxillofac Radiol, 2025; 83(3): 1078.
9. Tenório, BB, Rocha, T., De andrade B., et al.: Oral Radiol, 2026;. 31(34): 339-348.
10. Rozprávková, M., Lovásová, K., Sedlatá Jurásková, E., et al.: StomaTeam, 2017; 5(78): 139-140.
11. Feneis H. et al.: Anatomický obrazový slovník, 1996; 464.

Táto práca bola podporená grantom KEGA 006UPJS-4-2024.

HODNOTENIE TOXICITY ZMESI MIKONAZOL NITRÁTU A ACETAMIPRIDU PO 24 H EXPOZÍCII V BOVINNÝCH LYMFOCYTOCH

TOXICITY EVALUATION OF A MIXTURE OF MICONAZOLE NITRATE AND ACETAMIPRIDE AFTER 24 H EXPOSURE IN BOVINE LYMPHOCYTES

Viera Schwarzbacherová^{1,2}, Alžbeta Florková¹, Jana Halušková¹, Martina Galdíková¹

¹*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Faculty of Biotechnology, Collegium Medicum, University of Rzeszow, Pigoia st. 1,
Rzeszow, PL*

viera.schwarzbacherova@uvlf.sk

Abstract

In this study we evaluated the genotoxic and cytotoxic effects of a mixture of miconazole nitrate (antifungal drug) and acetamiprid (neonicotinoid insecticide) in bovine lymphocytes *in vitro*. Peripheral blood lymphocytes from bovine blood were exposed to concentrations of 0.625 to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 24 h. The results showed a significant increase in the frequency of micronuclei ($p < 0.05$; $p < 0.01$) and a decrease in the proliferation index CBPI (cytokinesis-block proliferation index), which indicates the inhibition of cell proliferation. The percentage of apoptotic cells increased significantly with increasing concentration in a dose-dependent manner. The combined action of miconazole and acetamiprid has a genotoxic and cytotoxic effect on bovine lymphocytes *in vitro* after 24 h exposure.

Úvod

Pesticídy predstavujú rozsiahlu skupinu chemických alebo biologických látok, ktoré sa používajú na reguláciu populácií organizmov považovaných za škodlivé v poľnohospodárstve, lesníctve, potravinárstve a v oblasti verejného zdravia. Systémovo pôsobiace neonicotinoídy patria do skupiny insekticídov, chemicky odvodených od prírodného alkaloidu nikotínu. Ich mechanizmus účinku spočíva v pôsobení na nervový systém hmyzu prostredníctvom väzby na nikotínové acetylcholinové receptory (nAChR). Pôsobia ako agonisti nAChR, avšak nepodliehajú enzymatickej degradácii acetylcholinesterázou, čo vedie k dlhodobej až permanentnej aktivácii receptorov, paralýze a smrti (1). Imidazoly predstavujú významnú podskupinu azolových antimykotických liečiv, ktoré sa široko využívajú vo veterinárnej aj humánnej medicíne na liečbu mykotických ochorení. Mechanizmus účinku imidazolov spočíva

v inhibícii biosyntézy ergosterolu, ktorý je esenciálnou zložkou bunkovej membrány húb prostredníctvom inhibície enzýmu lanosterol-14 α -demetylázy (CYP51) (2). Mikonazol patrí medzi imidazolové antimykotiká so širokým spektrom antimykotického pôsobenia a je jedným z najčastejšie používaných liečiv pri liečbe povrchových mykotických ochorení v humánnej aj veterinárnej medicíne. Mikrojadrový test (MN test) patrí medzi základné cytogenetické metódy využívané na hodnotenie genotoxických účinkov chemických látok. Je založený na detekcii mikrojadier, ktoré vznikajú z acentrických chromozomálnych fragmentov alebo z celých chromozómov, ktoré sa počas mitózy nezaradili do dcérskych jadier (3). TUNEL test sa používa na detekcie apoptózy a je založený na identifikácii fragmentácie DNA, ktorá predstavuje jeden z charakteristických znakov programovanej bunkovej smrti. Apoptotické bunky následne obsahujú fluorescenčne pozitívne jadrá, ktoré emitujú signál pri excitácii príslušnou vlnovou dĺžkou (4). Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť potenciálny cytotoxický a genotoxický účinok zmesi mikonazol nitrátu a acetamipridu na periférne lymfocyty hovädzieho dobytku v podmienkach *in vitro* po 24 h expozícii pomocou detekcie MN, apoptotických zmien a zmien v proliferácii buniek. Účinky acetamipridu a mikonazol nitrátu boli jednotlivo skúmané, ale nie ich kombinácia. Je známe, že viaceré látky v prostredí interagujú a môžu svoj účinok potenciovat' (5, 6).

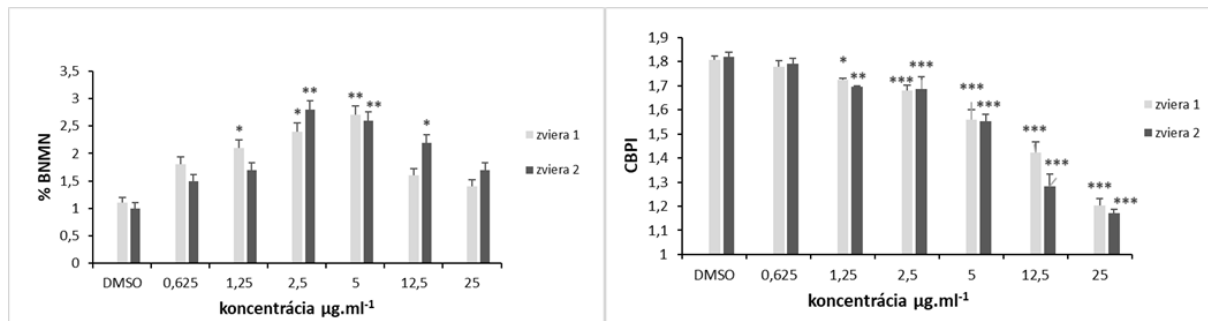
Materiál a metódy

Od dvoch zdravých býčkov (6 mes., križence Holštajnského dobytku) boli odobraté vzorky periférnej krvi. Lymfocyty boli kultivované a exponované počas 24 h rôznymi koncentraciami zmesi Mospilanu[®] 20SP (20% acetamiprid) a mikonazol nitrátu (0,625 - 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ako kontrolu a rozpúšťadlo sme použili DMSO (7). Genotoxický účinok bol študovaný pomocou mikrojadrového testu, ktorý slúžil na stanovenie počtu mikrojadier (MN) v dvojjadrových bunkách, čo je znak poškodenia chromozómov (8). Pomocou indexu CBPI sme hodnotili cytotoxicitu testovanej zmesi. Fragmentácia DNA bola hodnotená pomocou testu TUNEL, ktorý deteguje zlomy vlákna DNA spojené s programovanou bunkovou smrťou (7). Štatistická analýza bola vykonaná na určenie významnosti pozorovaných rozdielov medzi kontrolnou a exponovanou skupinou pomocou Chí-kvadrát testu (MN) a ANOVA+Dunnett post test (CBPI, TUNEL). Výsledky sú nasledovné: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Výsledky a diskusia

Indukcia MN bola pozorovaná u oboch donorov. U donora 1 sa štatisticky významné zvýšenie zistilo pri koncentráciách 1,25; 2,5 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($p < 0,05$; $p < 0,01$), zatiaľ čo u donora 2

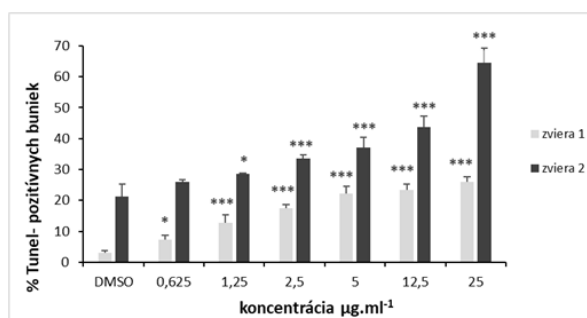
v rozmedzí 2,5 - 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (obr. 1; $p<0,05$; $p<0,01$). Expozícia ostatným testovaným koncentraciám vykazovala zvýšenie, ale bez štatistickej významnosti. Proliferačný index CBPI, ktorý sa hodnotí ako jedna zo súčastí MN testu, vykazoval dávkovo závislý pokles od koncentrácie 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 1; $*= p<0,05$; $**= p<0,01$; $***= p<0,001$).



Obr. 1 Zmeny indukcie MN a CBPI po expozícii zmesi mikonazol nitrátu a Mospilanu® 20SP.

CBMN test predstavuje citlivú a spoľahlivú metódu na hodnotenie chromozomálnych aberácií, ktorá umožňuje detekciu mikrojadier vznikajúcich v dôsledku poškodenia DNA alebo porúch segregácie chromozómov počas bunkového delenia. Výhodou tejto metódy je jej schopnosť zachytiť rôzne typy genotoxického poškodenia a zároveň poskytnúť informáciu o proliferácii buniek prostredníctvom výpočtu indexu blokovanej proliferácie (9). Na základe našich výsledkov MN testu predpokladáme, že pri vyšších koncentráciách prevažuje cytotoxický účinok nad genotoxickým, čo vedie k zníženiu počtu proliferujúcich buniek schopných tvoriť mikrojadrá. Podobný, nelineárny priebeh indukcie MN prezentovali aj Galdíková et al. (10), ktorí exponovali boviné lymfocyty neonikotínoidu tiakloprid v koncentráciách 30 – 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ počas 24 h a 48 h. Autori síce zaznamenali zvýšené poškodenie DNA a nárast chromozomálnych aberácií, avšak nedošlo k signifikantnému zvýšeniu mikrojadier, čo pripisujú výraznému poklesu proliferácie buniek. Podobný cytotoxický efekt bez výrazného nárastu genotoxických markerov bol zaznamenaný aj v štúdií Drážovskej et al. (11), kde fungicídna formulácia Tango® Super v boviných lymfocytoch viedla k poklesu mitotického indexu, proliferačného indexu a CBPI bez signifikantného zvýšenia poškodenia DNA.

Výsledky TUNEL testu preukázali vysokú mieru indukcie apoptotických zmien u oboch donorov od najnižšej testovanej koncentrácie (obr. 2; $p<0,05$; $p<0,001$) v dávkovej závislosti.



Obr. 2 Indukcia apoptotických zmien po expozícii zmesi mikonazol nitrátu a Mospilanu® 20SP detegovaná pomocou TUNEL assay.

Tieto výsledky poukazujú na vysokú citlivosť bovinných lymfocytov na účinok testovanej zmesi a naznačujú, že apoptóza predstavuje dominantnú bunkovú odpoveď pri vyšších koncentráciách. Podobné výsledky boli získané pri testovaní prípravku obsahujúceho tiakloprid počas 4 h na bovinných lymfocytoch (12). Autori taktiež detegovali produkciu reaktívnych foriem kyslíka vedúcej k oxidácii proteínov a poškodeniu samotnej DNA, čo predstavuje kľúčový aktivačný krok pre spustenie apoptózy alebo zastaveniu bunkového cyklu. I pri sledovaní účinku prípravku obsahujúceho triazolový fungicíd epoxikonazol bola potvrdená úloha oxidačného stresu ako hlavného mechanizmu podieľajúceho sa na indukcii cytotoxicity (7). Testovanie kombinovanej expozície viacerým látkam má praktický význam. V našom prípade mikonazol nitrát ako azolové antimykotikum narúša štruktúru bunkových membrán a môže ovplyvniť ich permeabilitu. Predpokladáme, že môže uľahčiť vstup acetamipridu do bunky, čím sa zvyšuje jeho intracelulárna koncentrácia a následný toxický účinok. Na význam kombinovaného pôsobenia chemických látok poukazujú aj experimentálne štúdie, v ktorých bola preukázaná vyššia genotoxicita a cytotoxicita zmesí pesticídov v porovnaní s jednotlivými látkami, čo naznačuje možný synergický efekt (13).

Súhrn

Expozícia testovaným látkam viedla k zvýšeniu frekvencie MN, ďalej poklesu proliferačnej aktivity buniek a k výraznej indukcii apoptózy, pričom zmeny týchto parametrov boli dávkovo závislé. Na základe týchto výsledkov predpokladáme genotoxický aj cytotoxický účinok zmesi acetamipridu a mikonazol nitrátu na lymfocyty hovädzieho dobytku v podmienkach *in vitro*. Výsledky práce poukazujú na potenciálne riziko kombinovaného pôsobenia pesticídov a liečiv, a súčasne zdôrazňujú význam hodnotenia účinkov chemických zmesí, keďže v reálnych podmienkach sú organizmy vystavené viacerým látkam súčasne.

Literatúra

1. Simon-Delso, N. et al.: Environ Sci Poll Res, 2015; 22: 5–34.
2. Odds, F. C., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R.: Trends Microbiol, 2003; 11(6):272–279.
3. Bolognesi, C., Bonassi, S.: Mutat Res/Rev Mutat Res, 2015; 770:1–16.
4. Włodkovic, D. et al. Methods, 2011; 57(3):327–338.
5. Wang, R. et al. Ecotoxicol Environ Safety, 2023; 263:115237.
6. Coalova, I. et al. Environ Toxicol Pharmacol, 2025; 119:104815.
7. Schwarzbacherová, V. et al.: Environ Sci Poll Res, 2017; 24 (3):2645–2654.
8. Fenech, M.: *Nat Protoc*, 2007; 2(5):1084–1104.
9. OECD. Test No. 487, Paris: OECD Publishing, 2016; ISBN 978-92-64-26071-9.
10. Galdíková, M. et al.: J Environ Sci Health, Part B, 2015; 50(10): 698-707.
11. Drážovská, M. et al.: J Environ Sci Health, Part B, 2016; 51(11):769-776.
12. Schwarzbacherová, V. et al.: Toxicol in Vitro, 2019; 61:104654.
13. Kocaman, A.: Environ Toxicol, 2009; 24(4):389–395.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore vedeckej grantovej agentúry MŠVVaM SR a SAV

VEGA č. 1/0240/25.

HISTOLOGICKÉ VYŠETRENIE ČREVA VČELY MEDONOSNEJ (*APIS MELLIFERA*) SO ZAMERANÍM NA DETEKCIU SPÓR *NOSEMA* SPP.

HISTOLOGICAL EXAMINATION OF THE INTESTINE OF THE HONEYBEE (*APIS MELLIFERA*) WITH A FOCUS ON THE DETECTION OF *NOSEMA* SPP. SPORES

**Imrich Szabó¹, Zuzana Demčišáková⁴, Rastislav Sabo², Martin Staroň³, Lucia Sabová²,
Monika Sučík¹**

¹ *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

² *Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

³ *Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum (NPPC), Odbor živočíšnej výroby,
Divízia včelárstva, Liptovský Hrádok, SR*

⁴ *Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

imrich.szabo@student.uvlf.sk

Abstract

The aim of the study was to compare the intestinal histology of healthy and infected honeybees (*Apis mellifera*) to confirm the presence of *Nosema* spp. spores. Samples of adult workers were divided into a control (healthy) and an experimental (infected, deceased) group. Histological sections were examined microscopically. In infected bees, marked disorganisation of the midgut epithelium, cell vacuolisation and numerous intracellular spores were observed. In the ileum, spores were mainly present in the lumen without significant epithelial damage. Healthy bees showed normal intestinal structure without spores. The results confirm the tropism of *Nosema* spp. for the midgut epithelium and its role in nosematosis pathogenesis.

Úvod

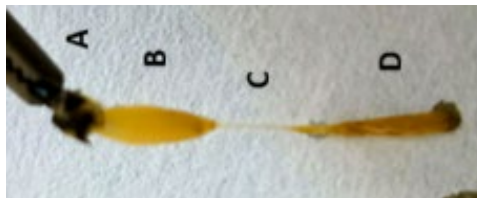
Včela medonosná (*Apis mellifera*) je modelový organizmus, u ktorého infekcia mikrosporídiami rodu *Nosema* spp. významne ovplyvňuje štruktúru a funkciu čreva. Histologické štúdie opakovane ukazujú, že najvýraznejšie zmeny sa nachádzajú v epiteli stredného čreva (*ventriculus*), kde dochádza k intracelulárnej replikácii parazita, degenerácii buniek a narušeniu integrity epitelu (1, 2). Infekcia *N. ceranae* spôsobuje vakuolizáciu buniek, stratu mikrokľvov, apoptózu a deštrukciu epitelu, spolu s poruchou peritrofickej membrány a tráviacej funkcie (3, 4). Spóry sa nachádzajú prevažne intracelulárne v strednom čreve, zatiaľ čo v zadných častiach tráviaceho traktu sú prítomné najmä v lúmene bez výrazných zmien, čo potvrdzuje tropizmus pre *ventriculus* (4). Progresia infekcie je sprevádzaná dezorganizáciou epitelu, akumuláciou spór a poruchami obnovy buniek, čo vedie k zníženej absorpcii živín a

oslabeniu čreva (3, 5, 6). Diagnostika nozematózy zahŕňa mikroskopické počítanie spór pomocou hemocytometra, histologické hodnotenie poškodenia čreva a farbiace metódy na zvýraznenie spór (7, 8, 9). Celkovo histologické nálezy potvrdzujú, že *Nosema* spp. primárne napáda epitel stredného čreva, kde spôsobuje štrukturálne aj funkčné poškodenie vedúce k nozematóze a oslabeniu včelstva.

Materiál a metodika

Odber materiálu

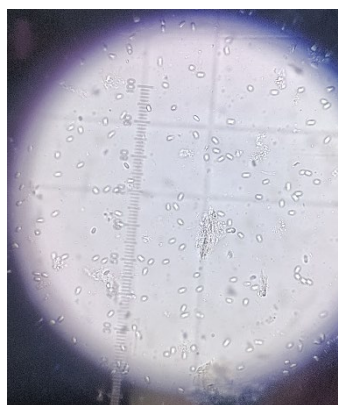
Vzorky pozostávali z dospelých robotníc včely medonosnej (*Apis mellifera*), ktoré boli rozdelené do kontrolnej skupiny (zdravé jedince) a experimentálnej skupiny (uhynuté jedince s potvrdenou infekciou *Nosema* spp.). U všetkých jedincov bol následne preparovaný tráviaci trakt so zameraním na stredné črevo (*ventriculus*).



