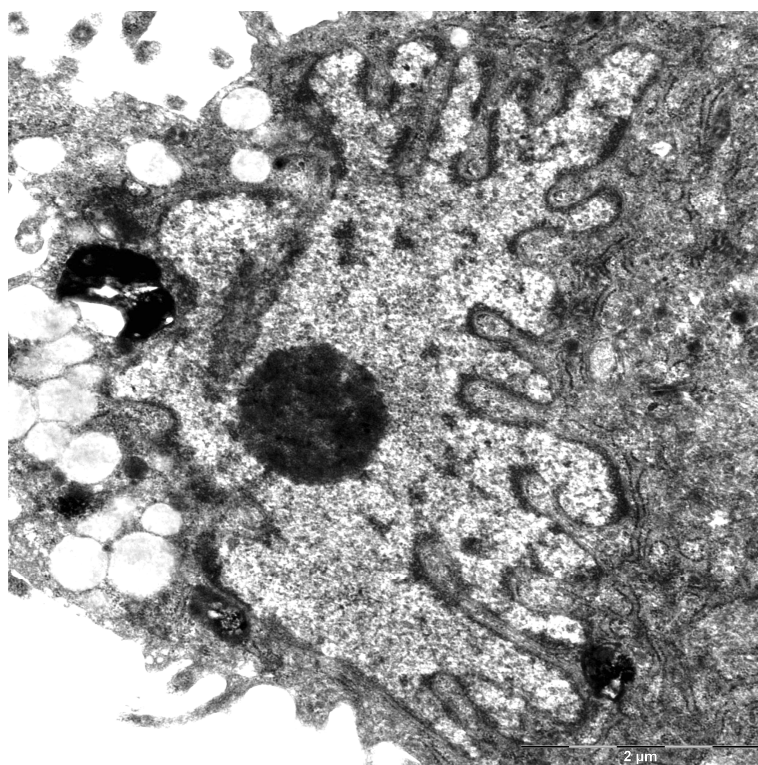


**OBČIANSKE ZDRUŽENIE MAMMA FEMININA**

RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

**BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM III.**

**ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC**



**Bratislava 2015**

### **Biomedicínsky výskum III.**

Editor: RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Vydal: © Občianske združenie Mamma Feminina, Bratislava, 2015

Recenzenti: doc. MUDr. Štefan Polák, CSc.  
doc. RNDr. Ivan Varga, PhD.

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovat', ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľa autorských práv.

**ISBN: 978-80-971370-2-1**

## OBSAH

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | <b>Barinka J., Zamborský R., Šimko P., Takáčsová M.</b> Otvorené zlomeniny a luxácie talu, astragalectomia – kazuistiky .....   | 3  |
| 2. | <b>Boháč M., Šimko L., Dubravay V., Sterančáková L., Payer J. sen, Jozef Fedeleš sen.</b> Funkčné a štrukturálne zmeny na distálnom predlaktí a ruke - anastomóza vs. ligácia artérie ..... | 8  |
| 3. | <b>Hošala M., Hátok J., Hošalová Matisová J., Smolár M., Laca Ľ., Palkoci B.</b> Kryoprezervácia ľudských hepatocytov a hodnotenie ich viablity po rozmrazení .....                         | 12 |
| 4. | <b>Juríková M., Boháč M., Polák Š.</b> Prehľad imunohistologických markerov proliferácie používaných v diagnostike nádorov prsníka .....  | 18 |
| 5. | <b>Macho P., Fedeleš J. Jr, Fekiačová D., Fedeleš J. sen.</b> Porovnanie kvality života rodičov u detí s rúžštepom pery v dvoch mesiacoch a v 1. roku ich života .....                      | 27 |
| 6. | <b>Miko M., Varga I., Kuniaková M.</b> Biological and morphological characterization of rat muscle multipotent cells .....  | 32 |
| 7. | <b>Nádaždyová A., Hirjak M.</b> Výživa a orálne zdravie .....   | 38 |

# Otvorené zlomeniny a luxácie talu, astragalectomia - kazuistiky

Barinka J.<sup>1</sup>, Zamborský R.<sup>1</sup>, Šimko P.<sup>1</sup>, Takácsová M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinika úrazovej chirurgie LF SZU a UNB, Limbová 5, 833 05 Bratislava

<sup>2</sup>Anatomický ústav LF UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

<sup>3</sup>Anatomický ústav LF SZU, Limbová 14, 833 03 Bratislava

Email: [jozefbarinka@gmail.com](mailto:jozefbarinka@gmail.com)

## Súhrn

Kompletná otvorená zlomenina alebo dislokácia talu od všetkých susediacich artikulačných spojov s alebo bez fraktúry je veľmi vzácny druh poranenia. Existuje len veľmi obmedzené množstvo prípadov ktoré boli zdokumentované a popísané v literatúre. V niektorých prípadoch je talus úplne odpojený od kosí nohy a väzivových štruktúr („chýbajúci talus“), ktorého prípad popisujeme aj v našom príspevku.

**Kľúčové slová:** talus, otvorené zlomeniny, luxačné zlomeniny talu, astragalectomia

**(Open talar fracture, traumatic dislocation of the talus, astragalectomia case reports)**

## Summary

Complete open dislocation of the talus from all its adjacent joints with or without a fracture is a very rare type of injury. Only a few such cases having been described in the literature. In some cases the talus is completely disconnected from the foot („missing talus“) as we described it in our report.

**Key words:** talus, open fracture, astragalectomia,

## Úvod

Členkovú kosť (*talus*) tvorí *trochlea tali, collum a caput tali* (1). Na dorzálnnej časti tela sa nachádza *processus posterior tali*, ktorý je tvorený *tuberculum laterale et mediale*, medzi ktorými prebieha *tendo musculi flexoris hallucis longus*. *Talus* má kĺbové plochy pre *os naviculare* a pre *calcaneus*. Na členkovú kosť sa upína mnoho väzov, ale žiadny sval. Mediálna tretina kosti je zásobená z vnútornej strany pomocou *ramus deltoideus a. canalis tarsi*, predstavuje vetvu *a. tibialis posterior*. Pri fraktúrach môže byť táto vetva jediný nepoškodený zdroj cievneho zásobenia. Stredná a laterálna tretina kosti je zásobená cievnu sieťou pod krčkom z anastomóz medzi *a. canalis tarsi* (vetva *a. tibialis posterior*) a *a. sinus tarsi* (vetva *a. dorsalis pedis*) (1,3).

Ide o zriedkavé poranenie, ktoré predstavuje asi 1-2 % všetkých traumatických luxácií (2, 4, 5, 6, 7, 8). Luxácie sa môžu vyskytnúť hlavne pri prudkých úrazoch, kedy dôjde k jeho deštrukcií.

Cieľom našej práce je prezentovať vlastné skúsenosti s nie veľmi častými, otvorenými a luxačnými zlomeninami talu, ich liečbou a ďalšími komplikáciami.

## Materiál a metódy

Krátky anatomický popis talu a jeho uloženia v členkovom kĺbe, špecifiká jeho uloženia. Na príklade 3 kazuistík prezentovanie aktuálnych možnosti liečby, otvorených zlomenín a luxačných zlomenín talu, výsledky operačnej liečby, zhodnotenie výsledkov liečby a komplikácii, ďalší postup pri daných zlomeninách.

### Kazuistika 1:

29 roč. pacient účastník autonehody - šmyk na motorke, privalenie dolnej končatiny motocyklom.

Nález: otvorenej zlomeniny krčka talu z luxáciou hlavičky talu laterálne, otvorená rana v oblasti laterálnej strany do 5cm, dislokácia potvrdená na RTG a CT snímkach. Pacient po príprave operovaný do 4 hodín.

Vykonaná otvorená repozícia rozšírením laterálnej rany a malá incízia z mediálnej strany, ostesyntéza 3x kortikálnou skrutkou. Následne končatina fixovaná 10 týžňov v sadrovej dlahe + následne indikovaná ortéza, odľahčovanie končatiny, následne postupne RHB a plná záťaž. Na kontrole po 3, 8 mesiacoch bez známkov bionekrózy talu, rany zhojené bez komplikácií, plná hybnosť končatiny.



Obr. 1. Primárny nález

Obr. 2. Primárna RTG snímka



Obr. 3. RTG snímka po operácii

Obr. 4. RTG snímka 8 mesiacov po operácii

### Kazuistika 2:

25 ročný pacient účastník autonehody ako motocyklista - kolízia motocykel s automobilom, pričom bola zakliesnená pravá dolná končatina medzi automobil a motorku.

Nález: devastačné poranenie v oblasti *dorsum pedis*, mediálnej a laterálnej strany nohy. RTG vyšetrenia potvrdili nález luxácie talu, zlomeniny *os calcaneum*, *os naviculare* a *os cuneiforme mediale*. Pacient bol po príprave operovaný do 1 hodiny.

Vykonaná revízia rany – rozsiahla rana ma mediálnej aj laterálnej strane nohy, siahajúca od oblasti nad mediálnym malleolom až po oblasť diafýzy I. metatarzu. Nález

takmer kompletnej luxácie talu, talus prichytený iba malým pruhom tkaniva z laterálnej strany. Nález zlomeniny *calcanea* v sustentakulárnej oblasti, s odlomením celej plochy cubocalcaneárneho kĺbu *os naviculare*, mediálnej strany, abrupcia mediálnej strany *os cuneiforme mediale* a bázy I. metatarzu. Ruptúra šľachy *musculus extensor pollicis longus*, lézia *a. dorsalis pedis*. Našli sme prerušený proximálny koniec. Distálny koniec v devastovanom tkanive nájdený nebol. Distálna časť nohy bola celkovo chladnejšia, bledšia, pulzácie na *a. tibialis posterior* slabo hmatné.

Po repozícii talu na pôvodné miesto, kalcaneokuboideálneho kĺbu a talovnavikulárneho kĺbu vykonávame dočasnú fixáciu talovnavikulárneho kĺbu Kirschnerovým drôtom - získali sme obnovenie tvaru nohy a dĺžky nohy, postavenie fixované externým fixátorom, na záver rana krytá podtlakovou terapiou V.A.C seal. S odstupom času vykonané ešte dve revízie rany a výmena V.A.C seal.

Následne boli realizované ešte dve operácie na Klinike popálenín a rekonštrukčnej chirurgie - debridement a nekrektómia, amputácia palca nohy, autotransplantácia kože z pravého stehna na dorsum pedis a oblasť mediálnej strany nohy.

Po troch mesiacoch sňatie externého fixátora a postupne chôdza z odľahčovaním z oporou barlí. Kontrola po jednom roku po operácii pacient chodí z oporou jednej francúzskej barle, nehojaci sa defekt v oblasti mediálnej strany talu, pretrváva secernácia z rany a nález pozitívnej mikrobiálnej kultivácie, nález osteomyelitidy. Pacient je perspektívne plánovaný na ďalší výkon. Vzhľadom na komplikovanosť stavu a možné ohrozenie na živote pri osteomyelitíde ja navrhovaná aj amputácia končatiny, ktorú pacient zatiaľ odmieta.



**Obr. 1.** Primárne poranenie



**Obr. 2.** Primárna RTG snímka



**Obr. 3.** Nález 1 rok po operácii



**Obr. 4.** RTG snímka 1 rok po operácii

### Kazuistika 3:

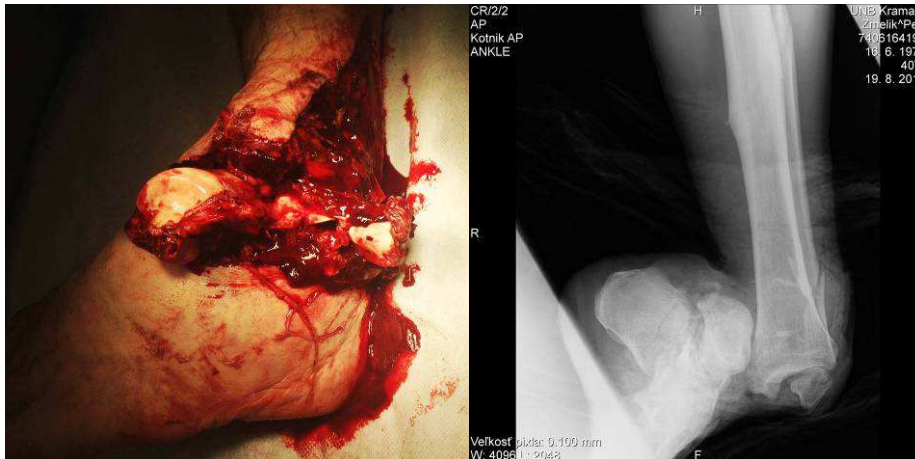
40 ročný pacient pracovný úraz, pri pílení stromu v lese pád na ľavú dolnú končatinu.

Nález: devastačné poranenie, dorzálnaj a laterálnej strany končatiny v oblasti členka, obrovská rana približne 25cm z laterálnej strany, nad laterálnym malleolom, luxácia talu z fr. krčka talu a trieštivá zlomenina distálnej fibuly na RTG snímkach. Pacient bol po príprave operovaný do troch hodín.

Vykonaná revízia rany, nález hlbokaj rany v oblasti nad laterálnym malleolom, poškodenia art. dorz. pedis ktorá bola ligovaná, bez lézie prednej skupiny svalov predkolenia, poškodenie laterodorzálnaj skupiny, sutura svalstva. Trieštivá zlomenina distálneho konca fibuly zo stratou kostného tkaniva, luxácia a zároveň frakt. talu v oblasti krčka. Vykonaná repozícia a fixácia Kirchnerovým drôtom transkalkaneárne až do tibie a premostenie trieštivej zlomeniny fibuly K - drôtom, sutura rany drenáž, na záver fixácia postavenia externým fixátorom.

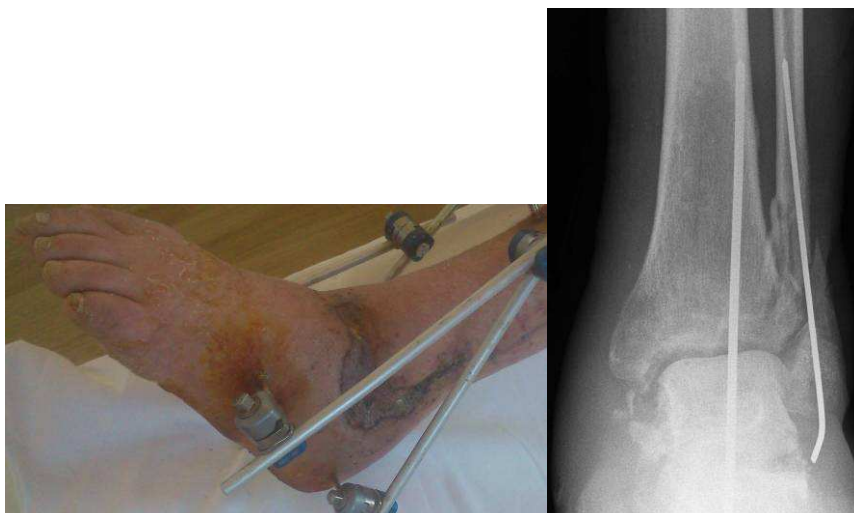
S odstupom času boli vykonané dve revízie rany a podtlaková drenáž V.A.C seal, následne na Klinike plastickej chirurgie jedna nekrektómia a tri krát krytie defektu xenotransplantátom, definitívne voľný kožný transplantát.

Po troch mesiacoch kontrola rany zhojenej bez defektu ešte ponechaný externý fixátor, následne po štyroch sňatie fixátora, postupne chôdza z odľahčováním z pomocou barlí.



Obr. 1. Primárny nález

Obr. 2. Primárna RTG snímka



Obr. 3. Nález 3 mesiace po operácii

Obr. 4. RTG snímka 3 mesiace po operácii

## Diskusia a záver

Poranenie talu, najmä otvorené zlomeniny a luxácie sú raritné poranenia, ako vyplýva z literatúry (2, 4, 5, 6, 7, 8) aj z našich klinických skúsenosti. Liečba poranení tohto typu je pomerne náročná a zdĺhavá, niekedy neprináša túžený výsledok a uspokojenie pre paciera aj pre lekára. *Talus*, ako kosť má pomerne zložité uloženie, je pokrytá z veľkej časti chrupkou, nemá silné väzivové spojenia, a preto pri výraznom násilí pôsobiacom v inverzii a dorzálnnej flexii nohy môže dôjsť k luxácií, luxačným zlomeninám. Častou príčinou daného typu úrazu sú dopravné nehody, špeciálne motocyklové. Ako je známe aj z literatúry, v liečbe sa kladie veľký dôraz na zachovanie talu ako kosti, ako medzičlánku medzi predkolením, pätou a zvyškom nohy (2, 4, 5, 6, 7, 8), ako dôležitej súčasti talocruralneho a subtalarneho kĺbu. Ak je čo len malá možnosť zachovávať túto kosť, aj napriek riziku vzniku infekcie, ktoré je pomerne veľké. Náhrada talu ako kosti ktorá spája predkolenie a nohu je zložité a často vedie k výraznému obmedzeniu hybnosti. Preto aj my s pri liečbe našich pacientov nepristupujeme k astragalektómii, alebo amputácii. *Talus* reponujeme späť do členkového kĺbu, snažíme sa ho fixovať v čo najoptimálnejšom postavení a rekonštruujeme mäkké tkanivá pre čo najlepšiu výživu a fixáciu talu. Definitívne zabezpečujeme postavenie talu a členkového kĺbu externým fixátorom.

Z daných kazuistík vyplýva, že najdôležitejšiu úlohu zohráva v konečnom dôsledku stav mäkkých tkanív, cievne a nervové zásobenie. Aj keď samotné kostné poranenie nemusí byť dramatické, postarať sa následne o mäkké tkanivá môže byť siahodlhý proces, vyžadujúci opakované operácie, zákroky a starostlivosť.

Vyššie uvedení pacienti z kazuistík podstúpili opakované operačné zákroky a ich stav ešte doteraz nie je definitívne ustálený. Riziko bionekrózy talu je vysoké, akútne a chronické infekcie rán sú časté, starostlivosť o zhojenie mäkkých tkanív je dlhý proces. Preto sledovanie daných pacientov musí byť dlhodobé a výsledky prehodnocované, a v ďalšom sledovaní uvidíme či naša snaha o záchranu talu - končatiny bola úspešná a benefitom pre paciera.

## Literatúra

1. Čihák R. Anatomie 1. Praha; Grada Publishing, 2011.
2. De Palma, L, Santucci A, Marinelli M, Borgogno E, Catalani A. Clinical outcome of closed isolated subtalar dislocations. Archives Orthopaedic and Trauma Surgery 2008; 128: 593-598.
3. Gray H. Anatomy of the human body. Philadelphia; Lea & Febiger, 1918.
4. Hiraizumi Y. Open Total Dislocation of the Talus with Extrusion (Missing Talus): Report of Two Cases. Foot & Ankle International 1992; 8: 473-477.
5. Chandoga I, Vajcziková S. Talus partitus. Kazuistika. A Case Report. Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Českoslovaca 2012; 79: 80-83.
6. Lacko M, Cellar R, Vaško G. Luxatio pedis subtalo. Subtalar Dislocation of the Foot. Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Českoslovaca.2012; 79: 447-450.
7. Merchan EC. Subtalar dislocations: Long term follow-up of 39 cases. Injury 1992; 23: 97-100.
8. Papaioannou NA. Traumatic Extrusion of the Talus (Missing Talus). Foot & Ankle International 1998; 19 (9): 590-593.



