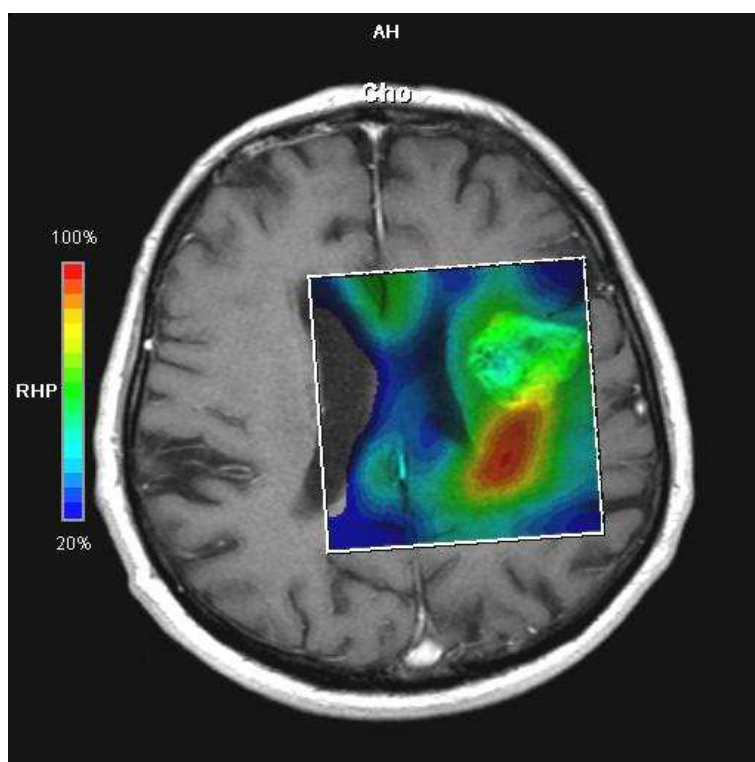


OBČIANSKE ZDRUŽENIE MAMMA FEMININA

Doc. MUDr. Štefan Polák, PhD.

BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM I.

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC



Bratislava 2013

Biomedicínsky výskum I.

Editor: doc. MUDr. Štefan Polák, CSc.

Vydal: © Občianske združenie Mamma Feminina, Bratislava, 2013

Recenzenti: MUDr. Drahomír Palenčár, PhD.
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 reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľa autorských práv.

ISBN: 978-80-971370-0-7

EAN: 9788097137007

Obsah

1. Katarína Bevízová, Ján Jakubovský, Štefan Polák: Klasifikácia nádorov z urotelu	3
2. Martin Boháč, Rastislav Trška, Drahomír Palenčár, Miloš Križko, Juraj Payer, Ľuboš Danišovič, Jozef Fedeleš: Autotransplantácia tuku – využitie v plastickej chirurgii	8
3. Ľuboš Danišovič, Zuzana Varchulová Nováková, Martin Boháč, Lenka Oravcová, Ján Vojtaššák: Modified Collagen/Hyaluronan/ Beta-Glucan Scaffold for Tissue Engineering Application	13
4. Gertruda Čáповá, Martina Havlíková, Viera Kristová, Alexander Kurtanský: Súčasnú možnosti farmakoterapie pľúcnej arteriálnej hypertenzie	19
5. Marcela Kuniaková, Zuzana Varchulová Nováková, Ľuboš Danišovič: Dlhodobá kultivácia kmeňových buniek a ich malígna transformácia	24
6. Miriam Petrová, Gertrúda Čáповá, Viera Kristová: Riziká užívania antipsychotík počas gravidity	28
7. Spurný Martin, Kriššáková Slavomíra: Primárny lymfóm CNS	30
8. Peter Záhorec, Martin Boháč, Ľuboš Danišovič, Ján Koller: Súčasný pohľad na liečbu chronických rán pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek	35

Klasifikácia nádorov z urotelu

Katarína Bevízová^{1,2}, Ján Jakubovský¹, Štefan Polák¹

¹Anatomický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; ²Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Abstract

Malignant tumors of the bladder are now second (after prostate cancer) most common malignancy of the urinary system, and 4th all the most common malignancy of cancer, especially in men. The present article is focused on clasification and characteriazation of different types of urinary bladder cancer.

Key words: urinary bladder, cancer, clasification

Úvod

Dnešná morfológická klasifikácia nádorov z urotelu, a ich prekursorov, sa opiera o klasifikáciu WHO/ISUP (The World Health Organization/International Society of Urological Pathology z r. 1998) (tab. 1).

Najnovšia WHO klasifikácia z roku 2004 (tab. 2) sa výrazne neodlišuje od WHO/ISUP z roku 1998 a vychádza z dohody pracovnej skupiny uropatológov v Lyone z decembra 2002 (Eble et al., 2004).

Tab. 2. WHO/ISUP klasifikácia nádorov močového mechúra (upravené podľa Galbavý, 2010)

Normálny epitel Normálny urotel (zahŕňa prípady predtým označované ako „ľahká dysplázia“)
Hyperplázia Plochá hyperplázia Papilárna hyperplázia
Atypické ploché zmeny Reakčná (zápalová) atypia Atypia neurčitého významu Dysplázia (intraurotelová neoplázia nízkeho stupňa malignity) <i>Carcinoma in situ</i> (intraurotelová neoplázia vysokého stupňa malignity)
Papilárne nádory PAPILÓM Invertovaný papilóm Papilárna neoplázia s nízkym malígnym potenciálom Papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity Papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity
Invázívne nádory Invázia do <i>lamina propria mucosae</i> Invázia do <i>lamina muscularis propria</i>

Tab. 2. WHO klasifikácia nádorov močového mechúra (upravené podľa Galbavý, 2010)

Neinvazívne neoplázie urotelu
Papilárne
Papilóm Invertovaný papilóm Papilárna urotelová neoplázia s nízkym malígnym potenciálom Neinvazívny papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity Neinvazívny papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity
Nepapilárne
Reakčná(zápalová) atypia Atypia neurčitého významu Dysplázia (intraurotelová neoplázia nízkeho stupňa malignity) <i>Carcinoma in situ</i> (intraurotelová neoplázia vysokého stupňa malignity)
Papilárne nádory
PAPILÓM Invertovaný papilóm Papilárna neoplázia s nízkym malígnym potenciálom Papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity Papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity
Invazívne nádory
Intraurotelová neoplázia vysokého stupňa malignity – <i>carcinoma in situ</i> Invazívne (infiltrujúce) nádory Invázia <i>lamina propria mucosae</i> Invázia <i>lamina muscularis propria</i> Invázia do tkaniva okolo mechúra a okolitých orgánov

Hyperplázia je zväčšenie orgánu premnožením sa jednotlivých buniek, ktoré ho tvoria. Tieto bunky nadobúdajú schopnosť deliť sa po istých stimuloch, alebo majú zvýšenú schopnosť reagovať na rôzne podnety. Experimentálne ju možno vyvolať použitím chemických látok, s povahu promótorov nádorov (Argyris, 1985). Predstavuje zvýšené riziko nádorovej premeny najmä v prípadoch s chronickou stimuláciou na bunkové delenie (Montironi et al., 2008).

Plochá hyperplázia urotelu je plochá porucha, charakterizovaná nápadnou zmenou hrúbky urotelu bez prítomnosti atypií (Lopez-Beltran, 2008). V minulosti ju definujú ako urotel, ktorý má hrúbku viac ako 7 vrstiev (Mostofi et al., 1988). Táto definícia v praxi zaniká pre zlé reprodukateľnosť. Ide o abnormity epitelu, ktoré sa môžu vyskytnúť v bezprostrednej blízkosti papilových urotelových nádorov typu „low-grade“.

Papilárna hyperplázia urotelu zahrňa poruchy bez príznakov. Charakterizujú ich malé papilárne útvary, pokryté urotelom rôznej hrúbky bez atypií (Readal a Epstein, 2010). V minulosti ju majú za polyploidnú cystitídu, privodenú zápalom. Dnes s ňou označujú aj polypoidne cystové poruchy. Choroba býva samostatná, aj viacnásobná ako skupina malých výrastkov. Na vzťah papilovej hyperplázie s papilárnou neopláziou urotelu sú názory nejednotné. Výskyt papilárnej hyperplázie v anamnéze pacientov s papilárnym karcinómom dovoľuje túto zmenu pokladať za spájajúci článok v patogenéze nádoru (Taylor, 1996). Papilárna hyperplázia nezvyšuje riziko vzniku nádoru, ale odporúča sa depistáž.

Atypické ploché poruchy

Reakčná atypia zahrňuje zmeny v jadre a jadierku. Vzniká pri akútnom, alebo pri chronickom zápale sliznice močového mechúra v urotele. V priebehu zápalových procesov sa jadrá buniek uniformne zväčšia, majú mechúrikový vzhľad a centrálné uložené jadierko. Môžu byť prítomné typické mitózoové figúry.

Atypia neurčitého významu nie je diagnostickou jednotkou. Výraz sa používa pri zápaloch, v ktorých sú prítomné ťažšie atypie, ale zmeny typické pre dyspláziu chýbajú.

Dysplázia je prednádorová porucha charakterizovaná zväčšovaním sa a zaokrúhľovaním sa jadier s miernymi atypiami a so stratou polarity buniek. Pomer objemu jadra k cytoplazme a počet amitóz môže rásť. Tieto zmeny postihujú väčšinou bazálne a intermediárne bunky, daždnikové bunky ostávajú nezmenené. Genetické poruchy potvrdzujú, že dysplázia môže byť predstupňom carcinoma in situ (CIS). Morfológicky, aj geneticky má dysplázia určité vlastnosti CIS (Hofstadter et al., 1986). Uvažuje sa nad postupným prechodom z normálneho urotelu na dyspláziový, neskôr na nádorový. Dyspláziový epitel má cytologické a štruktúrne zmeny, ktoré sa približujú k diagnostickému prahu carcinoma in situ (CIS). Pre problémy s interpretáciou jednotlivých pozorovaní, chýba jednotná definícia dysplázie. Delí sa na ľahkú, strednú a ťažkú. Najčastejšie je to však len stredná a ťažká forma. Poznatky o predchorobí dysplázie mechúra človeka sú nedostatočné (Robertson, 1990). Napriek tomu jestvujú dôkazy o tom, že dysplázia je v istých prípadoch prekursorovou zmenou invazívneho nádoru. Taký názor podporujú nálezy dysplázie v mechúroch ľudí s nádorom z urotelu, aj jej zriedkavá prítomnosť v mechúroch bez neoplázie.

Neopláziou sa nazýva zmnoženie tkaniva, ktorého rast je nadmerný, nekoordinovaný v porovnaní s rastom normálneho tkaniva a neprestáva ani vtedy, keď podnet, ktorý rast vyvoláva už nepôsobí.

Metapláziou označujeme premenu diferencovaného tkaniva jedného bunkového typu na diferencované tkanivo iného bunkového typu. Zahŕňa deštrukciu populácie normálnych buniek a jej nahradenie inou bunkovou populáciou v priebehu hojenia. V istých prípadoch môže predchádzať vzniku nádorov. Podľa miestneho rozsahu sa nádory delia do dvoch veľkých skupín – na neinvazívne a (Ta, T1 a Tis) a na invázne (T2 – T4) a ich podskupiny.

Neinvazívne nádory močového mechúra

Neinvazívne nádory močového mechúra, predstavujú širokú skupinu nádorov s rôznym biologickým potenciálom (Sexton 2010). Zväčša netvorí metastázy. Ich typickým znakom je viac ložisková povaha. Vtedy sa v mechúre nachádza viacero nádorových útvarov. Odhaduje sa, že viacej ako 20 % pacientov s nádorom z urotelu má v čase stanovenia diagnózy početné tumory. Tvoria asi 70–80% všetkých urotelových nádorov močového mechúra. Zaraďujú sa sem nádory Ta a T1 a nádorové zmeny bez exofytového rastu klasifikované ako CIS (*carcinoma in situ*). Podskupiny T1a a T1b informujú o hĺbke invázie nádoru do lamina propria mucosae. Prognóza týchto nádorov závisí od stupňa diferencovania, od početnosti nádorov, od včasných recidív a od prítomnosti CIS (Zieger et al., 2009).

Papilárne nádory. Mikroskopický vzhlľad, veľkosť a lokalizácia karcinómov močového mechúra sú veľmi rôznorodé. Asi 75% karcinómov urotelu postihuje trigonum vesicae.

Urotelový papilóm. Svetová zdravotnícka organizácia definuje papilóm ako malý papilový nádor s jemnou fibrovaskulárnou stopkou, podopierajúcou epitelovú vrstvu prechodných buniek s zvyčajnou hrúbkou a s normálnou cytológiou. Bunky dáždnikovité sú zachované, mitózy sa môžu vyskytnúť ojedinele v stratum basale. Urotelový papilóm má charakter benígnej zmeny bez progresie, s malým sklonom k recidívam. Vidno však vyjasnenie cytoplazmy, privedené dystrofickými zmenami. Určenie presného počtu vrstiev nie je podmienkou diagnózy (Epstein et al 1998). Vyskytuje sa medzi 30. – 60. rokom života.

Invertovaný urotelový papilóm je benígny tumor, charakterizovaný obráteným rastom. Tvoria ho histologicky aj cytologicky normálne urotelové bunky (Sung et al., 2006). Tvorí asi 2% nádorov močového mechúra. Objavuje sa medzi 40 – 60 rokom života, postihuje viac mužov. Najčastejšie rastie z trigona, alebo z hrdla močového mechúra. Tvoria ho polypové útvary s hladkým povrchom. Urotel nepodlieha dysplázii, vrstva dáždnikových buniek je zachovaná. Nádor vzniká z povrazcov aj zo stĺpcov urotelových buniek, ktoré sa šíria do lamina propria mucosae. Rastie teda expanzívne do lamina propria mucosae, ale nepreniká do svaloviny. Typický je pravidelný tvar buniek, malá proliferatívna aktivita a vzácne mitózy. Úplne excidovaný invertovaný papilóm predstavuje veľmi malé riziko recidívy (Witjes et al., 1997).

Papilárna neoplázia urotelu s nízkym malígnym potenciálom. Ide o papilárny nádor z urotelu s nepatrnými zmenami stavby urotelu. Polarita buniek je zachovaná. Urotel je zhrubnutý, s nezväčšenými jadrami buniek. Ojedinelé mitózy vidno v stratum basale. Nevniká do svaloviny a netvorí metastázy.

Neinvazívny papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity. Charakterizujú ho štíhle, vetviace sa papilárne útvary zmeňujú mikroskopické stavby tumoru a jeho cytologie. Nastávajú zmeny polarít buniek, zmeny veľkostí, aj tvaru jadier buniek a ich chromatinu. Jadrá sú jednoznačne zväčšené, rôznej veľkosti a tvaru. Mitózy vidno zvlášť v stratum basale. (Lee et al., 2011). Časté sú recidívy (50-70%).

Neinvazívny papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity je charakterizovaný prítomnosťou stredných až veľkých zmien urotelu. Zmeny histoarchitektúry a spektrum cytologických atypíí sú ľahko hodnotiteľné. Dominujú zmeny jadrovej polarít. Jadrá vykazujú stredný stupeň pleomorfizmu tvaru a veľkostí. Chromatín je nepravidelný. Jádierka prominujú. Atypické a početné mitózy sú vo všetkých vrstvách. K recidívam dochádza v 70 – 75% prípadov.