Obr. 1 Zadná časť tráviaceho traktu a bodacieho ústrojenstva včely medonosnej: A = bodacie ústrojenstvo; B = konečník; C = tenké črevo; D = stredná časť čreva (*ventriculus*).

Parazitologické vyšetrenie

Časti čreva boli mechanicky homogenizované v destilovanej vode a vzniknutý homogenát bol vyšetrený svetelným mikroskopom (400×) na detekciu oválnych, silne refraktilných spór *Nosema* spp. Na ich kvantifikáciu možno použiť hemocytometer podľa štandardného postupu.



Obr. 2 Spóry *Nosema* spp. v homogenáte čreva včely medonosnej (400×).

Histologické spracovanie

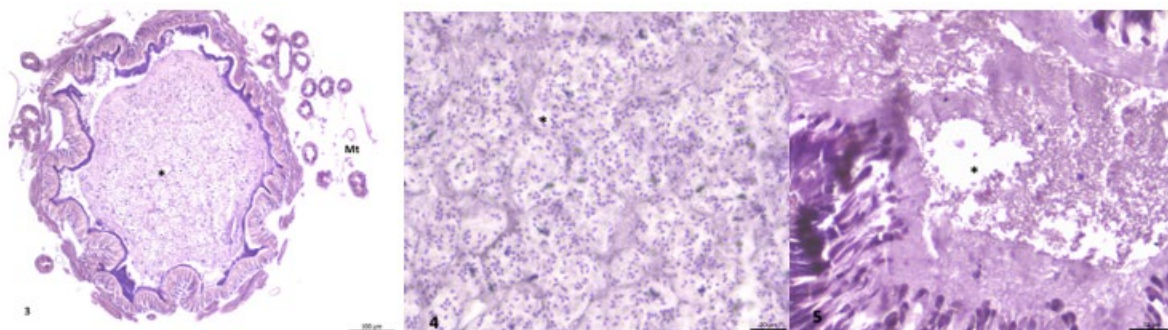
Vzorky odobratých tkanív určené pre mikroskopické hodnotenie boli fixované v Dentsovom fixačnom médiu (roztok metanolu a dimetylsulfoxidu v pomere 4 : 1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) minimálne 24 hodín po odbere. Následne boli vzorky dehydratované v etanolvej

rade, prejasnené a zaliate do parafínu. Pomocou rotačného mikrotómu (Leica RM2244, Leica Microsystems) boli pripravené sériové rezy s hrúbkou 7 µm, ktoré boli farbené rutinnou histologickou metódou hematoxylín-eozín (HE). Jadrá buniek boli ofarbené Mayerovým hematoxylínom (Millipore Sigma, St. Louis, MO, USA) a cytoplazma 1 % eozínom (Eosin G o Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Takto spracované histologické rezy boli následne montované do permanentného média (Entellan, Millipore Sigma, St. Louis, MO, USA) za účelom vytvorenia trvalých preparátov. Všetky zafarbené preparáty boli hodnotené pomocou svetelného mikroskopu Olympus CX43 (Olympus, Tokio, Japonsko) s integrovanou digitálnou kamerou PROMICAM 3-5CP+ (Promicra, Praha, Česká republika).

Výsledky

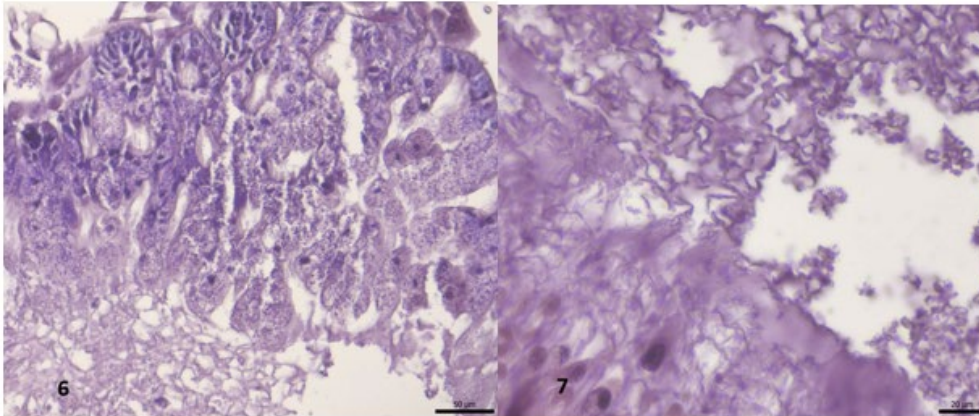
Mikroskopické hodnotenie

Pri histologickom vyšetrení ilea infikovaných včiel bola zistená masívna prítomnosť spór *Nosema* spp. v lúmene, ktorý bol miestami takmer úplne vyplnený. Malpighiho žľazy v okolí nepreukázali výrazné poškodenie. V tkanive boli pozorované početné oválne, refraktilné spóry. U zdravých jedincov sa spóry v lúmene nevyskytovali, čo potvrdzuje rozdiel medzi zdravými a infikovanými včelami (Obr. 4–5).



Obr. 3-5 Histologické porovnanie ilea včely medonosnej: (3) infikované ileum s lúmenom (*) vyplneným spórami *Nosema* spp. a prítomnými Malpighiho žľazami (Mt), (4) detail infikovaného tkaniva, (5) zdravé ileum bez prítomnosti spór. HE.

V histologických rezoch stredného čreva (*ventriculus*) infikovaných včiel boli pozorované výrazné patologické zmeny epitelu. Bunky obsahovali početné vývojové štádiá *Nosema* spp., cytoplazma bola zväčšená a vyplnená spórami, jadrá boli miestami posunuté a epitel vykazoval dezorganizáciu a vakuolizáciu (Obr. 6). U zdravých jedincov bola zachovaná normálna štruktúra epitelu bez prítomnosti spór a degeneratívnych zmien (Obr. 7).



Obr. 6-7 *Ventriculus* infikovanej a zdravej včely medonosnej: (6) Silne infikované epitelové bunky s rôznymi intracelulárnymi štádiami parazita, (7) zdravý ventriculus bez prítomnosti spór. HE.

Diskusia

Získané výsledky poukazujú na výrazné histologické rozdiely medzi zdravými a infikovanými jedincami včely medonosnej (*Apis mellifera*). Najvýraznejšie zmeny boli v epiteli stredného čreva (*ventriculus*), kde bola pozorovaná jeho dezorganizácia, vakuolizácia buniek a masívna intracelulárna prítomnosť spór *Nosema* spp., čo naznačuje narušenie trávenia, zníženú absorpciu živín a oslabenie jedinca. Tieto nálezy sú v súlade s Higes et al. (4), ktorí potvrdili vysoký tropizmus *Nosema* spp. pre epitel ventricula a intracelulárnu lokalizáciu parazita so zväčšenou cytoplazmou buniek a akumuláciou spór. Podobné zmeny boli zaznamenané aj v našich vzorkách. V ileu boli spóry prítomné prevažne v lúmene bez výrazných patologických zmien epitelu, čo podporuje ich transport zo stredného čreva a nie aktívnu infekciu tejto časti tráviaceho traktu. U zdravých jedincov bola zachovaná normálna štruktúra epitelu bez spór a degeneratívnych zmien, čo potvrdzuje súvis pozorovaných lézií s infekciou *Nosema* spp. Treba zohľadniť, že analyzované jedince boli uhynuté, čo mohlo ovplyvniť kvalitu tkanív postmortálnymi zmenami. Napriek tomu lokalizácia a charakter lézií zodpovedajú typickému obrazu nozematózy, čo podporuje ich infekčný pôvod.

Záver

Histologické vyšetrenie potvrdilo poškodenie epitelu stredného čreva (*ventriculus*) a prítomnosť intracelulárnych spór *Nosema* spp.. V infikovaných vzorkách boli pozorované degeneratívne zmeny epitelových buniek, vrátane vakuolizácie a narušenia ich štruktúry, ako aj uvoľňovanie spór do lúmenu ilea. Tieto nálezy poukazujú na aktívnu infekciu, ktorá vedie k

poškodeniu tráviaceho epitelu a následnému zníženiu funkčnosti čreva, čo môže negatívne ovplyvniť celkový fyziologický stav včely.

Literatúra

1. Fries, I.: Apidologie, 1988; 19(3):319–328.
2. Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., et al.: J Invertebr Pathol, 2007; 94(3):211–217.
3. Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., et al.: PLOS ONE, 2012; 7(5):e37017.
4. Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., et al.: Vet Pathol, 2020; 57(1):132–138.
5. Goblirsch, M.: Apidologie, 2018; 49(1):131–150.
6. Eskov, E.K., Eskova, M.D., Rozhenkov, A.S., et al.: Cell Tiss Biol, 2022; 16:92–96.
7. Cantwell, G.E.: Am Bee J, 1970; 110(6):222–223.
8. Duquesne, V., Aubert, M., Ribiere-Chabert, M., et al.: J Microbiol Methods, 2021; 184:106183.
9. Racine, E., Bégin-Pépin, M., Benoit-Biancamano, M.O.: J Vet Diagn Investig, 2026; 38(2):238–246.

*Publikácia vznikla za finančnej podpory projektov APVV-21-0185; GP MŠVVaŠ SR
VEGA 1/0161/23; VEGA 1/0074/24. Financované EÚ NextGenerationEU
prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu 09I03-03-V05-00017.*

**VYUŽITIE NEPRIAMEJ IMUNOHISTOCHEMICKEJ METÓDY NA URČENIE
PROLIFERÁCIE MYOCYTOV *MUSCULUS PECTORALIS MAJOR* U HYDINY
S PODÁVANÍM PRÍPRAVKU ECOBIOL**

USE OF INDIRECT IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD TO DETERMINE
PROLIFERATION OF PECTORALIS MAJOR MUSCLE MYOCYTES IN POULTRY
TREATED WITH ECOBIOL

**Renáta Szabóová¹, Robert Herich², Viera Karaffová², Erik Hudec², Zuzana Ševčíková²,
Martin Levkut²**

¹*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

renata.szaboova@uvlf.sk

Abstract

The effect of probiotic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 strain (in Ecobiol preparation) was evaluated on proliferative activity (as PCNA parameter) of broilers' pectoralis major muscle myocytes. A total of 20 000 chicken breed ROSS 308 were randomly divided into 2 groups (separately placed in two halls on the farm) – experimental group E with Ecobiol application and control group C. Ecobiol preparation was applied into water from experimental day 2 to day 6. The experiment lasted 12 days. We conclude that *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 supplementation improves the broiler pectoralis major muscle proliferation due to significant increase of PCNA expression ($p < 0,05^*$) – potential meat production marker in poultry.

Úvod

Jedným z markerov podieľajúcich sa na proliferácii a regenerácii svalových buniek je proteín definovaný ako proliferujúci bunkový nukleárny antigén (PCNA). Expresia PCNA je silne spojená s proliferáciou buniek a je regulovaná viacerými transkripčnými faktormi, cytokínmi a modulátormi bunkovej signalizácie. PCNA je vysoko exprimovaný počas S-fázy bunkového cyklu, ktorá sa používa na označenie aktivity proliferácie buniek (1, 2). Vo svalovom tkanive je expresia PCNA pozorovaná najmä vo svalových kmeňových bunkách zodpovedných za regeneráciu a hypertrofiu myocytov. U brojlerových kurčiat, ktoré sú selektívne chované pre rýchly rast a vysoký výťažok svalov, je expresia PCNA v satelitných bunkách vysoká, čo

koreluje so zvýšeným rastom svalov pozorovaným u týchto zvierat, vďaka čomu je PCNA užitočným biomarkerom na štúdium vývoja svalov u hydiny (3). Taktiež mikroorganizmy s probiotickým účinkom prospešne ovplyvňujú produkčné parametre hydiny akými sú napr. hmotnostný prírastok, jatočná výťažnosť a/alebo podiel svaloviny, a to na osi črevo – kostrový sval (4). Z tohto dôvodu bolo cieľom práce determinovať efekt probiotického kmeňa *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 (v prípravku Ecobiol) na proliferáciu aktivitu myocytov pomocou PCNA markera v procesoch myogenézy prsného svalu u kurčiat.

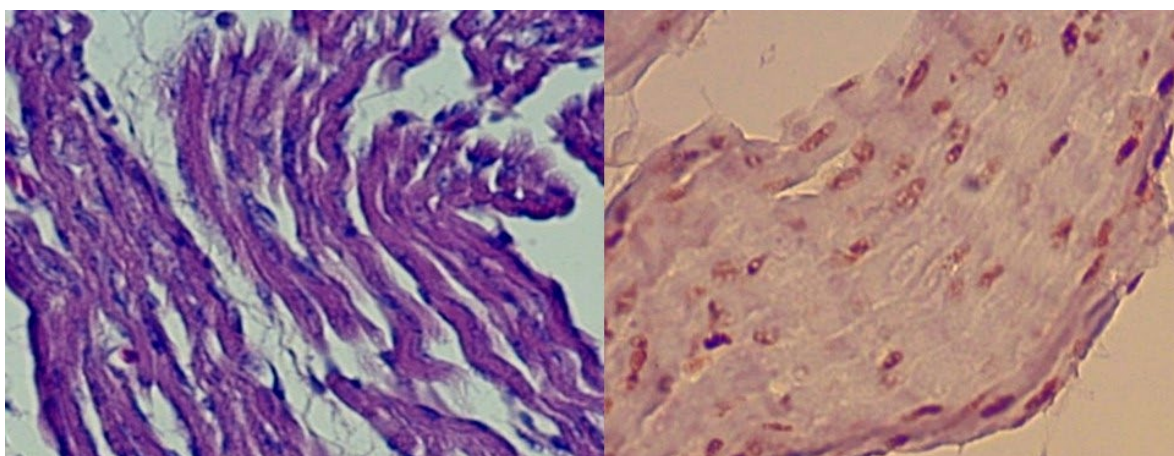
Materiál a metódy

Projekt prebiehal v dvoch separovaných halách farmového chovu brojlerových kurčiat (n = 20 000) plemena ROSS 308. V prvej hale sa nachádzali zvieratá experimentálnej skupiny E s podávaním probiotika a v druhej hale zvieratá kontrolnej skupiny K. Prvý deň experimentu – po vyliahnutí boli kurčatá (1. deň života) experimentálnej skupiny E v liahni nasprejované probiotickým preparátom Ecobiol obsahujúcim probiotikum *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 (Evonik; Nemecko). Počas druhého až šiesteho dňa experimentu bol preparát Ecobiol podávaný kurčatám v skupine E v pitnej vode podľa pokynov výrobcu. Odbery vzoriek *musculus pectoralis major* prebiehali na 5. (1. odber), 8. (2. odber) a 12. deň (3. odber) experimentu, pričom počas každého odberu boli odobraté vzorky prsného svalu náhodne vybratým desiatim kurčatám zo skupiny E (n = 10) a K (n = 10). Experiment trval 12 dní. Počas pokusu boli kurčatá v oboch skupinách kŕmené štandardnou štartérovou kompletnou sypanou kŕmnom zmesou pre kurčatá K1 (Biokrmivá Bonamix, Slovenská republika) so zabezpečením prístupu k vode *ad libitum*. Vzorky svaloviny kurčiat s objemom 1 cm³ boli získané z *musculus pectoralis major* a fixované v 4 % formaldehyde, dehydratované a zaliate do parafínu. Parafínové rezy svalového tkaniva boli narezané na hrúbku 5 µm (mikrotóm Leica, Nemecko), umiestnené na podložné sklíčka, zbavené parafínu a rehydratované podľa Koivukoski (5). Rezy boli IHC-farbené primárnou monoklonálnou protilátkou PCNA SPM350 na stanovenie proliferatívnej aktivity jadier v bunkách hydiny, a to použitím komerčnej súpravy (Novus Biologicals, USA) a sekundárnou protilátkou – biotinylačným činidlom (Dako, Glostrup, Dánsko) s finálnym protokolom. Negatívna kontrola bola získaná rovnakou metodológiou, ale bez použitia primárnej PCNA protilátky na tkanivových rezoch. Počet PCNA-pozitívnych jadier (v %) kostrového svalu *m. pectoralis major* bol sledovaný mikroskopicky v siedmich náhodných zorných poliach (400-násobné zväčšenie, mikroskop Nikon Labophot 2, Nikon Corporation, Japonsko) každej vzorky (n = 6) tkanivových rezov z experimentálnej a/alebo kontrolnej skupiny pomocou kamery Nikon DS-Fi1 Corporation a softvéru NIS-NElements-

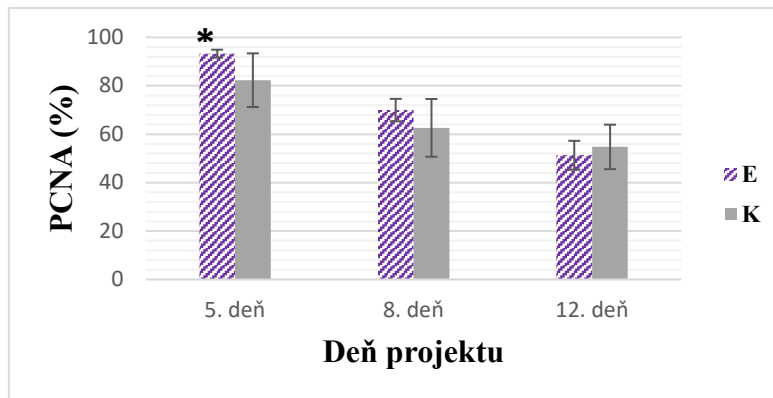
Fi1 (verzia 3.0, Laboratory Imaging, Česká republika). Percento jadier exprimujúcich PCNA pre každú vzorku tkanivového rezu sa určilo ako počet jadier exprimujúcich PCNA (proliferačný bunkový antigén) vydelený celkovým počtom buniek a vynásobených číslom 100 (6). Štatistická analýza výsledkov sa uskutočnila pomocou Studentovho párového t-testu použitím Graph Pad Prism verzie 8.00 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA) na určenie rozdielov medzi každou skupinou. Rozdiely medzi priemernými hodnotami pre každú skupinu sa považovali za štatisticky významné pri $p < 0,05^*$. Hodnoty sú uvedené ako priemery so štandardnými odchýlkami (\pm SD).