# Funkčné a štrukturálne zmeny na distálnom predlaktí a ruke - anastomóza vs. ligácia artérie

Boháč M.<sup>1</sup>, Šimko L.<sup>1</sup>, Dubravay V.<sup>2</sup>, Sterančáková L.<sup>3</sup>, Payer J. sen<sup>3</sup>, Jozef Fededeš sen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UN Bratislava, Ružinovská 6, 826 06, Bratislava*

<sup>2</sup>*Ortopedická klinika LF UK a DFNSP, Limbova 1, 833 40, Bratislava*

<sup>3</sup>*V. interná klinika LF UK a UN Bratislava. Ružinovská 6, 826 06, Bratislava  
Email: [bohac.md@gmail.com](mailto:bohac.md@gmail.com)*

## Súhrn

V traumatologickej praxi stále ostáva otvorená otázka urgentného riešenia, ligácie resp. anastomózy, lézie dominantnej artérie v oblasti predlaktia. Rozhodovanie sa o použití techniky môžu ovplyvniť zistené zmeny na muskuloskeletálnom systéme z dlhodobého hľadiska. Od roku 2000 do roku 2010 bolo na našej Klinike ošetrených 178 pacientov, ktorí by spĺňali inklúzne kritériá na zaradenie do štúdie. K následnému vyšetreniu na požiadanie sa však dostavilo len 12 z nich. Zistili sme, že u ôsmich pacientov z vyšetreného súboru bola realizovaná ligácia poškodenej artérie a u štyroch anastomóza artérie. V rámci vyšetrenia im bol daný štandardizovaný dotazník (Functional Status Scale) zameraný predovšetkým na hodnotenie subjektívnych pocitov pacienta a kvality funkcie ruky. Funkčnými vyšetreniami sme zisťovali citlivosť a krvné zásobenie postihnutej ruky pomocou Allenovho testu. Z vyšetrenia citlivosti bola testovaná taktílna citlivosť (diskriminačná citlivosť a dermatómy). Svalovú silu ruky sme merali hand-grip testom a objem ruky ponorením do kvapaliny odmerného valca. Na meranie kostnej denzity sme využili denzitometrické DXA vyšetrenie. Pomocou Allenovho testu sme zistili oklúziu vo všetkých prípadoch ledovaných artérií bez rozdielu použitej intervencie. Kožná senzitivita, diskriminačná citlivosť ruky jasne koreluje s léziou nervov prebiehajúcich v blízkosti ledovaných artérií predlaktia, pričom postrehnuté rozdiely sú markantné. Sila ruky je významne oslabená na poškodenej strane po úraze v priemere na 2/3 (66,67%) sily zdravej ruky. Rozdiel v objemoch ruky je v priemere na úrovni 40ml, čo by sme mohli vysvetliť tým, že denerváciou intraoseálnych svalov a svalov lumbricales dochádza k atrofii uvedených partii a tým k ubúdaniu objemu chorej ruky. Denzitometrické rozdiely neboli dostatočné na potvrdenie signifikantnosti. Predpokladáme, že na alteráciu ruky má väčší vplyv rekonštrukcia šlachového aparátu a nervov v porovnaní s technikou ošetrenia arteriálneho systému, čo sa potvrdilo aj v našej štúdií. To znamená, že nie je výrazný rozdiel medzi použitím ligácie a rekonštrukciou, ale pokiaľ je to možné z finálneho a časového hľadiska treba sa pokúsiť o anastomózu, ktorá pravdepodobne prináša benefit z hľadiska dlhobodej prevencie a zachovania lepšej funkcionality hornej končatiny.

**Kľúčové slová:** poranenie arteriálneho systému predlaktia, anastomóza, ligácia, muskulockeletálne zmeny

## Summary

In traumatological practice is still open the question of urgent solution in lesions of the dominant artery in the forearm, ligation versus anastomosis. Deciding whether to use each of techniques may affect changes in their musculoskeletal system in the way of long term. From 2000 to 2010 were treated in our clinic 178 patients, which fulfilled the inclusion criteria for our study. For subsequent examination upon request only 12 of them attended our clinic. We found that eight of the examined patients were treated by ligation of the injured artery, rest of

them had anastomosis of artery. For the evaluation was given a standardized questionnaire (Functional Status Scale) focused mainly on the assessment of subjective feelings of the patient and the quality of hand function. During functional examination we examined the sensitivity and the blood supply to the affected hand by Allen test. For susceptibility testing we tested tactile sensitivity (sensitivity and discriminatory dermatome). Muscle strength was measured by hand-grip test and a volume of liquid by hand immersion in a measuring cylinder. To measure bone density, we have used densitometry DXA testing. Using the Allen test, we found occlusion of injured arteries in all cases used without distinction to the intervention. Skin sensitivity, discriminatory sensitivity of hands clearly correlated with the lesion of nerves going near the injured artery of the forearm, while noticing differences are striking. Hand strength is significantly weakened after injury to an average of 2/3 (66,67%) of non-injured arm strength. The difference in volumes hands is on average 40 ml, what could be explain by the fact that intraosseous denervation muscles and lumbricalis muscles leads to atrophy and thus to the dwindling volume of the diseased hand. Densitometry differences were not sufficient to confirm the significance. We assume that the alteration of the hand is more influenced by reconstruction of tendons and nerves compared with the technique of treating arterial system, which was confirmed in our study. This means that there is a significant difference between using ligation and reconstruction but from financial and time-consuming point of view. But as far as it is possible we need to try performing the anastomosis, which is likely to bring benefits in terms of long-term prevention and better preserving the functionality for the upper limb.

## Úvod

Poranenia arteriálneho systému v oblasti predlaktia majú stúpajúci trend v rámci úrazov vyskytujúcich sa na oddeleniach centrálného príjmu. Zväčša sa jedná o monolaterálne lézie postihujúce jednu z hlavných artérií a zároveň variabilnú mieru poškodenia okolitých anatomických štruktúr (nervov, šliach, ...). Mechanizmus úrazu je viac-menej uniformný - sečné a rezné poranenia.

Momentálny nedostatok relevantných štúdií a chýbanie smerníc v manažmente vyššie uvedených poranení, aj napriek zvyšujúcemu sa výskytu, vytvára dilemu, či stačí poškodenú artériu ligovať, alebo je nutná jej rekonštrukcia. Pri rozhodovaní o spôsobe ošetrovania musíme zvážiť, že nami zvolená terapia bude mať priamy vplyv najmä na muskuloskeletálny systém, čo je možné s časovým odstupom pozorovať.<sup>3,4,5</sup>

Naša štúdia sa zameriava na hodnotenie a konzekvenciu použitej metódy pri lézii arteriálneho systému predlaktia. Primárnym cieľom bolo zhodnotiť následky na funkcie ruky a zistiť koreláciu medzi metódou a následnou funkčnou alteráciou, pokiaľ nastala.

## Materiál a metódy

V retrospektívnej štúdií bola sledovaná vzorka pacientov, ktorí podstúpili operačný zákrok pre traumatické poškodenie jednej, či oboch artérií predlaktia na Klinike plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UN Bratislava. Analyzovaní pacienti boli v časovom rozmedzí 3 až 10 rokov po úraze (2000-2010). Štúdia bola schválená etickou komisiou UNB Ružinov. Všetci pacienti, ktorí tvoria podklad pre štúdiu boli plne informovaní o jej charaktere, jej účelovosti, a následne podpísali informovaný súhlas.

Informácie o pacientoch do štúdie, zahŕňajúc ich osobné údaje ako vek, technika operácie, strana a rozsah poškodených štruktúr sme získali z ich zdravotnej dokumentácie. Po zozbieraní potrebných informácií sme následne písomne kontaktovali pacientov.

Pacienti, ktorí sa dostavili na základe písomnej výzvy na štúdiu realizovanou KPECH podstúpili komplexné vyšetrenie postihnutej a kontralaterálnej hornej končatiny. Vyšetrenie zahŕňalo vyplnenie príslušného dotazníka, funkčných a zobrazovacích vyšetrení a

fotodokumentácie. V rámci štandardizovaného dotazníku (Functional Status Scale) boli otázky týkajúce sa predovšetkým subjektívnych pocitov pacienta a kvality funkcie ruky, ako citlivosť, obmedzenia rozsahu pohyblivosti, či limitácie vykonávania každodenných aktivít, až po ťažkú fyzickú prácu. Medzi funkčné vyšetrenia, ktoré sme realizovali patrí vyšetrenie citlivosti a krvného zásobenia postihnutej ruky. Pri testovaní muskuloskeletálnych zmien sme sa sústredili na meranie svalovej sily, objemu ruky a meranie kostnej denzity. Na orientačné vyšetrenie cievneho zásobenia ruky respektíve priechodnosti ledovanej artérie sa nám osvedčil Allenov test, ktorý bol dostatočne špecifický, senzitívny, materiálne a finančne nenáročný a nebolo nutné realizovať náročnejšie zobrazovacie vyšetrenie. Z vyšetrenia citlivosti bola testovaná taktílna citlivosť (diskriminačná citlivosť a dermatómy). Svalovú silu ruky sme merali hand-grip testom a objem ruky ponorením do kvapaliny odmerného valca. Na meranie kostnej denzity sme využili denzitometrické DXA vyšetrenie, kde sme sa zamerali hlavne na distálnu časť predlaktia.<sup>6</sup> Vo všetkých meraniach sme použili metódu porovnávania poranenej a zdravej ruky a zároveň pri vyšetrení objemu ruky, svalovej sily a denzitometrie (BMD) sme porovnávali ruku dominantnú a nedominantnú, pričom bol zahrnutý koeficient dominancie pre silu ruky -6%, a objem ruky -10%. Na základe predchádzajúcich klinických štúdií nebolo nutné zahrnúť koeficient pri porovnávaní merania BMD, nakoľko pri nich neboli zistené signifikantné rozdiely<sup>2</sup>

## Výsledky

Zo 178 pacientov, spĺňajúcich inklúzne kritéria štúdie, oslovených písomnou korešpondenciou sa do času uzáveru výsledkov tejto práce (štúdia stále pokračuje) dostavilo len 12. Všetci pacienti boli mužského pohlavia s priemerným vekom 50 rokov. Najmladší pacient mal 24, najstarší 70 rokov. Operácii sa podrobili v priemere pred 6,41 rokmi. U všetkých pacientov bola poškodená len jedna z dvoch dominantných artérií predlaktia. A. ulnaris bola ledovaná v 9 prípadoch (75%), a. radialis v 3 (25%) prípadoch. V 4 (33,33%) prípadoch sa vykonala revaskularizácia poškodenej cievy, v ostatných 8 prípadoch (66,67%) bola realizovaná ligácia. Pomocou Allenovho testu sme zistili oklúziu vo všetkých prípadoch ledovaných artérií bez rozdielu použitej intervencie. Kožná senzitivita, diskriminačná citlivosť ruky jasne koreluje s léziou nervov prebiehajúcich v blízkosti ledovaných artérií predlaktia, pričom postrehnuté rozdiely sú markantné. Sila ruky je významne oslabená na poškodenej strane po úraze v priemere na 2/3 (66,67%) sily zdravej ruky. Rozdiel v objemoch ruky je v priemere na úrovni 40ml, čo by sme mohli vysvetliť tým, že denerváciou intraoseálnych svalov a svalov lumbricales dochádza k atrofii uvedených partií a tým k ubúdaniu objemu chorej ruky. (Obr.č.1) Denzitometrické rozdiely neboli dostatočné na potvrdenie signifikantnosti.



**Obr. 1.** Vyšetrenie pacienta po kombinovanej lézii ľavého predlaktia po 34 mesiacoch

## Diskusia

Pre našu štúdiu sme sa rozhodli kvôli vysokému počtu pacientov operovaných s léziou arteriálneho systému predlaktia na KPECH v posledných 10 rokoch. K jej vypracovaniu nás inšpirovala už existujúca štúdia (Basseto et al<sup>1</sup>). Predpokladali sme vzhľadom na veľkosť nášho súboru, že budeme schopní relevantne zhodnotiť prínos respektíve následky použitia techník pri léziách arteriálneho systému predlaktia. Avšak pre veľmi nízku účasť pacientov na štúdiu nemožno štatisticky podložiť výsledky existujúcej štúdie. Z predbežných výsledkov možno hodnotiť v porovnaní s inými štúdiami, že ligácia, metóda finančne, časovo aj technicky menej náročná obstála v porovnaní s anastomózou bez výrazných rozdielov ku vzťahu neskoršej alterácie ruky. Predpokladáme, že na alteráciu ruky má väčší vplyv rekonštrukcia šlachového aparátu a nervov v porovnaní s technikou ošetrenia arteriálneho systému, čo sa potvrdilo aj v našej štúdiu. To znamená, že nie je výrazný rozdiel medzi použitím ligácie a rekonštrukciou, ale pokiaľ je to možné z finančného a časového hľadiska treba sa pokúsiť o anastomózu, ktorá podľa štúdie (Basseto et al<sup>1</sup>) prináša benefit z hľadiska dlhodobej prevencie a zachovania lepšej funkcionality hornej končatiny.

## Literatúra

1. Basseto F., Zucchetto M., Vindigni V., Scomparin M. A., Corbetti F., Perissinotto E, Coin A., Sergi G. Traumatic Musculoskeletal Changes in Forearm and Hand after Emergency Vascular Anastomosis or Ligation. *J Reconstr Microsurg* 2010;26:441-447.
2. Sergi G., Perissinotto E., Zuchetto M., et al. Upper limb bone mineral density and body composition measured by peripheral quantitative computed tomography in right-handed adults: the role fo the dominance effect. *J Endocrinol Invest* 2009;32(4)298-302
3. Johnson M., Ford M., Johansen K., Radial or Ulnar Artery Laceration - Repair or Ligate. *Archives of Surgery*. sep 1993 vol:128 I:9 P:971-975
4. Shatford RA., King DH., The Treatment of major devascularizing injuries of the upper extremity. *Hand Clinics*. aug 2001 vol:17 I:3 P:371
5. Bacakoglu A., Ozkan MH., Coskunol E., Ozdemir O., Ekin A., Multifactorial Effects on the Patency Rates of Forearm Arterial Repairs. *Microsurgery* 2001 Vol:21 I:2 P:37-42
6. Luis O., Soykens S., Willnecker J., Van Den Winkel P., Osteaux M. Cortical and Total Bone Mineral Content of the Radius Accuracy of Peripheral Computed Tomography. *Bone* Vol: 18 No. 5, May 1996:467-472

# Kryoprezervácia ľudských hepatocytov a hodnotenie ich viability po rozmrazení

Hošala M.<sup>1</sup>, Hátok J.<sup>2</sup>, Hošalová Matisová J.<sup>3</sup>, Smolár M.<sup>1</sup>, Laca L.<sup>1</sup>, Palkoci B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Chirurgická klinika a transplantačné centrum JLF UK a UNM v Martine*

<sup>2</sup>*Ústav lekárskej biochémie JLF UK*

<sup>3</sup>*Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny JLF UK a UNM v Martine*

*Email: [hosalamichal@gmail.com](mailto:hosalamichal@gmail.com)*

## Súhrn

Zmrazovanie ľudských hepatocytov v tekutom dusíku je najlepším spôsobom ich uskladnenia. Avšak zmrazovanie znižuje ich viabilitu. Hlavným cieľom práce bolo sledovať vplyv zloženia kryoprotektívneho média na viabilitu ľudských hepatocytov po rozmrazení. Zdrojom biologického materiálu pre náš výskum boli pečene z multiorgánových odberov realizované na CHKaTC UNM v Martine v období od roku 2008 do roku 2010, ktoré boli nevhodné pre ortotopickú transplantáciu pečene. Viabilita a počty ľudských pečeňových buniek izolovaných kolagenázou, boli stanovené použitím metódy farbením trypanovou modrou. Bunky sme zmrazovali za použitia 4 rôznych zmrazovacích médií a sledovali ich vplyv na viabilitu po rozmrazení v rôznom čase. Spracovali sme pečene od 11 darcov, z toho 8 mužských a 3 ženských. Ako najvhodnejšie z porovnávaných kryokonzervačných médií sme vyhodnotili Recovery cell culture freezing medium a médium obsahujúce 10% DMSO.

**Kľúčové slová:** transplantácia hepatocytov, zmrazovanie hepatocytov, viabilita hepatocytov, kryokonzervačné médium, kultivácia hepatocytov, bioarteficiálna pečeň

**(Cryopreservation of human hepatocytes and evaluation of their viability after thawing)**

## Summary

Freezing human hepatocytes in liquid nitrogen is the best way of their storage. However, freezing reduces their viability. The main objective of this work was to study the effect of the composition of cryoprotective media on viability of human hepatocytes after thawing. The source of biological material for our research were livers from multipleorgan procurement performed in Surgical department and transplant center in Martin from 2008 to 2010. Those livers were unsuitable for orthotopic liver transplantation. The viability and number of human liver cells isolated by collagenase, were determined using the Trypan blue dye exclusion method. The cells were frozen in 4 different types of freezing media and we monitored their effect on post-thaw viability at different times. We processed the liver from 11 donors, including 8 men and 3 women. As the best cryopreservation media were evaluated Recovery freezing cell culture medium and medium containing 10% DMSO.

**Key words:** transplantation of hepatocytes, freezing of hepatocytes, viability of hepatocytes, cryopreservation media, cultivation of hepatocytes, bioartificial liver

## Úvod

Klinická aplikácia liečebných postupov založených na ľudských pečeňových bunkách, ako sú bioarteficiálna pečeň (BAL) a transplantácia hepatocytov, môže pomôcť znižovať úmrtnosť pacientov čakajúcich na transplantáciu pečene a pomôcť im dočkať sa očakávaného cieľa- transplantácie pečene. Vytvorenie štandardných protokolov izolácie, spracovania

a uskladnenia pečeňových buniek je základným kameňom tejto snahy. Zmrazovanie hepatocytov v tekutom dusíku je najlepším spôsobom ich uskladnenia, pričom však nepriaznivo vplyva na ich viabilitu (Hošala a kol., 2011). Kryokonzervačné médiá zohrávajú veľmi dôležitú úlohu pri dlhodobom skladovaní pečeňových buniek. Určenie najvhodnejšieho kryokonzervačného média, ktoré by umožňovalo dosiahnuť viabilitu hepatocytov podobnú tej pred zmrazením, môže napomôcť k ďalšiemu rozvoju liečebných postupov založených na použití ľudských hepatocytov a ich širšiemu použitiu v klinickej praxi v budúcnosti.