Nepapilárne nádory. CIS intraurotelová neoplázia vysokého stupňa je nepapilárna, plochá zmena urotelu, charakterizovaná prítomnosťou buniek s veľkými, nepravidelnými hypochrómymi jadrami, ktoré možno klasifikovať ako malígne. Môžu byť v celom zhrubnutom epiteli, či iba v niektorej časti. Histopatologickými znakmi CIS sú aj strata polarít, pleomorfizmus a početné atypické mitózy. Z klinického priebehu vyplýva, že CIS urotel je zmena veľkého stupňa malignity. Ide o prognosticky nepriaznivý variant, predstavujúci východisko vzniku infiltrujúceho nádoru. Riziko progresie so vznikom invázie do svaloviny je veľké hlavne pri plošne rozsiahlejších zmenách. Odhaduje sa na 42 – 83%. Novovzniknutý CIS tvorí menej ako 3% všetkých neoplázií urotelu, ale CIS zistený súčasne, či sekundárne pri iných nádoroch predstavuje 45 – 90%. 7 – 15% sa objavuje ako súčasť neinvazívnych papilárnych nádorov. V 45 – 65% je súčasťou invazívneho nádoru. CIS najčastejšie postihuje mužov, fajčiarov medzi 6 až 7 dekadou. Význam má aj imunohistochemický dôkaz dôkaz p53, ktorý koreluje s progresiou CIS (Horňák et al., 2005).

Invazívne nádory močového mechúra

Tvorí rôzne skupiny. Počínajúc nádormi, ktoré prenikajú do povrchovej, alebo do hlbkej svaloviny až po nádory, ktoré prerastajú celou stenou mechúra a preniknú do okolitých orgánov. Také nádory môžu, ale nemusia súvisieť s účasťou uzlinových, či vzdialených metastáz. Odhaduje sa, že asi 50% pacientov je v čase stanovenia diagnózy postihnutých okultnými metastázami, či už v lymfatických uzlinách, alebo vo vzdialenejších orgánoch. Najvýznamnejším prognostickým faktorom týchto nádorov je ich rozsah, hĺbka invázie a rozsah postihnutia lymfatických uzlín (Babjuk et al. 2002).

Invazívne nádory močového mechúra sa delia do nasledovných skupín:

- T2a – nádor vniká do povrchovej svaloviny močového mechúra;
- T2b – nádor vniká do hlbkej svaloviny močového mechúra;
- T3a – nádor vniká do tkanív okolo močového mechúra v mikroskopických rozmeroch;
- T3b – nádor vniká do okolia močového mechúra v rozmeroch viditeľných voľným okom;
- T4a – nádor preniká do prostaty, do maternice, alebo do vagíny

Použitá literatúra

1. Argyris BF. Comparison of suppressor cells obtained from tumor-allo-sensitized adult and untreated neonatal mice. *Dev Comp Immunol.* 1985;9(1):131-140.
2. Babjuk M, Soukup V, Mareš J, et al. The expression of PAX5, p53 immuno-histochemistry and p53 mutation analysis in superficial bladder carcinoma tissue. Correlation with pathological findings and clinical outcome. *Int Urol Nephrol.* 2002-2003;34(4):495-501.
3. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. WHO. Tumors of the urinary system and male genital organs. Pathology and genetics. Lyon. IARC Press 2004.
4. Epstein JI, Amin M, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(12):1435-1448.
5. Galbavý Š. Patológia nádorov močového mechúra. *Onkológia (Bratisl.).* 2010; 5(5):248-250.
6. Hofstädter F, Delgado R, Jakse G, Judmaier W. Urothelial dysplasia and carcinoma in situ of the bladder. *Cancer.* 1986;57(2):356-361.

7. Horňák M, Bárdoš A, Galbavý S. Urinary bladder carcinoma: the lesson taken from the past and the future prospect. *Bratisl Lek Listy*. 2005;106(11):378.
8. Lee TK, Chau A, Karram S, et al. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential of the urinary bladder: clinicopathologic and outcome analysis from a single academic center. *Hum Pathol*. 2011;42(11):1799-1803.
9. Lopez-Beltran A. Bladder cancer: clinical and pathological profile. *Scand J Urol Nephrol*. 2008;218(Suppl.):95-109.
10. Montironi R., Lopez-Beltran A., Scarpelli M., et al. Morphological classification and definition of benign, preneoplastic and non-invasive neoplastic lesions of the urinary bladder. *Histopathology*. 2008;53(6):621-633.
11. Mostofi FK, Davis CJ Jr, Sesterhenn IA. Progress in pathology of tumors of the urinary tract. *Prog Clin Biol Res*. 1988;277:1-20.
12. Readal N, Epstein JI. Papillary urothelial hyperplasia: relationship to urothelial neoplasms. *Pathology*. 2010;42(4):360-363.
13. Sung MT, Eble JN, Wang M et al. Inverted papilloma of the urinary bladder: a molecular genetic appraisal. *Mod Pathol*. 2006;19(10):1289-1294.
14. Taylor CR. Paraffin section immunocytochemistry for estrogen receptor: the time has come. *Cancer*. 1996;77(12):2419-2422.
15. Witjes JA, van Balken MR, van de Kaa CA. The prognostic value of a primary inverted papilloma of the urinary tract. *J Urol*. 1997;158(4):1500-1505.
16. Zieger K, Wiuf C, Jensen KM, et al. Chromosomal imbalance in the progression of high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *BMC Cancer*. 2009;16(9):149.

Autotransplantácia tuku – využitie v plastickej chirurgii

Martin Boháč^{1,2}, Rastislav Trška¹, Drahomír Palenčár¹, Miloš Križko¹, Juraj Payer¹, Ľuboš Danišovič³, Jozef Fedeleš¹

¹Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Pažitková 4, 821 01 Bratislava; ²Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava;

³Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Abstrakt

Podstatou plastickej chirurgie je hľadanie tvaru a jeho následné kreovanie. Tvar v konečnom dôsledku znamená objem. Pokiaľ je objem nedostatočný, je potrebné hľadať alternatívy na jeho doplnenie. To je možné či už samotným zmnožením materiálu v oblasti defektu, alebo transpozíciou tkaniva z inej donorskej oblasti tela. Pokiaľ ide však o nadbytok objemu, metódou voľby je jeho čiastočné zresekovanie. Odstránenie nadbytočného tkaniva a nahradenie chýbajúceho tkaniva je momentálne frekventnou myšlienkou v plastickej chirurgii a v mnohých ďalších medicínskych odvetviach. Využitie tukového tkaniva, za účelom doplnenia objemu pri deficite mäkkých tkanív, bolo prvýkrát realizované už pred cca 100 rokmi. V roku 1893 Neuber využil túto metódu na korekciu tvárových defektov ako následku infekcie. Po dlhom období charakterizovanom problémami s odberom a životaschopnosťou tukového tkaniva, prišla renesancia v podobe vynájdenia liposukcie. S príchodom tejto techniky sa rozmohlo využívanie tuku za účelom autotransplantácie. Bircoll ako prvý odprezentoval využitie vlastného tuku získaného liposukciou za účelom tvarovania a doplnenia defektov. Cieľom tohto prehľadového článku je zhrnúť súčasné poznatky o autotransplantácii tuku.

Kľúčové slová: tukové tkanivo, autotransplantácia tuku, fat grafting, plastická chirurgia

Úvod

Autotransplantácia tuku je komplexný proces, ktorý možno pripodobniť sadeniu. Pokiaľ dôjde v tomto procese k oslabeniu čo i len jednej časti, výsledok celého procesu bude slabý. Prvým faktorom v tomto procese je semeno, transplantovaný tuk. Mal by byť dostatočnej kvality, so schopnosťou viability. Ďalším faktorom je spôsob sadenia, ktoré by malo byť rovnomerné, difúzne a prinajlepšom atraumatické s prevenciou tvorby zhlukov. Taktiež pôda do ktorej sa sadí je kľúčovým faktorom. Závisí od recipientnej oblasti, jej veľkosti, vaskularizácie a prítomnosti resp. neprítomnosti rastových faktorov. Po zasadení netreba zabudnúť na dostatočnú výživu, t.j. pooperačná starostlivosť, immobilizácia a stimulácia rastových faktorov (Khouri et al., 2012). Bolo opísaných množstvo inovatívnych postupov za účelom zefektívnenia autológneho fat graftingu, ale problémy s nízkym resp. jeho nepredvídateľným prežívaním pre parciálne nekrózy stále pretrvávajú. Medzi ďalšie faktory ovplyvňujúce výsledky transplantácie ADSC patria nasledujúce: nakoľko ide o autotransplantáciu - vek, pohlavie a anamnézu nemožno zmeniť. Avšak odberové miesto, spôsob odberu, manipuláciu - dĺžku a intenzitu centrifugácie resp. premývanie transplantátu možno zmeniť. Ich optimalizácia je neustále diskutovaná. V súčasnosti sa skúma tiež pozitívny vplyv aplikácie podtlaku, PRP a O2.

Zdroj tukového tkaniva za účelom autotransplantácie

Doposiaľ bolo popísaných len niekoľko prác zaoberajúcich sa výťažnosťou jednotlivých oblastí tela na ADSC s použitím rôznych metodológií. Kishi vo svojom súbore 17-ich humánných kadáverov porovnával 10 odberových oblastí. Materiál bol získavaný excidovaním tkaniva s jeho následnou imunohistochemickou analýzou CD34+ a CD31- buniek. Na základe ich výsledkov, štatisticky najbohatšou oblasťou na ADSC bola spodná časť chrbta a podbruško (Kishi et al., 2010).

Jurgens et al. (2008), vo svojom súbore 22 pacientov, realizovali odber tukového tkaniva avšak pomocou tumescenčnej liposukcie z dvoch najčastejších suktovaných oblastí, a to z podbruška a stehien. Následnou izoláciou SVF a analýzou CFU dospeli k záveru, že oblasť podbruška je výrazne bohatšia na ADSC. To skôr tvrdili aj Stocchero et al. (2006) vo svojej štúdií kde porovnávali 9 suktovaných oblastí tela pomocou počtu CFU. Výsledkom bolo, že oblasť trupu je zhruba o tretinu bohatšia na ADSC v porovnaní s dolnou končatinou.

Odber tukového tkaniva za účelom autotransplantácie

Existujú dve základné metódy získavania tukového tkaniva z organizmu a to sú: liposukcia a lipektómia. Liposukcia patrí medzi najčastejšie kozmetické operácie. Pri tumescenčnej forme tohto zákroku sa najprv aplikuje fyziologický roztok s adrenalinom a lokálnym anestetikom do tukového tkaniva. Následne je tukové tkanivo aspirované manuálne alebo pomocou podtlaku zo stroja cez kanyly o priemere od 2-4 mm. Zvyčajný objem tukového tkaniva (od 100 ml do niekoľkých litrov) môže byť bezpečne odobratý bez poškodenia veľkých ciev a nervov idúcich do kože. Liposukčný aspirát má po zosedimentovaní dve zložky, vrchnú časť žltej farby, to je tuková zložka a spodnú ružovej alebo červenej farby tekutinovú časť obsahujúcu infiltračný roztok s krvou a zosedimentovaným tkanivovými kúsokmi.⁵ Bolo však zistené, že tukové tkanivo získané liposukciou obsahuje len cca polovičné množstvo ADSC v porovnaní s intaktným tukovým tkanivom získaným excíziou tzv. lipektómiou. Tiež sa v lipoaspiráte zistila prítomnosť mnohých popraskaných adipocytov, kapilár a veľké množstvo mŕtvych buniek.⁶ Relatívny nedostatok ADSC v aspirovanom tuku môže byť spôsobený tým, že určitá časť ADSC je lokalizovaná v okolí veľkých ciev, vrámci adventície a tým pádom sú ponechané v donorskom tkanive alebo časť buniek je uvoľnená do roztokovej časti aspirátu. Preto aspirované tukové tkanivo je považované za relatívne chudobný zdroj progenitorových buniek v porovnaní s intaktným tkanivom odobratým excíziou (Yoshimura et al., 2006; Matsumoto et al., 2006). Na druhej strane je však liposukcia metódou, pomocou ktorej sme relatívne neinvazívnym spôsobom schopní získať väčšie objemy síce „chudobnejšieho“ ale čo sa týka absolútneho počtu ADSC však bohatšieho materiálu.

Spracovanie tukového tkaniva za účelom autotransplantácie

Momentálny nedostatok štandardizácie v rámci spracovania a transplantácie tuku má za následok prítomnosť veľkého množstva techník s rozdielnymi výsledkami. Medzi relatívne štandardizované a aj najčastejšie používané patrí spracovanie tuku podľa Colemana, Pure graft systém a CAL (cell assisted lipotransfer) metóda.

Colemanova technika je relatívne jednoduchou metódou spracovania odobratého tuku pomocou centrifugácie liposuktátu. Liposukciou odobraté tukové tkanivo sa centrifugáciou 3000 ot./min po dobu 3 minút zahusťuje. Pri tom dôjde k rozseparovaniu materiálu do troch vrstiev. Najvrchnejšia vrstva je tvorená olejom pozostávajúcím z TAG a chylomikrónov uvoľnených z popraskaných buniek. Stredná vrstva obsahuje oddelený a zahustený tuk, ktorý sa ďalej aplikuje. V najspodnejšej vrstve sa nachádza prevažne infiltračná tekutina so sérom a zosedimentovaným peletom pozostávajúcím z krvných elementov. Na základe výskumov bolo dokázané, že pomocou tejto metódy dochádza k minimálnemu poškodeniu buniek potrebných pre následný fatgrafting a odstraňujú sa hlavne nepotrebné elementy (Illouz et al., 2011). Nevýhodou tejto techniky je, že sa pri nej spracováva len relatívne malé množstvo tuku napr. fatgrafting do tváre. Na dosiahnutie väčších objemov potrebných napr. pri rekonštrukciách prsníka je to veľmi zdĺhavá a pracná metóda.

V prípade získania väčších objemov sa používa metóda Puregraft TM 250, ktorá v sebe zahŕňa výhody uzatvoreného systému s premývaním liposuktátu. Podstatou tohto systému je fakt, že tuk odobratý do liposukčnej striekačky sa následne instiluje do špeciálneho vaku cez dvojcestný ventil. Tam sa po zhromaždení dosatočného množstva tuku zrealizuje tzv. washing čiže premytie odsatého materiálu pomocou instilovaného fyziologického roztoku. Prítomné membrány zabezpečia jemné premytie tuku roztokom a oddelenie sa vyčisteného tuku od tumescenčnej tekutiny s detritom, ktorá sa postupne odvádza pomocou odpadových hadičiek. Celý proces je realizovaný bez prístupu vzduchu. Podľa výskumov sa takto z aspirátu odstráni takmer o 50 % viac krvných elementov, v porovnaní s obyčajným odstátím. Totiž prítomnosť veľkého množstva krvných elementov v aspiráte pôsobí po ich rozpade cytotoxicky na okolité bunky (Condé-Green et al., 2010).