Výsledky a Diskusia

Po 4-dňovej aplikácii prípravku Ecobiol (t. j. počas 1. odberu) bola pozorovaná štatisticky významná expresia PCNA ($p < 0,05^*$) vo svalových bunkách kurčiat v E ($93,26 \pm 1,64$) v porovnaní s K ($82,30 \pm 11,09$) (Obr. 1). Zvýšené percento PCNA-pozitívnych jadier v skupine E ($69,97 \pm 4,62$) bolo namerané 2 dni po ukončení aplikácie probiotík (t. j. počas 2. odberu) v porovnaní so skupinou K ($62,61 \pm 11,93$). Šesť dní po ukončení aplikácie Ecobiolu (počas 3. odberu) sa nezistil významný rozdiel v PCNA markeroch medzi E a K (Graf 1).



Obr. 1 Reprezentatívne fotografie *m. pectoralis major* (E skupina, 5. deň projektu): vľavo – farbenie hematoxylín-eozín, zväčšenie 400x; vpravo – IHC metóda s použitím primárnej monoklonálnej protilátky PCNA SPM350 na analýzu expresie PCNA, zväčšenie 400x



Graf 1 *Expresia PCNA v myocytoch kurčiat počas/po podávaní prípravku Ecobiol: E – experimentálna skupina; K – kontrolná skupina; PCNA - proliferujúci bunkový nukleárny antigén; štatistická významnosť $p < 0.05$ **.

Expresia PCNA v satelitných bunkách kostrového svalstva ako aj ich počet sa zvyšuje najmä počas fázy rýchleho rastu u výkrmových typov kurčiat a moriek (7). Ako rastové stimulatory prírodného pôvodu sú v chovoch hydiny používané hlavne probiotiká podieľajúce sa na zlepšení pomeru konverzie krmiva, prírastku telesnej hmotnosti a celkovej produktivity zvierat (8). Po podaní probiotík ako rastových stimulatorov by na základe detekcie PCNA-markera v myocytoch mohla probiotická os črevo–kostrový sval potenciálne podporiť hypertrofiu svalových vlákien a/alebo zlepšiť rýchlosť rastu (9) ako to bolo pozorované v našej štúdiu, keď podávanie probiotík významne zvýšilo expresiu PCNA ($p < 0,05$) v myocytoch prsného svalu.

Súhrn

Na základe získaných výsledkov v kombinácii s efektom probiotík môže byť ovplyvnená na osi črevo-myocyt rýchlosť rastu svalstva brojlerových plemien kurčiat, čím vzniká predpoklad využitia stanovenia PCNA ako potenciálneho produkčného markera u hydiny.

Literatúra

1. Yu, S., Qiao, X., Song, X. et al.: *Fish & Shellfish Immunol*, 2022; 122:306-315.
2. Zhang, T., Chen, Y., Chen, W. et al.: *Agric Food Chem*, 2026; 74(5):4895-4914.
3. Che, S.: *Poultry Sci*, 2022; 101:101747.
4. Ferreira, T. Z.: *Front Physiol*; 2020, 11:529.
5. Koivukoski, S., Khan, U., Ruusuvuori, P. et al.: *Labor Investig*, 2023; 103(5):100070.
6. Guo, L.: *Poultry Sci*, 2011; 90(9):2024-2034.
7. Halevy, O.: *Front Physiol*, 2020; 11:235.
8. Naeem M, Bourassa D.: *Microorganisms*, 2025; 13(2):257.
9. Krysiak, K.: *Animals*, 2021; 11:1620.

Táto práca vznikla za podpory projektu Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-21-0129.

IMUNOHISTOCHÉMIA - NAŠE SKÚSENOSTI S JEJ VYUŽITÍM VO VETERINÁRNEJ MEDICÍNE

IMMUNOHISTOCHEMISTRY – OUR EXPERIENCE WITH ITS USE IN VETERINARY MEDICINE

Zuzana Ševčíková¹, Erik Hudec¹, Viera Karaffová¹, Renáta Szabóová²

¹Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

²Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

zuzana.sevcikova@uvlf.sk

Abstract

The basic principles of immunohistochemistry (IHC) have been known since the 1930s. However, it was not until the early 1940s when the first mention of fluorescein-labelled antibodies was published (1). Since then it has become a used technique in various areas of basic research. It provides answers to numerous practical and diagnostic problems in many areas of medicine. The use of IHC in veterinary diagnostic pathology is less common, as the diversity of the animated population and thus of the antigens, is responsible for some restrictions on the production of specific antibodies. Despite this fact the using of IHC in veterinary medicine becomes more desirable.

Úvod

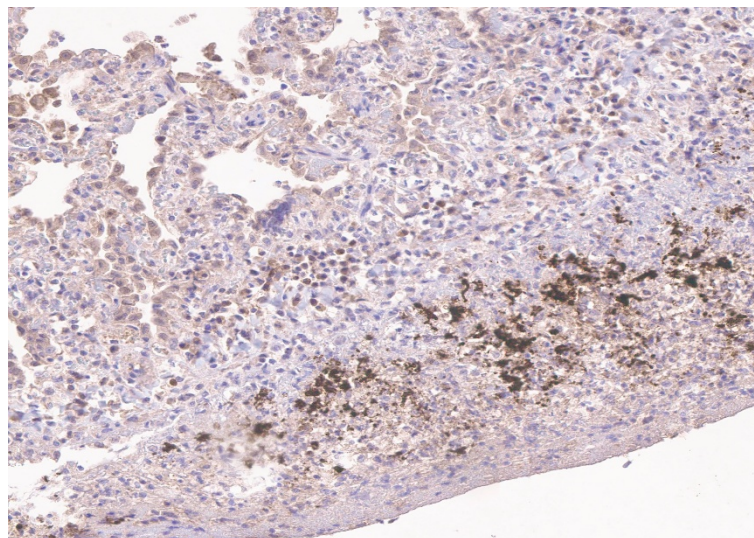
Imunohistochemické vyšetrenia sa aj vo veterinárnej medicíne používajú pri diagnostike pôvodcov ochorení, vývoji liekov a v biologickom výskume. Pri použití špecifických tzv. tumor markerov je IHC používaná na diferenciáciu benígnych a malígnych nádorov, stupňa diferenciácie, identifikáciu pôvodu buniek, ako aj na určenie nádorového tkaniva tvoriaceho metastázu. IHC predstavuje základné atribúty bioptickej diagnostiky ako takej a často aj následného klinického postupu (2). Spektrum terapeutických postupov sa vo veterinárnej medicíne výrazne rozšírilo, čo si vyžaduje presnejšiu diagnózu. Tento fakt upriamil pozornosť veterinárnych patológov na potrebu zlepšiť využívanie IHC v ich dennej rutinnej práci, nasledujúc tak trend v humánnej medicíne. V tejto práci prezentujeme použitie rôznych protilátok na potvrdenie pôvodcu infekčného ochorenia, na preukázanie pôvodu buniek pri mediastinálnej hemorágii a pri bifázickom metastázujúcom mezotelióme.

Materiál a metódy

V prezentovaných prípadoch boli počas pitiev odobraté vzorky na IHC vyšetrenia, a to: 1. pľúca aj s viscerálnou pleurou od jednoročného kryptorchického kocúrika plemena Európska krátkosrstá mačka, 2. hemoragická masa z oblasti mediastína od 10 mesačnej fenky plemena Anglický kokeršpaniel, 3. z neidentifikovanej susp. nádorovej masy od 10 ročného psa plemena Boxer. Boli aplikované rôzne protilátky (špecifikácia uvedená nižšie). Samotné IHC vyšetrenia boli realizované v externom laboratóriu Laboklin s.r.o. Bratislava, ako aj na Katedre morfológických disciplín UVLF v Košiciach.

Výsledky a diskusia

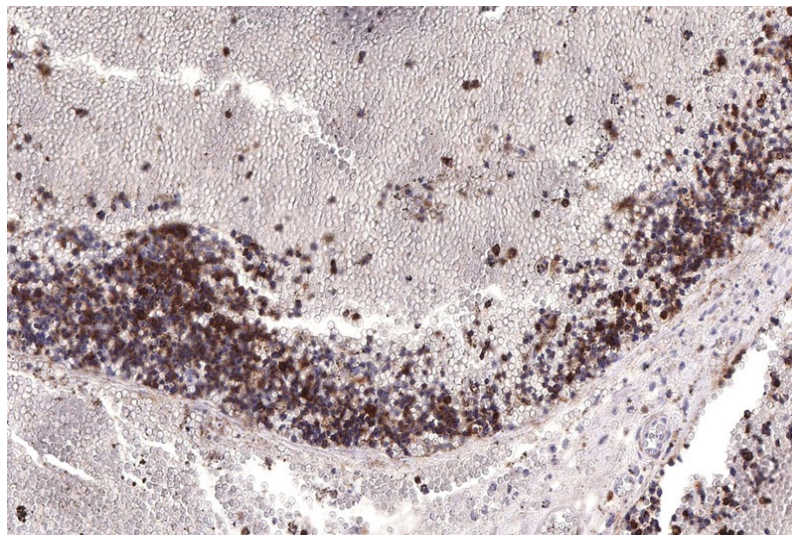
V prvom prípade (3) prezentujeme prípad felínnej infekčnej peritonitídy, konkrétne jej pleurálnu efuzívnu formu. Ide o potenciálne fatálne vírusové ochorenie domácich a divo žijúcich mačiek, ktoré je spôsobené vírusom felínnej infekčnej peritonitídy (FIPV). Boli realizované hematologické, biochemické a ultrasonografické (USG) vyšetrenia, ktoré detegovali tzv. stresový leukogram, zvýšený albumín:globulín pomer, hydrothorax, adhezívnu fibrinóznú pleuritídu a hypertrofiu ľavej srdcovej komory. Na základe negatívnej reakcie na terapiu, ako aj v dôsledku zhoršujúceho sa zdravotného stavu, bol kocúrik humánne utratený. Počas pitvy boli odobraté vzorky na IHC a histopatologické vyšetrenie, kde bola o.i. zistená fibrinózná pleuritída. IHC vyšetrenie potvrdilo prítomnosť antigénu proti FIP vírusu (Obr. 1). Klinické, ako aj morfológické vyšetrenia s vysokou mierou pravdepodobnosti poukazovali na FIP, avšak definitívnu diagnózu bolo možné potvrdiť až po IHC vyšetrení.



Obr. 1 Výsledok IHC vyšetrenia na detekciu antigénu FIP-vírusu pri fibrinóznej pleuritíde.

IHC, 10x. Zdroj: Laboklin s.r.o. Bratislava

Druhý prípad demonštruje rýchlo prebiehajúci, fatálny proces u 10 mesačnej fenky, ktorá uhynula krátko po prijatí na Klinike malých zvierat UVLF v Košiciach. Počas pitvy boli pozorované hemoperitonemum, hemothorax, anémia, melena a prítomnosť hemoragickej masy v mediastíne. Histologicky boli v tejto mediastinálnej lézii, pozorované zvyšky parenchýmu susp. týmusu a mnohopočetné cystické útvary vyplnené krvou a mononukleárnymi bunkami (susp. lymfocyty). Tento nález v súčinnosti s lokalizáciou procesu naznačoval ich týmusový pôvod. Za účelom potvrdenia tejto hypotézy boli odobraté vzorky na IHC vyšetrenie, v rámci ktorého bola použitá protilátka proti CD3 lymfocytom. Pozitívna reakcia (Obr. 2) potvrdila našu hypotézu, že sa jedná o krvácanie v týmuse s jeho následnou ruptúrou. Vo veterinárnej medicíne je tento proces známy, a to s niekoľkými možnými etio-patogenetickými mechanizmami: 1. trauma v oblasti hrudného koša, 2. ruptúra cýst týmusu (je to ojedinelé nenádorové ochorenie u psov), 3. ruptúra aortálnej aneurizmy, 4. súbežne prebiehajúca neoplázia, alebo 5. požitie antikoagulačných rodenticídov. V našom prípade (4), bol nález na základe anamnézy, klinických príznakov a morfológických vyšetrení, uzatvorený ako intoxikácia zvierat'a.

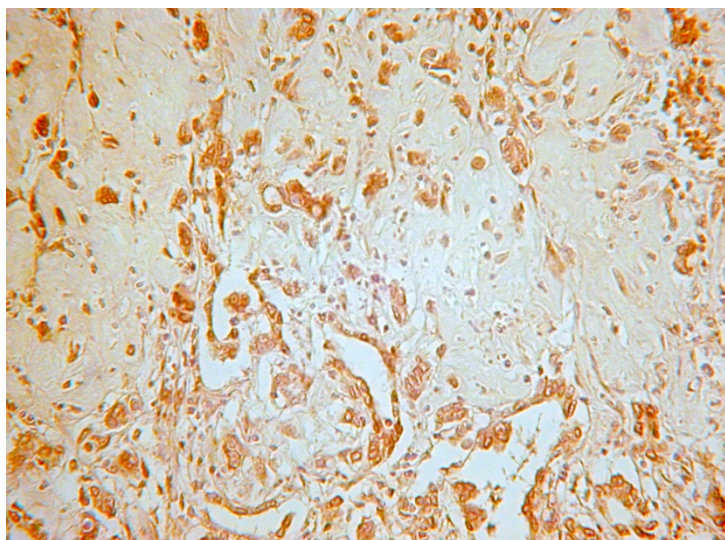


Obr. 2 IHC vyšetrenie potvrdilo prítomnosť CD3 pozitívnych buniek v hemoragických cystách.

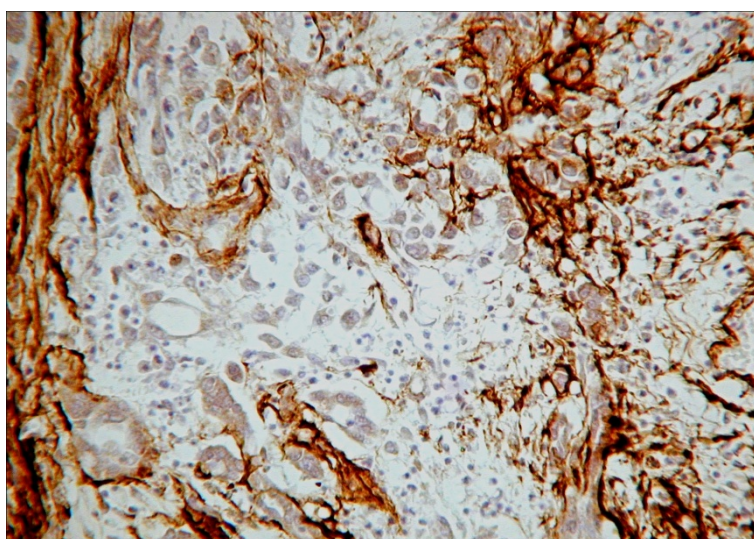
Zdroj: Laboklin s.r.o. Bratislava, 20x.

Medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádory v praxi malých zvierat patria nádory kože a nádory mliečnej žľazy. Sú však známe aj procesy ako napr. mezoteliómy, ktoré majú výrazne nižšiu incidenciu. Ich histologický obraz nie je vždy jednoznačný, a preto je odporúčané realizovať IHC vyšetrenia. V prípade 10 ročného psa plemena Boxer (5), ktorý bol prijatý na klinické pracovisko so zhoršením zdravotného stavu, bola po USG náleze ascitu vykonaná humánna eutanázia. Počas pitvy bolo možné o.i. pozorovať prítomnosť početných, bielych uzlíkov tuhej konzistencie veľkosti 2-10 mm v priemere, ktoré boli roztrúsené na parietálnom peritoneu a na

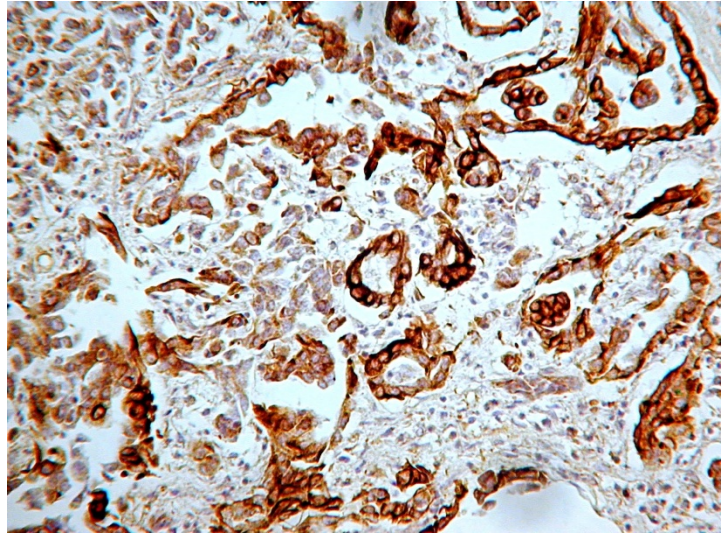
capsula serosa pečene a močového mechúra. Na základe pitevného vyšetrenia bolo možné predpokladať, že sa jedná o metastázujúci mezotelióm. Histologicky pozostávalo nádorové tkanivo z dvoch typov buniek– mezenchýmových a epiteloidných. Na IHC vyšetrenie boli použité protilátky proti vysoko molekulárnemu (HMW) cytokeratínu (monoklónová anti-myšacia, Biogenex, 1:50) (Obr. 3), proti dezminu (polyklónová anti-králičia, 1:8, Biogenex) (Obr. 4) a proti mutovanej forme p53 (DO-1, monoklónová anti-myšacia, 1:2000, Biotechnology) (Obr.5)



Obr. 3 Výsledok IHC vyšetrenia proti vysoko molekulárnemu cytokeratínu v nádorových epiteloidných bunkách mezoteliómu. (B-SA detekčný systém, 20x).



Obr. 4 Výsledok IHC vyšetrenia proti dezminu v nádorových mezenchýmových bunkách mezoteliómu (B-SA detekčný systém, 20x).



Obr. 5 Výsledok IHC vyšetrenia proti mutovanej forme p53 v nádorových bunkách mezoteliómu (B-SA detekčný systém, 20x).

Na základe bunkového zloženia sú mezoteliómy klasifikované ako epiteloidné, sarkomatózne (fibrózne) alebo zmiešané (bifázické), ktoré sú vo veterinárnej medicíne ojedinelé. Tieto sa prezentujú sa proliferáciou obidvoch bunkových populácií, čo bolo IHC metodikou dokázané aj v našej práci. Pozitivita proti mutovanej forme p53 preukázala malígny charakter procesu.