## **Materiál a metódy**

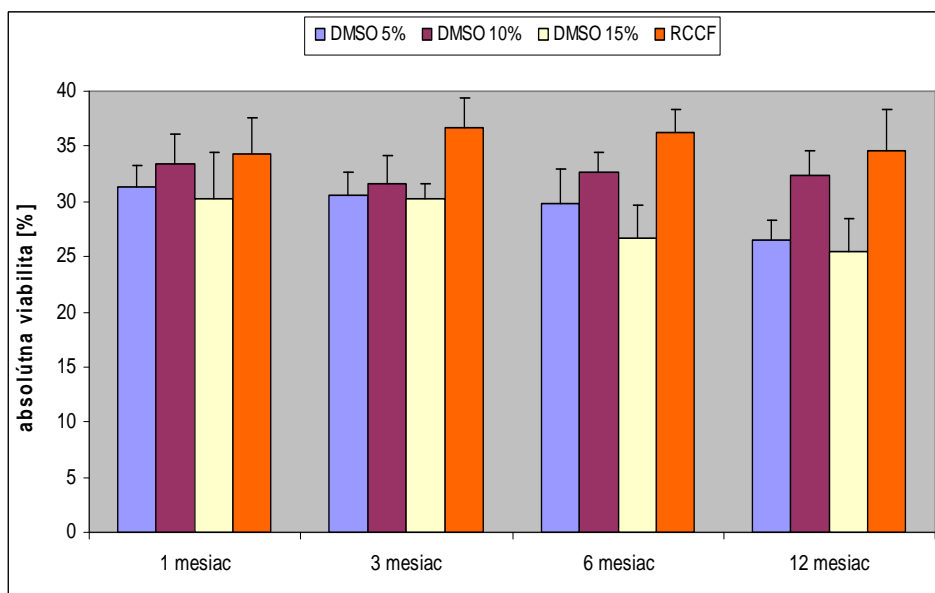
Zdrojom biologického materiálu pre náš výskum boli pečene z multiorgánových odberov realizované na CHKaTC UNM v Martine v období od roku 2008 do roku 2010, ktoré boli nevhodné pre ortotopickú transplantáciu pečene. Odborné ciele práce a jednotlivé pracovné postupy boli schválené Etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty UK v Martine. Pred samotným odberom sme zhodnotili funkcie jednotlivých orgánov. Rozhodnutie o odmietnutí orgánu na transplantáciu bolo založené na základe makroskopického vzhľadu pečene, histologických výsledkov bioptických vzoriek pečene, ako aj na základe patologických laboratórnych výsledkov hepatálnych testov. Viabilita a počty ľudských pečeňových buniek izolovaných kolagenázou, boli stanovené použitím metódy farbením trypanovou modrou. Bunky sme zmrazovali za použitia 4 rôznych zmrazovacích médií (DMSO 5%, DMSO 10%, DMSO 15% a RCCF). Skúmavky s obsahom buniek sme transportovali do mraziaceho boxu (-80°C), kde sme ich nechali do nasledujúceho dňa v kryoskopickej nádobe. Na druhý deň sme ich transportovali do tekutého dusíka a nechali uskladnené na ďalšie experimenty. Následne sme ich po 1,3, 6 a 12mesiacoch rozmrazili a sledovali ich viabilitu po rozmrazení.

## **Výsledky**

Spracovali sme pečene od 11 darcov, z toho 8 mužských a 3 ženských. Priemerný vek darcu bol  $45,7 \pm 11,8$  rokov. Získané množstvo buniek bolo od  $7,9 \times 10^7$  až po  $8,1 \times 10^9$  a získané množstvo buniek na gram tkaniva bolo od  $5,53 \times 10^4$  do  $5,02 \times 10^7$ . Najvyšší celkový výťažok buniek, ako aj najvyšší výťažok na 1g tkaniva bol dosiahnutý spracovaním a izoláciou buniek zo steatotických pečení, najnižší spracovaním cirhotických pečení. Priemerný čas studenej ischémie bol  $11,6 \pm 6,9$  hodiny.

Porovnávali sme viabilitu získaných pečeňových buniek v závislosti od doby skladovania pečeňových buniek zmrazením pri použití rôznych kryokonzervačných médií (DMSO 5%, DMSO 10%, DMSO 15% a RCCF). Na porovnanie slúžila absolútna viabilita získaných pečeňových buniek  $\Delta v$ . Najvyššie hodnoty absolútnej viability po rozmrazení pri porovnaní s ostatnými kryokonzervačnými médiami dosiahlo kryokonzervačné médium RCCF pri všetkých dobách skladovania zmrazovaním v tekutom dusíku.

Priemerná percentuálna hodnota absolútnej viability u RCCF bola v jednotlivých sledovaných obdobiach od  $34,3 \pm 3,27\%$  po 1 mesiaci do  $36,7 \pm 2,73\%$  v 3 mesiaci. Priemerná percentuálna hodnota absolútnej viability u média obsahujúceho 10% DMSO bola v jednotlivých sledovaných obdobiach od 31,6 do 33,4%. U kryokonzervačných médií obsahujúcich 5% a 15% DMSO dosahovala priemerná percentuálna hodnota absolútnej viability nižšie hodnoty ako u RCCF a kryokonzervačného média obsahujúceho 10% DMSO a mala klesajúcu tendenciu v čase. To znamená, že predlžovaním doby skladovania zmrazovaním klesala absolútna viabilita takto spracovaných pečeňových buniek po rozmrazení (viď graf 1).



**Graf 1.** Porovnanie absolútnej viability získaných pečeňových buniek v závislosti od doby skladovania pečeňových buniek zmrazením pri použití rôznych kryokonzervačných médií

V tabuľke 1 je porovnávaný vplyv rôznych kryokonzervačných médií na viabilitu pečeňových buniek po rozmrazení 1, 3, 6 a 12 mesiacov po ich uskladnení zmrazením v tekutom dusíku. Porovnávali sme vplyv jednotlivých médií na viabilitu navzájom. Pri vzájomnom porovnaní RCCF a DMSO 15% po vyhodnotení prežívania po rozmrazení po 6 resp. 12 mesiacoch od zmrazenia vyšiel štatisticky významný rozdiel  $P=0,0004$  resp.  $P=0,0001$ . Pri vzájomnom porovnaní RCCF a DMSO 5% po vyhodnotení prežívania po rozmrazení po 12 mesiacoch od zmrazenia vyšiel štatisticky významný rozdiel  $P=0,0001$ . Pri vzájomnom porovnaní DMSO 10% a DMSO 15% po vyhodnotení prežívania po rozmrazení po 12 mesiacoch od zmrazenia vyšiel štatisticky významný rozdiel  $P=0,0001$ . Z uvedeného vyplýva, že kryokonzervačné médium s najlepšou viabilitou pečeňových buniek po ich rozmrazení na základe výsledkov štatistiky je recovery cell culture freezing medium RCCF. Ako druhé najlepšie bolo vyhodnotenú kryokonzervačné médium obsahujúce 10% DMSO, ktoré taktiež dosahovalo štatisticky významné rozdiely vo viabilite pečeňových buniek po rozmrazení v porovnaní s kryokonzervačným médiom obsahujúcim 5% resp. 15% (viď tabuľka 1).

V tabuľke 2 je porovnávaný vplyv kryokonzervačného média na viabilitu pečeňových buniek v závislosti od trvania doby uskladnenia pečeňových buniek zmrazením v tekutom dusíku v mesiacoch. Porovnávali sme rozdiely absolútnej viability získaných pečeňových buniek  $\Delta v$  v 2 rôznych časových intervaloch uskladnenia pečeňových buniek zmrazením. V prípade kryokonzervačného média RCCF a kryokonzervačného média obsahujúceho 10% DMSO neboli zaznamenané žiadne štatisticky významné rozdiely v závislosti od trvania doby skladovania. Pri porovnaní rozdielov viability pečeňových buniek pri použití kryokonzervačného média obsahujúceho 5% DMSO pri dobe uskladnenia 1 a 12 mesiacov, vyšiel štatisticky významný rozdiel na úrovni  $P=0,012$ . Pri porovnaní rozdielov viability pečeňových buniek pri použití kryokonzervačného média obsahujúceho 15% DMSO pri dobe uskladnenia 1 a 12 mesiacov, vyšiel štatisticky významný rozdiel na úrovni  $P=0,01$  resp. pri dobe uskladnenia 1 a 6 mesiacov, vyšiel štatisticky významný rozdiel na úrovni  $P=0,04$ . Kryokonzervačné médiá s najvyššou absolútnou hodnotou prežívania pečeňových buniek pri dlhodobom skladovaní po ich následnom rozmrazení sú RCCF a médium obsahujúce 10% DMSO. (viď tabuľka 2).

**Tab. 1.** Štatisticky významné rozdiely pri vzájomnom porovnávaní vplyvu rôznych kryokonzervačných médií (RCCF, DMSO 5%, DMSO 10%, DMSO 15%) na viabilitu pečňových buniek po rozmrazení 1, 3, 6 a 12 mesiacov po ich predchádzajúcom uskladnení zmrazením

|                  | Médium 1 | Médium 2 | Hodnota P | Výsledok |
|------------------|----------|----------|-----------|----------|
| <b>1 Mesiac</b>  | RCCF     | DMSO 5%  | 0,19      | ns       |
|                  | RCCF     | DMSO 10% | 0,66      | ns       |
|                  | RCCF     | DMSO 15% | 0,07      | ns       |
| <b>3 Mesiac</b>  | DMSO 10% | DMSO 15% | 0,02      | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 5%  | 0,028     | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 10% | 0,019     | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 15% | 0,009     | **       |
| <b>6 Mesiac</b>  | DMSO 10% | DMSO 15% | 0,011     | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 5%  | 0,01      | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 10% | 0,029     | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 15% | 0,0004    | ***      |
| <b>12 Mesiac</b> | DMSO 10% | DMSO 5%  | 0,008     | **       |
|                  | DMSO 10% | DMSO 15% | 0,001     | ***      |
|                  | RCCF     | DMSO 5%  | 0,001     | ***      |
|                  | RCCF     | DMSO 10% | 0,048     | *        |
|                  | RCCF     | DMSO 15% | 0,0001    | ***      |

RCCF - recovery cell culture freezing medium DMSO – dimetylsulfoxid ns - nesiginifikantný

**Tab. 2.** Štatisticky významné rozdiely pri porovnávaní vplyvu kryokonzervačného média (DMSO 5%, DMSO 10%, DMSO 15%, RCCF) na viabilitu pečňových buniek po rozmrazení 1 a 3, 1 a 6, resp. 1 a 12 mesiacov po ich uskladnení zmrazením

|                 | Mesiac 1 | Mesiac 2 | Hodnota P | Výsledok |
|-----------------|----------|----------|-----------|----------|
| <b>DMSO 5%</b>  | 1        | 12       | 0,012     | *        |
| <b>DMSO 10%</b> | 1        | 12       | 0,18      | ns       |
| <b>DMSO 15%</b> | 1        | 6        | 0,04      | *        |
|                 | 1        | 12       | 0,01      | **       |
| <b>RCCF</b>     | 1        | 3, 6, 12 |           | ns       |

ns –nesiginifikantné

## Diskusia a záver

V posledných rokoch sa skúmajú nové postupy na liečbu ochorení pečene, využívajúce pečňové bunky. Transplantácia hepatocytov a model bioarteficiálnej pečene sú sľubné liečebné techniky, ktoré môžu slúžiť ako podporná, alebo dokonca alternatívna liečba k ortotopickej transplantácii pečene (Strain et al., 2002). Obe metódy by mohli prispieť k zmierneniu nedostatku darcovských orgánov, využitým jednej pečene na liečbu viacerých pacientov postihnutých terminálnym zlyhávaním pečene (Baccarani et al., 2003). Od prvej transplantácie hepatocytov človeku ubehlo už 22 rokov, kedy pacientovi s chronickou



hepatitídou a cirhózou pečene injikovali do sleziny hepatocyty zo segmentu jeho vlastnej pečene. K očakávanému klinickému zlepšeniu pacienta však nedošlo (Mito, Kusano, 1993). Taktiež ďalší autori vo svojich prácach uvádzajú úspešné uplatnenie transplantácie alogénnych hepatocytov pri liečbe akútneho zlyhania pečene, ako aj pri liečbe dedičných metabolických ochorení pečene (Baccarani et al., 2005; Fox, Chowdhury, 2004). Celkovo sa vo svete uskutočnilo asi 100 transplantácií pečeňových buniek človeku. Preto sa ešte stále nahliada na transplantáciu hepatocytov ako na experimentálnu metódu. Zariadenie s bioarteficiálnou pečeňou s ľudskými, alebo zvieracími hepatocytami, sa začalo používať s povzbudzujúcimi výsledkami pri dočasnej podpore pacientov postihnutých fulminantným zlyhávaním pečene (Fujita et al., 2005). Základným kameňom oboch týchto experimentálnych liečebných metód je dostupnosť životaschopných, dobre funkčných pečeňových buniek v dostatočnom množstve.

Veľmi vážny a kľúčový problém získaných pečeňových buniek je ich skladovanie. Izolované hepatocyty sa môžu uchovávať v primárnych bunkových kultúrach hepatocytov po dobu niekoľkých dní (Katenz et al., 2007). Avšak pre ich širšie uplatnenie v praxi je nevyhnutný iný, dlhodobjší spôsob uskladnenia. Uchovávanie zmrazených hepatocytov v tekutom dusíku sa zdá byť najlepšou možnosťou ich uskladnenia (Stephene et al., 2007, Hošala a kol., 2011). Avšak kryokonzerváciou sa znižuje viabilita izolovaných buniek. Najdôležitejšie faktory, ktoré ovplyvňujú výsledné prežívanie hepatocytov po rozmrazení sú zloženie kryokonzervačného média, použitý kryoprotektant a tempo zmrazovania a rozmrazovania (Guillouzo et al., 1999). Zdá sa, že pomalé tempo znižovania teploty, používanie dimetylsulfoxidu ako kryokonzervačného média a rýchle tempo rozmrazenia sú nevyhnutnými predpokladmi k úspešnému kryokonzervačnému protokolu (Loyd et al., 2004). V našom výskume sme sa zamerali na sledovanie vplyvu kryokonzervačného média na viabilitu pečeňových buniek po rozmrazení. Ako kryokonzervačné médiá sme použili dimetylsulfoxid v rôznych koncentráciách a RCCF médium a porovnávali sme ich vplyv na absolútnu viabilitu pečeňových buniek po rozmrazení a jej závislosť od dĺžky doby uskladnenia zmrazením. Najvyššie hodnoty absolútnej viability po rozmrazení dosiahlo v našom súbore médium RCCF pri všetkých dobách skladovania zmrazovaním. U kryokonzervačných médií obsahujúcich 5% a 15% DMSO dosahovala priemerná percentuálna hodnota absolútnej viability nižšie hodnoty ako u RCCF a média obsahujúceho 10% DMSO a mala klesajúcu tendenciu v čase, to znamená, že predlžovaním doby skladovania zmrazovaním klesala absolútna viabilita takto spracovaných pečeňových buniek po rozmrazení. Guillouzo sledoval vplyv DMSO v rôznych koncentráciách na viabilitu pečeňových buniek po rozmrazení rôznych živočíšnych druhov. Najlepšie výsledky viability po rozmrazení zaznamenal pri koncentráciách od 10 do 20% DMSO. Najvhodnejšia koncentrácia pri zmrazovaní hepatocytov potkanov bola 16% DMSO, u ostatných zvieracích druhov 14% a u človeka od 10 do 12% DMSO v kryokonzervačnom médiu (Guillouzo et al., 1999). Taktiež Alexandrova popisovala kryokonzervačné médium s obsahom 10% DMSO ako najvhodnejšie pri zmrazovaní ľudských hepatocytov (Alexandrova et al., 2005, Baudoin et al., 2013). Hlavnou príčinou je nízka molekulárna hmotnosť, čo umožňuje dobrú permeabilitu do bunky, a tým zaisťuje kryokonzervačný efekt na vnútrobunkovej úrovni.

Jednou z úloh do budúcnosti bude vytvoriť také kryokonzervačné protokoly, ktoré budú umožňovať skladovať hepatocyty tak, aby ich bolo možné použiť kedykoľvek to bude potrebné. Najdôležitejšou a najťažšou úlohou bude redukcia poklesu viability a funkčnosti hepatocytov počas procesu zmrazovania a rozmrazovania.

## **Pod'akovanie**

Práca bola podporená grantom UK 445/2008.

## Literatúra

1. Alexandrova K, Griesel C., Barthold M. et al., Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application In: Cell transplant., 2005, 14(10), p.945-953
2. Baccarani U., Sanna A., Cariani A. et al.: Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application In: transplantation proceedings, 2005, 37, p:256-259
3. Baudoin R., Prot JM. Et al.: Evaluation of seven drug metabolisms and clearances by cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in microfluidic biochips, Xenobiotica, February 2013, Vol. 43, No. 2 : Pages 140-152
4. Fox J., Chowdhury R.: Hepatocyte transplantation, In: American Journal of transplantation, 2004, číslo 6, p.7-13
5. Fujita R. Hui T., Chelly M. et al.: The Effect of Antioxidants and a Caspase Inhibitor on Cryopreserved Rat Hepatocytes In: Cell Transplantation, volume 14, Number 6, 2005, p.391-396
6. Guillouzo A, Riolland L, Fautrel A. et al.: Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. In: Chem Biol Interact 1999; 121: p.7-16
7. Hošala M., Laca L., Hatok J. a kol.: Transplantácia hepatocytov, In: Gastroenterológia pre prax, 2011, 1
8. Katenz E., Vondran F., Schwartlander R. et al.: Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent, In: Liver transplant, 2007, 13(1): p.38-45
9. Lloyd T., Orr S., Berry D. et al.: Development of a Protocol for Cryopreservation of Hepatocytes for Use in Bioartificial Liver Systems, In: Annals of Clinical & Laboratory Science, vol. 34, no. 2, 2004
10. Mito M., Kusano M.: Hepatocyte transplantation in man, In: Cell Transplant, 1993, 2: p.65-74
11. Stephene X., Najimi M., Ngoc D. et al.: Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1, In: Cell transplant, 2007, 16(4), p.409-419
12. Strain A., Neuberger J.: A bioartificial liver—state of the art. In: Science, 2002;295: p.1005-1009

# Prehľad imunohistologických markerov proliferácie používaných v diagnostike nádorov prsníka

Juríková M.<sup>1</sup>, Boháč M.<sup>2</sup>, Polák Š.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav histológie a embryológie LF UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

<sup>2</sup>Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickéj chirurgie LF UK a UN Bratislava, Ružinovská 6, 826 06, Bratislava

## Súhrn

Proliferácia je proces, kedy dochádza k rastu, deleniu a vytvoreniu nových buniek. Je charakteristická pre bunky s vysokou mitotickou aktivitou. Za normálnych podmienok majú bunky obmedzený replikačný potenciál a po sérii niekoľkých delení vstupujú do pokojového štádia. V prípade nádorových buniek však dochádza k deregulácii proliferácie a bunky nadobúdajú neobmedzený replikačný potenciál, čím sa stávajú nesmrteľnými. Proliferačná aktivita nádorových buniek je jedným z dôležitých prognostických ukazovateľov nádorov. Jednou z metód určujúcich proliferáciu buniek je imunohistochemické farbenie protilátkami, ktoré rozoznávajú deliace sa bunky. V praxi sú najčastejšie vyšetrovanými markermi proliferácie buniek antigény Ki67, PCNA a MCM proteíny. Táto práca ponúka prehľad spomínaných antigénov, bližšie charakterizuje ich štruktúru aj funkciu a poukazuje na vlastnosti, vďaka ktorým sa využívajú ako markery proliferácie pri diagnostike nádorových ochorení prsníka.

**Kľúčové slová:** markery proliferácie, Ki67, PCNA, MCM

**(Overview of immunohistochemical markers of proliferation used in breast cancer diagnostics)**

## Summary

Proliferation is a process leading to growing and multiplication of cells. It is characteristic for cells with an increased mitotic activity. Under normal conditions, cells have a limited replicative potential and after series of divisions they enter a quiescent phase. But in the case of tumor cells their replicative potential is deregulated and the cells acquire unlimited replicative potential thus becoming immortal. The proliferative activity of tumor cells represents an important prognostic marker. One of the methods assessing the proliferative activity of the cells is an immunohistochemical detection of cell-cycle specific antigens. Commonly examined markers of proliferation are Ki67, PCNA and MCM antigens. This review discusses about structure, function and properties of these antigens which make them good markers of proliferation in diagnosis of breast cancer.