Pravdepodobne najefektívnejšou metódou je obohacovanie tuku pomocou ADSC, no v našich podmienkach to nie je v súčasnosti možné realizovať vzhľadom na jej finančnú náročnosť. Ako bolo

už uvedené, tuk získaný aspiráciou obsahuje výrazne nižší pomer progenitorových buniek voči dospelým (Matsumoto et al., 2006). Tento nízky pomer ADSC voči adipocytom môže byť hlavným dôvodom atrofie transplantovného tuku po dlhšom čase. Nakoľko ADSC sú zodpovedné za remodeláciu tukového tkaniva nahradením starých adipocytov novými generáciami (Yoshimura et al., 2009). Na základe týchto faktov bola navrhnutá metóda bunkovo asisotovaného prenosu tuku (cell assisted lipotransfer - CAL), pri ktorej tukové tkanivo chudobné na progenitorové bunky je konvertované na tkanivo obohatené týmito bunkami pomocou izolácie SVF obsahujúcej čerstvé ADSC z nadbytočne aspirovaného tukového tkaniva (Matsumoto et al., 2006). Sú popísané minimálne tri štúdie využívajúce takéto obohacovanie pričom výsledkom je zväčšenie objemu alebo váhy tukového tkaniva, ktoré prežilo transplantáciu (Matsumoto et al., 2006; Masuda et al., 2004; Moseley et al., 2006). Pri metóde CAL - izolované bunky z SVF sú pridané k aspirovanému tuku, ktorý slúži ako živé biologické lešenie pre kmeňové bunky. Možno popísať minimálne štyri dôležité úlohy ADSC pri CAL metóde, ktoré sa čiastočne potvrdili v predklinických štúdiách (Matsumoto et al., 2006; Masuda et al., 2004). Prvá je, že ASCs sú schopné diferenciacie na adipocyty a sú teda schopné regenerovať tukové tkanivo. Druhou úlohou je možnosť diferencovania sa ADSC na VECs a tiež pravdepodobne aj na bunky cievnej steny vyúsťujúce v angiogénu. Treťou úlohou je schopnosť uvoľňovať proangiogénne rastové faktory ako hepatocytový rastový faktor HGF alebo so strómou asociovaný bunkový faktor 1 (SDF-1) ako odpoveď na poškodenie, hypoxiu a iné podmienky, pričom tieto faktory ovplyvňujú okolité prostredie. Štvrtou úlohou je fakt, že ADSC prežívajú ako nediferencované bunky a sú zodpovedné za fyziologickú alebo náhodnú prestavbu tukového tkaniva v budúcnosti. I keď životnosť adipocytov je veľmi dlhá (2-10 rokov), väčšina z nich zvyčajne zomiera skoro po fatgraftingu - tie sú za optimálnych podmienok nahradené novými odvodenými z ADSC (Spalding et al., 2008).

Proces autotransplantácie tukového tkaniva

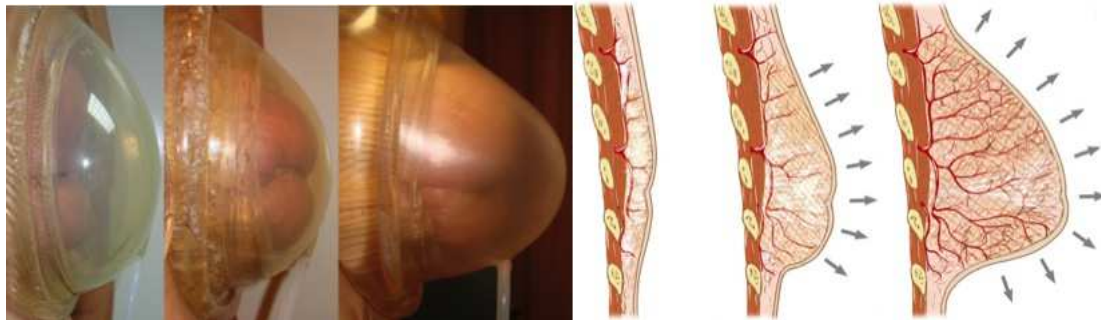
Po vyššie uvedenom spracovaní tuku nasleduje jeho aplikácia (obr. 1). Tá sa realizuje najčastejšie pomocou aplikačných kanyl rôznych veľkostí v závislosti od recipientnej oblasti. Platí však pravidlo, že čím väčší je priemer kanyly, tým väčšia je viabilita adipocytov (Ozsoy et al., 2006). Princípom je aplikácia transplantátu tak, aby sa dosiahla čo najväčšia kontaktná plocha medzi ním a okolitým vaskularizovaným tkanivom. Dosahuje sa to homogénnou retrográdnou aplikáciou tukových čiastočiek do tunela tkaniva vytvoreného kanylou. Následne ďalšia aplikácia prebieha v jeho tesnej blízkosti v rôznych vrstvách tak, aby sa využil čo najviac dostupný vaskularizovaný priestor. Hlavným limitujúcim faktorom aplikovaného objemu je kapacita príjmového miesta. Pri objemovom prekorigovaní dochádza totiž k zvýšeniu intersticiálneho tlaku s hypoperfúziou a následnou ischémiou, ktorá sa stáva hnacím motorom nekrózy transplantátu. Preto, aj v tomto prípade, je menej viac a množstvo aplikovaného tuku závisí najmä od empirie.



Obr. 1. Autotransplantácia tuku (Khouri et al., et al. 2012)

Podporné metódy pri autotransplantácii tuku

Pri augmentácii mäkkých tkanív, najmä v oblasti prsníka, sa spolu s autotransplantáciou tuku aplikuje s výhodou aj podtlakový systém. Prístroj sa predáva pod označením BRAVA (obr. 2) a v máji 2012 boli odpublikované Khourim et al. (2012). šesť ročné výsledky u 81 pacientiek, ktoré podstúpili takto kombinovanú liečbu. Peroperačné použitie tohoto prístroja, ktorý spôsobí predexpandovanie tkaniva a chronický edém s vaskularizáciou, umožňuje aplikáciu väčšieho množstva transplantovaného tuku v jednom sedení s vyššou pravdepodobnosťou jeho prežitia. Pokiaľ sa aplikuje príliš veľký objem do oblastí, kde nie je dostatok kože, dochádza následným tlakom k menšiemu preživanju tuku a k jeho nekróze. Tá môže mať za následok tvorbu olejových cýst alebo kalcifikácií, ktoré môžu interferovať pri onko-radiologickom follow-up pacientky. Percento prežitia tuku je pri tejto metóde je od 80% do 90%.



Obr. 2. Expanzia tkaniva pomocou BRAVA systému (Khouri et al., 2012)

Ďalším prostriedkom, ktorý by mohol pozitívne ovplyvniť autotransplantáciu tuku je prídanie PRP (platelet rich plasma) do transplantátu. Ide o 3 až 5 násobne vyššiu koncentráciu autológnych krvných doštičiek, oproti krvným koncentráciám, v malom množstve plazmy. Jej získanie je relatívne jednoduché a to pomocou prefabrikovaných kitov a následnej centrifugácie. Hlavným je obsah siedmich rastových faktorov, ktoré sú schopné sa uvoľniť pri degranulácii doštičiek a začať proces hojenia. Medzi ne patria tri druhy PDGF, dva izoméry TGF- β , VEGF a EGF. Tieto sú schopné stimulovať proliferáciu buniek, diferenciáciu buniek s cieľom regenerácie tkaniva a neoangiogenézy. Ďalšími látkami obsiahnutými v PRP sú fibronektín, vitronektín, fibrinogén, osteokalcín a osteonektín, ktoré sú schopné slúžiť ako bunkové adhezívne molekuly a matrice pre bunkové procesy. V súčasnosti sa však ešte dostatočne nepotvrdil klinický efekt takejto liečby (Salgarello et al. 2011).

Potransplantačná strata objemu tuku môže byť spôsobená tiež hypoxickou periódou trvajúcou až po prihojenie transplantátu. Hyperbarická kyslíková terapia zvyšuje tkanivový tlak kyslíka, podporuje hojenie rán a preto jej okamžitá aplikácia môže napomôcť ku zníženiu resorbcie tuku po jeho transplantácii. Zvýšenie angiogenézy a vaskulogenézy má za následok zvýšená hladina VEGF. Na potvrdenie tejto teórie bude však potrebný ďalší klinický výskum.

Záver

Zväčšovanie objemu mäkkých tkanív pri vrodených, získaných defektoch alebo za kozmetickým účelom, je možné realizovať pomocou autológneho tkaniva alebo pomocou cudzorodých materiálov. Prenos autológneho tuku bez cievného zásobenia tzv. fat grafting je sľubnou metódou na augmentáciu mäkkých tkanív. Táto metóda je výhodná v tom, že pri nej nedochádza ku komplikáciám spojeným s prítomnosťou cudzorodého materiálu a ďalšej tvorbe jaziev.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom MZ SR č. 2007/36-UK-07 a grantom VEGA č. 1/0706/11

Použitá literatúra

1. Condé-Green A, Gontijo de Amorim NF, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: A comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63(8):1375-81.

2. Illouz YG, Sterodimas A. Adipose stem cells and regenerative medicine. Springer, Berlin. 2011, 278s.
3. Jurgens WJFM, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 2008;332(3):415-26.
4. Khouri KR, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, et al. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: Result of a 6-year, 81 patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(5):1173-87.
5. Kishi K, Nobuaki I, Hirotooshi O, et al. Distribution of adipose-derived stem cells in adipose tissues from human cadavers. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63(10):1717-22.
6. Masuda T, Furue M, Matsuda T. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Eng.* 2004;10(11-12):1672-83.
7. Matsumoto D, Sato K, Gonda K et al. Cell assisted lipotransfer: supportive use of human adipose derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-82.
8. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3 Suppl):121S-128S.
9. Ozsoy Z, Kul Z, Bilir A. The role of cannula diameter in improved adipocyte viability: a quantitative analysis. *Aesthet Surg J.* 2006;26(3):287-9.
10. Salgarello M, Visconti G, Rusciani A. Comparative Clinical Study and Current State of the Art. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(6):2176-85.
11. Spalding KL, Arner E, Westermarck PO et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008;453(7196):783-7.
12. Stocchero IN, Stocchero GF, Stocchero G et al. Liposuctionable fat: a hypothetic model. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(1):337-8.
13. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derivated from fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64-76.
14. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose derived stem progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med.* 2009;4(2):265-73.

Modified Collagen/Hyaluronan/ Beta-Glucan Scaffold for Tissue Engineering Application

Ľuboš Danišovič¹, Zuzana Varchulová Nováková¹, Martin Boháč^{2,3},
Lenka Oravcová², Ján Vojtaššák¹

¹*Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava;* ²*Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava;* ³*Department of plastic, reconstructive and esthetic surgery, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Pažítková 4, 821 01 Bratislava*

Abstract

Cells and scaffolds belong to main components of tissue engineering. In this study we have performed *in vitro* cytotoxicity and biocompatibility testing of modified collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffold. We used direct contact assay as well as MTT test. Human adipose tissue-derived stem cells were used as biological model. According to obtained results, we can summarize, that modified collagen/hyaluronan/ beta-glucan scaffold is non-toxic and biocompatible, and after further testing it should be used as carrier of various types of cells.

Key words: Biocompatibility, cytotoxicity, somatic stem cells, scaffold.

Introduction

Tissue engineering is relatively new multidisciplinary field aimed at producing tissue or organ substitutes by cultivation of cells on the various types of scaffolds. These scaffolds mimics native extracellular matrix (ECM) and provide not only mechanical support for cultured cells but also effect their attachment, proliferation and differentiation, both *in vitro* and *in vivo* [1], [2].

Biodegradable polymers of natural or synthetic origin seem to be appropriate materials for preparation of ECM substitutes, because their interactions with cultured cells lead in to incremental biological degradation; and after their application there is no need to undergo other surgery to remove foreign material from patient's body [3].

ECM substitutes must possess specific biological and mechanical properties. They have to be non-toxic and biocompatible with cultured cells [4]. Structure of surface, pore size, porosity and structural strength are also important characteristics, which may influence behavior of cells [5]. Another important advantage is fact that synthetic ECM allows cells to grow in three-dimensional structure, which can promote new tissue formation [6].

Collagen and hyaluronic acid belong to natural biodegradable polymers, which are found in human body in large volumes. Their chemical and mechanical characteristics offer wide possibility to control and program their biodegradability [7]. The problem of collagen antigenicity can be overlapped by removal of the telopeptides from its molecules with specific enzymes or by chemical cross-linking [8], [9]. Beta-glucans are polysaccharides, which are abundant in plants. Moreover, they occur in the cell wall of yeasts, certain fungi, and bacteria. Yeast and medicinal mushroom derived beta-glucans are notable for their ability to modulate the immune system [10].

The main goal of present paper was preparation of collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffold and its testing for cytotoxicity and biocompatibility by using somatic stem cells derived from adipose tissue.

Material and methods

Scaffold Preparation

Hypro-Sorb (Hypro Otrokovice, Czech Republic) used as a source of collagen type I was cut into small pieces. Collagen (1.5 g) was mixed with 50 ml of distilled water. After that, 10 ml of 0.05 mol/l acetic acid was added and mixed together. Then, 10 ml of distilled water was added to sodium hyaluronate (0.12 g). After 3 h, swelled sodium hyaluronate was carefully mixed with collagen. In the next step, obtained mixture was mixed with 2.3 ml of 1.3% dialdehyde starch. Finally, whole mixture was supplemented with beta-glucan (0.5 g) and was transferred to molds following by air drying at 37°C.

Morphology of Scaffold

The morphology of collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffold was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Before testing, scaffolds were gold-plated using a JFC 1100 ion sputter and were analyzed by JSM 840 JEOL (JEOL, Japan).

Isolation and Cell Culture

Human adipose tissue-derived stem cells (ATSCs) were obtained from lipoaspirates of healthy female individual undergoing elective suction-assisted lipoaspiration always following patient's written and verbal informed consent in compliance with the Helsinki Declaration. The obtained samples were collected in sterile phosphate buffered saline (PBS; Oxoid, GB) with 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin and 250 ng/ml amphotericin B (PAA, Austria) and stored at laboratory temperature overnight.

ATSCs were isolated according to method published by Zuk et al. (2002) with some modifications [12]. Briefly, lipoaspirates were carefully washed with sterile PBS containing 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin and 250 ng/ml amphotericin B to remove contaminating erythrocytes. Adipose tissue fragments were treated with 0.1% collagenase type II (PAA, Austria) at 37°C for 1 h, followed by centrifugation. Supernatant containing fat and floating mature adipocytes was aspirated and cell pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM; PAA, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Austria) and centrifuged. Final pellet was resuspended in complete culture medium (D-MEM + 10% FBS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 250 ng/ml amphotericin B). Cells were counted and tested for viability by using trypan blue exclusion test and plated at density of 1×10^6 cells/ml into 100 mm Petri dishes (TPP, Switzerland). Cultures were maintained in CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂ in the air). After 24 h, non-adherent cells were removed by aspiration medium. Culture medium was refreshed every 48 h. When the cells reached confluence they were detached with 0.25% trypsin (PAA, Austria), and re-plated at a dilution of 1:3. ATSCs were cultured up to the third passage under same condition.

Cytotoxicity and Biocompatibility Testing

The direct contact assay to evaluate biocompatibility and cytotoxicity was performed according to International Standardization Organization standard 10993-5 [14] in triplicate. ATSCs in complete culture medium (50 000 cells / ml) were seeded into 6-well plates with the collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffolds. Their effect on the proliferation and morphology was evaluated by invert microscope Zeiss Axiovert 100 (Carl Zeiss, Germany).

Cytotoxicity of prepared materials was estimated according to proliferation tested by MTT-test [14]. The tested scaffold was cut into small pieces and was eluted in complete culture medium for 24 h. Obtained eluate was filtered through the 0,22 µm filter. Adipose derived stem cells were seeded into a the 96-well microplate in amount of 5000 cells and cultured overnight. On the second day, eluates were added. Complete culture medium was used as negative control. After 24, 48 and 72 h, the eluates and control culture medium was aspirated and CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega, USA) was added followed by 3 hours incubation. The cell proliferation was evaluated on ELISA microreader BioTek EL800 (BioTek, USA) by measuring the absorbance at 490 nm wavelength.

Immunohistochemical Evaluation

Scaffold with adipose tissue derived stem cells appointed for immunohistochemical evaluation were carefully rinsed with phosphate buffered saline and fixed in neutral formalin (Sigma-Aldrich, Germany) and embedded into paraffin. After that they were sectioned into 2 μm thick slices and stained by conventional staining methods. Immunohistochemical staining was performed using the biotin-avidin technique with primary mouse antibodies against vimentin (DAKO, Glostrup, Denmark). Visualization of the cells was developed with DAKO LSAB/HRP kit and DAKO En Vision/HRP kit (DAKO, Glostrup, Denmark). Observations were performed on the light microscope Nikon Eclipse 80i and camera Nikon DS-Fi1 (Nikon, Japan).

Results

Prepared collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffolds had the character of the membrane with a thickness of 2 mm. The SEM observation is shown in Fig. 1. The scaffold had bubble-like structure; cavities size ranged from 50 to 100 μm (Fig. 1a) and the surface was rough (Fig. 1b) to increase attachment of cultured cells.