Súhrn

V príspevku prezentujeme výsledky našich prác, ktoré demonštrujú využitie IHC vo veterinárnej medicíne, pri rôznych patologických procesoch, ako sú felína infekčná peritonitída, dôkaz pôvodu buniek pri mediastinálnej hemorágii a určenie typu a biologickej povahy mezoteliómu.

Literatúra

1. Coons A.H. et al.: Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 47, 1941, 200–202.
2. Kolodzieyski, L., Revajová, V.: Slov Vet Čas, 1995, 20; 283 – 287
3. Ševčíková, Z., Márková, K., Mandelík, R. et al.: Folia Veterinaria, 2024, 68(4); 1-8.
4. Ševčíková, Z., Hudec, E., Karaffová, V. et al: <http://www.jfmed.uniba.sk>, 2025; 147-152.
5. Ševčíková, Z., Kolodyieyski, L., Levkut, M. et al: Indian Vet J, 2000; 77: 852-855.

IMUNOHISTOCHEMIA: JEJ METÓDY A ICH APLIKÁCIA - PREHLAD

IMMUNOHISTOCHEMISTRY: ITS METHODS AND THEIR APPLICATION - A REVIEW

Šimaiová Veronika¹, Korim Filip¹, Maková Zuzana²

¹*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

²*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

veronika.simaiova@uvlf.sk

Abstract

This review highlights the concepts, processes, applications, and future perspectives of IHC, a popular immunostaining approach for the detection of specific proteins in tissue sections. Fixation, embedding, sectioning, antigen retrieval, blocking, detection, counterstaining, mounting, and visualization are part of the multistep IHC process, which interpretation is based on the microanatomical distribution and staining intensity. Common problems with IHC, such as nonspecific staining, tissue artifacts, insufficient inactivation of endogenous peroxidase activity, and cross-reactivity, can have a significant impact on the accuracy and reliability of results, affecting the interpretation of biological findings.

Úvod

Imunohistochemia (IHC) je diagnostická i výskumná metóda, ktorá využíva značené protilátky na lokalizáciu antigénov v tkanivách (1, 2). Pri aplikácii na jednotlivé bunky sa nazýva imunocytochemia. Protilátky, ktoré sú prirodzenými produktmi imunitnej odpovede tela, sa používajú na vizualizáciu miesta väzby protilátky na tkanivový alebo bunkový antigén (3). Značka sa pripojí k molekulám protilátky a možno ju detegovať. Imunocytochemia sa niekedy nazýva „imunologické značenie“. História imunohistochemie, rovnako dôležitá ako jej produkty, ctí inovácie lekárov a základných vedcov na celom svete (4, 5). Objavy, ktoré viedli k vytvoreniu imunohistochemie, sa začali v 90. rokoch 19. storočia malým výskumom „liečby sérom“, ktorý úzko súvisel s objavmi v praxi. Dr. Emil von Behring pracoval na Farmakologickom inštitúte Univerzity v Bonne ako asistent Roberta Kocha, priekopníka bakteriologického výskumu a budúceho laureáta Nobelovej ceny. Von Behring a jeho kolega Kitasato zistili, že injekčné podávanie oslabených foriem záškrtových baktérií zvieratám spôsobuje, že sa u zvierat v sérach vytvárajú „antitoxíny“, ktoré sa dajú terapeuticky využiť na liečbu týchto ochorení (6). Dosiahli prielom, aj keď pasívny, v liečbe záškrtu a tetanu a v roku

1890 úspešne liečili prvé dieťa. Translačný dopad bol obrovský, pretože predtým bola úmrtnosť na túto chorobu len v Nemecku vyše 50 000 ročne; antitoxínové sérum znížilo úmrtnosť z viac ako 50 % na 13 %. Vďaka tomu začala sérová terapia zachraňovať mnoho životov vrátane manželky Dr. von Behringa Else, ktorá s ním mala sedem detí. Von Behringova práca so sérovou liečbou mu v roku 1901 vyniesla prvú Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu. Aplikácia IHC môže poskytnúť cenné diagnostické informácie pri počiatočnom stanovení malignity. Špecifické protilátky namierené proti radu generických nádorových markerov určujú ich prítomnosť/nepítomnosť v chorom tkanive oproti normálnemu, ako aj špecifické diagnostické označenie pre daný súbor histologických zmien. Hoci je IHC analýza často interpretačná, a preto má zníženú špecificitu, identifikácia vzorcov imunoreaktivity môže potvrdiť typ nádoru. Okrem toho, keď sa použijú v kombináciách a interpretujú v správnom klinickom kontexte, hodnota takýchto markerov sa výrazne zvyšuje.

Vymedzenie problému

Napriek svojej kľúčovej úlohe v modernej diagnostike a biomedicínskom výskume čelí imunohistochemia (IHC) významným výzvam, ktoré obmedzujú jej plný potenciál v presnej medicíne. Od svojho vzniku IHC transformovala patológiu tým, že umožnila vizualizáciu špecifických proteínov v konzervovaných tkanivových rezoch, čím uľahčila diagnostiku, klasifikáciu a prognózu ochorení (7). Pokroky, ako je vyhľadávanie antigénov a multiplexná imunohistochemia, zlepšili citlivosť, špecificitu a schopnosť detekcie biomarkerov (8, 9). Tieto vylepšenia však úplne neodstránili kritické bariéry. Jedným z hlavných problémov je variabilita a subjektivita. Rozdiely v predanalytických faktoroch, ako je fixácia tkaniva, špecifickosť protilátok a protokoly na získavanie antigénov, prispievajú k nekonzistentným výsledkom v rôznych laboratóriách (10). Okrem toho, interpretácia IHC často závisí od ľudských znalostí, čo ju robí náchylnou na skreslenie pozorovateľa a znižuje reprodukovateľnosť (11). Problém sa stáva výraznejším, keď sa IHC používa pre prognostické markery, ako je Ki-67 v onkológii, kde je presná kvantifikácia kľúčová pre rozhodnutia o liečbe (12).

Princípy a metodologické základy

Teória väzby protilátka-antigén

Protilátky sú špecializované proteíny produkované B-lymfocytmi, ktoré rozpoznávajú a viažu sa na jedinečné molekulárne štruktúry antigénov, ktoré sa zvyčajne nachádzajú na povrchu buniek, patogénov alebo tkanív. Väzba je vysoko špecifická, často prirovnávaná k mechanizmu „zámok a kľúč“, kde väzbové miesto protilátky (paratóp) presne zodpovedá väzbovej oblasti

antigénu (epitópu). Táto interakcia je nekovalentná a spolieha sa na vodíkové väzby, van der Waalsove sily a elektrostatické interakcie, ktoré spolu vytvárajú silnú, ale reverzibilnú väzbu (13). V IHC sa tento biologický princíp využíva na detekciu prítomnosti, distribúcie a množstva špecifických proteínov v tkanivových rezoch. Aplikáciou protilátok proti cieľovému proteínu môžu výskumníci a klinickí lekári vizualizovať molekulárne zmeny v zdraví a chorobách, čím sa väzba protilátka-antigén stáva molekulárnym základom pre diagnostickú patológiu a translačný výskum (14).

Priame vs. nepriame metódy IHC

Existujú dva hlavné prístupy k aplikácii teórie protilátka-antigén v IHC: priame a nepriame metódy.

Priama IHC: zahŕňa značenie primárnej protilátky detekovateľným markerom, ako je enzým (napr. chrenová peroxidáza) alebo fluorescenčné farbivo. Po aplikácii na tkanivo sa táto protilátka viaže priamo na antigén a pripojená značka produkuje viditeľný signál. Výhodou priamej IHC je jej jednoduchosť a znížené farbenie pozadia, ale jej citlivosť je často nižšia, pretože každý antigén je viazaný iba jednou značenou protilátkou (14).

Nepriama IHC: využíva dvojkrovový proces. Primárna protilátka sa viaže na antigén a potom sa sekundárna protilátka konjugovaná s detekčným systémom viaže na primárnu protilátku. Keďže na jednu primárnu protilátku sa môže naviazať viacero sekundárnych protilátok, táto metóda výrazne zosilňuje signál, vďaka čomu je citlivejšia ako priama IHC. Nepriama IHC sa preto častejšie používa vo výskume a diagnostike, napriek tomu, že je časovo náročnejšia a má mierne vyššie riziko nešpecifického farbenia pozadia (15).

Detekčné systémy založené na enzýmoch a fluorescencii

Detekčné systémy sú kľúčové pre imunohistochémiu (IHC), pretože umožňujú vidieť neviditeľné väzbové udalosti protilátky a antigénu pre ľudské oko alebo zobrazovacie zariadenia. Dva široko používané prístupy sú detekčné systémy založené na enzýmoch a fluorescencii, pričom každý z nich má odlišné výhody a aplikácie (10).

Detekcia na báze enzýmov: Detekcia na báze enzýmov zostáva najbežnejšou metódou v diagnostickej patológii. Sekundárna protilátka je konjugovaná s enzýmom, ako je chrenová peroxidáza (HRP) alebo alkalická fosfatáza (AP). Po naviazaní sa pridá chromogénny substrát (napr. diaminobenzidín pre HRP) a enzým katalyzuje chemickú reakciu, ktorá priamo v mieste antigénu vytvára nerozpustnú farebnú zrazeninu. To vytvára trvalé farbivo viditeľné pod štandardným svetelným mikroskopom. Hlavnou výhodou systémov na báze enzýmov je ich

stabilita a reprodukovateľnosť. Zafarbené sklíčka sa dajú dlhodobo skladovať, vďaka čomu sú vhodné pre diagnostické archívy a retrospektívny výskum. Intenzita signálu však závisí od vývoja substrátu a môže byť obmedzená pri detekcii proteínov s veľmi nízkou abundanciou (1).

Detekcia založená na fluorescencii: Fluorescenčná detekcia naopak využíva protilátky konjugované s fluorofórom. Keď sú tieto fluorofóry vystavené svetlu so špecifickými excitačnými vlnovými dĺžkami, emitujú svetlo s dlhšími vlnovými dĺžkami, čím vytvárajú jasný fluorescenčný signál. Tento prístup umožňuje vysokú citlivosť a simultánnu detekciu viacerých antigénov prostredníctvom rôznych fluorescenčných farieb (multiplexná imunofluorescencia). Sila detekcie založenej na fluorescencii spočíva v jej kvantitatívnom potenciáli a multiplexnej schopnosti, čo je obzvlášť cenné vo výskume biomarkerov rakoviny, neurovede a systémovej biológii (10). Fluorescenčné signály sú však menej trvalé, pretože fluorofóry môžu časom fotobieliť a sklíčka zvyčajne vyžadujú na analýzu špecializované fluorescenčné alebo konfokálne mikroskopy (16).

Súhrn

Táto recenzia prináša niekoľko dôležitých príspevkov k existujúcemu súboru poznatkov o imunohistochemii (IHC). Prehľad tiež prispieva k poznaniu skúmaním obmedzení a výziev imunohistochemie vrátane interpretačnej variability, technickej zložitosti a potreby štandardizácie v laboratóriách. Riešením týchto výziev spolu s technologickým pokrokom recenzia identifikuje kľúčové oblasti, na ktoré by sa mal budúci výskum a klinická prax zamerať, najmä na integráciu imunohistochemie s molekulárnou patológiou, digitálnymi pracovnými postupmi a rámcami presnej medicíny.

Literatúra

1. Mebratie, D.Y., Dagnaw, G.G.: *Sem Diag Pathol*, 2024; 41(3), 154-160.
2. Cho, J.: *Blood Research*, 2022; 57(S1), 55-61.
3. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M.P., Yong, W.H.: An introduction to performing immunofluorescence staining. In W. H. Yong (Ed.), *Biobanking: Methods in molecular biology*, 2019; 299-311.
4. Rivera, J.P., Hang, J.F.: *Endocr Pathol*, 2025; 36(1), 8.
5. Momeni-Boroujeni, A., Nucci, M.R., Chapel, D.B.: *Adv Anat Pathol*, 2025; 32(1), 44-56.
6. El Hassani, M.: *The Biochemist*, 2024; 46(2), 18-22.
7. Magaki, S., Hojat, S.A., Wei, B., So, A., Yong, W.H.: In *Methods in Molecular Biology*, 2019; 289-298.
8. Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L.: *J Histochem Cytochem*, 1991; 39(6), 741-748.
9. Joe, C.: *J Clin Pathol Lab Med*, 2023; 5(4), 156.
10. Taylor, C.R., Levenson, R.M.: *J Pathol Inform*, 2023; 14, 100246.
11. Stack, E.C., Wang, C., Roman, K. A., Hoyt, C.C.: *Methods*, 2020; 170, 4-17.
12. Schimanski, T., Loucas, R., Loucas, M. et al.: *Cells*, 2025; 14(12), 898.
13. Hang, J.F., Rivera, J.P.: *Endocr Pathol*, 2025; 36,8.
14. Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A.: *Vet Pathol*, 2025; 58(5), 838-851.
15. Sukswai, N., Khoury, J. D.: *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, 14(5), 368-375.
16. Shi, S. R., Taylor, C.R.: *Methods Mol Biol*, 2022; 2483, 3-20.

IMUNOHISTOCHEMICKÁ EXPRESIA PROTEÍNU P53 AKO POTENCIÁLNY PROGNOSTICKÝ MARKER V INVAZÍVNYCH KARCINÓMOCH PRSNÍKA

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF THE P53 PROTEIN AS A POTENTIAL PROGNOSTIC MARKER IN INVASIVE BREAST CARCINOMAS

Miriama Šlebodová¹, Janka Vecanová¹, Ingrid Hodorová¹

¹*Ústav anatómie, LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, Košice, SR*

miriama.slebodova@upjs.sk

Abstract

The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of p53 protein in invasive breast carcinomas. A total of 135 paraffin-embedded tissue samples were analyzed and compared with normal breast tissue. Overexpression of dysfunctional p53 protein was detected in 24.4% of cases, while normal breast tissue showed no expression. p53 positivity was observed across all histological types of carcinomas, although negative cases predominated in each group. Immunohistochemical staining confirmed typical nuclear localization of p53 in tumor cells. These findings indicate that p53 expression can be reliably detected using immunohistochemistry. However, its prognostic significance requires further investigation.

Úvod

Karcinómy mliečnej žľazy predstavujú najčastejšie malígne ochorenie u žien a vo vyspelých krajinách sú druhou najčastejšou príčinou mortality v produktívnom veku (1, 2). Na Slovensku postihujú približne každú desiatu ženu a ich incidencia má stúpajúci trend. Napriek pokrokom v diagnostike a liečbe zostáva ich prognóza variabilná, čo je podmienené biologickou heterogenitou nádorov (3). Liečebná stratégia závisí od rozsahu ochorenia a biologických charakteristík nádoru a zahŕňa chirurgickú liečbu, rádioterapiu, chemoterapiu, hormonálnu terapiu a imunoterapiu (4). Pri rozhodovaní o liečbe sa využívajú tradičné prognostické faktory, ako sú veľkosť nádoru, histologický typ, histologický grade, stav lymfatických uzlín a expresia hormonálnych receptorov a HER2 (5). Tieto klasické faktory však nedokážu plne vystihnúť molekulovú heterogenitu nádorov (6). Približne u jednej tretiny pacientov zaradených do prognosticky priaznivej skupiny dochádza k recidíve ochorenia, zatiaľ čo u časti pacientov s nepriaznivou prognózou ochorenie neprogreduje. Z tohto dôvodu je snahou identifikovať nové prognostické a prediktívne markery (7). Jedným z takýchto markerov je proteín p53, ktorý

zohráva významnú úlohu v regulácii bunkového cyklu, apoptóze a odpovedi bunky na poškodenie DNA (8). Jeho mutácie sú časté v rôznych nádoroch a môžu byť spojené s agresívnejším priebehom ochorenia a vznikom liekovej rezistencie (9, 10).

Materiál a metódy

Štúdia bola realizovaná retrospektívne na 135 archívnych parafinových vzorkách invazívnych karcinómov prsníka. Tkanivá boli získané z patologických pracovísk v Košiciach, Prešove a Žiline. Vzorky boli odobraté počas chirurgického výkonu, fixované vo formalíne a následne spracované štandardnou histologickou technikou. Pacientky boli vo veku od 37 do 83 rokov, pričom väčšina bola staršia ako 50 rokov. Najčastejším histologickým typom bol invazívny duktálny karcinóm. Detekcia proteínu p53 bola realizovaná nepriamou trojstupňovou imunohistochemickou metódou (SABC). Použitá bola monoklonálna protilátka DO7. Vizualizácia reakcie antigén-protilátka bola dosiahnutá pomocou chromogénu DAB, ktorý spôsobuje hnedé sfarbenie pozitívnych buniek. Expresia p53 bola hodnotená semikvantitatívne:

- [-] bez expresie
- [1+] nízka expresia
- [2+] stredná expresia
- [3+] vysoká expresia

Stupne 2+ a 3+ boli považované za pozitívne (overexpresia) (11). Hodnotenie vykonali traja nezávislí hodnotitelia. Vo väčšine prípadov sme zaznamenali zhodu, v sporných prípadoch sme po spoločnom hodnotení a diskusii dospeli k jednotnému názoru.

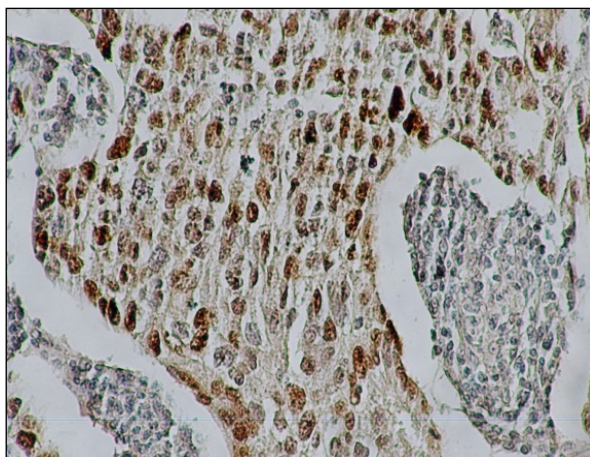
Výsledky

Histologická typizácia bola vykonaná patológmi na základe klasifikácie WHO a invazívny duktálny karcinóm bol gradovaný podľa Nottinghamskej klasifikácie. Pacientky boli vo veku medzi 37 a 83 rokov, väčšina bola v čase diagnózy nad 50 rokov. U väčšiny pacientok bol diagnostikovaný duktálny invazívny karcinóm a bolo prítomné aj postihnutie uzlín. Na imunohistochemickú detekciu p53 sme použili myšiu monoklonálnu protilátku proti p53 DO7 (DakoCytomation). Prehľad analyzovaného súboru a expresie p53 v invazívnych karcinómoch prsníka je zaznamenaný v tabuľke 1. Použitím imunohistochemickej metódy sme v týchto vzorkách stanovili expresiu defektného proteínu p53.