**Key words:** markers of proliferation, Ki67, PCNA, MCM

## Úvod

Proliferácia je proces, kedy dochádza k rastu, deleniu a vytvoreniu nových buniek. Je charakteristická pre bunky s vysokou mitotickou aktivitou. Za normálnych podmienok majú bunky obmedzený replikačný potenciál a po sérii niekoľkých delení vstupujú do pokojového štádia. V prípade nádorových buniek však dochádza k deregulácii proliferácie a bunky nadobúdajú neobmedzený replikačný potenciál, čím sa stávajú nesmrteľnými. Proliferačná aktivita nádorových buniek je jedným z dôležitých prognostických ukazovateľov nádorov. Jednou z metód určujúcich proliferáciu buniek je imunohistochemické farbenie

protilátkami, ktoré rozpoznávajú deliace sa bunky. V praxi sú najčastejšie vyšetrovanými markermi proliferácie aktivity nádorových buniek antigény Ki67, PCNA a MCM proteíny.

Táto práca ponúka prehľad spomínaných antigénov, bližšie charakterizuje ich štruktúru aj funkciu a poukazuje na vlastnosti, vďaka ktorým sa využívajú ako markery proliferácie pri diagnostike nádorových ochorení prsníka.

### **Ki67 proteín**

Začiatkom 80. rokov minulého storočia objavil tím nemeckých vedcov antigén Ki67 a identifikoval ho na základe použitia monoklonálnych protilátok proti jadrovému antigénu z bunkovej línie Hodgkinovho lymfómu<sup>1</sup>. Meno antigénu bolo odvodené z mesta pôvodu (Kiel, Nemecko) a čísla pôvodného klonu v 96-jamkovej platničke. Detailná analýza odhalila prítomnosť Ki67 antigénu v jadrách buniek vo všetkých fázach bunkového cyklu vrátane mitózy, zatiaľ čo bunky v G<sub>0</sub> fáze postrádali expresiu tohto antigénu<sup>2</sup>.

### **Expresia a bunková lokalizácia Ki67 proteínu v priebehu bunkového cyklu**

Intenzita expresie Ki67 počas bunkového cyklu osciluje. Kým niektorí autori uvádzajú, že na začiatku G<sub>1</sub> fázy sú bunky negatívne na prítomnosť Ki67<sup>3</sup>, iní preukázali nástup expresie Ki67 už v neskoršej G<sub>1</sub> fáze<sup>2</sup>. Je všeobecne akceptované, že počas S fázy sa zvyšuje intenzita farbenia Ki67 antigénom<sup>4</sup> a svoje maximum dosiahne počas metafázy mitózy. Prudký pokles nastáva počas anafázy a telofázy<sup>5</sup>. V pokojovom štádiu alebo v G<sub>0</sub> fáze bunky neexprimujú Ki67<sup>2,6</sup>.

Aj lokalizácia Ki67 počas bunkového cyklu nie je homogénna. V skorých štádiách G<sub>1</sub> sa Ki67 vyskytuje v malom množstve prerušovane v celej nukleoplazme. Tieto miesta korešpondujú s úsekmi satelitovej DNA<sup>7</sup>. S priebehom G<sub>1</sub> fázy dochádza k poklesu kolokalizačných oblastí satelitovej DNA. V neskoršej G<sub>1</sub> fáze, kedy dochádza k obnoveniu jadierka, sa Ki67 vyskytuje prevažne v tejto štruktúre<sup>5,8</sup>, aj keď jeho prítomnosť bola pozorovaná aj v niektorých heterochromatínových doménach molekuly DNA<sup>9</sup>. Podľa niektorých autorov sa počas S fázy nachádza Ki67 výlučne v jadierku<sup>8</sup>, iní zaznamenali jeho prítomnosť aj v nukleoplazme<sup>4,5</sup>. Kontroverzné je aj rozmiestnenie proteínu v G<sub>2</sub> fáze. Kým niektorí autori uvádzajú, že sa Ki67 nachádza roztrúsene po celom jadre<sup>4</sup>, iní pozorovali okrem toho aj zhluky proteínu<sup>5</sup>, ktoré čiastočne korešpondujú s umiestnením jadierka<sup>9</sup>. Výrazné zmeny v distribúcii Ki67 proteínu sú viditeľné počas mitózy. V profáze je Ki67 prítomný ako jemná sieť asociovaná s kondenzujúcim chromatinom<sup>10</sup>. V priebehu metafázy vykazuje Ki-67 silnú expresiu na povrchu kondenzovaných chromozómov<sup>5,9</sup>, aj keď nedochádza k úplnej asociácii proteínu s chromatinom. Po rozpade jadrovej membrány sa časť proteínu nachádza roztrúsene v cytoplazme. Táto expresia vymizne medzi anafázou a telofázou<sup>5</sup>.

### **Funkcia Ki67**

Ki67 bol pozorovaný v asociácii s nukleárnou matrix<sup>10</sup>, preribozómami<sup>11</sup> a satelitovou DNA v G<sub>1</sub> fáze<sup>7</sup>. Avšak až 40% proteínov bunky sa nachádza na povrchu mitotických chromozómov<sup>12</sup> ako súčasť perichromozómového obalu<sup>10</sup>. Tento obal pozostáva z proteínov a RNA, ktoré sú okrem centromér prítomné pozdĺž chromozómov a vytvárajú sieť fibríl a granúl odstupujúcich na krátku vzdialenosť od chromozómov<sup>13</sup>. Medzi proteíny a RNA vytvárajúce perichromozómový obal patria jadrové matrixové proteíny, jadrikové proteíny, ribozómové proteíny a snRNA<sup>12-14</sup>. Perichromozómový obal je prítomný na chromozómoch od profázy až po telofázu. Len nedávno sa zistilo, že práve Ki67 je jedným z hlavných proteínov podieľajúcich sa na vytváraní tohto obalu. Slúži ako lešenie, ku ktorému sa viažu nukleolárne proteíny, a preto nedostatok Ki67 proteínu bráni ďalším v ich zhromažďovaní sa okolo chromozómov počas mitózy, a teda chromozómy majú dramaticky redukovaný obsah

perichromozómového obalu alebo ho úplne postrádajú. Nukleolárne proteíny pritom vytvárajú obrovské agregáty, ktoré obklopujú jeden koniec ekvatoriálnej platničky metafázových chromozómov. Strata tohto obalu síce nespôsobuje zmeny vo vnútornej štruktúre chromozómov alebo počas segregácie chromozómov pri prvej mitóze, ale vedie k zmenám v morfológii jadierka a v organizácii jadra v nasledujúcej interfáze. Jadrá buniek ako aj samotné bunky sú oproti kontrole menšie, obsahujú iba jedno jadierko a dochádza k zmene organizácii chromozómov v jadre<sup>15</sup>.

Keďže sa Ki67 viaže na perichromozómový obal iba v aktívne rastúcich a deliacich sa bunkách, využíva sa ako marker týchto procesov, napr. sa používa na detekciu rastúcich nádorových buniek medzi zdravými bunkami tkaniva a na meranie efektívnosti liečiv používaných na zastavenie rastu nádorov<sup>16</sup>.

O jeho ďalších funkciách sa vie veľmi málo. Dôležitá je jeho úloha v bunkovom delení, pričom je nevyhnutná fosforylácia jeho serínových a treonínových zvyškov. Pretože ak dôjde k zablokovaniu Ki67 buď protilátkami alebo inhibovaním fosforylácie, bunková proliferácia sa zastaví<sup>9</sup>. Štúdie odhalili aj jeho účasť pri počiatkových krokoch rRNA syntézy, no jeho presná úloha zostáva dosiaľ neznáma<sup>6,17</sup>.

### **Využitie Ki67 antigénu**

Nepriítomnosť proteínu Ki67 v bunkách v pokojovom štádiu a jeho expresia v proliferujúcich bunkách, či už zdravých alebo nádorových, z neho robia výborného indikátora určujúceho podiel rastúcich buniek v danej bunkovej populácii<sup>18</sup>. Po tom, ako sa zistilo, že stanovenie podielu proliferujúcich buniek určením Ki67 indexu môže mať prognostickú hodnotu pri non-Hodgkinových lymfómoch<sup>2</sup>, robili sa rôzne štúdie, ktoré by potvrdili užitočnosť tohto markera. Viaceré štúdie dokázali jeho prognostickú hodnotu, najmä pri posudzovaní takých typov nádorových ochorení, pri ktorých stanoviť klinický priebeh ochorenia na základe iba histologických kritérií je náročné<sup>19</sup>.

Použitie Ki67 ako prediktívneho a prognostického markera pri nádoroch prsníka bolo do dnešnej doby veľmi skúmané. Preukázala sa asociácia Ki67 s bežnými histopatologickými parametrami, pričom najvýraznejší vzťah bol pozorovaný medzi Ki67 a stupňom malignity nádoru. Z viacerých analýz ďalej vyplýva, že Ki67 je sebestačným prognostickým parametrom prežívania pacientov bez ochorenia ako aj celkového prežívania pacientov<sup>20</sup>. Výsledky ďalej naznačujú, že hodnoty Ki67 proteínu nad 10-14% sú charakteristické pre prognosticky vysoko rizikovú skupinu<sup>21</sup>. Ki67 index sa považuje za dôležitý pri výbere dodatočnej formy chemoterapie pri pozitívnych hormón receptorových nádoroch prsníka a v závislosti od indexu boli nádory rozdelené na nízko, stredne a vysoko proliferujúce pri Ki67 menšom ako 15%, medzi 16-30% a nad 30%<sup>22</sup>.

### **PCNA (Jadrový antigén proliferujúcich buniek)**

V roku 1978 bol tento proteín objavený v sére pacientov so systémovým lupusom ako antigén autoimunitného ochorenia a dostal označenie PCNA, pretože sa vyskytoval v jadrách deliacich sa buniek<sup>23</sup>. O dva roky neskôr viedli štúdie génovej expresie bunkového cyklu HeLa buniek k objaveniu acidického nukleárneho proteínu, ktorý je prednostne syntetizovaný počas S fázy<sup>24</sup>. Tento proteín, označovaný aj ako cyklín<sup>25</sup>, úplne chýba alebo sa vyskytuje len v nepatrných množstvách v nedeliacich sa bunkách. Naproti tomu v proliferujúcich bunkách je syntetizovaný v rôznom množstve v priebehu celého bunkového cyklu. Nárast expresie PCNA nastáva v neskorej G<sub>1</sub> fáze a maximum dosahuje počas S fázy<sup>26</sup>. Bunky v G<sub>2</sub> a M fáze vykazujú úbytok proteínu v porovnaní s S fázou, avšak vyššiu hladinu ako v G<sub>1</sub> fáze<sup>27</sup>. Proteín je lokalizovaný v jadre iba v bunkách v S fáze<sup>28</sup> alebo v bunkách mimo S fázy, avšak po ožiarení UV svetlom (počas DNA opravy)<sup>29</sup>. Následné práce potvrdili, že PCNA a cyklín sú ten istý 29kDa proteín<sup>30</sup>.

## Štruktúra PCNA proteínu

PCNA je faktorom procesivity Pol $\delta$ , a teda funkčným homológom ostatných faktorov procesivity ako napr.  $\beta$  podjednotka DNA polymerázy III (Pol III) z *Escherichia coli* a produkt génu 45 bakteriofága T4. PCNA bol opísaný ako tzv. kĺzavý uzáver tvoriaci prstenec okolo molekuly DNA rovnako ako oba vyššie spomínané funkčné homológy<sup>31,32</sup>. Analýza kryštalickej štruktúry odhalila, že tento prstenec pozostáva z troch identických monomérov PCNA s vnútorným priemerom 3,4 nm. Táto štruktúra dovoľuje PCNA obtočiť sa okolo molekuly DNA a kĺzať tak voľne po dvojzávitnici v oboch smeroch<sup>33</sup>.

## Funkcia PCNA proteínu

Počas rozsiahlych štúdií sa zistilo, že PCNA zohráva dôležitú úlohu v procesoch spojených s metabolizmom DNA. Je kľúčovým prvkom pri replikácii DNA, kde vystupuje ako pomocný proteín pre DNA polymerázu  $\delta$  (Pol $\delta$ ) a  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ). PCNA je nevyhnutný pri oprave DNA a interaguje aj s proteínmi regulujúcimi bunkový cyklus.

Najlepšie prebádanou funkciou proteínu PCNA je jeho účasť na replikácii DNA. Ako už bolo vyššie spomínané, PCNA sa dokáže obtočiť okolo DNA a kĺzať pozdĺž nej. Naviazanie a odpojenie PCNA na a z molekuly DNA je na ATP závislý proces zabezpečený replikačným faktorom C (RFC)<sup>34</sup>. RFC otvorí prstenec PCNA a umožní tak naviazanie na DNA. PCNA slúži ako pohyblivá plošina pre následné naviazanie Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$  a ďalších replikačných proteínov interagujúcich s PCNA. Iba v prítomnosti PCNA dochádza k výmene Pol $\alpha$ , ktorá je zodpovedná za syntézu krátkych RNA/DNA primerov na vedúcom vlákne, za ďalšie polymerázy s vyššou procesivitou, ktoré pokračujú v syntéze DNA vlákien<sup>35</sup>. Okrem toho PCNA bráni opätovnému naviazaniu Pol $\alpha$  na replikujúcu sa DNA. Pol $\epsilon$  je zodpovedná za syntézu vedúceho vlákna, zatiaľ čo Pol $\delta$  pokračuje v syntéze Okazakiho fragmentov na zaostávajúcom vlákne v spolupráci s faktorom procesivity PCNA<sup>36</sup>.

Okrem úlohy PCNA počas replikácie DNA zohráva dôležitú funkciu počas reparačných procesov DNA. Počas opravy vyštípením pomáha pri rozpoznávaní poškodeného miesta, pri nasmerovaní esenciálnych endonukleáz k tomuto miestu a po ich vyštípení sa spolu s DNA replikačnými enzýmami a inými proteínmi podieľa na resyntéze komplementárneho vlákna a jeho ligácii k molekule DNA<sup>37,38</sup>.

Pri poškodení DNA alebo v procese starnutia bunky dochádza k zvýšenej tvorbe proteínu p21, ktorý blokuje prechod z G<sub>1</sub> do S fázy bunkového cyklu tak, že inhibuje aktivitu cyklín dependentných kináz<sup>39</sup>. p21 vytvára komplex spolu s PCNA, cyklínmi a cyklín dependentnými kinázami. Predpokladá sa, že naviazanie p21 na kĺzavý uzáver tvorený DNA v asociácii s PCNA môže blokať interakciu PCNA s RFC a Pol $\delta$ <sup>40</sup>, čím sa zastaví syntéza DNA. A keďže PCNA je kofaktorom Pol $\delta$  v priebehu syntézy DNA nielen počas replikácie, ale aj jej opravy, jeho interakcia s p21 pravdepodobne ovplyvňuje aj tento proces<sup>41</sup>.

## Využitie PCNA antigénu

Bunková expresia PCNA počas S a G<sub>2</sub> fázy bunkového cyklu z neho robí dobrého markera proliferácie. V kombinácii s ďalšími nádorovými markermi, ako estrogénový a progesterónový receptor a Her2/neu, sa javí aj ako užitočný prognostický marker<sup>42</sup>. Zvýšená expresia je spojená s kratším celkovým prežívaním u pacientov s nádorom prsníka<sup>43</sup>.

PCNA existuje v dvoch izoformách. Zatiaľ čo nádorové bunky prsníka a nádorové tkanivo obsahujú základnú formu proteínu a aj jeho acidickú izoformu, nemalígne prsníkové epitelové bunky obsahujú iba základnú formu. Keďže s nádorom asociovaná izoforma (caPCNA) nevzniká genetickou mutáciou, ale je výsledkom posttranslačnej modifikácie, z uvedeného vyplýva, že caPCNA môže slúžiť ako účinný marker nádorových ochorení prsníka<sup>44</sup>.

## **MCM (Minichromozómové udržiavajúce proteíny)**

MCM proteíny sú jednými z viacerých proteínov, ktoré sú nevyhnutné pre zahájenie replikácie DNA<sup>45</sup>. Nachádzajú sa výlučne v bunkách eukaryotických organizmov.

MCM proteíny boli prvýkrát identifikované v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kde ich úloha spočívala v udržiavaní plazmidov a minichromozómov v proliferujúcich bunkách<sup>46</sup>. Sú zodpovedné za vytváranie prereplikačného komplexu v G<sub>1</sub> fáze, čím dovoľujú replikáciu chromatinu v S fáze.

MCM proteíny zahŕňajú prevažne šesť hlavných proteínových rodín, Mcm2 až Mcm7. Okrem nich boli rozpoznané ďalšie štyri rodiny, avšak tieto majú nezávislú funkciu od predchádzajúcej skupiny. Patria sem Mcm1, Mcm8, Mcm9 a Mcm10. Napriek tomu, že Mcm1 a Mcm10 zdieľajú rovnaké menné označenie ako MCM proteíny, s Mcm2-Mcm7 toho nemajú veľa spoločného. Mcm1 je transkripčný faktor a nemá priamu úlohu počas replikácie DNA<sup>47</sup>.

## **MCM komplex**

Mcm2-Mcm7 proteíny vytvárajú v *in vivo* podmienkach proteínový komplex, resp. MCM komplex v podobe heterohexamérického prstenca. Jadro heterohexaméru tvorí trimér, ktorý pozostáva z Mcm4, Mcm6 a Mcm7 proteínov vzájomne pevne pospájaných. K jadru sa viaže Mcm2, ale už s menšou afinitou. Mcm3 a Mcm5 vzájomne vytvárajú dimér, ktorý sa pravdepodobne prostredníctvom Mcm7 viaže k ostatným proteínom<sup>48</sup>. V *in vitro* podmienkach v neprítomnosti ostatných MCM proteínov samotné jadro (Mcm4,6,7) dimérizuje a vytvára dimér-trimér (Mcm4,6,7)<sub>2</sub>, ktorý vykazuje helikázovú aktivitu<sup>49</sup>. MCM heterohexamér je nevyhnutný pre svoju translokáciu do jadra a následné udržanie v jadre a zahájenie replikácie DNA<sup>50</sup>.