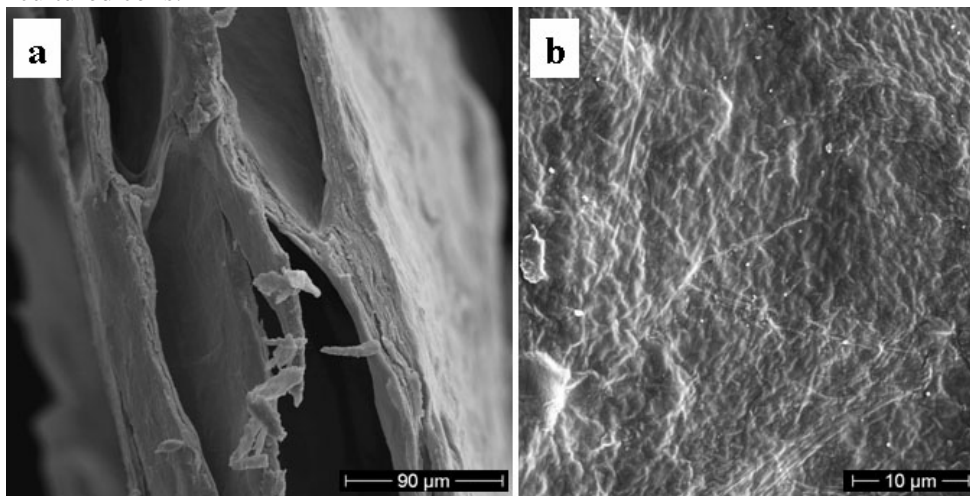


Fig. 1. SEM micrographs of collagen/hyaluron/beta-glucan scaffold.

Fig. 2 shows the proliferation of ATSCs in the presence of collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffolds. Growth inhibition as well as changes in morphology was not recorded. Fig. 3 shows results from MTT tests. Proliferation of ATSCs was not inhibited and was comparable with negative control. Obtained results indicated that collagen/hyaluronan/ beta-glucan scaffold is non-toxic and biocompatible with cultured cells.

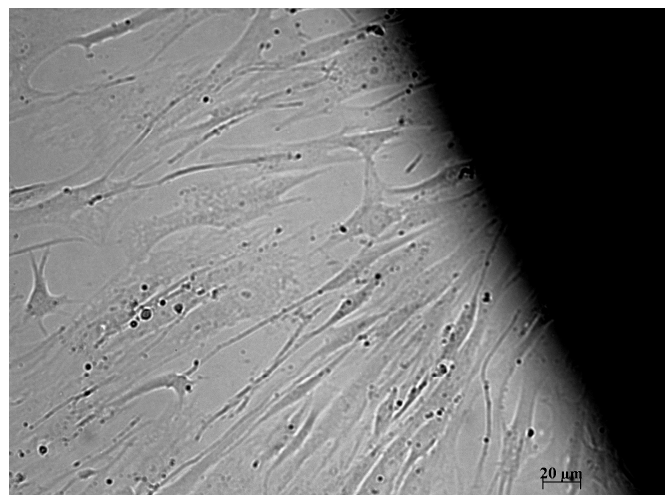


Fig. 2. Proliferation and morphology of ATSCs in the presence of collagen/hyaluron/beta-glucan scaffold.

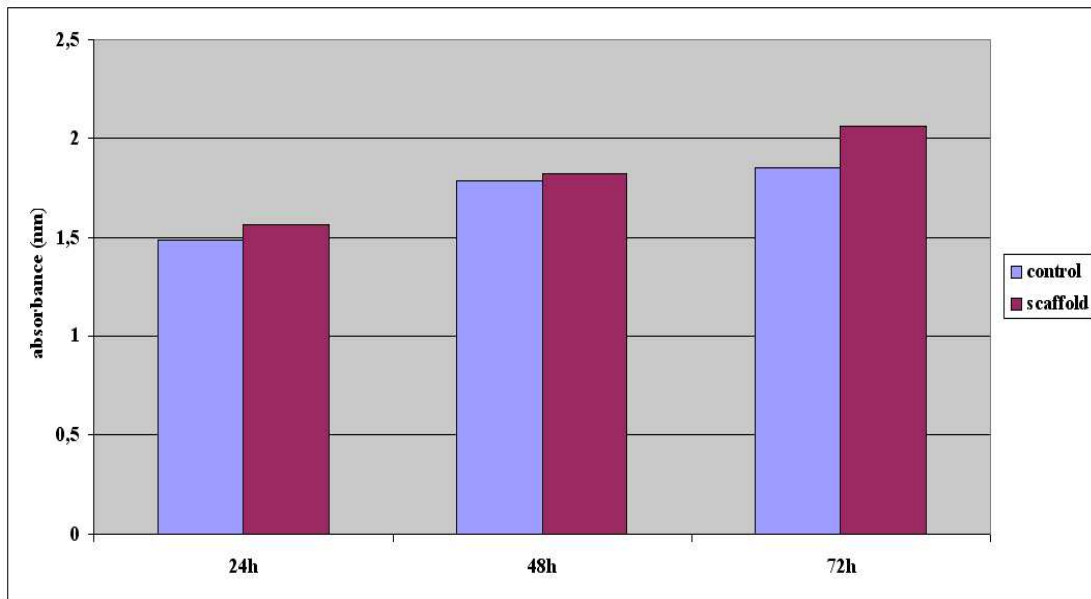


Fig. 3. Proliferation and morphology of ATSCs in the presence of collagen/hyaluron/beta-glucan scaffold.

Fig. 4 presents proliferation of ATSCs attached on the surface of collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffold.

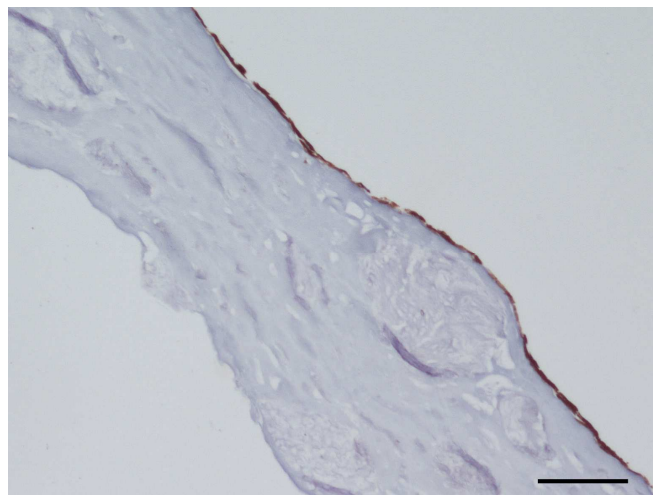


Fig. 4. Proliferation of ATSCs on the collagen/hyaluron/beta-glucan scaffold.

Discussion

In this study, novel scaffold composed of collagen type I, hyaluronan and beta-glucan was fabricated and characterized. The main objective of this study was to assess cytotoxicity and biocompatibility by using somatic stem cells derived from adipose tissue as in pertains to the potential usage in the tissue engineering and regenerative medicine.

Biodegradable polymers of natural origin, based on collagen and hyaluronic acid belong to widely used. They should be prepared by various techniques, including slow drying at laboratory temperature or freeze-lyophilization, that lead in the production of pores [11]. Scaffold porosity, pore size and their distribution have important effect on the cell adhesion and proliferation as well as differentiation [12]. It was also shown that pore size of 100 - 150 μm is appropriate for uniform cell penetration and migration. Moreover, it positively influences the production of ECM [13].

The tested collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffold had bubble-like structure with rough surface to increase attachment of cells. Similar structural characteristics were observed by other

authors in various composite scaffold based on the collagen and hyaluronic acid but also collagen and chitosan [14]-[16].

The crucial part of characterization of scaffolds appointed for utilization tissue engineering and regenerative medicine is their cytotoxicity and biocompatibility testing. Main components, collagen, hyaluronan and beta-glucan are non-toxic, but the cytotoxicity of modified biomaterial depends on residual cross-linking agents or specific processing method [17]. For this reason, we used direct contact assay and MTT test. As a biological model, we chose somatic stem cells derived from adipose tissue. Obtained results indicate that collagen/hyaluronan/ beta-glucan scaffold is non-toxic and fully biocompatible with ATSCs. Moreover, higher levels of MTT reduction after 48 and 72 h, suggesting that ATSCs not only adhered to scaffold but start to proliferate. Similar results were obtained by other authors [14], [18]. This finding supports their usage as a three-dimensional carrier of various types of cultured stem cells, because the three-dimensionality is essential for fabrication of artificial tissues, including skin, cartilage, bone, etc. [19]-[21].

Biocompatibility and non-toxicity was also proved by immunohistochemical analysis. Seeded ATSCs, attached on surface of scaffold and grow in confluent layer, which is again in accordance with the above literature.

Conclusion

Based on the obtained results, we can summarize, that modified collagen/hyaluronan/beta-glucan scaffold is non-toxic and biocompatible with adipose tissue-derived stem cells, and after performing further tests it should be used as carrier of various types of cells in the tissue engineering as well as in the regenerative and substitutive medicine.

Acknowledgement

This work was supported by Ministry of Health of the Slovak Republic under the project No. 2007/36-UK-07 and grant VEGA No. 1/0706/11.

References

1. C. Alberti, "Tissue engineering: technological advances to improve its applications in reconstructive surgery," *G. Chir.*, vol. 33, pp. 435-443, Nov. 2012.
2. Z. Ge, C. Li, B. C. Heng, G. Cao, and Z. Yang, "Functional biomaterials for cartilage regeneration," *J. Biomed. Mater. Res. A.*, vol. 100, pp. 2526-2536, Sep. 2012.
3. M. Vert, "Degradable polymers in medicine: updating strategies and terminology," *Int. J. Artif. Organs.*, vol. 34, pp. 76-83, Feb. 2011.
4. P. M. Taylor, "Biological matrices and bionanotechnology," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 362, pp. 1313-1320, Aug. 2007.
5. E. J. Chung, M. Sugimoto, J. L. Koh, and G. A. Ameer, "Low-pressure foaming: a novel method for the fabrication of porous scaffolds for tissue engineering," *Tissue Eng. Part C. Methods.*, vol. 18, pp. 113-121, Feb. 2012.
6. J. E. Davies, R. Matta, V. C. Mendes, and P. S. Perri de Carvalho, "Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery," *Organogenesis.*, vol. 6, pp. 161-166, Jul.-Sep. 2010.
7. M. Kremer, E. Lang, and A. C. Berger, "Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix(Integra artificial skin)," *Br. J. Plast. Surg.*, vol. 53, pp. 459-465, Sep. 2000.
8. M. Ishihara, P. N. Shaklee, Z. Yang, W. Liang, Z. Wei, R. J. Stack, and K. Holme, "Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor," *Glycobiology.*, vol. 4, pp. 451-458, Aug. 1994.
9. A. E. Eriksson, L. S. Cousens, L. H. Weaver, and B. W. Matthews, "Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 88, pp. 3441-3445, Apr. 1991.
10. V. E. Ooi, and F. Liu, "Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes," *Curr. Med. Chem.*, vol. 7, pp. 9782-9787, Jun. 1990.

11. R. C. Thomson, A. K. Shung, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, "Polymer scaffold processing," in *Principles of tissue engineering*, R. P. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Eds. San Diego: Academic Press, 2000, pp. 251-262.
12. J. Y. Kang, C. W. Chung, J. H. Sung, B. S. Park, J. Y. Choi, S. J. Lee, B. C. Choi, C. K. Shim, S. J. Chung, and D. D. Kim, "Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes," *Int. J. Pharm.*, vol. 369, pp. 114-120, Mar. 2009.
13. L. Ma, C. Gao C, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, and C. Han, "Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4833-4841, Nov. 2003.
14. M. Araña, E. Peña, G. Abizanda, M. Cilla, I. Ochoa, J. J. Gavira, G. Espinosa, M. Doblaré, B. Pelacho, and F. Prosper, "Preparation and characterization of collagen-based ADSC-carrier sheets for cardiovascular application," *Acta Biomater.* (in press)
15. Y. C. Lin, F. J. Tan, K. G. Marra, S. S. Jan, and D. C. Liu, "Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications," *Acta Biomater.*, vol. 5, pp. 2591-2600, Sep. 2009.
16. J. Yan, X. Li, L. Liu, F. Wang, T. W. Zhu, and Q. Zhang, "Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering," *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, vol. 34, pp. 27-39, Nov. 2006.
17. S. Ben Slimane, R. Guidoin, D. Marceau, Y. Merhi, M. W. King, and M. F. Sigot-Luizard, "Characteristics of polyester arterial grafts coated with albumin: the role and importance of the cross-linking chemicals," *Eur. Surg. Res.*, vol. 20, pp. 18-289, Jan. 1988.
18. H. T. Cheng, E. Y. Chuang, H. Ma, C. H. Tsai, and C. K. Perng, "Fabrication of quantum dot-conjugated collagen/hyaluronic acid porous scaffold," *Ann. Plast. Surg.*, vol. 69, pp. 663-667, Dec. 2012.
19. S. Tang, S. M. Vickers, H. P. Hsu, and M. Spector, "Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid-collagen composite scaffolds," *J Biomed Mater Res A.*, vol. 82, pp. 323-335, Aug. 2007.
20. D. Harvanova, J. Rosocha, D. Bakos, R. Svihla, G. Vasko, S. Hornak, V. Ledecy, S. Gromosova, P. Cibur, and R. Rasi., "Collagen/hyaluronan membrane as a scaffold for chondrocytes cultivation," *Biologia.*, vol. 64, pp. 1032-1038, Oct. 2009.
21. M. Chen, D. Q. Le, A. Baatrup, J. V. Nygaard, S. Hein, L. Bjerre, M. Kassem, X. Zou, and C. Bünger, "Self-assembled composite matrix in a hierarchical 3-D scaffold for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, pp. 2244-2255, May 2011.

Súčasn  možnosti farmakoterapie p ľucnej arteriálnej hypertenzie

Gertruda  apov ¹, Martina Havl kov ¹, Viera Kristov ¹, Alexander Kurtansk ²

¹ stav farmakol gie a klinickej farmakologie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského,  pit lska 24, 81372 Bratislava; ²Fyziologick   stav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského,  pit lska 24, 81372 Bratislava, Slovensk  republika

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic, rare, devastating and progressive disease, characterized by pathological progressive obliteration of the pulmonary microvasculature resulting in elevated pulmonary vascular resistance (PVR), right ventricular dysfunction and premature death. Currently there is no cure for PAH, but three classes of drugs targeted on three pathways have been developed and approved for the treatment of PAH – prostanoids, phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5) and endothelin receptor antagonists (ERAs). These drugs alleviate symptoms and improve exercise capacity. Despite of these advances, PAH is still incurable disease. The long-term data about efficacy and safety of combination therapy in PAH requires further study.

Key words: Pulmonary arterial hypertension (PAH), prostanoids, phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5), endothelin receptor antagonists (ERAs)

 vod

P ľucna arteriálna hypertenzia (PAH) je chronick , progresivne, potenciálne fatálne ochorenie p ľucneho obehu, charakterizovan  patologickým zvy šen m p ľucnej cievej rezistencie (PVR), progresivn m zlyhávaním pravého srdca (Gali  a kol., 2009). Z pohľadu hemodynamickej definicie je charakterizovan  ako progredujúca prekapilárna p ľucna hypertenzia. Je to tak  forma p ľucnej hypertenzie, kedy je zvy šen  stredn  tlak v arteria pulmonalis (≥ 25 mm Hg), súčasne je normálny tlak v zakľn n  (PCWP ≤ 15 mm Hg) a p ľucna cieva rezistencia (PVR) je nad 3 Woodove jednotky (W.j.) (Jansa et al., 2011).