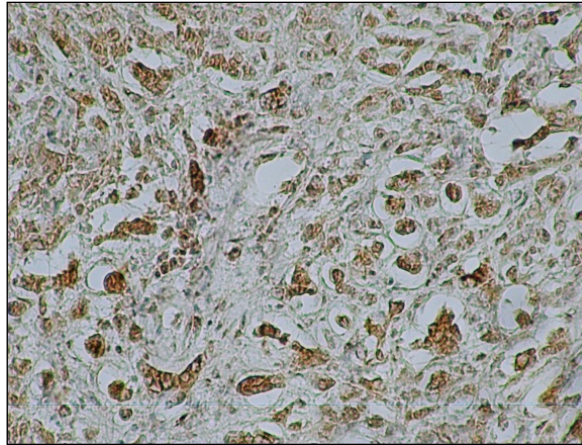
Parameter	Počet (n)	Podiel (%)
Počet pacientok spolu	135	100
Histologický typ		
Duktálny karcinóm	110	81,5
Lobulárny karcinóm	10	7,4
Iné typy	15	11,1
Expresia p53		
Pozitívna	33	24,4
Negatívna	102	75,6

Tab. 1 Prehľad analyzovaného súboru a expresie p53 v invazívnych karcinómoch prsníka

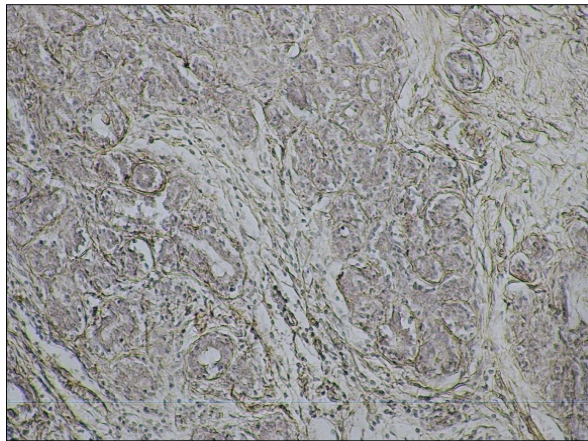
V prvej skupine, ktorú tvorili vzorky duktálneho karcinómu, bolo 25 vzoriek hodnotených p53 pozitívne (22,7%) (Obr. 1) a 85 vzoriek bolo p53 negatívnych (77,3%). V druhej skupine lobulárneho karcinómu vykazovali p53 expresiu 3 vzorky (30%) (Obr. 2) a 7 vzoriek ostalo bez expresie p53 (70%). V tretej skupine (iné typy) 5 vzoriek (33,3%) vykazovalo p53 pozitivitu. Ostatné vzorky ostali bez p53 pozitivity. Zdravé tkanivo nevykazovalo expresiu defektného proteínu p53 (Obr. 3).



Obr. 1 Duktálny karcinóm – Prítomnosť p53 sa prejavila výrazným hnedým sfarbením jadier nádorových buniek. Zväčšenie 200x



Obr. 2 Lobulárny karcinóm – tmavohnedé sfarbenie jadier nádorových buniek je dôkazom imunohistochemickej detekcie proteínu p53. Zväčšenie 200x



Obr. 3 Zdravá mliečna žľaza – Bunky zostali p53 negatívne. Ich jadrá sú hematoxylínom sfarbené na modro. Zväčšenie 200x

Diskusia

Proteín p53 patrí medzi tumor-supresorové proteíny a zohráva kľúčovú úlohu pri udržiavaní genetickej stability bunky. Podieľa sa na regulácii bunkového cyklu, oprave DNA a indukcii apoptózy. V normálnych bunkách je jeho hladina nízka, čo znemožňuje jeho detekciu imunohistochemickými metódami. V nádorových bunkách dochádza často k mutáciám génu TP53, ktoré vedú k tvorbe stabilného, avšak nefunkčného proteínu p53. Tento sa akumuluje v jadre buniek a je detekovateľný imunohistochemicky ako pozitívne hnedé sfarbenie jadier nádorových buniek. V našej štúdií sme detegovali expresiu p53 v 24,4 % invazívnych karcinómoch prsníka, pričom zdravé tkanivo nevykazovalo jeho prítomnosť. Tieto výsledky sú v súlade s literárnymi údajmi, ktoré uvádzajú expresiu p53 približne v 19–35 % prípadov karcinómov prsníka (11, 12, 13). Expresia p53 sa vyskytovala vo všetkých sledovaných histologických typoch, pričom vo všetkých skupinách prevažovali negatívne prípady. Rozdiely

medzi jednotlivými typmi boli minimálne, čo naznačuje, že expresia p53 pravdepodobne nesúvisí s histologickým typom nádoru. Mikroskopické hodnotenie potvrdilo typickú jadrovú lokalizáciu p53 v nádorových bunkách, zatiaľ čo v zdravom tkanive nebola jeho expresia detegovaná. Tento nález podporuje využitie imunohistochemického dôkazu ako pomocného nástroja pri hodnotení nádorových tkanív. Viaceré štúdie poukazujú na možnú súvislosť expresie p53 s agresívnejším biologickým správaním nádorov, avšak jeho presný prognostický význam zostáva nejednoznačný, keďže niektoré práce tento vzťah nepotvrdili (14). Na základe našich výsledkov možno konštatovať, že imunohistochemická detekcia p53 je vhodnou metódou na identifikáciu jeho expresie v nádorových tkanivách, avšak jej prognostický význam si vyžaduje ďalšie overenie.

Súhrn

V našej štúdií sme hodnotili imunohistochemickú expresiu proteínu p53 v 135 prípadoch invazívnych karcinómov prsníka. Expresia p53 bola detegovaná v 24,4 % prípadov, pričom zdravé tkanivo prsníka nevykazovalo jeho prítomnosť. Pozitivita p53 bola zaznamenaná vo všetkých sledovaných histologických typoch karcinómov, pričom vo všetkých skupinách prevažovali negatívne prípady. Mikroskopické hodnotenie potvrdilo typickú jadrovú lokalizáciu proteínu p53 v nádorových bunkách. Získané výsledky naznačujú, že imunohistochemická detekcia p53 predstavuje vhodný nástroj na hodnotenie jeho expresie v nádorových tkanivách. Význam p53 ako prognostického markera však zostáva nejednoznačný a vyžaduje ďalšie klinické štúdie.

Literatúra

1. Kajo, K., Žúbor, P.: Gynekológia a pôrodnictvo, 2010; 3-4:146-151.
2. Bray, F., et al.: CA Cancer J Clin, 2018; 68(6):394-424.
3. Polyak, K.: J Clin Invest, 2011; 121(10):3786-3788.
4. Waks, A.G., Winer, E.P.: JAMA, 2019; 321(3):288-300.
5. Goldhirsch, A., et al.: Ann Oncol, 2011; 8(22):1736-1747.
6. Yersal, O., Barutca, S.: World J Clin Oncol, 2014; 5(3):412-424.
7. Colomer R., González-Farré B., Ballesteros A.I., et al.: Clin Transl Oncol. 2024;26(12):2935-2951.
8. Levine, A.J.: Cell, 1997; 88(3):323-331.
9. Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P.: Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010;2(1):a001008.
10. Vousden, K.H., Prives, C.: Cell, 2009; 137(3):413-431.
11. van Diest, P.J., van Dam, P., Henzen-Logmans, S.C., et al.: J Clin Pathol, 1997;50(10):801-804.
12. Marvalim, C., Datta, A., Lee, S.C.: Theranostics. 2023;13(4):1421-1442.
13. Gasco, M., Shami, S., Crook, T.: Breast Cancer Res. 2002;4(2):70-76.
14. Pei, XJ., Yang, QX., Liu, SJ., et al.: Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2012;41(7):479-480.

This work was funded by EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under the project No. 09I03-03-V05-00008 (VVGs ESGV vvgS-2023-2939).

VPLYV PREDINKUBÁCIE NA TVORBU ADIPONEKTÍNU A VÝVIN ČREVA KURACIEHO EMBRYA

THE INFLUENCE OF PREINCUBATION ON ADIPONECTIN FORMATION AND INTESTINAL DEVELOPMENT OF CHICKEN EMBRYO

Slavomíra Štefancová¹, Bronislava Pokorná¹, Eva Petrovová², Lenka Luptáková¹

¹*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

²*Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR*

slavka780@gmail.com

Abstract

The objective of this study was to assess the impact of hatching egg storage duration and preincubation on embryonic development and adiponectin expression in the intestine of chickens (*Gallus gallus domesticus*). A total of 60 eggs were stored under controlled conditions (16°C) for varying durations: 0, 3, 9, and 14 days. A subset of these eggs was subjected to a preincubation process at 30°C for 12 hours prior to the initiation of the formal incubation process and all the eggs were incubated (37,5°C) until embryonic day 9 (ED9). Preincubation exhibited a significant increase in embryonic weight ($p < 0.05$), while prolonged storage demonstrated a negative impact on embryonic growth. Histological analysis revealed no structural differences in intestinal morphology between groups but adiponectin was detected in all samples, predominantly in the *tunica mucosa*, and its expression varied dynamically depending on storage conditions. The highest expression was observed in the long-term storage group that had undergone preincubation. These findings suggest that preincubation mitigates the adverse effects of storage duration, while adiponectin may be involved in adaptive regulatory mechanisms during embryogenesis.

Úvod

Globálna produkcia hydiny sa zameriava najmä na kurčatá a rastúci dopyt po ich mäse a vajciach zvyšuje potrebu optimalizácie všetkých fáz produkcie (1). Embryonálny vývin tvorí významnú časť života brojlerov, preto je jeho optimalizácia kľúčová pre liahnivosť a rast kurčiat (2). Tento proces je ovplyvnený viacerými faktormi, ako sú vek rodičovského krdľa, podmienkami skladovania vajec vrátane otáčania, dĺžky trvania, polohy vajec, teploty a manipulačných postupov, ako je predinkubácia, ktoré predstavujú kritické determinanty

životaschopnosti embryí a úspechu liahnutia (3). Dlhodobé skladovanie, aj keď len 7 dní v starších chovných krdľoch, môže negatívne ovplyvniť liahnivosť a kvalitu kurčiat (4). Predinkubácia pomáha synchronizovať vývin embryí a zmierňuje negatívne účinky teplotných zmien (5). Okrem toho, teplotná manipulácia počas embryogenézy môže zvýšiť termotoleranciu prostredníctvom fyziologickej adaptácie a epigenetickej regulácie génovej expresie, čo potenciálne zvyšuje metabolickú aktivitu po vyliahnutí (6; 7). Vývin a funkčnosť gastrointestinálneho traktu sú vysoko citlivé na faktory prostredia vrátane teploty a inkubačných podmienok, ktoré môžu ovplyvniť morfológiu čriev, mikrobiálnu kolonizáciu a metabolickú aktivitu. Stresory, ktoré narúšajú vývin črevnej sliznice, môžu zhoršiť absorpciu živín a rast čreva, vďaka čomu je morfológia čriev široko používaným ukazovateľom zdravia čriev (8). Táto štúdia sa zameriava na vplyv predinkubácie a skladovania vajec na vývin embryí a expresie adiponektínu v tráviacom trakte, konkrétne v čreve. Výsledky môžu prispieť k zlepšeniu liahnivosti, kvality rastu kurčiat a zároveň priniesť poznatky o vývine a metabolických procesoch hydiny.

Materiál a metódy

Oplodnené slepačie vajcia (*Gallus gallus domesticus*, n = 60) boli získané z certifikovaného liaharenského zariadenia (EN ISO 22000; Liaharenský podnik Nitra, as, Párovské Háje, Slovensko) a rozdelené do štyroch skupín podľa dĺžky skladovania (0, 3, 9 a 14 dní) s predinkubáciou a bez nej. Vajcia boli skladované pri 16 °C, pričom polovica z každej skupiny bola predinkubovaná (30 ± 0,5 °C; 60 % RH, 12 h) a následne boli všetky vajcia inkubované pri 37,5 ± 0,5 °C do 9. dňa embryonálneho vývinu (ED9); kontrolná skupina (0 dní) bola inkubovaná bez skladovania. Na ED9 boli embryá odobraté, zaznamenala sa mortalita, hmotnosť embrya, čreva a morfologické abnormality. Črevo bolo po dekapitácii fixované v Dentsovom roztoku (n = 50), spracované štandardnou histologickou technikou (parafínové rezy 4 µm, farbenie hematoxylín-eozín) a analyzované pomocou svetelnej mikroskopie (20x, 40x). Imunohistochemická detekcia adiponektínu bola realizovaná na parafínových rezoch po antigénovom demaskovaní, blokovani peroxidázy, inkubácii s primárnou protilátkou (1:100), sekundárnou protilátkou (1:200) a ABC/DAB vizualizáciou; negatívna kontrola bola bez primárnej protilátky. Intenzita farbenia bola kvantifikovaná digitálnou analýzou (ImageJ) ako priemerná hodnota z 5 snímok po odpočítaní pozadia. Štatistická analýza bola vykonaná v programe GraphPad Prism (ANOVA, Šídakov a Tukeyho test), pričom rozdiely boli považované za významné pri $p < 0,05$.

Výsledky

Predinkubácia mala signifikantný vplyv na rast embryí, pričom jedince zo všetkých skupín s predinkubáciou (PI) vykazovali vyššiu telesnú hmotnosť v porovnaní so skupinami bez predinkubácie (BPI). Osem vajec bolo neoplodnených a 2 boli mŕtve. Štatisticky významné zvýšenie hmotnosti celého embrya bolo zaznamenané na 3. deň ($p < 0,05$), pričom pri dlhšom skladovaní (9 a 14 dní) došlo k miernemu poklesu. Hmotnosť čreva sa medzi skupinami výrazne nelíšila, avšak u PI skupín bola pozorovaná tendencia k vyšším a stabilnejším hodnotám, najmä pri dlhšom skladovaní, na rozdiel od BPI skupín, kde bol zaznamenaný pokles. Histologická analýza nepreukázala prítomnosť morfológických ani štrukturálnych odchýlok medzi jednotlivými skupinami. Imunohistochemická analýza potvrdila prítomnosť adiponektínu vo všetkých experimentálnych skupinách bez zreteľných rozdielov pri kvalitatívnom hodnotení. Lokalizácia adiponektínu bola prevažne v *tunica mucosa* (epitel a *lamina propria mucosae*), s prítomnosťou aj v *tunica muscularis* a *tunica serosa*. Semikvantitatívna analýza (ImageJ) však odhalila štatisticky významné rozdiely ($p < 0,05$). Najvyššia expresia adiponektínu v čreve bola zaznamenaná v PI skupine po 14 dňoch skladovania. Tieto výsledky naznačujú, že adiponektín je stabilne exprimovaný v čreve počas embryonálneho vývinu, pričom jeho expresia podlieha dynamickej regulácii v závislosti od dĺžky a podmienok skladovania.

Diskusia

Dlhodobé skladovanie násadových vajec má preukázateľne negatívny vplyv na ich kvalitu, liahnivosť a životaschopnosť embryí (9; 10). V tejto štúdií boli oplodnené vajcia skladované pri 16 °C počas 0, 3, 9 a 14 dní, pričom predinkubácia (30 °C /12 h) sa ukázala ako účinný faktor zmiernujúci nepriaznivé dôsledky skladovania. U vajec skladovaných 3 dni nastalo signifikantné zvýšenie hmotnosti embryí ($p < 0,05$), čo naznačuje, že krátkodobé skladovanie vajec môže podporiť embryonálny vývin a zlepšiť životaschopnosť embryí. Zaujímavé je, že vajcia inkubované bezprostredne po znáške sa často liahnu neskôr než vajcia skladované jeden alebo dva dni. Tento jav možno vysvetliť vyššou koncentráciou CO₂ v čerstvo znesených vajciach, čo môže inhibovať iniciáciu embryonálneho vývinu, ako aj vyššou viskozitou bielka, ktorá môže obmedziť výmenu plynov a dostupnosť živín (11). Optimálne liahnutie sa preto dosahuje pri krátkodobom skladovaní, približne do 4 dní (9). Naopak, predĺžené skladovanie (9-14 dní) bolo spojené so zníženým embryonálnym rastom, najmä bez predinkubácie. Predinkubácia aj pri relatívne krátkom trvaní (12 hodín) preukázateľne podporila embryonálny rast a zmiernila negatívne dôsledky skladovania, čo je v súlade so zisteniami o jej pozitívnom vplyve na synchronizáciu liahnutia a kvalitu kurčiat (5). Vo všeobecnosti sa odporúča

neprekračovať dobu skladovania 7 dní pri približne 17 °C, keďže dlhšie skladovanie vedie k výraznému zhoršeniu liahnivosti (12). Histologická analýza čreva nepreukázala štrukturálne rozdiely medzi skupinami, čo naznačuje zachovanie fyziologickej integrity tkanív a stabilný priebeh embryogenézy vo všetkých sledovaných skupinách. Tento výsledok podporuje predpoklad, že vývin gastrointestinálneho traktu je u vtákov vysoko regulovaný a morfológicky stabilný, pokiaľ nedochádza k pôsobeniu výrazných stresových faktorov (13). Imunohistochemická analýza potvrdila prítomnosť adiponektínu vo všetkých sledovaných tkanivách, s lokalizáciou najmä v *tunica mucosa* (epitel a *lamina propria mucosae*), čo poukazuje na jeho úlohu v lokálnej regulácii tkanivového prostredia. Tento hormón je známy ako významný regulátor metabolizmu a bunkových procesov, pričom jeho široká expresia naznačuje komplexnú funkciu počas embryonálneho vývinu (14; 15; 16).