## **Funkcia MCM komplexu**

Pred nástupom S fázy sa Mcm2-Mcm7 komplex sústreďuje do blízkosti komplexu rozpoznávajúceho počiatok replikácie<sup>51</sup>, ktorý sa viaže na počiatok replikácie v G<sub>1</sub> fáze prostredníctvom Cdc6 a Cdt1 proteínov. Tie sú nevyhnutné pre pripojenie MCM heterohexaméru<sup>52,53</sup>, čím následne dochádza k vytvoreniu prereplikačného komplexu. Prereplikačný komplex je aktivovaný počas G<sub>1</sub>-S prechodu bunkového cyklu pripojením ďalších proteínov<sup>54</sup>. Komplex MCM je tvorený v cytoplazme a za jeho nasmerovanie do jadra sú zodpovedné proteíny Mcm2 a Mcm3<sup>55</sup>. MCM komplex umožňuje zahájenie replikácie chromatinu a počas elongácie pravdepodobne pôsobí ako DNA helikáza<sup>56</sup>. Helikázová aktivita vyžaduje pravdepodobne prítomnosť ďalšieho faktoru, ktorým je Cdc45 proteín<sup>57</sup>, ktorý spoločne s MCM komplexom cestuje s replikačnou vidlicou. Takmer vo všetkých organizmoch sa MCM komplexy nachádzajú konštitutívne v jadre v asociácii s chromatinom počas celého bunkového cyklu. MCM komplexy sa viažu na chromatin v priebehu G<sub>1</sub>-S prechodu a k ich disociácii dochádza v priebehu S fázy<sup>58,59</sup>. Časť MCM proteínov existuje aj samostatne rozpustná v jadre v priebehu bunkového cyklu. Iba u *S. cerevisiae* môžu MCM proteíny vstupovať a vystupovať z jadra počas jedného bunkového cyklu, a teda MCM komplex prítomný iba v jadre je len počas S fázy. Aj v prípade *S. cerevisiae* platí, že za nasmerovanie MCM proteínov do jadra sú zodpovedné sekvencie prítomné na Mcm2 a Mcm3 proteíne<sup>60</sup>. Export MCM komplexu z jadra ako aj zahájenie replikácie iba jedenkrát v rámci bunkového cyklu zabezpečuje aktivita CDK kináz<sup>61</sup>.

Okrem funkcie pri replikácii DNA sa predpokladá účasť MCM proteínov aj počas iných bunkových dejov. Ukázalo sa, že viaceré MCM proteíny sa asociujú s karboxyterminálnou doménou RNA polymerázy II (RNA Pol II), pričom prídanie protilátky k Mcm2 má za následok inhibíciu transkripcie *in vitro*<sup>62</sup>. Zistilo sa, že MCM proteíny sa viažu aj so špecifickými transkripčnými faktormi<sup>63</sup>.

## Využitie MCM proteínov

Keďže prítomnosť a aktivita MCM proteínov je nevyhnutná počas replikácie DNA v deliacich sa bunkách a stráca sa v pokojovom štádiu, predstavujú MCM proteíny vhodné markery proliferácie<sup>64</sup>. MCM môžu byť dokonca lepšími ako klasické faktory proliferácie, napr. Ki67. Zistilo sa totiž, že počet buniek exprimujúcich Mcm6 proteín je vyšší ako počet exprimujúcich Ki67. Dôvodom je expresia Mcm6 aj počas G<sub>1</sub> fázy, kedy je expresia Ki67 nevýrazná, resp. len nastupuje<sup>45,64</sup>. Molekulárne štúdie poukazujú, že MCM vedia označiť nielen proliferujúce malígne bunky<sup>65,66</sup>, ale aj prekancerózne bunky a potenciálne recidivujúce bunky<sup>67,68</sup>. Predpokladá sa, že expresia MCM proteínov môže mať význam pri diagnostike a určovaní prognózy nádorových ochorení v praxi<sup>69</sup>.

V nádoroch z prsníka bola preukázaná expresia Mcm2 proteínu v jadre. Jeho expresia v dysplastických, malígnych a nádorových bunkách môže predikovať potenciálnu malignitu a môže napomôcť pri určení stupňa nádoru<sup>64,70,71</sup>. Dokázalo sa, že zvýšená hladina Mcm4 mRNA ako aj expresia Mcm4 proteínu sú asociované s nádorovým ochorením prsníka a sú signifikantne vyššie pre ER negatívne nádory. Rovnako aj intenzita zafarbenia Mcm4 sa zvyšuje s histologickým stupňom nádoru. No iba samotná expresia Mcm4 je slabým prognostickým markerom progresie prsníkových nádorov<sup>72</sup>. Naopak zistila sa silná pozitívna korelácia medzi expresiou jednotlivých MCM proteínov Mcm2-7 komplexu, z čoho môžeme usudzovať, že MCM2-7 gény sú navzájom regulované prostredníctvom spoločných transkripčných faktorov. Nadexpresia každého MCM proteínu je asociovaná so zníženým prežívaním pacienta, a teda nadexpresia všetkých proteínov je asociovaná s progresiou nádorového ochorenia. Čím viac proteínov z Mcm2-7 komplexu je nadexprimovaných, tým sa zvyšuje riziko úmrtia pacientov v porovnaní s tými, u ktorých nedochádza k nedexpresii žiadneho MCM proteínu, a teda expresia všetkých MCM proteínov je spoľahlivým prognostickým indikátorom u pacientov s nádorom prsníka. Štúdia ďalej odhalila, že nádory, ktoré reagovali lepšie na liečbu, nadexprimovali viac druhov MCM proteínov, z čoho vyplýva, že expresia MCM sa môže použiť ako prediktívny ukazovateľ protinádorovej liečby<sup>72</sup>.

## Použitá literatúra

1. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13–20
2. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710–1715
3. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, et al. 1991. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 12:42–49
4. du Manoir S, Guillaud P, Camus E, et al. 1991. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* 12:455–463
5. Braun N, Papadopoulos T, Muller-Hermelink HK. 1988. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 56: 25-33
6. Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, et al. 2006. Ki67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 206:624-635
7. Bridger JM, Kill IR., Lichter P. 1998. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res* 6:13–24
8. Kill IR. 1996. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci* 109:1253–1263
9. Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C. 1996. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109:143–153



10. Verheijen R, Kuijpers HJ, Van Driel R, et al. 1989. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *Journal of Cell Science* 92:531–540
11. Isola J, Helin H, Kallioniemi OP. 1990. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. *The Histochemical Journal* 22:498–506
12. Ohta S, Bukowski-Wills JC, Sanchez-Pulido L, et al. 2010. The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics. *Cell* 142:810–821
13. Hernandez-Verdun D, Gautier T. 1994. The chromosome periphery during mitosis. *BioEssays* 16:179–185
14. Van Hooser AA, Yuh P, Heald R. 2005. The perichromosomal layer. *Chromosoma* 114:377–388
15. Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L, et al. 2014. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife* 3:e01641
16. Dowsett M, Nielsen TO, A'hern R, et al. 2011. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute* 103:1656–1664
17. Rahmzadeh R, Huttmann G, Gerdes J, Scholzen T. 2007. Chromophore-assisted light inactivation of pKi67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif* 40:422–430
18. Alison MR. 1995. Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum Exp Toxicol* 14:935–944
19. Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Phys* 182:311–322
20. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F. 2013. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 139:539–552
21. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM et al. 2010. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11: 174–183
22. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. 2009. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20:1319–1329
23. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *The Journal of Immunology* 121:2228–2234
24. Bravo R, Celis JE. 1980. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 84:795–802
25. Bravo R, Fey SJ, Bellatin J et al. 1982. Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide („cyclin“) whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation . *Prog Clin Biol Res* 85 Pt A. 235–248
26. Bravo R. 1986. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res*, 163: 287–293
27. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, et al. 1986. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166:209–219
28. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. 1981. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154:1899–1909
29. Celis JE, Madsen P. 1986. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett* 209:277–283
30. Mathews MB, Bernstein RM, Franza R et al. 1984. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309:374–376
31. Kong XP, Onrust R, O'Donnell M, Kuriyan J. 1992. Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69:425–437
32. Gogol EP, Young MC, Kubasek WL, et al. 1992. Cryoelectron microscopic visualization of functional subassemblies of the bacteriophage T4 DNA replication complex. *Journal of Molecular Biology* 224:395–412
33. Krishna TS, Kong XP, Gary S, et al. 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79:1233–1243
34. Majka J, Burgers PM. 2004. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78: 227–260

35. Waga S, Bauer G, Stillman B. 1994. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem* 260:10923–10934
36. Burgers PM. 2009. Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem* 284:4041–4045
37. Maga G, Hubscher U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116:3051–3060
38. Strzalka W, Ziemienowicz A. 2011. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 107:1127–1140
39. Sherr CJ, Roberts JM. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149–1163
40. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574–578
41. Pan ZQ, Reardon JT, Li L, et al. 1995. Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* 270:22008–22016
42. Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjanen K. 1993. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancer Res* 13: 533–538
43. Tahan SR, Neuberg DS, Dieffenbach A, Yacoub L (1993) Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 71: 3552–3559
44. Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, et al. 2006. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *PNAS* 103:19472–19477
45. Heidebrecht H J, Buck F, Endl E, et al. 2001. Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to MCM6: Comparison of the distribution profile of MCM6 and the Ki67 antigen. *Laboratory Investigation* 81: 1163-65
46. Maine GT, Sinha P, Tye BK. 1984. Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 106:365–385
47. Passmore S, Elble R, Tye BK. 1989. A protein involved in minichromosome maintenance in yeast binds a transcriptional enhancer conserved in eukaryotes. *Genes Dev* 3: 921-935
48. Prokhorova TA, Blow JJ. 2000. Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexameric with replication licensing activity. *J Biol Chem* 275:2491-2498
49. Lee JK, Hurwitz J. 2001. Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:54–59
50. Pasion SG, Forsburg SL. 1999. Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly. *Mol Biol Cell* 10:4043–4057
51. Remus D, Beuron F, Tolun G, et al. 2009. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* 139: 719-730
52. Cocker JH, Piatti S, Santocanale C, et al. 1996. An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* 379:180–182
53. Maiorano D, Moreau J, Méchali M. 2000. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* 404:622– 625
54. Liu Y, Richards TA, Aves SJ. 2009. Ancient diversification of eukaryotic MCM DNA replication proteins. *BMC Evolutionary Biology* 9:60
55. Kimura H, Ohtomo T, Yamaguchi M, et al. 1996. Mouse MCM proteins: complex formation and transportation into the nucleus. *Genes Cells* 1:977-993
56. Labib K, Tercero JA, Diffley JF. 2000. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* 288:1643–1647
57. Masuda T, Mimura S, Takisawa H. 2003. CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45. *Genes Cells* 8:145–161
58. Fujita M, Kiyono T, Hayashi Y, Ishibashi M. 1997. In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP. *J Biol Chem* 272:10928–10935
59. Todorov IT, Attaran A, Kearsey SE. 1995. BM28, a human member of the MCM2–3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol* 129:1433–1445

60. Young MR, Suzuki K, Yan H, et al. 1997. Nuclear accumulation of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm3 is dependent on its nuclear localization sequence. *Genes Cells* 2:631–643
61. Nguyen VQ, Co C, Irie K, Li JJ. 2000. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2–7. *Curr Biol* 10:195–205
62. Yankulov K, Todorov I, Romanowski P, et al. 1999. MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* 19:6154–6163
63. DaFonseca CJ, Shu F, Zhang JJ. 2001. Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN- $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3034–3039
64. Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, et al. 2003. Minichromosome maintenance protein-2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol* 21:4306–4313
65. Freeman A, Morris LS, Mills AD, et al. 1999. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 5:2121–2132
66. Ishimi Y, Okayasu L, Kato C, et al. 2003. Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem* 270:1089–1101
67. Alison MR, Hunt T, Forbes SJ. 2002. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. *Gut* 50:290–291
68. Hunt DP, Freeman A, Morris LS, et al. 2002. Early recurrence of benign meningioma correlates with expression of mini-chromosome maintenance-2 protein. *Br J Neurosurg* 16:10–15
69. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. 2010. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol* 25:351–370
70. Wojnar A, Kobierzycki C, Krolicka A, et al. 2010. Correlation of Ki-67 and MCM-2 proliferative marker expression with grade of histological malignancy (G) in ductal breast cancers. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 48:442–446
71. Cobanoglu U, Mungan S, Gundogdu C, et al. 2010. The expression of MCM-2 in invasive breast carcinoma: a stereologic approach. *Bratisl Lek Listy* 111:45–49
72. Kwok HF, Zhang S, McCrudden CM, et al. 2015. Prognostic significance of minichromosome maintenance proteins in breast cancer. *Am J Cancer Res* 5:52–71

# Porovnanie kvality života rodičov u detí s rászštepom pery v dvoch mesiacoch a v 1. roku ich života

Macho P., Fedeleš J. Jr, Fekiačová D., Fedeleš J. sen

<sup>1</sup>*Klinika plastickej, estetickej a rekonštrukčnej chirurgie SZU a Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, UNB Ružinov*

## Súhrn

Rászštepy pery a podnebia patria k najčastejším vrodeným vývinovým ochoreniam. Práve izolované rászštepy pery a úplne rászštepy pery a podnebia stigmatizujúce tvár novorodenca stavajú rodičov takto postihnutých detí pred novú výzvu, s ktorou sa musia vysporiadať. Kvalite života rodičov postihnutých detí sa venuje len malý počet štúdií. Hoci dopady rászštepového ochorenia na kvalitu života rodín ako pocity zmätenosti, zapierania, viny, beznádeje, depresia, pocit neschopnosti počať zdravé dieťa sú všeobecne známe a popisované, objektívne hodnotenie vplyvu rászštepového ochorenia detí na kvalitu života ich rodičov v našich podmienkach študované nebolo. V našej, tri roky trvajúcej, prospektívnej štúdii sme použili štandardizovaný dotazník The Impact in Family Scale (IFS), hodnotiaci ekonomický vplyv, sociálny vplyv, rodinný vplyv a napätie opatrujúcej osoby rászštepového dieťaťa. Hodnotenie bolo realizované v druhom mesiaci života dieťaťa a následne v jednom roku života dieťaťa so vzájomným porovnaním. Po operačnom zákroku došlo k očakávanému zníženiu výrazného vplyvu na rodinu pre operačnú korekciu viditeľnej vady pery a funkčnej korekcií rászštepeného podnebia. Ochorenie spôsobuje najmä pocit zvýšených finančných problémov, avšak sociálna interakcia s inými ľuďmi nie je ovplyvnená ba dokonca vzťahy v rodine sú chorobou utužené. Rodičia však pociťujú napätie ako subjektívny pocit bremena. Verifikovali sme tiež, že izolovaný rászštep pery ovplyvňuje kvalitu života rodičov menej ako úplný rászštep pery a podnebia.

**Kľúčové slová:** rászštepy pery a podnebia, kvalita života

## Úvod

Rászštepy pery a podnebia patria k najčastejším vrodeným vývinovým ochoreniam.<sup>1</sup> Práve rászštepy pery stigmatizujúce tvár novorodenca stavajú rodičov takto postihnutých detí pred novú výzvu, s ktorou sa musia vysporiadať.

V rászštepovom centre Kliniky plastickej chirurgie UNB Nemocnica Ružinov sú pacienti s rászštepmi v dispenzárnej starostlivosti interdisciplinárneho rászštepového tímu. Rászštepom postihnuté dieťa je po narodení vyšetrené odborníkmi ako sú: pediater, genetik, plastický chirurg, ortodontista, logopéd či foniater. Od narodenia do tretieho mesiaca zväčša prebieha ortodontická príprava – nasoalveolárne modelovanie s cieľom korekcie postavenia alveolárnych oblúkov spolu s úpravou pery a nosa priblížením okrajov pier a predĺžením kolumely. Operačné riešenie rászštepu pery je načasované približne na tretí mesiac života pacienta. Operačné uzavretie rászštepu podnebia je naplánované na šiesty mesiac života dieťaťa. Pooperačne pacient ostáva v ambulantnom sledovaní a podľa potreby sú indikované ďalšie korekčné zákroky.

Celé popôrodné obdobie následne s pooperačným priebehom výrazne ovplyvňuje životy nielen pacientov, ale najmä rodičov rászštepových detí. V porovnaní so zdravými deťmi je ich kvalita života značne ovplyvnená vrodenou chybou, ktorá si vyžaduje operačnú korekciu. V poslednom období sa v medicíne dostáva do popredia práve sledovanie kvality života pacientov, resp. ich rodín. Počet štúdií zameraných na sledovanie vplyvu rászštepu pery

dieťaťa na život rodiny pacientov je zatiaľ minimálny. Aj to bolo príčinou toho, že sme zrealizovali štúdiu zaoberajúcu sa kvalitou života rodín pacientov v našom rázštepovom centre.

### **Cieľ štúdie**

Operácia predstavuje v súčasnosti jedinou metódu, ktorou sa definitívne koriguje rázštep. Jej vplyv na kvalitu života pacientov a ich rodiny je nesporný. Cieľom štúdie je objektivizovať vplyv rázštepu pery / a podnebia dieťaťa aj s jeho následnou liečbou na kvalitu života rodičov pomocou štandardizovaného dotazníka. Ten sa vyhodnocuje v dvoch mesiacoch života dieťaťa a následne v jednom roku života dieťaťa, kedy sa predpokladá, že dieťa je už po operáciách pery i podnebia a rázštep už má skorigovaný.

**Inklúzne kritéria:** Pacienti s rázštepom pery, alebo pery a podnebia, ktorí boli operovaní na Klinike plastickej chirurgie UNB. Operácia pery sa konala v treťom mesiaci života dieťaťa a v indikovanom prípade operácia podnebia v šiestom mesiaci života dieťaťa podľa operačného protokolu rázštepového centra.

**Exklúzne kritéria:** Do štúdie neboli zaradení pacienti, ktorí mali okrem rázštepu i iné stigmatizácie v rámci syndrómového ochorenia.

### **Metodika**

Na objektivizovanie vplyvu operácie na kvalitu života rodičov pacientov sme použili štandardizovaný dotazník The Impact on Family Scale (IFS, The Impact of Chronic Illness on a Family)<sup>2</sup>. Rodičia prvýkrát vyplňali dotazník v 2. mesiaci života dieťaťa a následne druhý dotazník s rovnakými otázkami v prvom roku života dieťaťa so vzájomným porovnaním. Dotazník obsahuje 27 otázok, na ktoré rodič odpovedá výberom jednej zo štyroch odpovedí: úplne súhlasím, skôr súhlasím, skôr nesúhlasím, úplne nesúhlasím. Oplyvnenie kvality života rodičov pacientov je chápané najmä ako vplyv ochorenia dieťaťa na rodinu. Za najdôležitejšie sa považujú štyri veličiny: ekonomická (zmeny v ekonomickom stave rodiny), sociálna (kvalita a kvantita sociálnej interakcie rodičov s inými ľuďmi), rodinná (kvalita interakcie v rámci rodiny) a napätie (subjektívny pocit bremena zažívaný rodičom – opatrovateľom o choré dieťa). Tieto faktory sú analyzované v dotazníku. Pri vyhodnocovaní dotazníkov sa používa štandardný skórovací systém, t.j. za odpoveď úplne súhlasím sa pridelujú 4 body, za odpoveď skôr súhlasím 3 body, skôr nesúhlasím 2 body a úplne nesúhlasím 1 bod. V prípade že odpoveď chýba 0 bodov. Čím nižší je počet bodov, tým menší vplyv má ochorenie dieťaťa na kvalitu života rodiny. Napríklad 27 bodov znamená najnižší, resp. žiadny vplyv ochorenia na kvalitu života rodičov. Naopak 108 bodov znamená najvyšší vplyv na kvalitu života rodičov.

### **Výsledky**

Inklúzne kritériá na zaradenie do prospektívnej štúdie v priebehu troch rokov na našej Klinike splnilo 28 rodín, štúdia aj naďalej pokračuje, ide preto len o predbežné výsledky. Týchto 28 rodín bolo rozdelených na dve skupiny. V prvej skupine boli rodiny s dieťaťom, ktoré mali izolovaný rázštep pery (v anglosaskej literatúre označované ako CL), kam sme zaradili 16 rodín. Druhú skupinu tvorili rodiny s dieťaťom majúci kompletný rázštep (v anglickej literatúre označované ako CLP), do tejto skupiny sme zaradili 12 rodín.