PAH je vzácne ochorenie, minimálna prevalencia dospelaj európskej populácie je 15-50 prípadov na milion obyvateľov (Peakock et al., 2007). Predstavuje heterogénnu skupinu chorôb. Patrí sem idiopatick  a hereditárna PAH, ktor  tvoria asi 43% populácie s PAH. Vyskyt PAH spojen  s postihnut m spojivového tkaniva predstavuje 15-20% prípadov dospelaj populácie. Najčastejšou príčinou pri systémovom ochorení je syst mov  sklerodermia a syst mov  lupus erytematodes. Pomerne vzácne sa vyskytuje PAH pri reumatoidnej artritide a pri dermatomyozitide. Okrem uvedených ochorení do skupiny PAH patrí i vrodenn  skratov  srdcov  vada (Eisenmengerov synd m), portálna hypertenzia, abúzus drog (kokaín, amfetamín), anorekt k a iných toxických látok, HIV infekcia (Tab. 1). PAH spojen  s HIV infekciou sa vyskytuje v 0,5% infikovaných chorých. Prognóza PAH je nepriazniv . Medián prežitia neliečenej PAH je 2,8 roka. Medián prežitia neliečenej PAH pri systémovej sklerodermii je 12 mesiacov. Rovnako nepriazniv  prognózu m  i PAH spojen  s HIV infekciou. Prognóza PAH spojenej s vrodennou srdečnou vadou je výrazne priaznivejšia (Jansa et al., 2011).

Príčinou PAH je prestavba p ľucnych ciev. Na zvy šovan  PVR ako  stredn ho faktora sa zúčastňuje viacero mechanizmov ako vazokonstrikcia, zápal, trombóza a najmä obštruk n  remodelácia p ľucnych artérií, pod ktor  zahŕňame procesy hypertrofie, proliferácie a fibrózy. Za kľ ov  bod kaskády vedúcej k remodelácii sa povaŕuje endotelov  dysfunkcia, ktor  vedie k poruche rovnováhy humorálnych regulačných faktorov v prospech vazokonstrik ne, prokoagula ne, mitog nne pôsobiacich mediátorov ako sú endotelín, sérotonín, trombox n. Expresia týchto látok je nadmern , na druhej strane produkcia látok priaznivo pôsobiacich na endotel ako prostacykl n, bradykinín a predovšetkým NO, je chronicky zn izen . Podkladom všetkých typov PAH je teda dysfunkcia endotelu p ľucnych ciev u geneticky disponovan ho jedinca. Dysfunkcia endotelu je navoden  vyvolávajúcim

faktom, ktorým môže byť vaskulitída, infekcia (HIV) alebo abúzus toxických látok a niektorých liekov (anorektiká). Stanovenie diagnózy PAH ako aj podanie adekvátnej liečby patrí výhradne do špecializovaných centier.

Tab.1. Klinická klasifikácia PAH (Galié et al., 2009)

1. Pľúcna arteriálna hypertenzia (PAH)
1.1 Idiopatická
1.2 Hereditárna - pri mutácii génu na BMPR2 receptore (bone morphogenetic protein receptor type II) - pri mutácii génov na ALK1 receptore (A receptor type - II like 1) alebo endoglin (ENG) s hereditárnou hemoragickou hemangiopatiou alebo bez nej - mutácie na neznámom géne
1.3 Indukovaná liekmi alebo toxínmi
1.4 Asociovaná s inými stavmi (APAH) <ul style="list-style-type: none">1.4.1 ochorenie spojivového tkaniva1.4.2 infekcia HIV1.4.3 portálna hypertenzia1.4.4 vrodené chyby srdca1.4.5 schistosomiáza1.4.6 chronická hemolytická anémia
1.5 Perzistujúca pľúcna hypertenzia novorodencov

Liečba

Cieľom liečby PAH je zasiahnúť do troch základných patofyziologických mechanizmov uplatňujúcich sa pri vzniku a rozvoji pľúcnej arteriálnej hypertenzie (vazokonstrikcia, proliferácia, prokoagulačný stav) a dosiahnutia funkčnej triedy NYHA II (Jansa et al., 2011)

Okrem režimových opatrení rozdeľujeme terapeutické možnosti PAH na liečbu konvenčnú (antikoagulanciá, diuretiká, kardiotoniká, oxygenoterapia), špecifickú (vazodilatačná liečba blokátormi kalciových kanálov, prostanoidy, antagonisty endotelínových receptorov a inhibítory fosfodiesterázy typu 5) (Galié et al., 2009), kombinovanú liečbu, ktorej koncept vychádza z patofyziologickej predstavy viacerých dráh sprostredkujúcich patologické zmeny v pľúcnych cievach (Luknár et al., 2010) a liečbu nefarmakologickú (transplantácia pľúc).

Režimové opatrenia

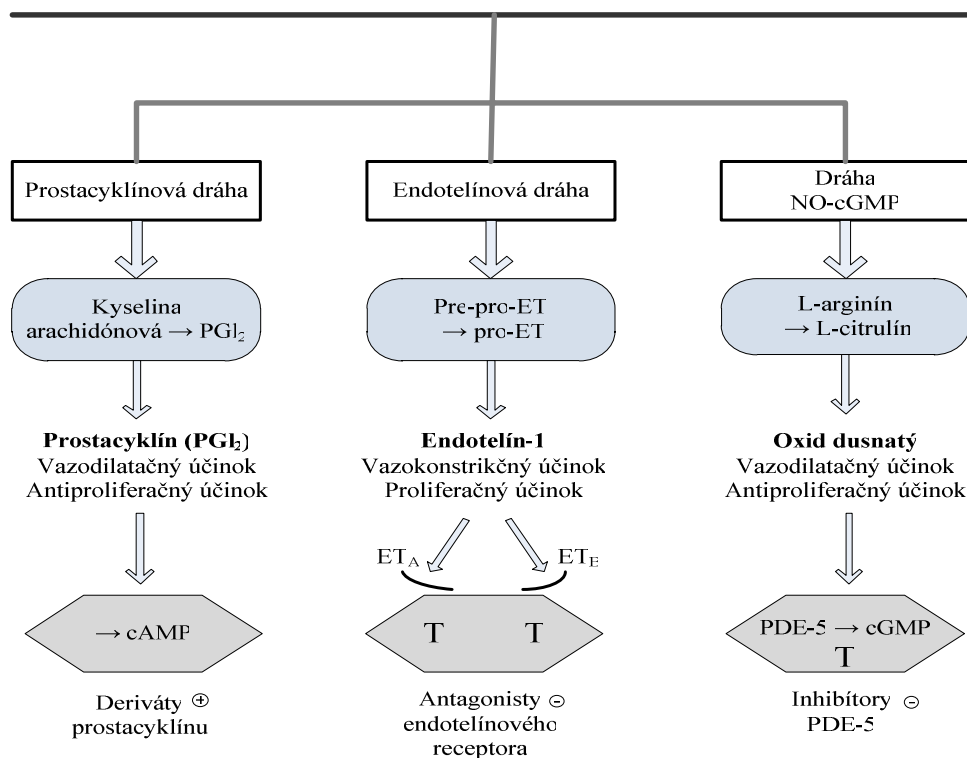
Fyzická záťaž je u chorých s PAH vhodná podľa individuálnej tolerancie. Nie je vhodný pobyt vo vysokých nadmorských výškach (nad 2000 m n. m.). Pri ceste lietadlom je nevyhnutná inhalácia kyslíka. Doporučuje sa očkovanie proti chrípke a pneumokokovej infekcii. Tehotenstvo je u PAH kontraindikované, pretože materská mortalita počas gravidity a pôrodu dosahuje 30 – 50 %. Chirurgické výkony s celkovou anestéziou trvajúce dlhšie než tri hodiny sú rizikové. Pri chirurgických výkonoch uprednostňujeme epidurálnu anestéziu (Jansa et al., 2011; Galié et al., 2009).

Konvenčná podporná farmakoterapia

Diuretiká zlepšujú symptómy v súvislosti s retenciou tekutín pri srdcovom zlyhaní. Chronická antikoagulačná liečba warfarínom je indikovaná predovšetkým u idiopatickej, hereditárnej PAH a u PAH asociovej s abúsom anorektík, ako i pri intravenózne liečbe prostanoidmi s cieľom znížiť riziko trombózy katétru. Kardiotoniká - digoxín nie je v súčasnej dobe bežnou súčasťou terapie pľúcnej arteriálnej hypertenzie (Jansa et al., 2011).

Špecifická farmakoterapia

Moduluje abnormality prostacyklínovej, endotelínovej a NO cesty v patogenéze pľúcnej arteriálnej hypertenzie, a tým brzdí vlastné patogénne mechanizmy choroby (vazokonstrikciu, obštrukčnú remodeláciu) (Jansa et al., 2011) (Obr. 1).



Obr. 1. Ciele farmakoterapie (upravené podľa Callaghan et al., 2011)

Blokátory kalciových kanálov

Špecificky blokujú prienik iónov Ca²⁺ napätovo riadenými kalciovými L – kanálmi do hladkosvalovej bunky arteriol, čím navodia vazodilatácia v arteriálnom riečisku. Majú priaznivý účinok na pľúcnu hemodynamiku a na zníženie hypertenzie v arteria pulmonalis. Na druhej strane však súčasne vedú k zvýšenému prekrveniu hypoventilovaných alveol a k zhoršeniu ventilačno / perfúzných pomerov a k poklesu PaO₂. Liečba vysokými dávkami blokátorov kalciových kanálov (nifedipín, diltiazem, amlodipín) je indikovaná len v prípade pozitívneho testu pľúcnej vazoreaktivity, čo je pokles stredného tlaku v a. pulmonalis aspoň o 10 mm Hg vstupných hodnôt bez poklesu srdcového výdaja. Dlhodobá odpoveď na vazodilatačnú liečbu blokátormi kalciových kanálov, ktorá je charakteristická zlepšením symptómov do štádia NYHA I a II, bola dosiahnutá len u 50% akútnych respondérov. Liečba blokátormi kalciových kanálov nesmie byť náhle prerušená pre riziko „rebound“ fenoménu (Jansa et al., 2011).

Prostanoidy

Vznikajú z kyseliny arachidónovej pôsobením kľúčových enzýmov cyklooxygenázy (COX) a prostacyklínsyntetázy.

Ich účinok v pľúcnej cirkulácii je sprostredkovaný špecifickými receptormi na povrchu bunky. Tie boli objavené na povrchu trombocytov a na bunkách endotelu. Všetky prostanoidné receptory sú spojené s efektorovým mechanizmom G – regulačných proteínov, preto sa po naviazaní prostanoidu na receptor spustí aktivácia G – proteínu a zvýši sa intracelulárna koncentrácia cAMP, ktorá následne aktivuje proteínkinázu A. To zapríčini inhibíciu agregácie trombocytov, relaxáciu hladkého svalstva a vazodilatáciu v pľúcnych artériách.

Prostacyklín (prostaglandín I₂) inhibuje agregáciu trombocytov a prispieva k antitrombotickým vlastnostiam nepoškodenej steny ciev. Je silným vazodilatátorom, spôsobuje relaxáciu hladkého svalstva ciev a jeho i.v. podanie vedie k hypotenzii. Znižuje pľúcnu vaskulárnu rezistenciu. Jeho nevýhodou je však krátky biologický polčas, a preto sa pre klinické použitie hľadali jeho chemicky stabilnejšie formy ako je napríklad epoprostenol.

Epoprostenol je syntetický analóg prostacyklínu. Vzhľadom k jeho krátkemu biologickému polčasu (3 – 5 min) je nutné podávanie formou dlhodobej kontinuálnej infúzie do centrálného žilového

katétra. Roztok epoprostenolu je termolabilný, preto je nutné ho počas aplikácie chladit'. Zároveň sa musí chrániť pred svetlom, skladovať pri teplote 2 – 8 °C, pri izbovej teplote zostáva stabilný asi 8 hodín. Epoprostenol zlepšuje symptómy, telesnú výkonnosť, hemodynamické parametre a prognózu pacientov s IPAH a FPAH, čo bolo dokázané v niekoľkých randomizovaných štúdiách (Galiè et al., 2009). Liečba je zahajovaná dávkou 2 – 4 ng/kg/min s postupným zvyšovaním dávky liečiva v závislosti od tolerancie a nežiaducich účinkov ako flush, bolesti hlavy, bolesti čelustí, bolesti na hrudníku, nauzea, hnačka, hypotenzia, tachykardia. Hlavným rizikom liečby sú lokálne a systémové infekčné komplikácie v dôsledku permanentného centrálného žilového katétra, obštrukcia katétra, riziko poruchy infúznej pumpy s vyvolaním „rebound“ fenoménu pri náhlom prerušení liečby. Intravenózne epoprostenol je liekom voľby u pacientov v klinickom štádiu NYHA III a IV (Galiè et al., 2009).

Treprostinil je tricyklický benzidínový analóg epoprostenolu, je termostabilný. U pacientov s PAH zlepšuje hemodynamiku, telesnú výkonnosť a prognózu. Za minimálne účinnú dávku sa považuje 10 ng/kg/min. Najčastejším nežiaducim účinkom je lokálna bolestivá reakcia v mieste podkožnej infúzie. Subkutánny treprostinil je v Európskej únii registrovaný pre liečbu PAH v štádiu NYHA III (Jansa et al., 2011).

Iloprost je chemicky stabilný analóg prostacyklínu s polčasom 20 – 30 minút schválený pre inhalačnú liečbu idiopatickej PAH. Vedie ku zlepšeniu telesnej výkonnosti, hemodynamiky a funkčnej triedy podľa NYHA. Dlhodobý účinok monoterapie zostáva sporný (Galiè et al., 2009). Je indikovaný pre liečbu pacientov v triede NYHA III a IV.

Beraprost je prvý chemicky stabilný perorálny analóg prostacyklínu. Jeho účinok pri dlhotrvajúcej monoterapii však nie je presvedčivý. Registrovaný je pre liečbu PAH v Japonsku a Kórei (Jansa et al., 2011).

Antagonisty endotelínových receptorov

Endotelín má v patogenéze PAH kľúčovú úlohu. Je produkovaný najmä v cievnom endoteli a jeho pôsobenie je zabezpečené prostredníctvom endotelínových receptorov:

ETA receptor: jeho stimulácia vedie k pľúcnej vazokonstrikcii, podporuje proliferáciu buniek hladkej svaloviny v arteria pulmonalis a aktivuje zápalové procesy.

ETB receptor: jeho stimulácia vedie k vazokonstrikcii a tiež k vazodilatácii, podporuje bunkovú proliferáciu, aktivuje zápalové procesy, podlieha up – regulácii pri vaskulárnych ochoreniach.

Bosentan je duálny antagonista receptorov pre endotelín s výraznejšou afinitou k receptoru ETA. Pôsobí antiproliferačne a vazodilatačne. Jeho vplyv na významné zlepšenie telesnej výkonnosti, hemodynamických parametrov a prežívanie chorých bol dokázaný vo viacerých klinických štúdiách, hlavne u idiopatickej PAH a u PAH asociovanej so systémovými chorobami spojiva vo funkčnom štádiu NYHA II. Podáva v dávke 62,5 mg dvakrát denne prvé štyri týždne, neskôr 125 mg dvakrát denne. K hlavným nežiaducim účinkom patrí reverzibilná a na dávke závislá hepatopatia, ktorá sa vyskytuje asi u 10% liečených. Okrem toho môže spôsobovať anémiu, interaguje s metabolizmom warfarínu a je teratogénny. Môže tiež znižovať účinnosť hormonálnej antikoncepcie. Je indikovaný u pacientov s PAH v štádiu NYHA II a III (Jansa et al., 2011).