Hoci vizuálne hodnotenie neodhalilo zjavné rozdiely v intenzite imunopozitivity, semikvantitatívna analýza identifikovala štatisticky významné rozdiely medzi skupinami, čo poukazuje na vyššiu citlivosť digitálnych analytických prístupov (17). Expresia adiponektínu zároveň vykazovala dynamický charakter, pričom v čreve bola zvýšená najmä pri dlhšom skladovaní (14 dní, PI). Tento trend naznačuje jeho možnú úlohu v adaptívnych mechanizmoch a koordinácii vývinu tráviaceho traktu počas embryogenézy (14; 16).

Celkovo výsledky poukazujú na význam predinkubácie ako efektívnej stratégie na zmiernenie negatívnych účinkov dlhodobého skladovania, pričom adiponektín sa javí ako potenciálny regulátor procesov spojených s vývinom a metabolickou adaptáciou embrya.

Súhrn

Výsledky štúdie potvrdili, že predĺžené skladovanie násadových vajec negatívne ovplyvňuje embryonálny rast, zatiaľ čo predinkubácia predstavuje účinný nástroj na zmiernenie týchto nepriaznivých účinkov. Absencia histologických zmien naznačuje zachovanie fyziologickej integrity črevného tkaniva počas embryogenézy. Súčasne bola potvrdená stabilná, avšak dynamicky regulovaná expresia adiponektínu, s jej zvýšením pri dlhšom skladovaní v skupinách s predinkubáciou. Tieto zistenia poukazujú na potenciálnu úlohu adiponektínu v adaptačných a regulačných mechanizmoch vývinu tráviaceho traktu. Predinkubáciu tak možno považovať za vhodnú stratégiu na optimalizáciu liahnivosti a kvality kurčiat pri dlhšom skladovaní vajec.

Literatúra

1. Çalik, Ş. et al.: *Europ Poult Sci*, 2023; 87(1):1–10.
2. Gao, M. et al.: *Poult Sci*, 2024; 103(6):103624.

3. Tona, K. et al.: Front Physiol, 2022; 13:895854.
4. Tesarova, M. et al.: Poult Sci, 2021; 100(8):101293.
5. Özlü, S.: Poult Sci, 2021; 100(3):101016.
6. Al Amaz, S. et al.: Poult Sci, 2024; 103(4):103527.
7. David, S.A. et al.: Front Genet, 2019; 10:1207.
8. Al Amin, M. et al.: J Poult Sci, 2025; 62(1):2025004.
9. Andri, F. et al.: Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production, 2024; 25(1):59–64.
10. Çam, M. et al.: Ital J Anim Sci, 2022; 21(1):1632–1641.
11. Adriaensen, H. et al.: Front Physiol, 2022; 13:902154.
12. Biesek, J. et al.: Animal, 2024; 18(12):101366.
13. Helal, M. et al.: J-STAGE, 2025; 13:20–31.
14. Cai, J. et al.: Poult Sci, 2021; 100(12):101480.
15. Diot, C. et al.: Reprod Biol and Endocrinol, 2015; 13:81.
16. Ramachandran, R. et al.: Gen Comp Endocrinol, 2013; 190:88–95.
17. Chlipala, E. et al.: Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2019; 28(6):428–436.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0373/24.

ZVÝŠENIE ANTIBAKTERIÁLNEJ AKTIVITY BIOCEMENTU NA BÁZE α -TRIKALCIUMFOSFÁT/MED PÔSOBNÍM GLUKÓZOOXIDÁZY

GLUCOSE OXIDASE-MEDIATED ENHANCEMENT OF THE ANTIBACTERIAL PERFORMANCE OF α -TRICALCIUM PHOSPHATE/HONEY BIOCEMENT

**Radoslava Štulajterová¹, Lubomír Medvecký¹, Mária Giretová¹, Pavlína Jevinová²,
Tibor Sopčák¹**

¹*Divízia funkčných a hybridných systémov, Ústav materiálového výskumu SAV, v.v.i.,
Watsonova 47, 04 001 Košice, Slovakia*

²*Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF v Košiciach,
Komenského 73, Košice, 041 81, Slovakia*

rstulajterova@saske.sk

Abstract

An α -TCP/honey and glucose oxidase-based cement composite demonstrated potent antibacterial efficacy against *E. coli* and *S. aureus*. While high affinity of glucose oxidase (GO) for the α -TCP surface initially reduced enzymatic activity in phosphate-buffered saline, serum supplementation induced a fourfold activity increase due to partial enzyme desorption. This strategy significantly augments the antimicrobial potential of bone cements for treating infected wounds, contaminated fractures, and postoperative complications.

Úvod

Vápenatofosfátové cementy (CPC) patria do dôležitej skupiny biomateriálov používaných v ľudskom tele na regeneráciu kostí vďaka svojej biokompatibilite, osteovodivosti a novej bioresorpcii (1). CPC sa aplikujú vo forme pást po zmiešaní prášku a kvapalných zložiek, ktoré vzájomne interagujú a vytvárajú najčastejšie nestechiometrický hydroxyapatit v nanokryštalickej forme (2). Med predstavuje prírodnú látku, ktorá aktívne podporuje proces hojenia rán a popálenín (3). Kyslý charakter medu (pH 3,2 – 4,5) stimuluje jeho antibakteriálne vlastnosti a v súvislosti s hojením kostných defektov sú ďalším zaujímavým antioxidantom a protizápalovým účinkom polyfenolov a glyoxalu alebo metylglyoxalu. Vlastnosti medu zodpovedné za zníženie oxidačného stresu vyplývajú z reaktívnych oxidačných látok v kostných tkanivách (4). Okrem toho jednou z kľúčových zlúčenín v mede, ktorá pozitívne ovplyvňuje inhibíciu mikrobiálneho rastu je peroxid vodíka (H₂O₂). Nízke množstvo enzýmu –

glukózooxidázy (GO) – identifikovaného v mede v neaktívnom stave by mohlo byť kľúčovým predpokladom pre in situ produkciu H_2O_2 po zriedení vo vodnom médiu. Kompozitný cement tetrakalciumfosfát/med mal iba nízku až strednú antibakteriálnu aktivitu, ale med aktívne zvyšoval osteogénnu aktivitu kompozitu (5). Ukázalo sa, že populáciu klinicky relevantných baktérií rezistentných na antibiotiká možno účinne znížiť pomocou H_2O_2 pri minimálnych inhibičných koncentráciách medzi 0,2 a 3,19 mM, a po expozícii in vitro nebola zistená žiadna rezistencia voči H_2O_2 (6). Štúdia sa zameriava na charakterizáciu nových kompozitných biocementov α -TCP obsahujúcich med ako jednu zo zložiek kompozitu a enzým GO na zlepšenie antibakteriálnych vlastností in situ produkciou H_2O_2 . Zloženie cementu a použitá metóda aplikácie by mohli predstavovať jednoduchý a veľmi účinný spôsob ako zvýšiť antibakteriálne vlastnosti kostných cementov, najmä pri bakteriálnom napadnutí rán, liečbe kontaminovaných zlomenín alebo pooperačných infekcií.

Materiál a metódy

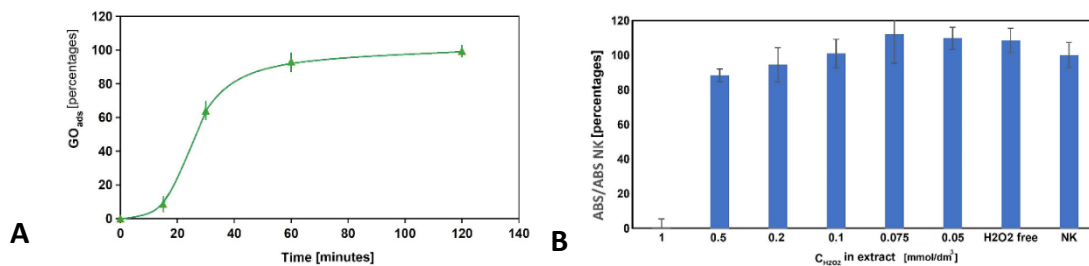
α TCP bol syntetizovaný reakciou $CaCO_3$ ($CaCO_3$ p.a., Sigma Aldrich) a bezvodým $CaHPO_4$ (monetit, DCPA) ($CaHPO_4$, Ph.Eur., Fluka) pri teplote 1320 °C/ 2 hod. Kompozitný cement M10 bol pripravený zmiešaním prášku α TCP s kvapalnou zložkou 1 % (hm./obj.) roztoku NaH_2PO_4 (p.a., Sigma-Aldrich) a 10 % (hm./obj.) medu (Manukový med (M), Activion®, medicínska čistota, Advancis medical). Cementy M10 obsahujúce GO sa získali zmiešaním roztoku GO (z *Aspergillus niger*, 100 000 – 250 000 U/g, typ X-S, Sigma-Aldrich) (rozpušteného v 1 % (hm./obj.) roztoku NaH_2PO_4) s kvapalnou zložkou bezprostredne pred prípravou kompozitných pást. Pomer P/L bol 2,6 a konečný obsah medu a GO v kompozitoch bol 5 % (hm./obj.) a 10; 5; 2,5 ppm (čo zodpovedá 5; 2,5; 1,25 μ g/500 mg α TCP, označených ako M10GO5, M10GO2,5 a M10GO1,25). Vzorky na analýzu produkcie peroxidu vodíka v kompozitoch boli pripravené formovaním valčekov z cementových pást (500 mg α TCP + 190 μ l kvapalnej zložky, ich uchovávaním pri 100 % vlhkosti pri teplote 37 °C/10 minút a namáčaním v 5 ml kultivačného média α MEM (voľného alebo doplneného 10 % FBS (MEM FBS)) pri teplote 37 °C počas vybraných časov. Všetky experimenty boli vykonané v troch opakovaníach. Obsah H_2O_2 vo vzorke bol stanovený pomocou súpravy na stanovenie peroxidu (MAK311, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a UVVIS spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Na stanovenie cytotoxicity extraktov cementu M10 doplnených H_2O_2 boli bunky MC3T3E1 Subklon 4 (ATCC CRL-2593, Manassas, VA, USA) resuspendované v kultivačnom médiu (α MEM Minimum essential medium Eagle + 10 % FBS (fetálne bovinné sérum), 1 % roztok antibiotika) (antibiotický antimykotický roztok (100 \times), s 10 000 jednotkami

penicilínu, 10 mg streptomycínu a 25 µg amfotericínu B na ml (Sigma-Aldrich)) a hustota buniek bola upravená na $1,0 \times 10^5$ buniek /ml v injekčnej liekovke. Cementové pasty M10 boli namočené v kultivačnom médiu (0,2 g/ml kultivačného média) pri teplote 37 °C/24 hodín. Následne bol do extraktu pridaný peroxid vodíka v takom množstve, aby jeho konečná koncentrácia bola 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mM. In vitro cytotoxicita bola vyhodnotená pomocou MTS testu (Cell titer 96 aquaterial one solution cell proliferation assay, Promega Madison, WI, USA) a koncentrácia formazánu bola stanovená UV-VIS spektrofotometrom (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) pri 490 nm. Na stanovenie antibakteriálneho účinku testovaných vzoriek boli použité kmene *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (Česká zbierka mikroorganizmov, Masarykova univerzita Brno, Česká republika). Hustota bola meraná pomocou denzitometra (BIOSAN, Lotyšsko). Z pripravených bakteriálnych suspenzií bolo 0,1 ml prenesených a rovnomerne rozotretých na povrchy dvoch kultivačných médií: Müller-Hintonovho agaru a Nutrient agaru (HiMedia, India). Na stanovenie antibakteriálnej aktivity kompozitov sa použili cementové pasty s tromi rôznymi koncentraciami GO. Po inkubácii Petriho misiek pri 37 °C/ 24 – 48 hodín sa pomocou prístroja na meranie presnosti merania (kalibrované pravítko) (HiMedia, India) zmerali priemery všetkých výsledných inhibičných zón okolo jamiek. Štatistické vyhodnotenie výsledkov ($n = 3$) sa vykonalo pomocou jednofaktorovej ANOVA analýzy (Statmost pre Windows) na úrovni $\alpha = 0,05$.

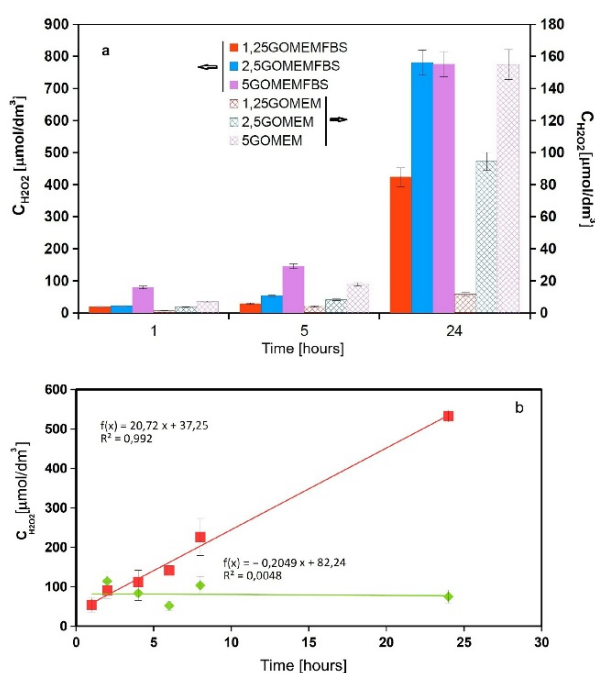
Výsledky a diskusia

Povrchová transformácia pôvodnej fázy α TCP na CDHA zohrala kľúčovú úlohu v pozorovanom rýchlom poklese koncentrácie GO v namáčaacom roztoku a tento proces mohol aktívne ovplyvniť aktivitu enzýmu. Z hľadiska možnej zmeny enzymatickej aktivity GO po jeho adsorpcii na povrch fáz fosforečnanu vápenatého v cemente bola adsorpcia GO hodnotená po 15, 30, 60 a 120 minútach namáčania cementu M10 (bez GO) do roztoku obsahujúceho 20 mg GO v PBS pri teplote 37 °C. Nameraná závislosť jasne ukázala rýchlu adsorpciu GO z roztoku s >90% znížením koncentrácie GO aj po 60 minútach namáčania (1A).

Testovanie cytotoxicity MTS in vitro (1B) ukázalo, že cementové extrakty s koncentraciou $H_2O_2 < 0,5$ mM (čo zodpovedá koncentrácii H_2O_2 v extrakte kompozitu M10GO1.25 po 24 hodinách namáčania alebo kratších časoch namáčania kompozitov M10GO2.5 a M10GO5) neboli cytotoxické v zmysle štandardu (7). Treba poznamenať, že biomineralizácia GO fosforečnanom vápenatým účinne zlepšila biokompatibilitu a znížila cytotoxicitu komplexu fosforečnan vápenatý/GO (8).



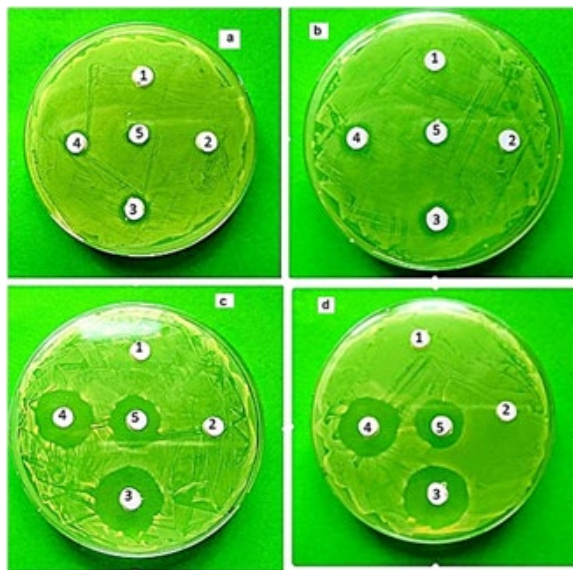
Obr. 1 *A* - Adsorpcia GO na povrch častíc fosforečnanu vápenatého v cemente po ponorení cementu M10 (bez GO) do roztoku obsahujúceho 20 mg GO v PBS pri teplote 37 °C. *B* – Viabilita osteoblastov kultivovaných v MEM pri teplote 37 °C, 95 % vlhkosti, 5 % CO₂ a rôznych koncentráciách peroxidu vodíka.



Obr. 2 Koncentrácia vyprodukovaného H₂O₂ počas namáčania kompozitných cementov M10GO v MEM a MEM FBS pri teplote 37 °C (a), závislosť koncentrácie H₂O₂ od času namáčania kompozitu M10GO5 v MEM FBS doplnenom o 0,5 % (hm./obj.) glukózy (b – červená krivka) a závislosť množstva H₂O₂ vyprodukovaného počas 1 hodiny v cementových extraktoch (b – zelená krivka).

Aktivita GO v roztoku manuka medu lekárskej kvality, v 40 % (hm./obj.) roztoku bola nízka (približne 15 mU/ml), zatiaľ čo koncentrácia H₂O₂ po 24 hodinách inkubácie pri teplote 37 °C bola približne 100 μM a minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) pre *S. aureus* sa rovnala 5 % (hm./obj.) medu (9). Produkcia H₂O₂ cementami M10 bola takmer štyrikrát vyššia ako stanovená MIC, a to aj pri najnižšom pridaní GO do cementu a pri desaťnásobne nižšom obsahu

medu v extrakčnom médiu, čo jasne preukázalo účinnosť pridaného GO do cementu na produkciu H₂O₂.



Obr. 3 Reprezentatívne snímky inhibičných zón pre *Escherichia coli* CCM 3954 (a, b) a *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (c, d) okolo jamiek s testovanými vzorkami cementu kultivovanými v Müller-Hintonovom (b, d) a Nutrient agare (a, c).