Naše predbežné výsledky ukazujú, že v druhom mesiaci života dieťaťa je u CL priemerný IFS 57, 267 bodov, pričom najmenší počet bodov bol 34, najväčší 83 bodov. Následne v prvom roku života dieťaťa s CL bol priemerný IFS 52 bodov, najmenej 36 bodov, najviac 81 bodov.

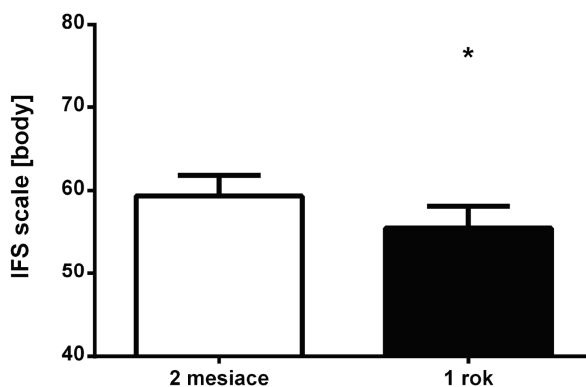
V druhej skupine s úplným rázštepom pery a podnebia (CLP) bol v druhom mesiaci priemerný IFS 60,917 bodov, pričom najmenší počet bodov bol 47 bodov, najväčší 89 bodov.

Následne v prvom roku života dieťaťa CLP bol priemerný počet bodov 58,083, najmenší počet bodov 45, najväčší 81 bodov.

**Tab. 1.** Štatistické vyhodnotenie kvality života rodín pacientov s rázštepom v 2 mesiaci a 1. roku života

|                         | 2 mesiace | 1 rok | 1 rok -<br>2 mesiace |
|-------------------------|-----------|-------|----------------------|
| Number of values        | 28        | 28    | 28                   |
| Minimum                 | 34        | 36    | -21                  |
| 25% Percentile          | 48,5      | 45    | -9                   |
| Median                  | 60        | 51,5  | -3,5                 |
| 75% Percentile          | 66,75     | 68,25 | 3,25                 |
| Maximum                 | 89        | 81    | 12                   |
| Mean                    | 59,39     | 55,54 | -3,857               |
| Std. Deviation (SD)     | 13,13     | 13,84 | 8,592                |
| Std. Error of Mean SEM) | 2,481     | 2,616 | 1,624                |
| Lower 95% CI            | 54,3      | 50,17 | -7,189               |
| Upper 95% CI            | 64,48     | 60,9  | -0,5253              |

**Porovnanie kvality života u rodín pacientov s rázštepom**



**Graf 1.** Porovnanie hodnotenia kvality života rodín pacientov v 2 mesiaci a 1. roku

## Diskusia

Predbežné výsledky našej prospektívnej štúdie prinášajú objektivizované hodnotenie vplyvu rázšepu pery / a podnebia detí na kvalitu života rodičov. Podobné realizované štúdie, napr. v Nemecku Krammerom<sup>6</sup>, zistili nízky vplyv rázšepu na kvalitu života rodičov. Naše výsledky odhalili najmä nízky vplyv na sociálnu interakciu, vyšší vplyv na pocit ekonomickej záťaž, zároveň však tiež vysoký vplyv na rodinné interakcie a pocit napätia. V prvom roku dieťaťa je vplyv rázšepu na kvalitu života jeho rodiny nižší (52, resp. 58,083 bodov ) ako v jeho dvoch mesiacoch života (57,267, resp. 60,917). Čo sa týka ekonomického vplyvu. Ochorenie vyžaduje vyššie náklady pre častejšie dochádzanie do ambulancií, nemocníc potrebu operačného riešenia v 3 mesiacoch a následné kontroly (pociťovanie finančných problémov pre ochorenie – 1,933 resp. 2,667 bodov u 2 mesačných detí, 1,467 resp. 2,083

u ročných detí). Na Slovensku je materská dovolenka do troch rokov dieťaťa preto, čo sa týka výpadku rodinných príslušníkov v práci, sa ekonomická veličina v IFS, prejavuje len minimálne (1,2 – 2,06 resp. 1 – 2,16 bodu v 2 mesiacoch resp. 1,06 – 2 resp. 1,16 – 1,5 bodu v jednom roku). Sociálna interakcia s inými ľuďmi pri rásztepoch pery nepredstavuje výrazný vplyv na kvalitu života rodičov (1,5 – 1,6 bodov u 2 mesačných, resp. 1,32 – 1,54 u ročných). Pri hodnotení rodinných inerakcií boli vzťahy v rodine sú ochorením dieťaťa najviac ovplyvnené. Jednak ide o utuženie vzťahov v rodine pre prítomnosť choroby a potrebu ju zvládať (3,13 resp. 3,25 bodu u 2 mesačných, resp. 3,2 - 3,33 bodu u ročných), potrebu komunikácie pre prítomnosť choroby s partnerom (4 body u 2 mesačných. resp. 4 a 3,867 u ročných), pocit nedostatku času pre ostatných členov rodiny (1,933 resp. 2,167 u 2 mesačných resp. 1,933 a 2 u ročných), vynaložení snahy o rovnaké zaobchádzanie ako so zdravým dieťaťom (4 resp. 3,917 u 2 mesačných, resp. 3,933 resp. 4 body u ročných). V prípade napätia (subjektívny pocit bremena) ide o veličinu, ktorá ovplyvňuje kvalitu života rodičov. Častokrát ide hlavne o pocity nepochopenia ostatných ľudí (2,13 a 1,917 bodov u 2 mesačných, resp. 1,933 a 2,333 u ročných), obavy z budúcnosti (3 resp. 2,333 bodov u 2 mesačných, resp. 2,067 a 3 u ročných), pocitu nestálosti života: pocit krízy pri zhoršení zdravotného stavu dieťaťa, pocit bezproblémovosti pri dobrom zdravotnom stave dieťaťa (2,669 a 2,333 bodu u 2 mesačných. resp. 1,867 a 2,25 u ročných).

### **Záver**

Predbežným vyhodnotením našej prospektívnej štúdie možno konštatovať, že rásztepy ovplyvňujú výrazne kvalitu života rodičov pacientov s takýmto postihnutím. Avšak kvalitnou zdravotnou starostlivosťou o rásztepočných pacientov v rásztepočných centrách sa následne zvyšuje kvalita života ich rodičov.

### **Literatúra**

1. Fedeles J Jr, Ziak P, Krizko M, Payer J Jr, Bohac M, Palencar D, Hulin I Jr, Fedeles J. 2012: Prevalence of cleft lip and palate in western Slovakia in the years 2001-2007. Bratisl Lek Listy 2012;113(2): 117-9
2. Stein R E K, Jessop D J: TABLES DOCUMENTING THE PSYCHOMETRIC PROPERTIES OF A MEASURE OF THE IMPACT OF CHRONIC ILLNESS ON A FAMILY. 1985: Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University Montefiore Medical Center.
3. Krammer F J, Baethge C, Sinikovic B, Schliephake H, 2007: An analysis of quality of life in 130 families having small children with cleft lip/palate using the impact on family scale. int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2007; 36:1146 – 1152.

### Príloha vzor dotazníka

|   |
|---|
| Choroba spôsobuje rodine finančné problémy  |
| Z dôvodu návštev nemocnice vymeškávam v práci   |
| Skracujem si pracovný čas, aby som sa mohla starať o dieťa  |
| Za účelom pokrytia výdavkov za liečbu je potrebné mať ďalší príjem  |
| Kvôli chorobe môjho dieťa som prestala pracovať   |
| Kvôli chorobe nie sme schopní cestovať mimo mesto   |
| Ľudia v susedstve sa k nám kvôli chorobe môjho dieťa správajú inak  |
| Kvôli chorobe môjho dieťa nechceme moc chodiť von   |
| Je ťažké nájsť niekoho spoľahlivého, kto by sa staral o moje dieťa  |
| Niekedy musíme kvôli stavu dieťaťa na poslednú chvíľu zmeniť plány ísť von  |
| Kvôli ochoreniu dieťaťa sa menej často vídame s rodinou a priateľmi   |
| Po tom čo sme prežili sme si v rámci rodiny bližší  |
| Niekedy si hovorím, či by sa s mojím dieťaťom malo zaobchádzať "špeciálne", alebo ako s normálnym dieťaťom  |
| Moji príbuzní majú pochopenie pre moje dieťa a pomáhajú mi  |
| Rozmýšľam, že už nebudem mať ďalšie dieťa kvôli tejto chorobe   |
| O problémoch môjho dieťaťa hovoríme spolu s mojím partnerom   |
| Snažíme sa zaobchádzať s mojím dieťaťom ako s normálnym dieťaťom  |
| Kvôli starostlivosti o moje dieťa mi nezostáva veľa času pre ostatných členov rodiny  |
| Príbuzní mi zasahujú do starostlivosti o moje dieťa a myslia si, že vedia čo je pre moje dieťa najlepšie  |
| Kvôli chorobe môjho dieťaťa sa naša rodina vzdáva niektorých vecí   |
| Kvôli chorobe môjho dieťaťa mám problémy s únavou   |
| Žijem zo dňa ma deň a nerobím si plány do budúcnosti  |
| Nikto nechápe aké nesiem bremeno  |
| Cestovanie do nemocnice je pre mňa namáhavé   |
| Po tom, ako som sa naučila zvládať chorobu môjho dieťaťa mám o sebe lepšiu mienku   |
| Obávam sa, čo sa stane s mojím dieťaťom v budúcnosti (keď vyrastie a ja nebudem nablízku)   |
| Niekedy mám pocit, že náš život je ako na húsenkovej dráhe:<br>v kríze, keď je moje dieťa akútne choré,<br>v poriadku, keď moje dieťa nemá problémy |



# Biological and morphological characterization of rat muscle-derived stem cells

Miko M.<sup>1</sup>, Varga I.<sup>1</sup>, Kuniaková M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Histology and Embryology, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 4, 81108 Bratislava, Slovak Republic*

<sup>2</sup>*Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 4, 81108 Bratislava, Slovak Republic*

Email: [misko.miko@gmail.com](mailto:misko.miko@gmail.com)

## Summary

In this study, we isolated, cultured and characterized rat muscle-derived stem cells (rMDMCs) and discuss their potential for toxicological testing of various chemical compounds *in vitro*. The rMDMCs were obtained from femoral muscle of Wistar rat by enzymatic digestion and seeded by pre-plating technique into sterile Petri dishes and expanded under proper *in vitro* condition up to 3th passage to obtain sufficient amount of cells. rMDMCs were characterized by different morphological (inverted microscopy, TEM) and biological methods (flow cytometry, growth curve, etc.). Obtained results proved typical morphology of cells with marked proteosynthetic activity: irregular nucleus with several deep notches and prominent nucleolus. Highly developed and numerous rough endoplasmic reticulum is another marker that support this finding. Large amounts of lysosomes as well as transport vesicles (*caveolae*) just beneath the cell membrane show that cell is very active in regards of exchange of substances with the environment. Moreover, rMDMCs express CD34 and Sca-1, and were negative for CD45. They were also positive for myogenic markers, including desmin and actin.

**Key words:** muscle-derived multipotent cells, rat, morphology, biological characteristics

## Introduction

Skeletal muscle represent source of two distinct populations of adult stem cells – satellite cells and multipotent muscle-derived stem cells (MDSCs). Satellite cells are monopotent cells – they produce cells of myogenic lineage, which play pivotal role in the regeneration of muscles (1). MDSCs are multipotent and they are considered to be predecessor of the satellite cells. Moreover, they undergo myogenic, cardiogenic, chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation, both *in vivo* and *in vitro* (2). Therefore, MDSCs have higher potential not only for regenerative medicine and tissue engineering, but also for toxicology as an *in vitro* model for toxicological screening as well as for study of various events on the cellular level (3).

In this study, we described the isolation technique and subsequent *in vitro* expansion of rat muscle-derived stem cells (rMDMCs). We performed their comprehensive characterization by different morphological and biological methods.

## Material and methods

### *Isolation and cell culture*

rMDSCs were obtained under sterile conditions from a biopsy specimen of femoral muscle (Wistar rat, male individual, n=3). Obtained samples were carefully washed by sterile phosphate buffered saline (PBS, Oxoid, UK) supplemented with gentamycin (Lek, Slovenia). Then minced into small pieces and digested with 0,1 % collagenase type I (Pan Biotech,

Germany) for 1h at 37 °C. Suspension was centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The resultant supernatant was aspirated and sediment was resuspended in 10 ml of 0,25 % trypsin–EDTA solution (PAA, Austria) for 30 min at 37 °C. The final suspension was filtered through 70 µm pore-size cell strainer (BD Falcon, US) and centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The supernatant was carefully removed and sediment was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma Aldrich, USA) with 10 % foetal calf serum (FCS, PAA, Austria) and gentamycin. The suspension was plated on a sterile Petri dish assigned as PP1 and paced in CO2 incubator (37 °C, 5 % of CO2 in air) for 2 h. Then, floating cells were aspired and plated on other Petri dish assigned as PP2. The procedure was repeated several times after 24 h incubation and the last Petri dish was designated PP5. Cells from PP5 were cultured for 21 days to obtain a sufficient number of rMDSCs, and the culture medium was refreshed 3 day interval. When the cells reached confluence, they were trypsinized and sub-cultured up to the 3rd passage. Cells from last passage were used for characterization.

### ***Morphological analysis***

The morphology of the *in vitro* expanded rMDSCs was continually examined under inverted microscope Zeiss Axiovert 100 during cultivation.

Cells assigned for transmission electron microscopy examination were fixed with 2,5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Germany) for 4 h. After fixation, samples were washed in PBS and post-fixed in 2% osmium tetroxide (Serva, Germany) for 2 h, then rinsed in distilled water and dehydrated in a graduated series of ethanol. Then, the samples were embedded in Durcupan and cut into semi-thin sections. Ultra-thin sections were mounted on 200 mesh copper grids, then double stained using uranyl acetate and lead citrate (Serva, Germany) and examined using a Philips Morgagni TEM.

Cells proposed for immunohistochemical analysis were fixed with cold methanol for 1 min. After that they were prepared for immunofluorescence staining against  $\alpha$ -actin and desmin (Dako Glostrup, Denmark) according to protocol provided by manufacturer.

### ***Phenotypical analysis***

rMDSCs from the third passage were analyzed by direct and indirect immunofluorescence, according to protocols specific for each antibody. In each case, 10 000 events were acquired and analyzed by a Coulter Epics ALTRA flow cytometer. The following surface proteins were analyzed: CD34, CD45 and Sca-1.

### ***Growth kinetics***

The evaluation of the growth characteristics of rMDSCs was performed by generating a growth curve prepared according to a standard method. Briefly, suspension of rMDSCs ( $5 \times 10^4$  cells/ml) at passage 3 was seeded into 60 mm Petri dishes. During the next 7 days of cultivation, three dishes were monitored on a daily basis for density. Growth curves were plotted by using Microsoft® Office Excel 2003.

### **Discussion and results**

In the present study, rMDSCs obtained from the skeletal muscle of adult Wistar rats were isolated and expanded under *in vitro* conditions. The cell cultures were initiated by a preplate seeding technique due to differences in the ability of various cell types to adhere on the substrate (4). The selection of this method was also contingent on the fact that cells isolated directly from dissociated suspension after fluorescence-activated cell sorting or magnetic activated cell sorting seem to exhibit a decreased regenerative ability (5).

rMDSCs started to proliferate as single cells or small colonies (Fig. 1). After 8 – 10 days of cultivation, the cells reached confluency (Fig. 2) and were sub-cultured. Contact inhibition was observed if they were not sub-cultured promptly. Comparable observations were published also by other authors, in rats and human (6,7). The kinetics of proliferation of rMDSCs from the third passage is presented on Fig. 3. The lag phase was almost undetectable; rMDSCs adhered directly after cell seeding. Then they started to proliferate and their number increased logarithmically. They reached the stationary phase after 7 days. Likewise, similar results were obtained by other authors in papers focused on the behavior of stem cells of different origin cultured under *in vitro* conditions (7-9).

Primary isolated rMDSCs had a bipolar to polygonal fibroblast-like morphology; they were elongated with some processes. During further expansion they maintained this morphology. TEM showed a normal ultrastructure of cells with high proteosynthetic activity. rMDSCs had a large and irregular nucleus with higher amount of euchromatine (Fig. 5). A variable number of prominent nucleoli of compact type were present in each nucleus (Fig. 6). The cytoplasm contained richly developed rough endoplasmic reticulum (Fig. 7) and prominent Golgi apparatus cisterns. Moreover, transport vesicles containing glycogen granules and lipid droplets were present in abundance (Fig. 8, 9). rMDSCs had a variable number of microvilli and filopodia responsible for their attachment to the substrate *in vitro* (Fig. 4).

Results obtained from immunohistochemical analysis proved production of  $\alpha$ -actin and desmin (Fig. 10, Fig 11). These results also indicate the capacity of MDSCs to give rise to cells of myogenic lineage (10).

Results of the flow cytometry analysis showed production of rMDMCs express CD34 and Sca-1. On the contrary rMDSCs were negative for CD45.

It follows that rMDSCs are considerably heterogenic and therefore, it is necessary to combine more markers for a more precise characterisation. One of these markers should be the production of desmin (also analysed in our study). Other authors demonstrated that rMDSCs are positive for MyoD and Sca-1 (11,12). Mentioned above open area for scientific discussion and further studies.