Ambrisentan je vysoko selektívny nesulfonamidový antagonista endotelínového receptoru ETA. Zlepšuje symptómy, telesnú výkonnosť, hemodynamické parametre a predlžuje dobu do klinického zhoršenia u pacientov s idiopatickou PAH. Liečba je zahajovaná dávkou 5 mg denne. Incidencia abnormálnych hepatálnych testov sa vyskytuje v rozmedzí 0,8 – 3 % liečených pacientov. Je schválený pre liečbu pacientov s PAH vo funkčnej triede NYHA II a III (Galiè et al., 2009).

Inhibítory fosfodiesterázy typu 5

Účinok NO na cievy je závislý od zvýšenej koncentrácie cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP) nachádzajúceho sa v bunkách hladkej svaloviny ciev. Účinok intracelulárneho cGMP je krátkodobý v dôsledku jeho rýchlej degradácie fosfodiesterázou typu 5, ktorá je produkovaná v pľúcnom tkanive. Génová expresia a aktivita fosfodiesterázy typu 5 je výrazne zvýšená pri chronickej pľúcnej hypertenzii. Inhibítory fosfodiesterázy sprostredkujú stúpanie hladiny cGMP a pôsobia vazodilatačne a antiproliferačne (Rubin, 2006).

Sildenafil je perorálny, selektívny inhibítor fosfodiesterázy typu 5. Početné klinické štúdie potvrdzujú účinky sildenafilu zlepšujúce telesnú výkonnosť, symptómy a hemodynamiku, pretrvávajúce i po 12 mesiacoch. Liečba je indikovaná v dávke 20 mg trikrát denne. Najčastejšie nežiaduce účinky sú ľahkého až stredne ťažkého stupňa, vyplývajúce hlavne z vazodilatácie, ako je bolesť hlavy, flush, dyspepsia a epistaxis. Je zaregistrovaný pre liečbu PAH vo funkčnej triede NYHA II a III. (Galiè et al., 2009).

Tadalafil je selektívny inhibítor fosfodiesterázy typu 5. Podáva sa perorálne jedenkrát denne v dávke 40 mg. Profil nežiaducich účinkov je podobný ako u sildenafilu. Zahŕňa flush, bolesť hlavy a svalov (Galiè et al., 2009).

NO je endogénna vazodilatačná látka. Inhalovaný NO pôsobí selektívne v oblasti pľúcnej cirkulácie. Použitie je overené pri pľúcnej hypertenzii novorodencov, detí s vrodenými srdcovými chybami alebo pri pľúcnej transplantácii. Okrem použitia pri akútnych situáciách sa NO využíva pri teste akútnej pľúcnej vazoreaktivity.

Kombinovaná farmakoterapia

Monoterapia PAH u mnohých pacientov nedosahuje požadovaných cieľov, čo je stupeň NYHA I-II, prejedenie vzdialenosti pri 6-minutový test chôdze > 400-500m, kompenzované pravostranné zlyhanie. Kombinovaná liečba umožňuje zasiahnúť do viacerých patogenetických mechanizmov, z čoho vyplýva logicky i ďalšia terapeutická stratégia pri zlyhaní monoterapie alebo jej nedostatočnosti.

Záver

I napriek nárastu liečebných modalít, dostupných pre liečbu PAH, zostáva riadenie ochorenia naďalej zložitú. Máme neľahkú úlohu, ktorá spočíva v umení vybrať najvhodnejšiu látku alebo ich kombináciu pre jednotlivých pacientov. Voľba je často ovplyvnená lokálnymi ekonomickými a právnymi úpravami. Pre ďalšie terapeutické rozhodovanie zohráva významnú úlohu klinické, funkčné a hemodynamické monitorovanie odpovede na liečbu. V súčasnosti sú sledované nové molekuly v klinických štúdiách, ktorých výsledky by mohli byť prínosom pri dosahovaní cieľov liečby pacientov s PAH.

Použitá literatúra

1. Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009;34(6):1219-1263.
2. Jansa P, Popelova J, Al-Hiti H, Linhart A. Doporučený diagnostický a liečebný postup České kardiologickej spoločnosti 2010. *Cor et Vasa.* 2011;53(3):169-182.
3. Luknár M, Lesný P, Varga I, Solík P, Goncalvesová E. Idiopatická pľúcna artériová hypertenzia: úspech kombináčnej liečby. *Kardiológia.* 2010;19(4):279-286.
4. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2007;30(1):104-109.
5. Rubin LJ. Pulmonary Arterial Hypertension. *Proceeding of American Thoracic Society.* 2006;3:111-115.

Dlhodobá kultivácia kmeňových buniek a ich malígna transformácia

Marcela Kuniaková, Zuzana Varchulová Nováková, Ľuboš Danišovič

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Abstract

Stem cells represent adult cellular population defined by special characteristics as self-renewal, broad differentiation potential, regeneration capacity, immunosuppressive capacity, capacity to migrate to the sides of injury, inflammation, or to tumor areas. These capacities make SC promising candidates for use in regenerative medicine and tissue engineering, as well as serving as efficient delivery vehicles in site-specific therapy. In this time we use SC in different medical areas such as orthopedics, urology, stomatosurgery, cardiology and endocrinology.

Key words: stem cells, adipose tissue, Wharton jelly, dental pulp, malignant transformation, chronological aging

Úvod

Kmeňové bunky (KB) predstavujú dospelú bunkovú populáciu ktorá sa vyznačuje špeciálnymi vlastnosťami ako schopnosť sebaobnovy, široký diferenciačný potenciál, regeneračné a imunosupresívne vlastnosti, schopnosť migrovať do miesta poškodenia, zápalu alebo k nádorom. Práve tieto vlastnosti robia z KB ideálny nástroj v regeneratívnej medicíne, tkanivovom inžinierstve a pri vývoji „site-specific“ terapií (Satija et al., 2007). Už dnes sa využívajú v rôznych oblastiach medicíny napr. v ortopédii, urológii, stomatológii, neurológii, kardiológii a v endokrinológii.

Cieľom tohto prehľadu je

Zdroje kmeňových buniek

KB sa nachádzajú v rôznych orgánoch a tkanivách ľudského tela (kostná dreň, tukové tkanivo, svaly, pupočník, zubná dreň), z ktorých sa dajú relatívne ľahko izolovať v rôznych množstvách s rozdielnou efektívnosťou. Tak ako je rýchlosť rastu KB závislá od miesta ich pôvodu, tak isto existuje aj interindividuálna variabilita v dĺžke života a proliferácii klonov toho istého pôvodu od rôznych pacientov (darcov) (Motlan et al., 2010).

Množstvo KB v kostnej dreni je negatívne korelované s vekom. Pri narodení je frekvencia 1: 10 000, v 80 rokoch 1: 2 mil buniek. Negatívny efekt má aj chronické ochorenie pacienta, ktoré „vyčerpáva“ regeneračný potenciál jeho kmeňových buniek.

V tukovom tkanive predstavujú stromálne (kmeňové) bunky 2 % všetkých jadrových buniek lipoaspirátu (resp. 1g tuku obsahuje 1x10⁶ KB), množstvo kmeňových buniek je teda oproti kostnej dreni vyššie (Yang et al., 2011). Náročnosť a bolestivosť odberu tukového tkaniva je oproti kostnej dreni neporovnateľne nižšia. MKB izolované z tuku majú podobné, avšak nie identické vlastnosti ako MKB z kostnej drene (Bunnell et al., 2008). Majú porovnateľnú fenotypickú charakteristiku, bunky však rastú v nižšej denzite, majú nižší proliferatívny potenciál a relatívne rýchlo sa dostávajú do fázy senescencie.

Pupočná šnúra obsahuje dve artérie a jednu venu ktoré sú obklopené Whartonovým gélom (Wg) - mukoidným spojivovým tkanivom. Wg sa skladá z glykoproteínových mikrofibríl, kolagénových vlákien, glykosaminoglykánu, kyseliny hyaluronovej a stromálnych buniek s fibroblastovou morfológiou, ktoré spolu vytvárajú hydratovaný gél ktorý chráni pupočník pred tlakom. Bunky izolované z Whartonovho gélu pupočníka prasiat exprimujú gény Oct4, Nanog a Sox2 ktoré sú charakteristické pre pluripotentné bunky. Tieto fibroblastom podobné bunky vo Wg predstavujú populáciu primitívnych stromálnych buniek. Podľa najnovších výskumov tieto bunky exprimujú podobné povrchové znaky ako mezenchýmové kmeňové bunky (Deryl et al., 2008).

Whartonov gél reprezentuje unikátny zdroj ľahko dostupných a „nekontroverzných“ kmeňových buniek. Materiál sa odoberá ihneď po pôrode, takže bunky nie sú zaťažené stratou telomerázovej aktivity, majú kratší deliaci čas a veľký expanzný potenciál. Odber je absolútne bezbolestný a finančne nenáročný, nakoľko sa jedná o biologický odpad. Aktuálne sú ale potrebné ďalšie práce na dôkaz, či bunky z Whartonovho gélu vykazujú všetky tri znaky kmeňovej bunky (dlhodobá kultivácia, sebaobnova a diferenciačný potenciál) a sú skutočne mezenchýmovými kmeňovými bunkami (Hwai-Shi et al., 2004).

Prítomnosť KB v zubnej dreni prvý krát dokázal Gronthos (2000). Po izolácii a kultivácii v médiu s vysokým obsahom séra bunky diferencovali nie len na odontoblasty ale aj na iné bunky mezenchýmového pôvodu (adipocyty a osteoblasty). Takáto široká schopnosť diferenciácie je vysvetlená tým, že zubná dreň má pôvod v kraniálnom neurálnom hrbole, čo potvrdzuje aj „embryonic-like“ fenotyp KB (Atari et al., 2012).

Starnutie kmeňových buniek

MKB získané od mladých darcov majú za vhodných kultivačných podmienok schopnosť deliť sa 50-100 krát, proliferačná aktivita buniek od starších darcov je znížená. Pri každom populačnom delení sa dĺžka teloméru skrúti o 50bp. Toto postupné skracovanie teloméru počas života bunky vedie až k zastaveniu rastu – senescencii. KB z pupočníka, nakoľko majú mierne dlhšie telomerické sekvencie ako ostatné KB, môžu byť kultivované dlhší čas, kým sa stanú senescentné. V kultúre sa prejavuje senescencia aj zmenou tvaru buniek, sú väčšie, majú ploché, ohraničené jadro, narastajúci lyzozómový kompartment a endogénnu β -galaktozidázovú aktivitu. Senescentné bunky majú aj významne up-regulované tumor – supresorové gény (Motaln et al, 2010). Zastavenie proliferácie má vplyv aj na karyotyp KB, podľa Rubio a kol. (2005) 30% senescentných buniek vykazuje trizómiu chromozómu 8, v 20-tej pasáži sa bunky stávajú polyploidné (najčastejšie tetraploidné), neskôr až aneuploidné. Vzhľadom na to, sa musí počas kultivácie buniek v prípade terapeutických aplikácií, venovať špeciálna pozornosť epigenetickým zmenám a výskytu senescencie, ktorá môže mať za následok genetické abnormality.

MKB majú ale schopnosť prekročiť replikačnú senescenciu ktorá je bežnou charakteristikou u všetkých diploidných bunkových kultúr. Podľa niektorých už publikovaných štúdií bolo dokázané, že po 4 – 5 mesiacoch in vitro kultivácie, 50% postsenescentných KB preskočilo proliferačnú krízu, stratili kontaktnú inhibíciu a stali sa tumor-like transformované KB. Transformované KB majú odlišnú morfológiu, vyšší podiel jadro / cytoplazma, výrazne jadierka a viac desmozómov. Transformované KB majú vysokú telomerázovú aktivitu, stávajú sa aneuploidné s rôznymi intrachromozomálnymi translokáciami (Rosland et al., 2009).

Molekulárne mechanizmy spojené so starnutím a malígna transformácia adultných kmeňových / progenitorových buniek. Dosah na terapeutickú aplikáciu.

Všetky terapeutické protokoly majú spoločné to, že k dosiahnutiu terapeutického efektu je potrebné aplikovať veľké množstvá KB, ktoré sa dajú získať iba ich dlhodobou kultiváciou. S dlhodobou kultiváciou je ale spojená hrozba malígnej transformácie kultivovaných buniek a v tom spočíva významne biologické riziko (biohazard). Vzhľadom na tieto skutočnosti je nutné zriadenie štandardizovaného kultivačného protokolu pre kultiváciu KB, ktorý by neovplyvňoval schopnosť sebaobnovy KB, diferenciačný proces, metyláciu génov, schopnosť usídlenia a dlhodobý terapeutický efekt.

Normálne ľudske starnutie je komplex biologických procesov, ktoré sú dôsledkom postupných fenotypických a funkčných zmien bunky v priebehu času. Patofyziologické zmeny spojené s vekom typicky vedú k nerovnováhe, čo následne aktivuje mechanizmus replikačnej senescencie a programovanej bunkovej smrti – apoptóze. Hoci väčšina tkanivových kmeňových / progenitorových buniek má dlhú dĺžku života, kumulatívna strata telomerickéj DNA, defekty v DNA reparačných mechanizmoch, oxidačný stres, poškodenia DNA vplyvom UV žiarenia, chromozomálna nestabilita vplyvom veku môžu byť spúšťačom rôznych kontrolných mechanizmov v bunkovom cykle. Tieto mechanizmy zahŕňajú up-reguláciu produktov tumor-supresorových génov ako p16, p19, p53, pRb, následkom čoho je inhibovaná aktivita cyklín-dependentná kináza/cyklín komplexov, represie transkripčných faktorov, čo vedie k zastaveniu bunkového rastu, senescencii resp. apoptóze (Wang et al., 2010). Na rozdiel od apoptotických buniek, senescentné bunky sa v tkanivách akumulujú. Tieto sú

potom náchylné na malígnu transformáciu. Napriek týmto kontrolným mechanizmom, zosilnenie ektoptickej expresie telomerázovej katalytickej subjednotky, môže viesť k aktivácii telomerázy, zachovaniu telomér a zväčšeniu dĺžky života kmeňových / progenitorových buniek a ich potomstva. Okrem re-aktivácie telomerázy aj inaktivácia produktov tumor-supresorových génov v KB počas chronologického starnutia môže viesť k obídeniu senescencie a apoptózy a spôsobiť započatie rakoviny (Deng a Chang, 2007).

S vekom spojená karcinogenéza

Hoci hlavnou úlohou KB je zachovanie homeostázy v tkanivách, vplyvom veku sa ich funkcie zhoršujú a ich počet klesá. Taktiež aj zmeny v špecializovanom mikroprostredí obklopujúcom KB, vplyvom veku, zápalov a oxidačného stresu, majú negatívny vplyv na regeneráciu tkanív, čo spôsobí rozvinutie rôznych ochorení (Wilson a Trumpp, 2006).

Najnovšie štatistiky potvrdzujú vzrastajúci výskyt určitých typov rakoviny so zvyšujúcim sa vekom u ľudí – myoblastické leukémie, gliové tumory mozgu a epiteliálne nádory. Konkrétne zvýšený zápalový a oxidačný stres, skracovanie telomér alebo akumulovanie onkogénnych vplyvov u KB počas chronologického starnutia, môže viesť ku genómovej nestabilite, čo môže spôsobiť transformáciu na prekancerózne KB (Mimeault a Batra, 2008). Toto včasné štádium genómovej nestability vedúce k formácii pre-malígnych lézií, môže byť nasledované zvýšením telomerázovej aktivity (imortalizácia) a inaktiváciou produktov tumor-supresorových génov (p16, pRb, p53), čo spôsobí prekročenie replikačnej senescencie a apoptotického procesu. Ďalšia akumulácia množstva onkogénnych podnetov, ako aktivácia signálnych dráh pre rastové faktory u prekanceróznych KB môže vyvrcholiť ich transformáciou na vysoko leukemické alebo tumorogénické kmeňové bunky, začatím rakoviny a progresiou počas chronologického starnutia. Okrem toho, rakovinu-začínajúce bunky perzistujú v tkanivách v „quiescent“ stave, majú aktívnu opravu DNA, intracelulárne detoxikačné enzýmy a anti-apoptotické signalizačné faktory ako Bcl-2 a survivín, čo spôsobuje ich rezistenciu na antihormónovú, rádio a chemoterapiu (Mimeault et al., 2007).