Výsledky potvrdzujú relatívne široký rozsah koncentrácií GO, kde antibakteriálna aktivita kompozitov M10GO (a produkcia H₂O₂) bola vysoká, oproti študovaným bakteriálnym kmeňom, najmä počas počiatočného obdobia hojenia po aplikácii. Testované kompozity s GO preukázali silnú antibakteriálnu aktivitu oproti *E. coli* (gramnegatívnym baktériám) a *S. aureus* (grampozitívnym baktériám). Oba bakteriálne kmene boli citlivé na peroxid vodíka generovaný glukózooxidázou, čo viedlo k tvorbe bakteriálnych inhibičných zón okolo testovaných vzoriek. Klesajúci obsah GO vo vzorkách koreloval so znížením priemerov inhibičných zón okolo vzoriek pre oba bakteriálne druhy. Neboli pozorované žiadne inhibičné zóny okolo cementov alfa TCP alebo M10 bez GO.

Súhrn

Výskum bol zameraný na metodiku zvýšenia antibakteriálnej účinnosti biocementového kompozitu pozostávajúceho z práškovej zložky na báze α -TCP a tekutej fázy suplementovanej medom a glukózooxidázou (GO), pričom získané výsledky potvrdili efektívnu inhibíciu rastu kmeňov *E. coli* a *S. aureus* aj pri nízkej koncentrácii enzýmu, čo je spôsobené intenzívnou produkciou peroxidu vodíka v roztoku. Hoci identifikovaná adsorpcia GO na povrchu cementových častíc viedla k výraznému zníženiu enzymatickej aktivity, množstvo GO

uvoľnené do média s obsahom fetálneho bovinného séra (FBS) bolo dostatočné na potlačenie bakteriálnej proliferácie, pričom pre GO bol stanovený relatívne široký koncentračný interval s vysokou antimikrobiálnou aktivitou pri zachovaní bezpečnej cytotoxicity. To naznačuje, že tieto kompozity by mohli predstavovať inovatívny prístup k zvyšovaniu antibakteriálnych vlastností kostných cementov.

Literatúra

1. Carey, L.E., Xu, H.H.K., Simon, C.G. et al.: Biomaterials, 2005; 26(24):5002-5014.
2. Bohner M., Gbureck U., Barralet J.E.: Biomaterials, 2005;26(33):6423-6429.
3. Abd-El Aal, A.M., El-Hadidy M.R., El-Mashad N.B. et al.: Ann Burn Fire Disasters, 2007;20(2):83-88.
4. Deng, J., Liu, R., Lu, Q. et al.: Food Chem, 2018;252:243-249.
5. Medvecky, L., Giretova, M., Stulajterova, R. et al.: J Funct Biomater, 2023;14(9):457.
6. Raval, Y.S., Flurin, L., Mohamed, A. et al.: Antimicrob Agents Chemother, 2021;65(5):2021.
7. ISO 10993-12:2012: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5:2012.
8. Fu, L.H., Qi, C., Sun, T. et al.: Exploration, 2023;3(6):20210110.
9. Bucekova, M., Buriova, M., Pekarik, L. et al.: Sci Rep, 2018;8(1):9061.

Výskum bol financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV 20-0184 a Grantovou agentúrou Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied, projekt č. 2/0038/25.

ÚLOHA VOMERONAZÁLNEHO ORGÁNU VO VZŤAHU ČLOVEK-ZVIERA

THE ROLE OF THE VOMERONASAL ORGAN IN HUMAN-ANIMAL RELATIONSHIP

Jana Teleky, Sandra Andrašková

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice

jana.teleky@uvlf.sk

Abstract

The Jacobson's organ has a significant impact on the behavior of many mammals. By processing chemical signals, it allows animals to better perceive information about their surroundings and respond to them in an appropriate manner. This ability plays an important role, especially in social interactions, reproduction, and orientation in the environment. Chemical communication plays an important role not only in interactions between individuals of the same species, but can also influence the relationship between animal and man.

Úvod

Z hľadiska etológie má Jakobsonov orgán významný vplyv na správanie mnohých cicavcov. Prostredníctvom spracovania chemických signálov umožňuje zvieratám lepšie vnímať informácie o svojom okolí a reagovať na ne vhodným spôsobom. Táto schopnosť zohráva dôležitú funkciu hlavne pri sociálnych interakciách, reprodukcii a orientácii v prostredí. Chemická komunikácia zohráva významnú úlohu nielen v interakciách medzi jedincami rovnakého druhu, ale taktiež môže ovplyvňovať aj vzťah medzi zvieratom a človekom (1).

Jakobsonov orgán a jeho význam v canisterapii a hipoterapii

Jakobsonov alebo tiež vomeronazálny orgán (VNO) patrí k špecifickým zmyslovým orgánom cicavcov. Z anatomického hľadiska ide o párovú štruktúru, nachádzajúcu sa v prednej časti nosovej dutiny, na jej dne, v tesnej blízkosti nosovej priehradky, pozdĺž kosti *vomer* (2). Frederik Ruysh (holandský anatóm) bol prvý, kto v roku 1703 pri pitve hlavy mladého mužského tela, opísal slepý vakovitý otvor na anteroinferiorálnej strane nosovej priehradky. Objav je však pripisovaný dánskemu lekárovi a anatómovi, Ludwingovi Lewin Jacobsenovi, ktorý opísal VNO u mnohých cicavcov vrátane niektorých hlodavcov a prežúvavcov, koňa, ošípanej, psa a mačky. Na základe jeho významnej práce, ktorá bola publikovaná v roku 1813, sa tento orgán začal označovať ako Jakobsonov orgán (3). Orgán má podlhovastý, tubulárny

tvar, je uložený v špeciálnom chrupavkovom alebo väzivovom puzdre, ktoré ho mechanicky chráni, zároveň udržiava jeho stabilnú polohu v nosovej dutine. Má bohaté cievne zásobenie, inervovaný je trojklanným nervom a má nervové spojenie s čuchovým kyjom (4). Zo strany nosovej dutiny je VNO pokrytý nesenzorickým epitelom, ten má ochrannú a podpornú funkciu a je podobný respiračnému epitelu. V jeho strede sa nachádza dutina (*lumen*), ktorá umožňuje vstup chemických látok z prostredia. *Lumen* je vystlaný epitelom, ktorý je senzorický a je to špecializovaný typ neuroepitelu. Obsahuje receptorové bunky schopné zachytávať chemické signály (5). Receptorové bunky sú priamo zodpovedné za detekciu chemických signálov, ktoré sa viažu na špecifické receptory nachádzajúce sa na povrchu týchto buniek. Na rozdiel od buniek hlavného čuchového epitelu majú receptorové bunky vomeronazálneho orgánu na svojom povrchu namiesto riasiniek mikrokľky, a preto sú schopné zachytávať špecifické chemické molekuly, najmä feromóny. Axóny týchto buniek následne vytvárajú nervové vlákna, ktoré sa spájajú do vomeronazálneho nervu, a ten prenáša signály do prídavného čuchového kyju, ktorý je súčasťou predného mozgu. Odtiaľ sa informácie ďalej prenášajú do oblastí limbického systému, napríklad do amygdaly a hypotalamu, ktoré sú spojené s reguláciou správania, emócií a reprodukčných procesov (6). Okrem epitelovej výstelky obsahuje *lumen* aj vrstvu, ktorá je tvorená väzivovým tkanivom. V tejto vrstve sa nachádzajú krvné cievy, nervové vlákna a vomeronazálne žľazy. Funkciou týchto žliaz je produkovať sekrét, ktorý zvlhčuje *lumen* VNO a pomáha transportovať chemické molekuly k receptorovým bunkám. Vaskularizácia orgánu je pomerne výrazná a predpokladá sa, že zmeny v jej prekrvení ovplyvňujú pohyb tekutín a transport chemických molekúl v rámci orgánu, čo následne môže ovplyvniť aj citlivosť receptorových buniek (5). Prepojenie VNO s limbickým systémom vysvetľuje, prečo je vomeronazálny orgán úzko spojený so sociálnym a reprodukčným správaním mnohých cicavcov. Signály zachytené v tomto orgáne môžu ovplyvňovať hormonálne procesy alebo vyvolávať špecifické behaviorálne reakcie. Tieto reakcie môžu byť spojené napríklad s párením, teritoriálnym správaním, či rozpoznávaním jedincov rovnakého druhu. Chemická komunikácia zohráva významnú úlohu nielen v interakciách medzi jedincami rovnakého druhu, ale taktiež môže ovplyvňovať aj vzťah medzi zvieratom a človekom, čo sa využíva v canisterapii a hipoterapii (1).

U psa je čuch jedným z najdôležitejších zmyslov a zohráva kľúčovú úlohu pri získavaní informácií o prostredí. Psy dokážu rozlišovať veľké množstvo pachových molekúl a vďaka tomu získavajú informácie o ľuďoch, ich emocionálnom stave alebo ich fyziologických zmenách. Výskumy naznačujú, že psy sú schopné reagovať na tieto signály a prispôbovať svoje správanie v závislosti od danej situácie (7). Takéto schopnosti sú jedným z dôvodov,

prečo sa psy často využívajú v rôznych oblastiach práce s ľuďmi. V rámci canisterapie môže pes reagovať na emocionálne signály človeka a prispôbovať svoje správanie tak, aby podporil pozitívnu interakciu. Hoci sa pri tomto procese uplatňuje najmä hlavný čuchový systém, predpokladá sa, že vomeronazálny orgán môže zohrávať doplnkovú úlohu pri vnímaní niektorých chemických signálov, ktoré súvisia so sociálnou komunikáciou (8). Podobné mechanizmy možno pozorovať aj u koní. Kone sú veľmi citlivé na podnety z prostredia a dokážu reagovať na rôzne signály, ktoré pochádzajú od iných jedincov, alebo od človeka. Chemické signály zachytávané Jakobsonovým orgánom môžu zohrávať úlohu napríklad pri rozpoznávaní jednotlivcov ako aj pri sociálnych interakciách v stáde. Aj keď kone využívajú predovšetkým vizuálne a behaviorálne signály, chemická komunikácia môže predstavovať doplnkový spôsob prenosu informácií (9). V oblasti hipoterapie je vzťah medzi koňom a človekom založený na vzájomnej dôvere a komunikácii. Kone dokážu reagovať na rôzne podnety z prostredia vrátane pachových signálov, ktoré môžu poskytovať informácie o prítomnosti človeka a o jeho psychickom stave. Schopnosť vnímať tieto signály môže ovplyvňovať správanie koňa počas výkonu terapie a prispievať tak k vytváraniu stabilného vzťahu medzi zvieratom a človekom (10).

Súhrn

Z hľadiska interakcie medzi človekom a zvieratom je preto dôležité uvedomiť si, že zvieratá vnímajú svoje okolie prostredníctvom viacerých zmyslov. Čuchový systém vrátane Jakobsonovho orgánu predstavuje významnú úlohu pri získavaní potrebných informácií od iných druhov zvierat, ale do istej miery aj od človeka. Aj keď presný význam vomeronazálneho orgánu pri komunikácii medzi človekom a zvieratom ešte nie je úplne objasnený, predpokladá sa, že môže zohrávať určitú úlohu pri spracovaní chemických podnetov, ktoré ovplyvňujú správanie psa a koňa.

Literatúra

1. D'aniello, B. et al.: *Frontiers in Neuroanatomy* [online], 2017.
2. Salazar, I., Barrios, A. W., Sánchez-Quinteiro, P.: *The Anatomical Record*, [online] 2016.
3. Stoyanov, G. S. et al.: *Handbook of Clinical Neurology*. [online] 2021.
4. Lee, K. H. et al.: *Tissue and Cell*, [online] 2016.
5. Breer, H., Fleischer, J., Strotmann, J.: *Cell and Tissue Research*, 2014; 356 (3): 537-546.
6. Cavagna, P. et al.: *Journal of Veterinary Science*, 2019; 20(3):29.
7. Kokocińska-Kusiak, A. et al.: *Animals*, [online] 2021.
8. Kokocińska-Kusiak, A. et al.: *Animals*, [online] 2022.
9. Bini, L. et al.: *Animals*, 2023; 13(20): 3180.
10. Górski, K. et al.: *Animals*, [online] 2026.

HISTOPATOLÓGIA ŠTEPU OBLIČKY PO MECHANICKEJ PERFÚZII KOMBINOVANEJ S ANTIBIOTIKAMI

HISTOPATHOLOGY OF A KIDNEY GRAFT FOLLOWING MECHANICAL PERFUSION COMBINED WITH ANTIBIOTICS

*Tóth, Š.¹, Bočeva, S.¹, Krišková, K.¹, Hnatko, O.¹, Fagová, Z.¹, Kalanin, R.², Hulík, Š.²,
Gaľa, I.³, Adandedjan, D.²*

¹Ústav histológie a embryológie LF UPJŠ, Šrobárova 2, 04001 Košice

²Chirurgická klinika LF UPJŠ a UNLP, Trieda SNP1, 040 11 Košice

³Transplatačné centrum UNLP, Trieda SNP1, 040 11 Košice

stefan.toth1@upjs.sk

Abstract

Hypothermic machine perfusion (HMP) is an innovative method of organ preservation that allows the maintenance of metabolic activity in the graft during the *ex vivo* phase. It has the potential not only to preserve kidney viability but also to serve as a platform for organ preparation, targeted therapy, and improvement of kidney quality. The aim of our study is a comprehensive histopathological analysis of the kidney graft following HMP combined with the antibiotics (ATB) gentamicin and tigecycline. The experimental design of the animal model was divided to 2 groups: with ATB (ATB+) and without ATB (ATB-), each consisting of three subgroups: pre-perfusion (B1 PR), post-perfusion (B2 PO), and after five days of survival (B3 5D), for a total of six groups. Based on our results, we did not observe statistically significant changes in the histopathological injury index in any of the analyzed groups. Histomorphologically, we observed changes in selected parameters of the renal corpuscle, likely associated with the development of compensatory hypertrophy following retransplantation; however, they could also indicate a burden on the glomerular apparatus of the renal cortex as a consequence of HMP or, alternatively, ATB therapy.

Úvod

Transplantácia obličky predstavuje v súčasnosti najefektívnejšiu liečbu terminálneho zlyhania obličiek. Dostupnosť kvalitných darcovských orgánov je výrazne obmedzená, čo vedie k potrebe efektívneho využitia aj marginálnych darcovských orgánov, a potenciálne aj k akceptácii donorov s rozšírenými kritériami (1, 2). V tejto súvislosti sa čoraz viac dostávajú do

popredia pokročilé techniky *ex vivo* manipulácie s orgánmi, ktoré umožňujú ich lepšie vyhodnotenie, regeneráciu a optimalizáciu pred samotným transplantovaním. Jednou z najperspektívnejších je hypotermická strojová perfúzia (HMP). Na rozdiel od tradičného statického chladenia (SCS), HMP predstavuje nielen konzervačnú, ale aj aktívne stimulačnú metódu, ktorá môže zlepšiť biologickú pripravenosť orgánu na transplantáciu (3). V našej štúdií sme HMP kombinovali s antibiotikami (gentamicín, tigeckyklín), u ktorých je popisovaný nefrotoxický účinok. Ide o širokospektrálne ATB účinné voči multirezistentným patogénom s potenciálom redukovať riziko mikrobiálnej kontaminácie transplantovanej obličky (4, 5). Experiment bol realizovaný v nadväznosti na našu predchádzajúcu spoluprácu v rámci projektu APVV. Primárnym cieľom našej histologickej štúdie bola komplexná histopatomorfometrická analýza biopsií štetu obličky po mechanickej perfúzii kombinovanej s ATB (tigelckyklín, gentamicín).

Materiál a metódy

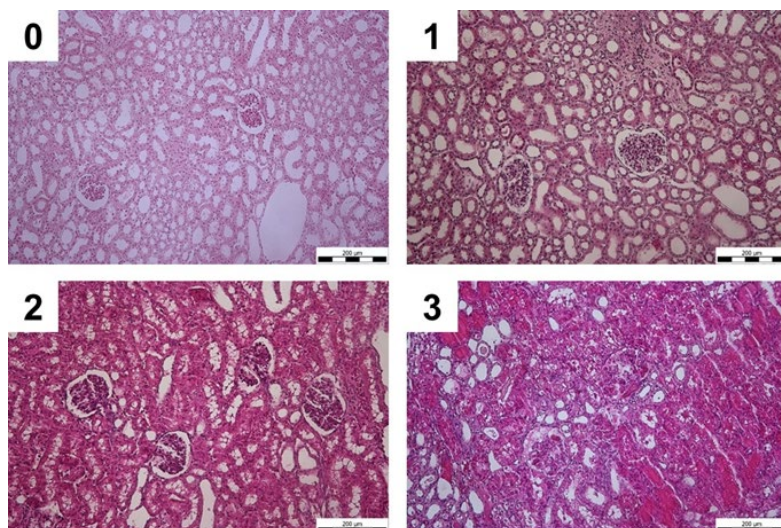
V experimente bol využitý animálny model prasiat Landrace-Yorkshire (n=6). Výskum prebiehal v rámci projektu APVV-23-0594 v spolupráci s UVLF v Košiciach v súlade s etickými normami, inštitucionálnymi a právnymi predpismi o manipulácii s laboratórnymi zvieratami, na základe povolenia Etickej komisie UVLF v Košiciach, č. povolenia EKVP/2023-12. Prasatá boli uvedené do celkovej anestézie, následne bola vykonaná nefrektómia. Bezprostredne po odbere boli obličky napojené na 4-hodinovú hypotermickú strojovú perfúziu (HMP; Kidney Assist Transport, XVIVO) a rozdelené do 2 skupín: kontrolná skupina (ATB-, perfúzia štandardným roztokom PumpProtect®, Carnamedica) a experimentálna skupina (perfúzia s pridaním vysokých koncentrácií tigelckyklínu (Tygacil, Wyeth®) a gentamicínu (Gentamicin Sandoz, Sandoz Pharmaceuticals) o koncentrácií 600mg/ml). Po HMP nasledovala autotransplantácia ošetrenej obličky s odstránením natívnej obličky, čím bolo prežitie zvierat plne závislé od funkcie ošetrenej obličky. Pooperačne bol prietok krvi obličkou monitorovaný pomocou USG Doppler vyšetrenia. Po uplynutí stanovenej doby (5 dní, resp. po úhyne) bola vykonaná nefrektómia ošetrenej obličky. Z obličky boli celkovo odobrané 3 typy bioptických vzoriek na analýzu: pred HMP (B1 PR), po HMP (B2 PO) a po piatich dňoch prežívania (B3 5D). Odobrané bioptické vzorky boli fixované v 4% paraformaldehide a spracované štandardným postupom. Po zaliatí do parafínu boli pripravené 4-5 µm tenké histologické rezy. Pri hodnotení celkového indexu histopatologického poškodenia (IHP) a histomorfometrickej analýze sme využili rutinnú metódu farbenia hematoxylín a eozín (HE). Stupeň histopatologického poškodenia kôry obličiek sme hodnotili na základe IHP vypracovaného

špeciálne pre potreby našej histologickej analýzy s dôrazom, ktorý rozlišoval celkovo **4 stupne poškodenia (0 až 4)** vid'. Tab. 1 a Obr. 1.