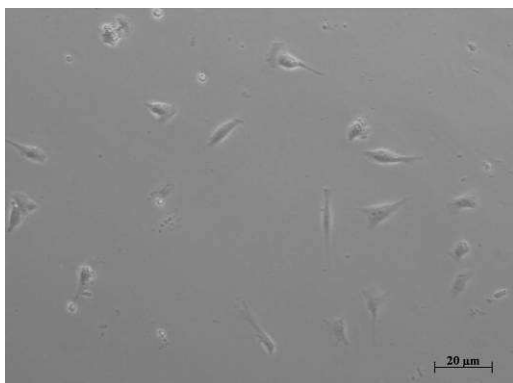


Fig. 1: rMDSCs in the early stage of cultivation

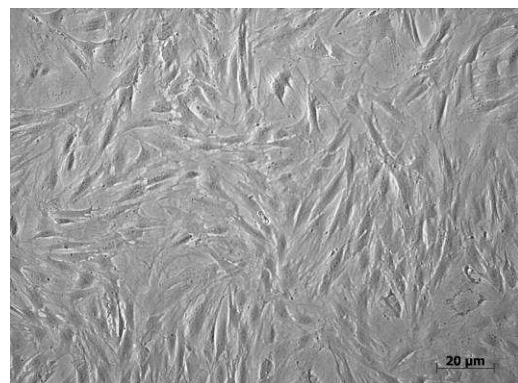


Fig. 2: rMDSCs after 10 days of cultivation

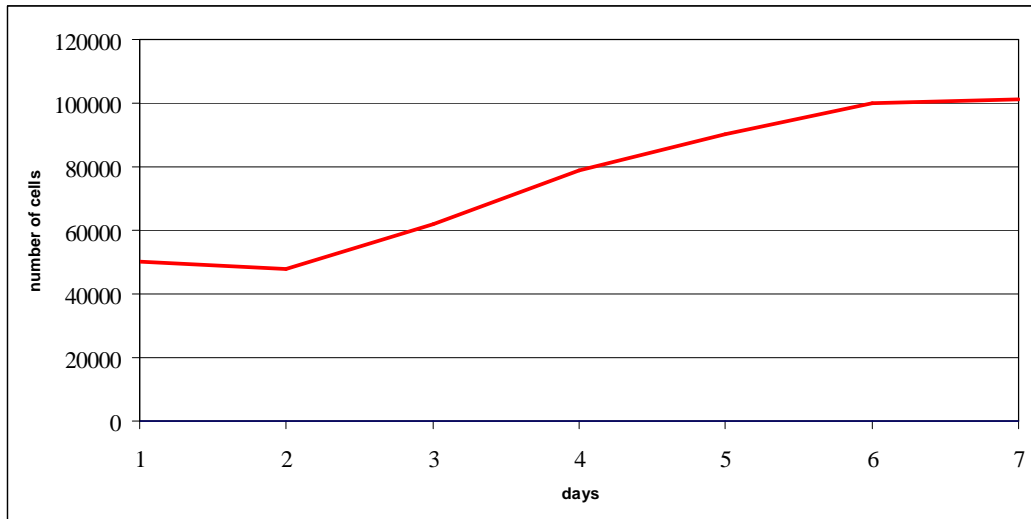


Fig. 3: Representative growth curve of rMDSCs

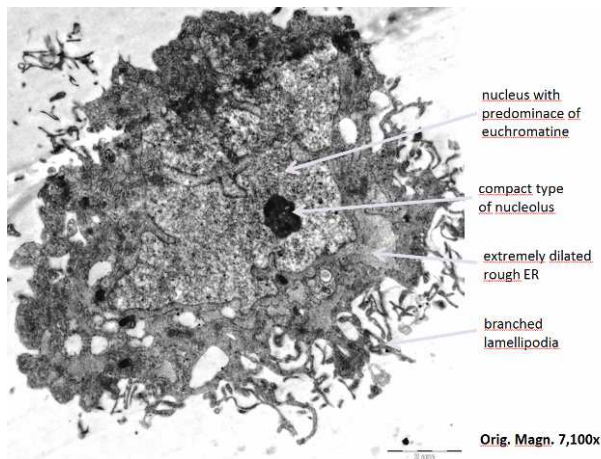


Fig. 4: Panoramic view of rMDSCs

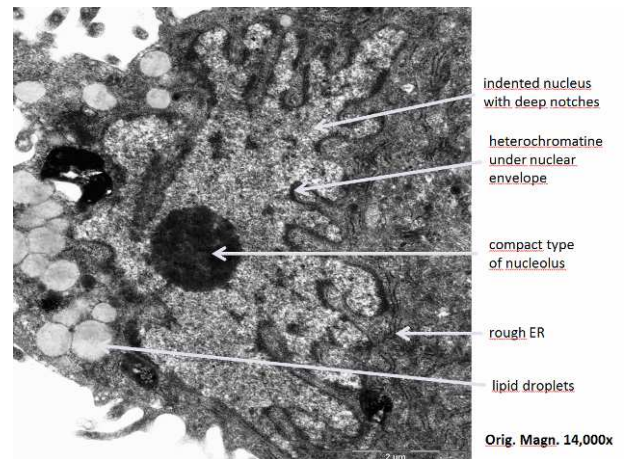


Fig. 5: Inspectional view of nucleus

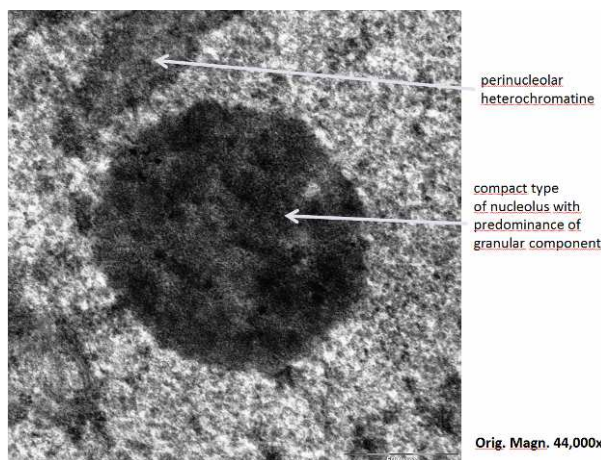


Fig. 6: Detail of nucleolus of compact type

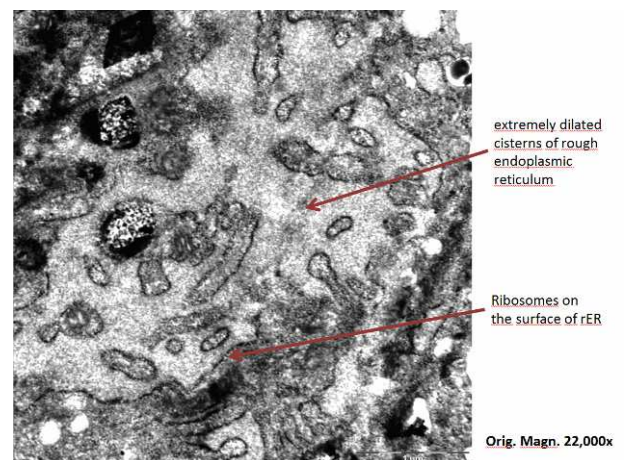


Fig. 7: Detail of rough endoplasmic reticulum

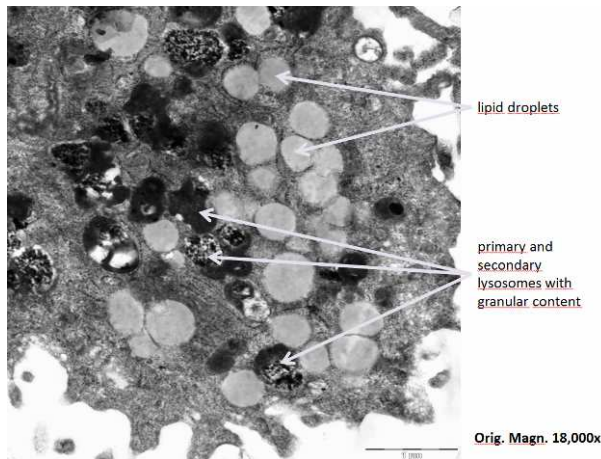


Fig. 8: Detail of lysosomes and lipid droplets

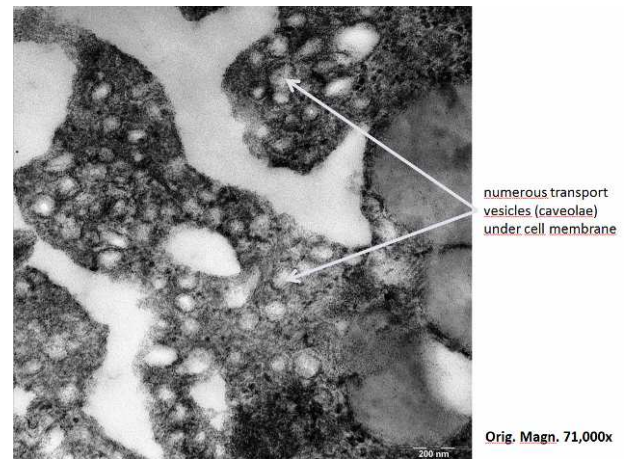


Fig. 9: Ultrastructural view of transport vesicles

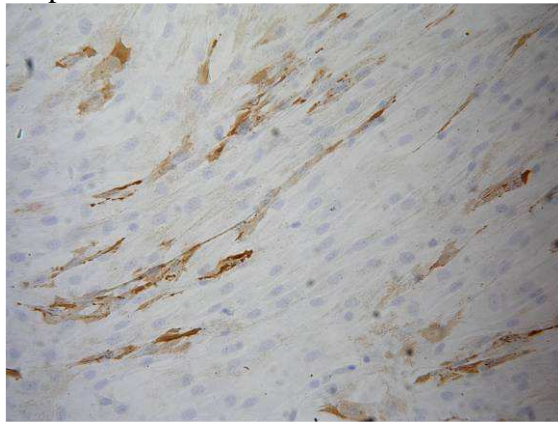


Fig. 10:  $\alpha$ -actin positivity of rMDSCs

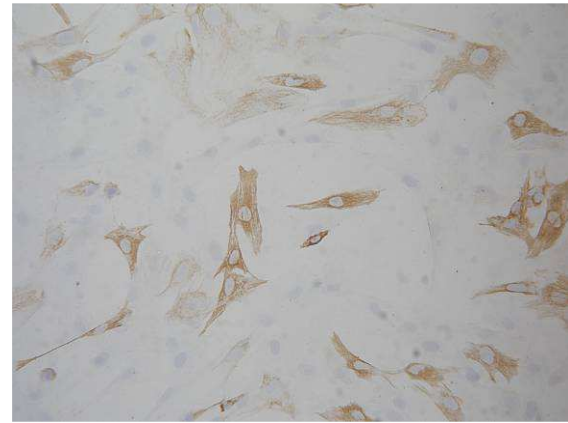


Fig. 11: desmin positivity of rMDSCs

### Acknowledgements

This study was supported by grant of the Slovak Research and Development Agency No. APVV-0434-12 and by the grant Vega No. 1/0076/13.

### References

1. Danisovic, L., Polak, S., Vojtassak, J. Adult stem cells derived from skeletal muscle—biology and potential. *Central European Journal of Biology*. 2013; 8(3):215-25.
2. Bueno, D.F., Kerkis, I., Costa, A.M., et al., New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. *Tissue Eng. Part. A*. 2009; 15:427-35.
3. Kelc, R., Trapecar, M., Vogrin, M., Cencic, A. Skeletal muscle-derived cell cultures as potent models in regenerative medicine research. *Muscle Nerve*. 2013;47(4):477-82.
4. Lu, S.H., Wei, C.F., Yang, A.H., et al. Isolation and characterization of human muscle-derived cells. *Urology*. 2009; 74(2):440–45.
5. Cao, B. and Huard, J., Muscle-derived stem cells. *Cell Cycle*. 2004; 3(2):104-7.
6. Alessandri, G., Pagano, S., Bez, A., et al. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet*. 2004;364(9448):1872–83.
7. Okumachi, E, Lee, S.Y., Niikura, T., et al. Comparative analysis of rat mesenchymal stem cells derived from slow and fast skeletal muscle in vitro. *Int Orthop*. 2015; 39(3):569-76.

8. Miao, Z., Jin, J., Chen, L., et al., Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 2006, vol. 30, no. 9, pp. 681–687.
9. You, Q., Tong, X., Guan, Y., et al., The biological characteristics of human third trimester amniotic fluid stem cells. *J Int Med Res*, 2009, vol. 37, no. 1, pp. 105–112.
10. Collins, C.A., Gnocchi, V.F., White, R.B., et al., Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS One*. 2009; 4:1-13.
11. Machida, S., Spangenburg, E.E., Booth, F.W. Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages. *Cell Prolif*. 2004;37(4): 267-77.
12. Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., Rudnicki, M.A. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002;159(1):123-34.

## Výživa a orálne zdravie

Nádaždyová A.<sup>1</sup>, Hirjak M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Onkologického ústavu Svätej Alžbety, Heyduková 10, 81250 Bratislava*

<sup>2</sup>*Katedra verejného zdravotníctva, Vysoká škola sv. Alžbety v Bratislave, Palackého 1, 81000 Bratislava*

E-mail: [anna.nadazdyova@fmed.uniba.sk](mailto:anna.nadazdyova@fmed.uniba.sk)

### Súhrn

Zubný kaz, zápal ďasien a paradontu predstavujú závažné ochorenia súčasnej doby. V Slovenskej republike trpí chorobami zubov a ďasien 80 – 90 % populácie napriek skutočnosti, že najmenej 80 % detí vo veku 6 rokov by malo mať intaktný chrup. Hoci starostlivosť o zuby spočíva v správnej dentálnej hygiene, zloženie niektorých potravín výrazne prispieva k vzniku zubného kazu. Vysoká konzumácia sacharidov, najmä ak sa konzumujú často, vedie k uvedenému a v súčasnosti najrozšírejšiemu infekčnému ochoreniu. Baktérie zubného povlaku premieňajú sacharidy na kyseliny, ktoré demineralizujú sklovinu. Protikladom sacharidov sú vitamíny A a D, ktoré počas vývoja zabezpečujú stimulovanie kostného metabolizmu. Vitamín D je nenahraditeľný pri vstrebávaní vápnika a fosforu, podstatného pre tvorbu kostí a zubov. Pri zníženom príjme vitamínu A dochádza k poruchám amelogenézy a dentinogenézy. Vitamín C je potrebný pre chemický proces vzniku kolagénu. Viaceré pozorovacie štúdie ukázali priaznivý vplyv horčička v liečbe paradentózy. Vápnik je jedným z najdôležitejších minerálov v tele a spolu s horčikom a fosforom je základným stavebným prvkom kostry a zubov. Fluorid je prírodná látka, ktorá podporuje lepšiu rast a vývoj zubov, kostí a zabraňuje vzniku demineralizácie a zubného kazu.

**Kľúčové slová:** orálne zdravie, výživa, vitamíny, minerálne látky, sacharidy

### Úvod

Orálne zdravie je súčasťou celkového zdravia. Zahrňuje zdravé zuby a okolité tkanivá (ďasná a paradont). Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) udáva pre Slovenskú republiku index KPE (kaz, plomba, extrakcia) 4,3. V Európskej únii (EÚ) má daný index priemernú hodnotu 1,5. Jedným z cieľov politiky „Zdravie 21“ – zdravie pre Európsky región v 21. storočí, je zníženie výskytu neprenosných chorôb (RÚVZ, Košice, 2013).

V ústnej dutine bolo identifikovaných takmer 500 druhov baktérií, ktorých životný proces je závislý od sacharidov. Kariogénne baktérie premieňajú sacharidy na kyseliny, ktoré poškodzujú povrch zubov a spôsobujú vznik zubného kazu. Nie vždy sa tento proces zastaví na povrchovej časti zuba, ale častejšie postupuje hlbšie - k dreni zuba.

Základný boj proti zubnému kazu spočíva v správnej dentálnej hygiene, avšak zloženie niektorých potravín je pre naše zuby z hľadiska kariológie nebezpečné.

V súčasnosti by malo mať najmenej 80 % detí vo veku 6 rokov chrup bez kazu a 12-ročné deti by nemali mať v priemere index KPE viac ako 1,5 (RÚVZ, Košice, 2013). Pre hodnotenie stavu paradontu sa odporúča používať komunitný paradontálny index - CPI. Na tento účel sa celý chrup delí na šesť úsekov - sextantov. Aby bol CPI hodnotiteľný musí sextant obsahovať aspoň dva zuby, u ktorých nie je indikovaná extrakcia. Stav sextantu sa hodnotí podľa najvyššieho dosiahnutého stupňa: 0 = zdravý paradont, 1 = krvácanie ďasien, 2 = prítomnosť zubného kameňa, 3 = prítomnosť plytkého paradontálneho vačku (do hĺbky 5 mm), 4 = hlboký paradontálny vaček (> 5 mm hĺbky). Stav paradontu sa klasifikuje podľa najhoršieho hodnotiteľného sextantu. Index CPI sa používa až od pätnástich rokov, kedy je už takmer úplne ukončená výmena zubov (Broukal et al., 2004).

Zvýšené úsilie v oblasti starostlivosti o populáciu v období vývoja je odôvodnené aj tým, že o zdravotnom stave dospeljej populácie vo veľkej miere rozhoduje obdobie detstva a mladosti. Berúc na vedomie predpoklad o silnejšom účinku výchovného pôsobenia v období rozvoja v porovnaní s obdobím dospelosti, je nevyhnutné zdôrazniť význam výchovy k zdraviu u detí a mládeže aj z ekonomického pohľadu. Vo vyspelých európskych krajinách je primárnej prevencii chorôb ústnej dutiny u detí venovaná veľká pozornosť, a preto je zaznamenaný pokles zubného kazu v chrupe stálom, ale aj mliečnom. K poklesu kazivosti zubov dochádza pod vplyvom široko implementovaných primárno-preventívnych opatrení (Longauerová, Boledovi, 2014).

K orálnemu zdraviu okrem výživy negatívne prispieva napr. genetika, sociálne nerovnosti a kvalita zdravotnej starostlivosti, kde jedna z dvoch základných dimenzií kvality zdravotnej starostlivosti je dostupnosť (Samohýl, 2014).

### **Zubný kaz**

Zubný kaz je progresívna demineralizácia a deštrukcia tvrdého zubného tkaniva, ktorá postihuje mliečny, ale aj trvalý chrup. Etiológia zubného kazu je multifaktoriálna. Zubný kaz zapríčiňujú baktérie. Medzi ne patria baktérie *Staphylococcus mutans*, ktoré využívajú fruktózovú časť cukru ako zdroj energie a jeho glukózovú časť premieňajú na polysacharid dextrán, ktorý na zuboch vytvára povlak obkolesujúci kolónie baktérií. Zubný kaz je dynamický proces, ktorý je možné v počiatočných štádiách významne ovplyvniť. Vznik kariéznej lézie závisí od striedania procesu demineralizácie a remineralizácie skloviny. Pri procese demineralizácie dochádza k poškodeniu povrchu skloviny, ktorý sa pôsobením kyselín rozpúšťa a uvoľňuje minerály (kalcium a fosfáty). Proces demineralizácie môže byť inhibovaný remineralizáciou, ak sa na povrchu skloviny koncentruje fluorid (Kaiferová et al., 2009). Zubný kaz, zápal ďasien a parodontu predstavujú závažné ochorenia súčasnej doby. V Slovenskej republike trpí chorobami zubov a ďasien 80 – 90 % populácie (RÚVZ, Košice, 2013).

#### ***Medzi rizikové faktory zvýšenej kazivosti zubov u detí podľa Kaiferovej et al. (2009) patria:***

- 131071. nedostatočná expozícia fluoridmi/prevenca,
- 131072. orálne hygienické návyky (čistenie zubov),
- 131073. nadmerný príjem sacharózy,
- 131074. dĺžka dojčenia,
- 131075. pitie z fľaše,
- 131076. celkový zdravotný stav detí

### **Sacharidy**

Sacharidy sú pre zuby škodlivé, najmä ak sa konzumujú často. Ich častý príjem vedie k oslabeniu zubnej skloviny, nakoľko baktérie v zubnom povlaku premieňajú sacharidy na kyseliny, ktoré zapríčiňujú jej demineralizáciu. Jedlo, ktoré obsahuje sacharidy baktérie v zubnom povlaku rýchlo vstrebávajú a vytvárajú za 1 – 2 minúty kyseliny (RÚVZ, Levice, 2014). Fermentované sacharidy patria k rizikovým faktorom podieľajúcim sa na rozvoji zubného kazu (Hujoel, 2009). Ľudia, ktorí konzumujú stravu s nízkym obsahom sacharidov, majú nižšiu prevalenciu zubného kazu v porovnaní s populáciou, ktorá konzumuje potravu s vysokým obsahom sacharidov. Sacharidy zostávajúce v ústnej dutine ovplyvňujú činnosť zubného povlaku. Pre zuby je rozhodujúce koľkokrát za deň a ako dlho sú vystavené pôsobeniu sacharidov, a teda aj kyselinám. V prevencii zubného kazu je potrebné sa vyhýbať konzumácii sladkostí (RÚVZ, Levice, 2014).