Záver

Štúdium biológie adultných KB a ich malígneho náprotivku – rakovinových KB, nám môže poskytnúť dôležité informácie o genetických alebo epigenetických zmenách, ktoré môžu prispieť k patogenéze množstva chorôb a opakujúcich sa agresívnych foriem rakoviny, počas chronologického starnutia. Tieto informácie tiež môžu pomôcť vyvinúť nové efektívne anti-aging terapie a špecifické nádorové terapie v blízkej budúcnosti.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0076/2013.

Použitá literatúra

1. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, et al. Dental Pulp of the Third Molar: A New Source of Pluripotent-like Stem Cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 14):3343-56.
2. Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol.* 2008;456:155-71.
3. Deng Y, Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest.* 2007;87(11):1071-6.
4. Deryl L Troyer, Mark L Weis: Consise rewiew. Wharton's jelly-derived cells are primitive stromal cells population. *Stem cells.* 2008;26:591-599
5. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30.
6. Hwai-Shi Wang, Shih-Chien Hung, Shu-Tine Peng: Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells.* 2004;22:1330-1337.
7. Mimeault M, Batra SK. Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res Rev.* 2009;8(2):94-112.

8. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5):981-1011.
9. Motaln H, Schichor C, Lah TT.: Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer.* 2010;116(11):2519-30.
10. Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009;69(13):5331-9.
11. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65(8):3035-9.
12. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev.* 2007;16(1):7-23.
13. Wang X, Li W, Zheng J, et al. Tumor suppressor gene alterations of spontaneously malignant transformed cells from human embryonic muscle in vitro. *Oncol Rep.* 2010;24(2):555-61.
14. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):93-106.
15. Yang XF, He X, He J, et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2011;18:59

Riziká užívania antipsychotík počas gravidity

Miriám Petrová, Gertrúda Čápová, Viera Kristová

*Ústav farmakológie a klinickej farmakologie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského,
Špitálska 24, 81372 Bratislava*

Abstrakt

Liečba psychózy počas tehotenstva predstavuje náročný problém z etického, medicínskeho, ale aj farmakologického hľadiska. Treba zvážiť následky neliečeného ochorenia vs. možné ohrozenie plodu nežiaducimi účinkami antipsychotík. Článok sa venuje rizikám antipsychotík a rozdeľuje ich podľa klasifikácie FDA (Food and Drug Administration). Väčšina z nich spadá do kategórie C, v ktorej riziko nemôže byť vylúčené.

Kľúčové slová: tehotenstvo, antipsychotiká, benefit liečby, riziko liečby, perinatálny syndróm

Úvod

Pri liečbe antipsychotikami v tehotenstve treba zvážiť, či benefit podávania liekov pre matku a plod prevyšuje riziko vyplývajúce z neliečenia ochorenia. Vzhľadom na častý výskyt relapsov ako aj na negatívny vplyv psychózy na plod a matku, mnohí odborníci odporúčajú pokračovať v terapii. Vždy je treba zvážiť predchádzajúci priebeh psychózy a riziko relapsu (Marsalová, 2009). Ak je pacientka v remisii, je možné vysadiť liečbu aspoň v prvom trimestri a je vhodné podávať čo najnižšie efektívne dávky liekov, ktoré ešte postačujú na kontrolu ochorenia. Užívanie antipsychotík počas tretieho trimestra môže viesť k perinatálnemu syndrómu, ktorý sa dá minimalizovať znížením dávky antipsychotika, prípadne jeho vysadením pred pôrodom (Marsalová, 2009).

Bezpečnosť liekov počas tehotenstva podľa klasifikácie FDA

Asi najznámejšou klasifikáciou rizika podávania liekov počas tehotenstva je klasifikácia FDA (Food and Drug Administration; Úradu pre kontrolu potravín a liečiv v USA). Delí lieky podľa ich rizika počas tehotenstva do piatich kategórií: A, B, C, D, X. Antipsychotiká podľa klasifikácie FDA (Tab. 1).

Tab.1. Antipsychotiká podľa klasifikácie FDA.

A	štúdie u tehotných žien nedokázali riziko pre plod	
B	nie je dôkaz pre riziko u ľudí (nálezy na zvieratách ukazujú riziko, ale ľudské nálezy nie; ak chýbajú štúdie u tehotných žien, nálezy na zvieratách sú negatívne)	Klozapín
C	riziko nemôže byť vylúčené (ľudské štúdie nie sú k dispozícii, niektoré štúdie na zvieratách riziko ukazujú, alebo chýbajú)	olanzapín, kvetiapín, risperidon, ziprasidon, chlorpromazín, flufenazín, haloperidol, perfenazín, thioridazín
D	pozitívny dôkaz rizika (výskumné alebo postmarketingové dáta ukazujú riziko pre plod)	
X	kontraindikované lieky počas tehotenstva (riziko pre plod prevažuje možný benefit pre pacienta)	

Dôvodom nedostatku údajov ohľadom užívania antipsychotík počas tehotenstva sú etické komplikácie. Do štúdií sú zahrnuté najmä ženy, ktoré užívali tieto lieky pri počatí. Často súčasne užívajú aj iné psychofarmaká. Napriek týmto údajom sú stále málo známe konečné riziká pre plod. Keď posudzujeme bezpečnosť liekov počas tehotenstva, môže dôjsť k trom typov negatívnych vplyvov na plod: ku kongenitálnym malformáciám (najčastejšie k nim dochádza pri expozícii liekmi počas vývoja hlavných orgánov; 2 až 8 týždňov po oplodnení), k poruchám správania a

neuropsychiatrickým symptómom a k perinatálnemu syndrómu (príčinou je podávanie antipsychotík v dobe pred pôrodom; patrí sem napríklad nepokoj, tremor, poruchy príjmu potravy, hypertonus) (Demler a spol., 2012).

Vybrané antipsychotiká

Chlorpromazín: patrí medzi sedatívne antipsychotiká prvej generácie a FDA ho zaraďuje do skupiny C. U zvierat pri dávkach omnoho vyšších než odporúčané dávky pre ľudí spôsoboval kongenitálne malformácie (Hannah a spol., 1982). Po jeho užívaní boli len ojedinele hlásené fetálne malformácie alebo gestačný diabetes (Reis a spol., 2008). Perinatálne komplikácie sú relatívne časté, ak sa užíva v neskorom tehotenstve (Kulkarni a spol., 2007).

Klozapín: podľa FDA patrí do kategórie B napriek nedostatku údajov o jeho bezpečnosti (Gentile, 2010). Predávkovanie klozapínom počas tehotenstva môže spôsobiť odumretie plodu (Klys a spol., 2007). Nevýhodou je rovnako riziko agranulocytózy a ortostatická hypotenzia s následným zníženým prietokom krvi cez placentu (Yaeger a spol., 2006). Naopak pozitívom je jeho nízky prechod cez placentárnu bariéru.

Olanzapín, kvetiapín, risperidon, ziprasidon: patria medzi antipsychotiká druhej generácie a FDA ich zaraďuje do kategórie C. Zistenia o ich vplyve na plod sú nedostatočné a riziko nemôže byť vylúčené. Nežiaduce účinky antipsychotík ako obezita, cukrovka, vysoký TK sú rizikové pre matku i dieťa. Výskyt malformácií a úmrtí novorodencov matiek so schizofréniou je dvakrát vyšší ako v bežnej populácii (Marsalová, 2009). Užívanie antipsychotík počas tretieho trimestra môže spôsobiť extrapyramídové motorické poruchy u novorodenca (Yaeger a spol., 2006) a iné postnatálne komplikácie. Perinatálny syndróm sa vyskytuje zriedkavo a vo všeobecnosti bez dlhodobých následkov.

Stratégia liečby

Terapia tehotných žien so schizofréniou vyžaduje spoluprácu viacerých odborníkov – gynekológa, psychiatra, dietológa. Väčšinou sa farmakoterapia antipsychotikami úplne nevynecháva pre riziko relapsu, ktorý môže viesť k sebaopškodzujúcemu chovaniu a narušeniu vzťahu matka-dieťa. Je možné zvážiť podávanie liekov počas prvého trimestra a tesne pred pôrodom podľa stavu individuálneho pacienta. Je nutné informovať pacientku a príbuzných o rizikách a benefitoch terapie. Pri plánovanom aj neplánovanom tehotenstve počas prebiehajúcej liečby pokračujeme v podávaní naordinovaného antipsychotika v čo najnižších účinných dávkach. V prípade novovzniknutej psychózy vyberáme lieky s čo najlepším bezpečnostným profilom. Dávky antipsychotika v prípade zhoršenia ochorenia v dôsledku hormonálnych zmien je potrebné zvyšovať.

Podakovanie

Práca vznikla za pomoci grantov VEGA MŠ 1/0501/11 a 1/0583/13.

Použitá literatúra

1. Demler TL. Labeling guidelines for antipsychotics during pregnancy. *US Pharmacist*. 2011;36(11): 39-44.
2. Gentile S. Antipsychotic therapy during early and late pregnancy. A systemic review. *Schizophrenia bulletin*. 2010;36(3):518-544.
3. Hannah RS, Roth SH, Spira AW. The effects of chlorpromazine and phenobarbital on cerebellar Purkinje cells. *Teratology*. 1982;26:21-25.
4. Klys M, Rojek S, Rzepecka-Woźniak E. Neonatal death following clozapine self-poisoning in late pregnancy. An unusual case report. *Forensic Sci Int*. 2007;171:e5-e10.
5. Kulkarni J, McCauley-Elsom K, Marston N, et al. Preliminary findings from the national register of antipsychotic medication in pregnancy. *Aust N Z J Psychiatry*. 2007;42:38-44.
6. Marsalová A. Podávanie psychofarmák počas gravidity – tymoprofylaktiká, antipsychotiká (2. časť). *Psychiatria pre prax*. 2009;10(2):58-61.
7. Reis M, Källén B. Maternal use of antipsychotics in early pregnancy and delivery outcome. *J Clin Psychopharmacol*. 2008;28:279-288.
8. Yaeger D, Smith HG, Altschuler LL. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia during pregnancy and the postpartum. *Am J Psychiat*. 2006;63(12):2064-2070.

Primárny lymfóm CNS

Spurný Martin, Kriššáková Slavomíra

M.R Institute s.r.o., Bernolákova 10, Banská Bystrica

Úvod

Primárny lymfóm centrálnej nervovej sústavy PCNSL (primary central nervous system lymphoma) je zriedkavá forma non-Hodgkinovho lymfómu (NHL), bez súčasného postihnutia iných orgánov. PCNSL predstavuje 1 - 5 % zo všetkých mozgových nádorov. Potvrdeným rizikovým faktorom pri vzniku PCNSL je primárny alebo sekundárny imunodeficientný stav, u imunokompromitovaných pacientov prechádzajúca infekcia vírusom Epstein-Barr (6,11).

U imunokompetentných pacientov sú najčastejším typom PCNSL B-veľkobunkové typy (B-NH2 95 %). U imunokompromitovaných pacientov (AIDS) sa PCNSL vyskytuje u 6 % a veková hranica je posunutá k 30. – 45. roku života. U indolentných lymfómov CNS sa častejšie vyskytujú T-bunkové NHL. Diagnostika indolentných PCNSL je veľmi náročná a niekedy je ťažšie odlíšiteľná od reaktívnych zápalových procesov mozgových štruktúr, prípadne sclerosis multiplex.

Diagnostika PCNSL

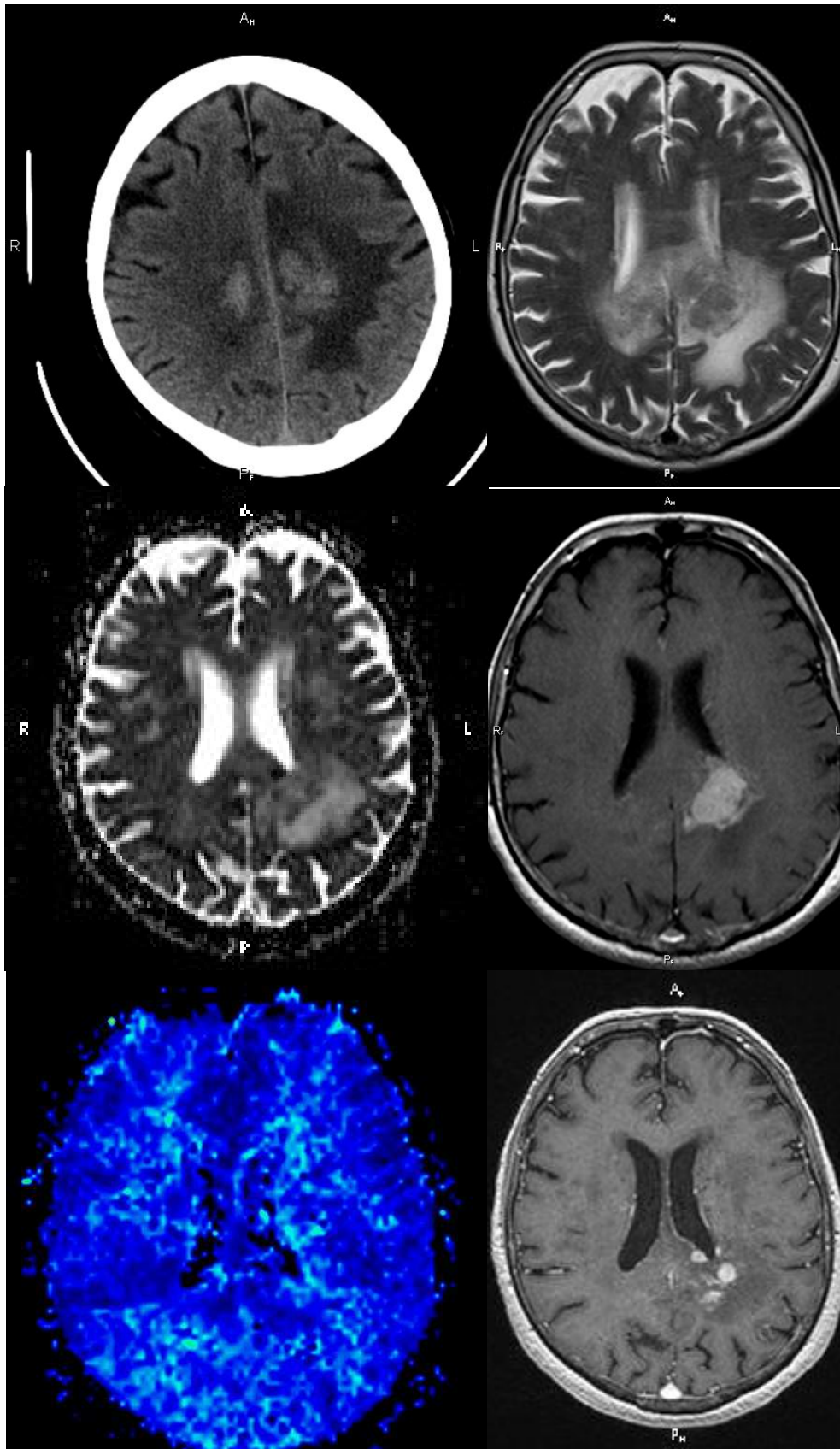
PCNSL postihujú všetky vekové skupiny s maximom incidencie v 60. - 70. roku života. Klinické prejavy sú nešpecifické a zodpovedajú uloženiu intrakraniálnej lézie. Najčastejšie klinické príznaky sú bolesť hlavy (56%), intrakraniálna hypertenzia - nausea (35 %), vomitus (11 %) a edém papily očného nervu (32 %). PCNSL vzniká v mozgovom parenchýme, cerebelle, mozgovom kmeni, v oku, v leptomeningoch a v mieche. Asi 10 - 15 % všetkých PCNSL primárne vzniká infratentoriálne. Leptomeningeálna lokalizácia bez postihnutia mozgového parenchýmu sa vyskytuje asi u 10 % prípadov (2).