Stupeň poškodenia	Definícia indexu poškodenia	Histopatologický nález
0	Bez patologického poškodenia	normálna histologická štruktúra obličkových teliesok a kanálikov nefrónu
1+	Minimálny stupeň poškodenia	ojedinelé zmeny najmä tvaru obličkových teliesok a kanálikov nefrónu s miernym opuchom a stratou kefkovitého lemu epitelových buniek, prítomnosť parenchymatóznej dystrofie
2+	Mierny stupeň poškodenia	výraznejšie zmeny architektúry obličkových teliesok a epitelu kanálikov nefrónu s výraznejším opuchom a miernou vakuolizáciou cytoplazmy epitelu, prítomnosť hyalínového skvapôčkovatenia a ojedinelé plazmorágia
3+	Stredný stupeň poškodenia	výraznejšie zmeny s deformatami morfológie obličkových teliesok, poškodenie bunkových jadier a intenzívna vakuolizácia cytoplazmy s fokálnou denudáciou epitelu kanálikov nefrónu, prítomné početné plazmorágie
4+	Výrazný stupeň poškodenia s nekrózou tkaniva kôry obličky	prítomnosť výrazných a početných lézií zasahujúcich rozsiahle oblasti kôry obličky s nekrózou obličkových teliesok a kanálikov, ruptúra bazálnej membrány so stratou typickej histologickej architektúry kôry obličkového parenchýmu

Tab.1 Index histopatologického poškodenia kôry obličky – semikvantitatívny skórovací systém

Štatistická analýza bola vykonaná pomocou GraphPad In-Stat verzia programu 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA) a Dunn's multiple comparison test boli použité pre semikvantitatívne údaje indexu histopatologického poškodenia (IHP). Výsledky boli vyjadrené ako aritmetický priemer (M) ± štandardná chyba merania (S.E.M.). Za štatisticky významné sme považovali hodnoty *p* menšie ako 0,05.



Obr. 4 Index histopatologického poškodenia kôry obličiek – reprezentatívne mikrofotografie znázorňujúce jednotlivé zaznamenané stupne histopatologického poškodenia (0 - normálna štruktúra kôry obličky bez patologického poškodenia,); 1 - minimálny stupeň poškodenia; 2 - mierny stupeň poškodenia; 3 - stredný stupeň poškodenia (200x, farbenie HE).

Výsledky

Podľa výsledkov (Tab.2) IHP nedosahoval štatisticky významné zmeny pri porovnávaní skupín pred perfúziou, po perfúzii a po 5 dňoch prežívania ani v jednej analyzovanej skupine. Najvýraznejšiu, hoci len numerickú zmenu sme zaznamenali medzi skupinami pred perfúziou s ATB (B1= PR ATB+) a po 5 dňoch prežívania s ATB (B3 = 5D ATB+) a to 26%, kde vidíme stúpajúcu tendenciu. Pri porovnaní IHP skupín ATB- vs. ATB+ dosiahla celkovo lepšie hodnoty skupina s ATB, pričom medzi skupinami s 5 dňovým prežívaním bol IHP lepší o 20% v skupine s ATB (B3 = 5D ATB+) v porovnaní so skupinou bez ATB (B3= 5D ATB).

	M ± S.E.M	<i>Exp. skupina s ATB</i>	M ± S.E.M
Exp. skupina bez ATB			
<i>B1= PR ATB-</i>	2,19 ± 0,14*	<i>B1= PR ATB+</i>	1,25 ± 0,14*
<i>B2= PO ATB-</i>	1,94 ± 0,15	<i>B2 = PO ATB+</i>	1,04 ± 0,16
<i>B3= 5D ATB-</i>	2,13 ± 0,08	<i>B3 = 5D ATB+</i>	1,70 ± 0,29

Tab.2 Index histopatologického poškodenia kôry obličky – prehľad výsledkov analýzy

Diskusia a záver

Gentamicín patrí medzi aminoglykozidové antibiotiká, a napriek vysokej účinnosti je jeho použitie limitované nefrotoxickými účinkami, teda vytváraním oxidačného stresu, zápalovej

reakcie a následnej nekrózy a apoptózy (1, 6). Tigecyklín je širokospektrálne glycylycyklínové antibiotikum, vyvinuté na liečbu multirezistentných patogénov, pričom viaceré štúdie odporúčajú jeho použitie v kombinácii s iným antibiotikom. Nezanedbateľné sú aj jeho nefrotoxické účinky (3, 6). Gentamicín v kombinácii s tigecyklínom vykazuje farmakodynamicky synergistický terapeutický účinok pri zlepšovaní účinnosti proti širokému spektru patogénov. Súčasné podávanie však vedie k výraznejšiemu renálnemu poškodeniu ako monoterapia (5). Transplantácia obličky, ktorá bola ošetrená s pomocou HMP, do experimentálneho modelu prasaťa s druhostrannou nefrektómiou simuluje podmienky v prípade transplantácie obličky v klinickej praxi, v čom spočíva význam nami zistených údajov zo skupiny 5 dní po transplantácii. Na našich výsledkov môžeme konštatovať, že použitie kombinácie širokospektrálnych ATB gentamicín+tigecyklín nevedlo k výraznému zhoršeniu histopatologického poškodenia. Zmeny histologickej štruktúry v kôre obličiek v skupine B3 5D ATB+ pravdepodobne nie sú podmienené vplyvom HMP a ATB, ale odzrkadľujú predovšetkým vplyv samotnej transplantácie a ischemicko-reperfúzneho poškodenia. Naznačujú zvýšenú záťaž glomerulárneho aparátu (8, 9), ktorá môže byť normálnou odpoveďou na experimentálne podmienky (10), ale i dôsledkom, či príčinou renálneho poškodenia (11). V ďalšom výskume by pre posúdenie potransplantačnej adaptácie orgánu bolo potrebné predĺžiť prežívanie 3. skupiny a rozšíriť sledované parametre pre overenie našich doterajších výsledkov.

Literatúra

1. Adandedjan, D., Tóth Š., Holodová M., et al.: *Začínáme žiť v období umelej inteligencie*. Univerzita Komenského v Bratislave, 2024; ISBN 9788022359795: 67-72.
2. Lasorsa, F., Rutigliano, M. et al.: *Int J Mol Sci*, 2024; 25(8):4332.
3. Tatsis, V., Dounousi, E., Mitsis, M.: *Transplant Proc*, 2021;53(9):2793–2796.
4. Abushanab, D., Nasr, Z.G., Al-Badriyeh, D.: *Antibiot*, 2022; 11(11):1630.
5. Elgazzar, D., Aboubakr, M. et al.: *Pharmaceuticals*, 2022;15(7):736.
6. Randjelovic, P., Veljkovic, S., et al.: *EXCLI J*, 2017;24(16):388-399.
7. Cai, Y., Nan B. et al.: *Infectious Diseases*, 2016;48(7): 491–502.
8. Archana, K., Nalla, R., Pramod, K. et al.: *Int J Adv Biochem Res*, 2024; 8(4):453-457.
9. Tobar, A., Ori, Y. et al.: *PLoS ONE*, 2013; 8(9): e75547.
10. Johnson, H.A., Vera, Roman J.M.: *Am J Pathol*. 1966; 49(1):1-13.
11. Helal, I., Fick-Brosnahan, G. et al.: *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:293–300.

*Práca bola podporená grantovými projektami: APVV-23-0594, PCOV VVGS-2023-2736 a
KEGA 008UPJS-4/2024.*

MORFOLOGICKÉ ZNAKY VČASNEJ DIABETICKEJ NEFROPATIE U DETÍ S DIABETES MELLITUS 1. TYPU

MORPHOLOGICAL FEATURES OF EARLY DIABETIC NEPHROPATHY IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Iryna Vikhrova

Ústav histológie a embryológie, LF UK v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR

iryna.vikhrova@fmed.uniba.sk

Abstract

The early detection of diabetic nephropathy in children with type 1 diabetes mellitus remains a significant clinical and morphological challenge. Structural alterations in renal tissue may develop long before the onset of clinically detectable markers such as microalbuminuria. This study aimed to investigate early morphological alterations in renal tissue in children with type 1 diabetes mellitus by assessing selected biomarkers and evaluating their role in the early development of diabetic nephropathy.

Introduction

Diabetic nephropathy is one of the most significant microvascular complications of type 1 diabetes mellitus, being a leading cause of chronic kidney disease worldwide (1). In pediatric patients, the early stages of renal involvement are often asymptomatic, which significantly limits the ability to make a timely diagnosis and implement early intervention. It is well established that structural alterations in renal tissue precede clinical manifestations, including thickening of the glomerular basement membrane, mesangial matrix expansion, and damage to tubular epithelial cells in the early stages (2). These processes reflect the initial stages of microvascular remodeling, metabolic disturbances, and endothelial dysfunction, which are induced by chronic hyperglycemia. These alterations represent early glomerular and tubulointerstitial remodeling at the microstructural level, reflecting the involvement of multiple nephron compartments in the initial stages of diabetic kidney disease. In recent years, diabetic nephropathy has increasingly been recognized as a complex and multifactorial condition involving both the glomerular and tubulointerstitial compartments (1). Many of these early morphological alterations remain undetectable using conventional clinical markers such as microalbuminuria. Therefore, the identification of sensitive biomarkers reflecting underlying

structural changes represents a promising approach for the indirect assessment of early renal injury. Integrating morphological concepts with biomarker-based evaluation could provide deeper insight into the early stages of diabetic kidney disease and improve strategies for its timely diagnosis.

Materials and Methods

The study included 55 pediatric participants: 47 patients with type 1 diabetes mellitus and eight healthy controls. The patients were divided into three groups according to disease duration into: <1 year, 1–5 years, and >5 years. Morning fasting urine samples were collected under standardized conditions, centrifuged, and stored at -20°C . For analysis, pooled samples were prepared for each group (500 μL total). The expression of selected the following renal biomarkers was assessed using the Proteome Profiler Human Kidney Biomarker Antibody Array (R&D Systems, USA). This allowed for the simultaneous semi-quantitative evaluation of multiple markers. This membrane-based method is analogous to ELISA and enables the detection of relative protein expression levels. Signal detection was performed using the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, USA), and semi-quantitative analysis was conducted using Bio-Rad Image Lab software based on pixel density. Comparative analysis was conducted to evaluate biomarker expression patterns in relation to disease duration.

Results

The results of the study demonstrated that early diabetic nephropathy in children is associated with subtle but significant morphological changes, including mesangial expansion, thickening of the glomerular basement membrane, and early alterations in tubular epithelial cells. An increased signal intensity of all analyzed urinary biomarkers—adiponectin, VCAM-1, RBP-4, ANPEP, and DPP IV—was observed in all groups of children with type 1 diabetes mellitus compared to control. In patients with a disease duration of less than one year, a significant elevation of renal injury biomarkers was already evident. ANPEP and DPP IV levels increased by 2.6-fold and 3.5-fold, respectively. Adiponectin levels increased by a 1.5-fold, while VCAM-1 and RBP-4 were elevated by 1.3-fold each compared to the control group. In the group with a disease duration of 1–5 years, a more pronounced increase in ANPEP (3.2-fold) and DPP IV (3.7-fold) was observed. RBP-4 remained elevated at 1.3-fold, similar to the first group. VCAM-1 increased by 1.4-fold, and adiponectin by 1.7-fold compared to controls. The highest levels of several biomarkers were detected in patients with a disease duration exceeding 5 years. Adiponectin increased by 3.9-fold, VCAM-1 by 1.6-fold, RBP-4 by 1.5-fold, and DPP IV by

4.6-fold. In contrast, ANPEP demonstrated a slight decrease compared to the 1–5 years group, although it remained elevated at 2.7-fold relative to controls. Overall, adiponectin, VCAM-1, RBP-4, and DPP IV exhibited a progressive increase with longer disease duration. In contrast, ANPEP expression peaked in the 1–5 years group, followed by a moderate decline in patients with longer disease duration, while remaining significantly elevated compared to the control group ($p < 0.05$).

Discussion

The present study demonstrates that early diabetic nephropathy in children with type 1 diabetes mellitus is associated with subtle yet biologically meaningful alterations in renal structure, reflected by changes in urinary biomarker expression. The observed patterns support the concept that diabetic kidney disease begins prior to clinically detectable microalbuminuria and involves multiple nephron compartments. According to the pathological classification by Tervaert et al. (2), early diabetic nephropathy is characterized by mesangial expansion and thickening of the glomerular basement membrane. Our findings are consistent with this framework, while also supporting a more integrated view of diabetic kidney disease. Recent evidence emphasizes its multifactorial and multicompartmental nature, involving glomerular, tubular, interstitial, and vascular components (1, 4). The consistent elevation of urinary biomarkers in our study reflects this complex and coordinated involvement of the nephron. Adiponectin, a protective adipokine with anti-inflammatory and insulin-sensitizing properties (3), showed increased urinary levels, which may represent a compensatory response to early metabolic and endothelial stress. Similarly, the progressive rise in RBP-4 levels with disease duration supports its role in insulin resistance and suggests early tubular dysfunction (6). Elevated VCAM-1 further indicates endothelial activation and early microvascular involvement. The behavior of ANPEP and DPP IV highlights tubular participation in disease progression. ANPEP expression peaked in the 1–5-year disease duration group, possibly reflecting a phase of active tubular adaptation, followed by partial stabilization. In contrast, DPP IV showed a gradual increase, suggesting cumulative tubular involvement. These findings support the emerging “tubulocentric” paradigm of diabetic kidney disease, which emphasizes the early role of tubular injury (5). The use of a membrane-based antibody array enabled simultaneous semi-quantitative assessment of multiple biomarkers, providing a comprehensive overview of early renal involvement in line with current biomarker research approaches (7). From a clinical perspective, the detection of biomarker alterations prior to microalbuminuria is particularly important, given its limited sensitivity in early disease stages. The analyzed

biomarkers may therefore serve as useful tools for early diagnosis and monitoring of disease progression in pediatric patients. However, several limitations should be acknowledged, including the relatively small sample size, cross-sectional design, and semi-quantitative nature of the assay. Further studies are required to validate these findings and assess the predictive value of the identified biomarkers.

Conclusion

The study demonstrated that early diabetic nephropathy in children with type 1 diabetes mellitus is associated with subtle but significant morphological changes in renal tissue. These changes affect multiple compartments of the nephron, including the glomerular, tubular, tubulointerstitial, and microvascular structures, and are reflected in the altered expression of selected urinary biomarkers. Specifically, adiponectin, VCAM-1, RBP-4, ANPEP, and DPP IV showed elevated levels in children with diabetes compared to healthy controls, although the magnitude and pattern of increase varied by marker and disease duration. Adiponectin, VCAM-1, RBP-4, and DPP IV generally exhibited progressive increases with longer disease duration. ANPEP, however, reached its highest elevation in children with 1–5 years of diabetes and showed a slight decrease in the >5 years group, while remaining above control values. These findings indicate that urinary biomarkers can reflect early structural and functional alterations in different renal compartments, providing an indirect but sensitive insight into early morphological remodeling of the kidney. The combined evaluation of these markers allows for a more comprehensive assessment of glomerular and tubular integrity, identification of children at higher risk of diabetic nephropathy. This has the potential to facilitate early intervention even before overt clinical manifestations such as microalbuminuria appear.

Summary

Early diabetic nephropathy in children with type 1 diabetes mellitus is characterized by subtle structural alterations affecting the glomerular, tubular, and microvascular compartments. These changes occur at microstructural level and precede the onset of clinically detectable symptoms such as microalbuminuria. Altered expression of urinary biomarkers, including adiponectin, VCAM-1, RBP-4, ANPEP, and DPP IV, reflects early renal remodeling and injury to specific compartment. The combined use of these biomarkers provides a non-invasive approach to the early detection and risk stratification of diabetic kidney disease in pediatric patients.

References

1. Alicic, R.Z., Rooney, M.T., Tuttle, K.R.: Clin J Am Soc Nephrol, 2017; 12(12):2032–2045.
2. Tervaert, T.W.C., Mooyaart, A.L., Amann, K., et al.: J Am Soc Nephrol, 2010; 21(4):556–563.
3. Yaturu, S.: Endocr Pract, 2015; 21(6):1–10.
4. Bjornstad, P., Maahs, D.M.: Curr Opin Pediatr, 2019; 31(4):1–7.
5. Zeni, L., Norden, A.G.W., Cancarini, G., et al.: J Nephrol, 2024; 37(2):1–10.
6. Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., et al.: Diabetologia, 2024; 67(3):1–10.
7. Chika, N., et al.: Biomolecules, 2024; 14(9):1049.

The authors acknowledge the research group of Thomas Boren (Umeå University) for supporting this study within the Erasmus+ (KAI) program. The work was conducted as part of the research project of the Department of Pediatrics, Sumy State University (Registration No. 0120U102150).

The author acknowledges the use of Gemini (<https://gemini.google.com/>), ChatGPT (<https://chatgpt.com/>) and Grammarly (<https://app.grammarly.com/>) to refine the academic language, accuracy of the text, check and improve the quality of English in this article. After using this tool/service, the author reviewed and edited the content as needed and took full responsibility for the publication's content.

29. KOŠICKÝ MORFOLOGICKÝ DEŇ
Imunohistochemia ako nástroj modernej medicíny
Zborník vedeckých prác

Zostavovatelia: doc. MVDr. Štefan Tóth, PhD.
MVDr. Zuzana Fagová, PhD.
MUDr. Alexandra Kunová

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
vo Vydavateľstve ŠafárikPress

Rok vydania: 2026
Počet strán: 207
Rozsah: 13,57 AH
Vydanie: prvé



DOI: <https://doi.org/10.33542/KMD-0523-8>
ISBN 978-80-574-0523-8 (e-publikácia)