Polyoly (alkoholové cukry) sú viacsýtné alkoholy, teda alkoholy obsahujúce dve a viac hydroxylových skupín. Polyoly sú štruktúrne podobné molekule cukru, s výnimkou



nahradenia hydroxylovej skupiny v mieste skupiny aldehydu, alebo ketónu. Táto substitúcia zachováva niektoré chemické štruktúry cukru, mnoho fyzikálnych vlastností cukrov, čoho výsledkom je, že polyoly (často v kombinácii s intenzívnymi sladidlami) môžu účinne nahradiť cukor. Rozsiahly výskum, vrátane početných štúdií vykonaných počas posledných troch desaťročí, potvrdzuje, že polyoly nespôsobujú zubný kaz. Polyoly sa všeobecne vyrábajú hydrogenáciou cukrov a sú komerčne používané v potravinách a liečivách. V potravinárstve sú polyoly považované za náhrady cukru, pretože môžu byť použité ako náhrada sacharózy. Polyoly tak slúžia ako užitočné alternatívy cukru v širokej škále produktov, vrátane žuvačiek, cukroviniek, zmrzliny, pečiva a ovocných nátierok. Používajú sa tiež v zubných pastách, v ústnych vodách a vo farmaceutických výrobkoch (Patton, Nabors, 2011).

### **Vitamíny a minerálne látky**

Aj populácia s vysokým kalorickým príjmom môže byť podvyživená. Podvýživa je spôsobená nedostatočným nutričným zložením potravy. Vitamín A a D zabezpečujú stimulovanie kostného metabolizmu. Vitamín D je nenahradiiteľný pri vstrebávaní vápnika a fosforu, na tvorbu kostí a zubov. Pri zníženej dávke vitamínu A dochádza k poruchám amelogenézy a dentinogenézy (Winston, 2011). Vitamín C je potrebný pre chemický proces vzniku kolagénu (bielkoviny nevyhnutnej pre zdravé zuby, kosti, d'asná, chrupavky a kožu) a jeho nedostatok spôsobuje krvácanie z d'asien, zdurenia a zápal (Winston, 2011). Nedostatok vitamínov C a E môže zhoršiť paradentózu, ale samotný príjem vitamínov v liečbe paradentózy nepomáha.

Horčík (Mg) je jednou z najrozšírenejších katiónov prítomných v živých bunkách. Je dôležitý minerál, ktorý je potrebný pre širokú škálu fyziologických funkcií. Horčík je považovaný za antagonistu vápnika. Na bunkovej úrovni, môže pôsobiť ako dôležitý regulátor bunkových funkcií. Jeho koncentrácia v sére je konštantná za fyziologických podmienok. Vysoké normálne koncentrácie Mg v sére sú protektívne proti rôznym chorobám (Laires et al., 2004). Nerovnováha v metabolizme Mg je spojená s rôznymi patologickými stavmi. Niektoré pozorovacie štúdie ukázali priaznivý vplyv Mg na liečbu paradentózy. Paradentóza je zápalové ochorenie tkaniva d'asien vyvolané baktériami, ktoré sa usadzujú v povlaku na povrchu zubov. Zápal vedie k deštrukcii kostí a nakoniec k strate zubov. V industrializovaných krajinách, paradentóza postihuje 30 – 50 % dospelaj populácie, z ktorých 10 % má závažné príznaky (Albandar, 2002). Supplementácia Mg by mohla znížiť riziko straty zubov v strednom veku, kvalitu života jedinca a náklady na protetickú liečbu by sa mohli znížiť.

Vápnik (Ca) je jedným z najdôležitejších minerálov v tele a spolu s Mg a fosforom je základným stavebným prvkom kostry a zubov. Organizmus dospelého človeka obsahuje viac ako 1 kg Ca. Epidemiologická štúdia, ktorá bola uskutočnená na univerzite v Buffale prišla k záveru, že deti, ktoré mali nízky príjem Ca a vitamínu C mali v dospelosti dvakrát vyššie riziko vzniku ochorenia paradontu, ako deti, ktoré mali vyšší príjem Ca a vitamínu C. Najnovšia štúdia potvrdila, že dospelí, ktorí konzumujú Ca aspoň 1 500 mg/deň majú výrazne nižšie riziko vzniku paradentózy, pretože Ca pravdepodobne posilňuje alveolárne kosti. Riziko straty zubov môžeme minimalizovať optimálnym príjmom Ca 1 000 – 1 200 mg/deň a príjmom vitamínu D (vystavovaniu sa slnečnému žiareniu) 4 – 6 µg/deň (Perry, 2003). Vápnik pre zdravé zuby ma osobitný význam. Okrem mliečnych výrobkov je priaznivý príjem fluoridu v pitnej vode.

Fluorid je prírodná látka, ktorá podporuje rast, vývoj zubov a kostí a zabraňuje vzniku postupného zubného kazu. Všetky zlúčeniny fluoridu sú rozpustné vo vode. Podľa štatistik 1 mg/deň fluoridu v 1 l vody znižuje incidenciu zubného kazu približne o 50 %. Zdrojmi fluoridu sú fluoridovaná soľ alebo mlieko. Fluorid obsahujú aj produkty, ktoré nie sú určené

na konzumáciu napr. zubná pasta a ústna voda. Fluorid obsiahnutý v zubných pastách je schopný znížiť výskyt zubného kazu o 20 – 40 % (Kwan et al., 2005).

Železo (Fe) je kofaktorom prolylhydroxylázy, ktorá katalyzuje tvorbu hydroxylového prolínu. Železo je pravdepodobne prítomné v odontoblastoch pri tvorbe kolagénu (Wen, Paine, 2005). Pri vyššom príjme Fe ako sú OVD môže nastať sfarbenie zubov.

Ďalšia minerálna látka, ktorá je potrebná pre výživu zubov a kosti je fosfor, ktorý sa vyskytuje vo všetkých živých organizmoch. Najväčšia časť sa nachádza v kostiach, zuboch a orgánoch.

V praxi sa osvedčili výplachy soľným roztokom, ako pomocná liečba zapálených ďasien, ktoré sa neodporúča prehltnúť. (Samohýl et al., 2014). Soľ môže pomôcť k posilneniu ďasien a zubov a má schopnosť zbaviť sa nepríjemného zápachu v ústnej dutine.

### **Tehotenstvo a výživa**

Vývoj zubných tkanív začína už 6. týždni embryonálneho života. Výživa matky tak ovplyvňuje vývoj zubov plodu (Touger-Decker, 2005). Počas tehotenstva by ženy mali zvýšiť pozornosť o preventívnu starostlivosť v oblasti ústnej dutiny. Hormonálne zmeny počas tehotenstva vedú k zvýšenej náchylnosti k zápalu ďasien (zápal a krvácanie ďasien) a paradentózy (Ferris, 1993). Ochorenie paradontu u tehotnej ženy je klinicky významným rizikovým faktorom pre predčasný pôrod a nízku pôrodnú hmotnosť novorodenca (Offenbacher, 1996). Časté vracanie počas tehotenstva môže mať za následok opakovanú expozíciu žalúdočnej kyseliny, čo spôsobuje zvýšené riziko poškodenia zubnej skloviny.

Zlé stravovacie návyky (vysoká konzumácia jednoduchých sacharidov) zvyšuje riziko vzniku zubného kazu (Chido, Rosenstein, 1985). V Bratislavskom samosprávnom kraji bola počas tehotenstva potvrdená vysoká konzumáciu sladených nápojov ( $4,10 \pm 3,81$  dl) (Samohýl et al., 2014). V tehotenstve sa odporúča konzumovať čerstvú zeleninu a ovocie, nakoľko ich štruktúra obsahuje jemné vlákno, ktoré jemne čistí zuby. Optimálny príjem zeleniny počas tehotenstva je 350 g. V štúdií, ktorá bola uskutočnená na populácií tehotných žien sa zistilo, že tehotné ženy majú nízky priemerný príjem čerstvej zeleniny počas tehotenstva  $54,30 \pm 49,78$  g (Samohýl et al., 2014).

O správnej výžive dieťaťa a vzhľadom k vzniku zubného kazu je potrebné informovať tehotné ženy, pretože zubný kaz sa pri absencii ústnej hygieny môže objaviť čoskoro po prerezaní prvých dočasných zubov. Nebezpečné je pre dieťa pitie sladkých nápojov z dojčenskej fľaše najmä v noci, alebo často počas dňa, namáčanie cumľa do medu, alebo cukru (Merglová, Killian, 2002).

### **Celosvetový program orálneho zdravia**

Celosvetový program orálneho zdravia (Global Oral Health Programme) je jeden zo zdravotníckych programov v rámci odboru prevencie chronických chorôb a podpory zdravia. Bol spracovaný v súlade s novou stratégiou prevencie a podpory zdravia. Väčší dôraz je kladený na rozvoj globálnych politík v oblasti podpory zdravia ústnej dutiny a prevenciu ochorení ústnej dutiny a je zameraný na účinnejšiu koordináciu s ostatnými prioritnými programami podpory zdravia a s externými partnermi. Hlavným koordinátorom projektu je WHO. Celosvetový program orálneho zdravia je zameraný na orálnu zdravotnú politiku a na účinné riadenie rizík pre zdravie ústnej dutiny.

Dôraz v celosvetovom programe orálneho zdravia je kladený na ovplyvniteľné rizikové faktory súvisiace so životným štýlom ako je optimálna výživa, fajčenie a nadmerná konzumácia alkoholu (Petersen, 2003). Tabakový dym komplikuje a predlžuje hojenie zubnej rany. Z hľadiska orálneho zdravia sa konzumácia alkoholu neodporúča, nakoľko narúša proces hojenia ďasien a podporuje krvácanie po rôznych diagnostických a terapeutických výkonoch. Alkohol deštruuje vitamíny a minerály, citlivé na alkohol sú najmä vitamín

A a vitamíny skupiny B. Vitamín A je potrebný pre normálny rast a vývoj tela, obzvlášť pre zdravé kosti a zuby. V roku 2010 bolo v Slovenskej republike diagnostikovaných 5 868 ľudí s diagnózou závislosti od alkoholu (Samohýl, Jurkovičová, 2014), kde každý piati muž a každá desiata žena konzumuje viac ako 60g/deň alkoholu (Samohýl, 2014).

Program podporuje krajiny a regióny v ich úsilí zabezpečiť zdravé prostredie, ako je prístup k nezávadnej pitnej vode, hygienickým zariadeniam a prijatie účinných programov zameraných na asociáciu medzi fluoridom a prevenciou zubného kazu. Celosvetový program orálneho zdravia pracuje na formulácii národných politík a politík pre účinnú kontrolu rizikových faktorov výživy pre zubné ochorenia, rakoviny ústnej dutiny, lebky a paradentózy. Celosvetový program orálneho zdravia dáva prednosť integrácii všeobecných zdravotných programov na úrovni celospoločenskej, ale aj na vnútroštátnej úrovni. Globálne ciele pre zdravie ústnej dutiny do roku 2020 sú určené pre rozvoj kvality zubných zdravotných systémov. Program pracuje na aplikácii stratégie založenej na dôkazoch v oblasti podpory zdravia ústnej dutiny, prevencii a liečby chorôb ústnej dutiny, výskumu zdravotníckych systémov a vývoja. Dôraz je tiež kladený na prevenciu a starostlivosť o ústne slizničné lézie, vrátane rakoviny ústnej dutiny a ústne prejavy choroby HIV/AIDS (Petersen, 2003).

### **Odporúčaná výživa orálneho zdravia**

- konzumácia orechov, pretože sú bohaté na Ca, Mg a fosfor, ktoré sú dôležité pre zdravie zubov. Odporúča sa konzumovať orechy ako sú kešu, arašidy, mandle, vlašské orechy
- konzumácia ovocia, zeleniny, celozrnných potravín a výrobky z obilnín.
- konzumácia potravín bohatých na Ca ako je mlieko, syry a jogurty.
- potraviny, ktoré sa konzumujú medzi jednotlivými hlavnými jedlami by nemali obsahovať skvasiteľné (fermentované) cukry.
- neodporúčajú sa konzumovať sladkosti, v prípade konzumácie sladkosti je potrebné čistenie zubov
- odporúča sa konzumovať cukor skôr jednorázovo ako kontinuálne počas celého dňa
- ľudia, ktorí majú radi konzumáciu mäsitých pokrmov by si mali dávať väčší pozor pri čistení zubov a to najmä kvôli tomu, že vlákna z mäsitých pokrmov ostávajú medzi zubnými priestormi a pôsobením kyseliny pri ich rozklade môžu spôsobovať demineralizáciu zubnej skloviny
- odporúča sa pitie bylinkových čajov a minerálnych vôd (RÚVZ, 2013)

### **Záver**

Z uvedenej práce vyplýva, že zubný kaz, zápal ďasien a parodontu predstavujú závažné ochorenia súčasnej doby. V Slovenskej republike trpí 80 – 90 % populácie rôznymi chorobami zubov a ďasien. V orálnom zdraví je potrebné zabezpečiť konzumáciu potravín s obsahom vitamínov A, skupiny B, vitamínov C, D a E, a zároveň konzumáciu minerálnych látok ako je Mg, Ca, Fe a fluorid hlavne počas vývoja tvrdých zubných tkanív. Počas tehotenstva odporúčame zvýšenú starostlivosť o ústnu dutinu, nakoľko hormonálne zmeny počas tehotenstva vedú k zvýšenej náchylnosti k zápalu ďasien (zápal a krvácanie ďasien) a paradentózy.

V súčasnosti vidíme problém spätý so vznikom zubného kazu a ochoreniami parodontu hlavne v nedostatočnej dentálnej hygiene a v nízkej informovanosti populácie o zdraviu škodlivých potravinách najmä s vysokým obsahom sacharidov.

### **Literatúra**

1. ALBANDAR, JM. 2002. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. In Periodontol 2000. ISSN 0906-6713, 2002, vol.29., p. 177-206.

2. BROUKAL, Z. – MRKLAS, L. – KREJSA, O. et al. 2004. Analýza orálního zdraví vybraných věkových skupin obyvatel české republiky 2003. Souhrnná zpráva o výsledcích statistického zjišťování v oboru stomatologie v roce 2003 ve srovnání s roky 1994, 1997 a 2000. In VÚS, ÚZIS. Praha. 2004.
3. FERRIS, GM. 1993. Alteration in female sex hormones: their effect on oral tissues anti dental treatment. In *Compend Contin Educ Dent*. ISSN 0894-1009, 1993, vol. 14., no. 12. p. 1558-1564.
4. HUJOEL, P. 2009. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine: Dietary Carbohydrates and Dental-Systemic Diseases. In *J Dent Res*. ISSN 0022-0345, 2009, vol. 88., no. 6. p. 490-502.
5. CHIDO, GT. – ROSENSTEIN, DI. 1985. Dental treatment during pregnancy: a preventive approach. In *J Am Dent Assoc*. ISSN 0002-8177, 1985, vol. 110., no. 3. p. 365-368.
6. KAIFEROVÁ, J. – KOVÁČSOVÁ, L. – MARKOVSKÁ, N. 2009. Význam prevencie a ošetrovania zubného kazu v mliečnom chrupe. In *Pediatr prax*. ISSN 1336-8168, 2009, vol. 10., no. 5. s. 254-256.
7. KWAN, S. – PETERSEN, PE. – PNIE, CM. et al. 2005. Health-promoting schools: an opportunity for oral health promotion. In WHO. Ženeva. 2005.
8. LAIRES, MJ. – MONTEIRO, CP, BICHO, M. 2004. Role of cellular magnesium in health and human disease. In *Front Biosci*. ISSN 1093-9946, 2004, vol. 1., no. 9. p. 9:262-276.
9. LONGAUEROVÁ, A. – BOLEDOVI, M. 2011. Efektivita edukačných preventívnych programov v kontexte dentálneho zdravia žiakov mladšieho školského veku. In *Preven úrazu, otráv a násilí*. ISSN 1801-0261, 2011, vol. 8., no. 1. p. 75-84.
10. MERGLOVÁ, V. – KILIAN, J. 2002. Prevence vzniku zubního kazu a následných poruch orálního zdraví u dětí. In *ČLS JEP*. Praha. 2002.
11. OFFENBACHER, S. – KATZ, V. – FERTIK, G. et al. 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. In *J Periodontol*. ISSN 0022-3492, 1996, vol. 67., no. 10. p. 1103-1113.
12. PATTON, J. – NABORS, LO. 2011. Polyols: Sweet Oral Benefits. In *J int oral health*. ISSN 0976 – 7428, 2011, vol. 3., no. 1. p. 1-6.
13. PERRY, OD. 2003. Support healthy teeth with calcium. In *Active Interest Media*. Atlanta. 2003.
14. PETERSEN, PE. 2003. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. In *Community Dent Oral Epidemiol*. ISSN 0301-5661, 2003, vol. 31., no. 1. p. 3-23
15. REGIONÁLNY ÚRAD VEREJNÉHO ZDRAVOTNÍCTVA. 2013. 12. september – Európsky deň ústneho zdravia. In RÚVZ KE. Košice. 2013.
16. REGIONÁLNY ÚRAD VEREJNÉHO ZDRAVOTNÍCTVA. 2013. Európskemu dňu ústneho zdravia je venovaný 12. september 2013. In RÚVZ DS. Dunajská streda. 2013.
17. REGIONÁLNY ÚRAD VEREJNÉHO ZDRAVOTNÍCTVA. 2014. Európsky deň ústneho zdravia. In RÚVZ LV. Levice. 2014.
18. SAMOHÝL, M. – RAMS, R. – HIROŠOVÁ, K. et al. 2014. Asociácia príjmu nutričnej energie a prírastku hmotnosti matky v období tehotenstva. In *Sociálno-zdravotnícke spektrum*. Bratislava. 2014.
19. SAMOHÝL, M. – RAMS, R. – JURKOVIČOVÁ, J. 2014. Výživa a rizikové faktory životného štýlu matky v období tehotenstva. In: *Životné podmienky a zdravie*. Eds. Jurkovičová, J. Štefániková, Z. Bratislava, ÚVZ SR, 2014: 167-174.
20. SAMOHÝL, M. 2014. Kvalita zdravotnej starostlivosti. In *Postgraduální medicína*. ISSN 1212-4184, 2014, vol. 16., no. 5. p. 887-892.
21. SAMOHÝL, M. 2014. Spotreba alkoholických nápojov a zdravotné rizika. In *Sociálno-zdravotnícke spektrum*. Bratislava. 2014.
22. SAMOHÝL, M. JURKOVIČOVÁ, J. 2014. Alkohol ako príčina dyslipidémie. In *Preveda*. Bratislava. 2014.
23. SAMOHÝL, M. – RAMS, R. – HIROŠOVÁ, K. et al. 2014. Príjem sodíka a jeho vplyv na kardiovaskulárnu chorobnosť a úmrtnosť. Bratislava. 2014.
24. TOUGER-DECKER, R. – SIROIS, DA. – MOBLEY, CC. 2005. *Nutrition and Oral Medicine*. New Jersey: Humana Press Inc. 2005. p. 391. ISBN 1-58829-192-8.
25. WEN, X. – PAINE, ML. 2013. Iron Deposition and Ferritin Heavy Chain (Fth) Localization in Rodent Teeth. In *BMCResearchNotes*. ISSN 1756-0500, 2013, vol. 6., no. 1. p. 1-11.
26. WINSTON, I. 2011. Good nutrition key to oral health; Bad teeth, swollen gums, may signal poor diet In *GIPC*. Kanada. 2011.