Štandardné laboratórne hodnoty u PCNSL a serologické vyšetrenia, prípadne testy na HIV sú negatívne. PCNSL je charakterizovaný v CT aj MR zobrazovaní svojimi vlastnosťami, ako sú hypercelularita, vysoký stupeň porušenia hematoencefalickej bariéry s predilekciou periventrikulárnych a povrchových oblastí, často v kontakte s komorovým systémom a mozgovomiešnymi obalmi (3). U všetkých typov PCNSL je v natívnom CT obraze typická hyper- alebo izodenzná lézia vo väčšine prípadov homogénna, ktorá vykazuje stredný až vyšší stupeň vysycovania po aplikácii kontrastnej látky (10). Menej zriedkavé je prstencovité sýtenie, prípadne ešte zriedkavejší nevysycujúci sa PCNSL po intravenóznom podaní kontrastnej látky (12 %).

V MR obraze v T1 vážení je lézia neostro ohraničená, natívne homogénna izo- až hypointenzívna v porovnaní s kortexom (11). U časti pacientov môže byť signál heterogénny. V T2 vážení je homogénna izo- až hypointenzívna vo vzťahu ku kortexu. Zriedkavá heterogenita môže byť spôsobená hemorágiou. V okolí tumoru býva prítomný stredný stupeň edému (12,13).

Vo FLAIR sekvencii je lézia homogénne izo/hypointenzívna.

V T2*GRE - SWI je u väčšiny tumorov (98 %) prítomný homogénny signál. Ojedinele môžu byť prítomné deriváty hemosiderínu pri hemorágii. V DWI obraze sú prítomné výrazné známky reštrikcie difúzie s nízkymi hodnotami ADC v porovnaní s malígnymi gliovými tumorami (2,5). Hodnoty ADC sa pohybujú okolo 0,51 \pm 0,09, čo je menej ako pri gliových tumoroch, napr. glioblastoma multiforme (0,79 \pm 0,21). V PWI (perfusion weighted imaging) je relatívne CBV nižšie než u malígnych gliómov, relCBV = 2,33 \pm 0,68 proti glioblastoma multiforme (6,33 \pm 2,03). V T1 vážení po aplikácii kontrastnej látky sledujeme výrazné homogénne zvyšovanie intenzity signálu u imunokompetentných pacientov. U imunokompromitovaných pacientov je sýtenie po aplikácii kontrastnej látky nehomogénne.



Obr. 1. Natívne CT s hyperdenznými tumoróznymi masami v oboch hemisférach a perifokálnym edémom. T2 vážený obraz s hypointenzívnymi štruktúrami a perifokálnym edémom. ADC mapa v difúzne váženom obraze (DWI) - nízky signál solídnej zložky tumoru. T1 vážený obraz so zvyšovaním intenzity signálu solídnej časti tumoru. V perfúznom zobrazení - relCBV znížená perfúzia v mieste

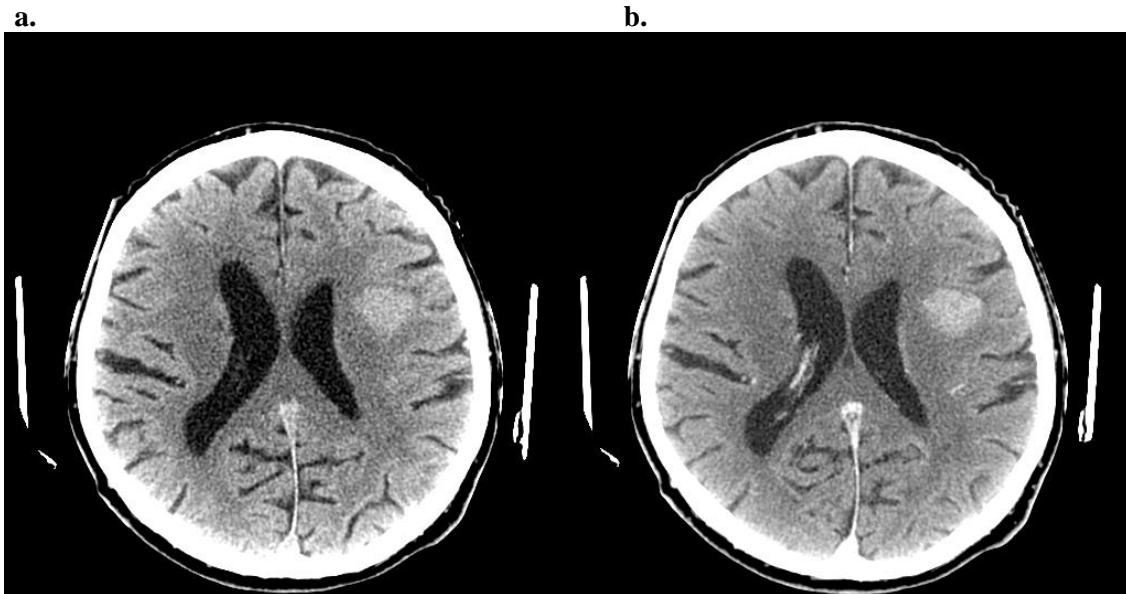
tumoru. Kontrolné MR vyšetrenie T1 vážený postkontrastný obraz s regresiou veľkosti tumoru po aplikácii kortikoidov v rámci antiedematózneho liečby.

MR spektroskopika

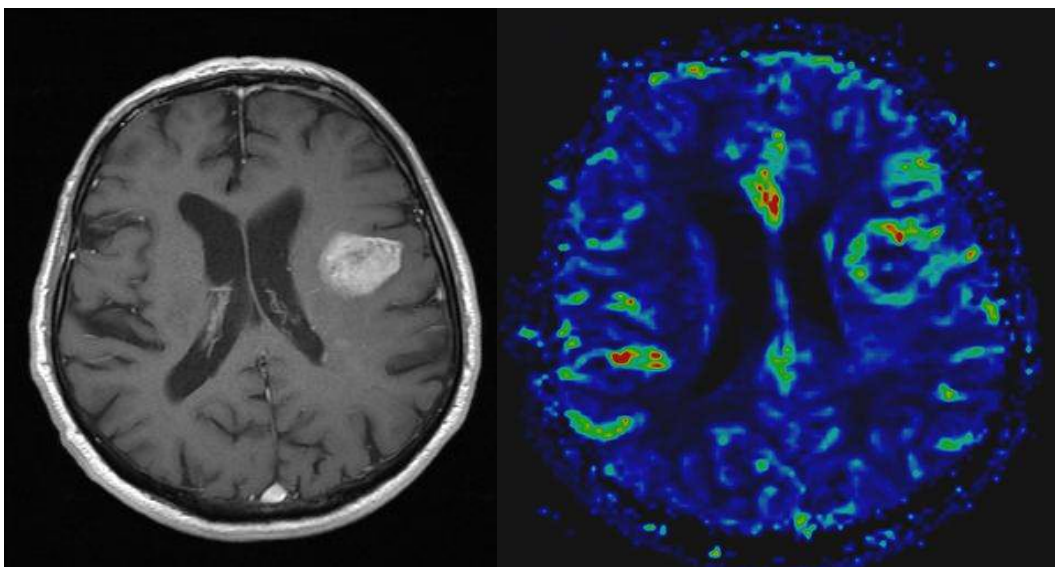
V spektroskopickom obraze býva výrazné zníženie hodnôt NAA s zvýšením hodnôt cholínu, v pozícii 1,4 ppm sa objavujú peaky lipidov a laktátu. Výsoký pomer cholínu voči kreatínu (14).

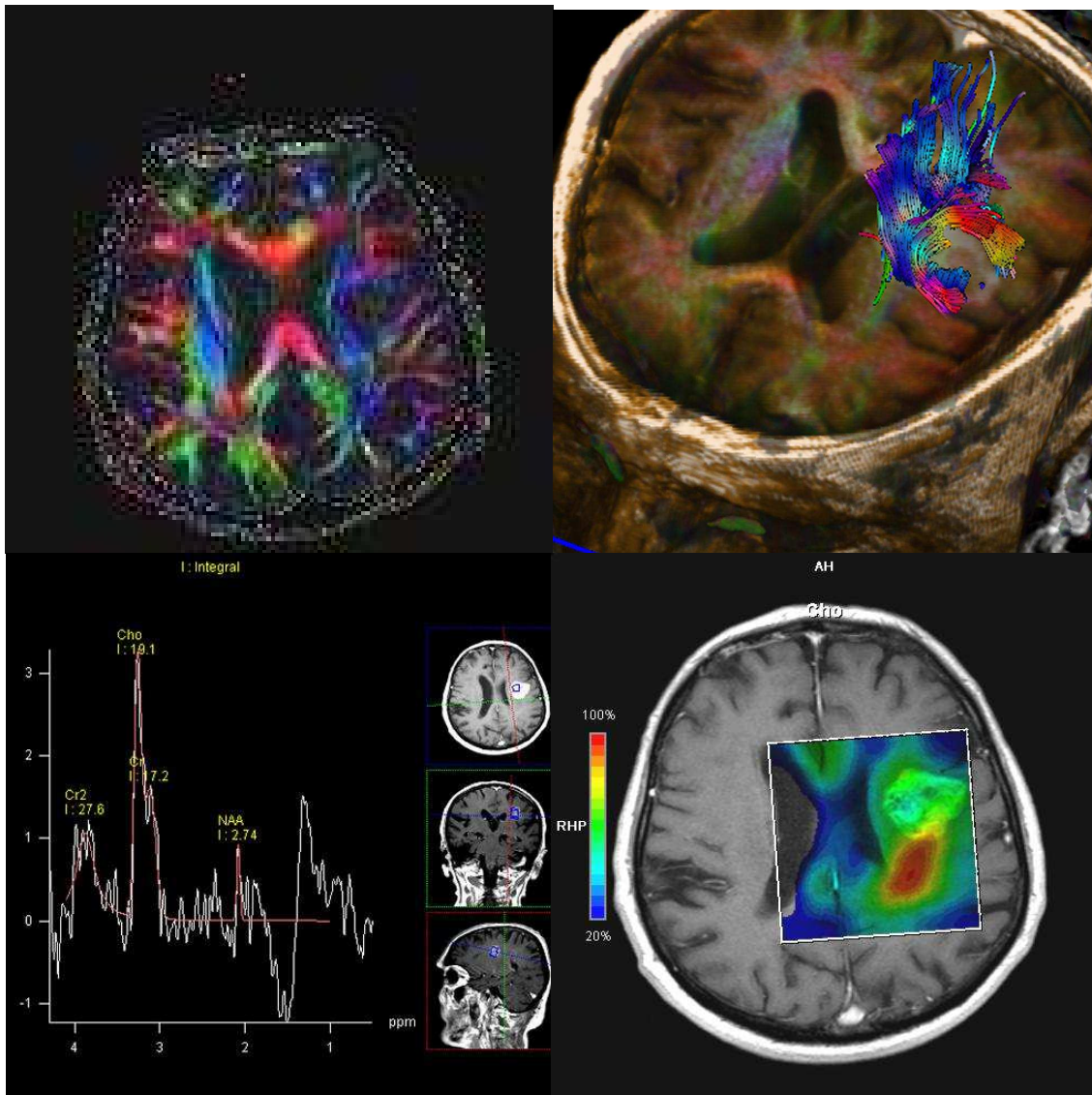
MR traktografia

V diffusion tensor imaging - DTI je PCNSL charakteristický výrazne zníženou frakčnou anizotropiou (signifikatne zníženou v porovnaní s glioblastoma multiforme) (8).



Obr. 2. Natívne (a) a postkontrastné CT (b) s hyperdenznou masou vľavo frontálne s minimálnym vysycovaním po aplikácii kontrastnej látky (b).





Obr. 3. MR vyšetrenie - T1 vážený obraz postkontrastne (a) s výrazným zvyšovaním intenzity signálu tumoru s znížením CBV (b). Zníženie až vymiznutie anizotropie v centre tumoru (c), ktoré možno sledovať na traktografii - DTI (d) včítane dislokácie okrajových nervových dráh. MR spektroskopické zobrazovanie CSI technikou (e) s výrazne zníženými hladinami NAA a zvýšenou hladinou cholínu. Prítomný peak laktátu. Parametrická mapa cholínu (f).

Diferenciálna diagnóza

Glioblastoma multiforme - v MR obraze má typický motýľovitý vzhľad s prerastaním cez corpus callosum na kontralaterálnu stranu. Často sú prítomné hemorágie, postkontrastné zvyšovanie intenzity signálu heterogénne s prstencovitým vysycovaním okolo nekrotických hmôt (95 % nálezov). **Mozgový absces** - v T2 vážení prítomný hypointenzívny prstenec s typickou reštrikciou difúzie v DWI. Okrajové zvyšovanie intenzity signálu s centrálnou nekrózou. V MR spektroskopii prítomný signál aminokyselín a laktátov (9).

Demyelinizácia - podobne sa môže objavovať v corpus callosum, po aplikácii kontrastnej látky často nehomogénne alebo úplne chýbajúce zvyšovanie intenzity signálu skôr smerujúce ku kortikálnym a subkortikálnym oblastiam.

Mozgové metastázy - sú charakteristické viacpočetnými, relatívne dobre ohraničenými léziami s typickým rozsiahlym vazogénnym edémom.

Sekundárny CNS lymfóm - je typický postihnutím meningov a durálnych priestorov. Môže sa však šíriť aj do hlbších štruktúr a periventriculárnych priestorov.

Toxoplazmóza - často neodlíšiteľná, nutná korelácia s klinickým stavom.

Klasifikácia

Väčšina PCNSL sú difúzne B-bunkové non-Hodgking lymfómy so solitárnymi, prípadne viacpočetnými masami oboch cerebrálnych hemisfér, prípadne infratentoriálne.

Prognóza

U pacientov s PCNSL je prognóza výrazne horšia ako u systémového postihnutia NHL, s mediánom prežívania 50 mesiacov u imunokompetentných a 36 mesiacov u pacientov s poruchou imunity (1,7). Faktory, ktoré zvyšujú medián prežívania u imunokompetentných pacientov, sú chýbanie meningeálnej infiltrácie, prípadne periventrikulárna infiltrácia. Lepšiu prognózu majú solitárne lézie a vek nižší ako 60 rokov (6,13).

Dôležitým faktorom je včasná najlepšie stereotaktická biopsia s následnou rádio a chemoterapiou. Typickým znakom PCNSL je veľmi dobrá odpoveď na kortikoidy, ktoré sa často podávajú na elimináciu perifokálneho edému a môžu maskovať vymiznutie pôvodného infiltrátu, ktorý sa v krátkom časovom odstupe (v prípade nezahájenej liečby) objavuje na inom mieste, prípadne v pôvodnej lokalizácii.

Použitá literatúra

1. Calli C, Kitis O, Yuntun N, et al. Perfusion and diffusion MR imaging in enhancing malignant cerebral tumors. *Eur J Radiol.* 2006;58:394-403.
2. Go JL, Lee SC, Kim PE. Imaging of primary central nervous system lymphoma. *Neurosurg Focus.* 2006; 21.
3. Hakyemez B, Erdogan C, Bolca N, et al. Evaluation of different cerebral mass lesions by perfusion-weighted MR imaging. *J Magn Reson Imaging.* 2006;24:817-824.
4. Cha S, Lupo JM, Chen MH, et al. Differentiation of glioblastoma multiforme and single brain metastasis by peak height and percentage of signal intensity recovery derived from dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007; 28:1078-1084.
5. Kim HS, Jahng GH, Ryu CW, et al. Added value and diagnostic performance of intratumoral susceptibility signals in the differential diagnosis of solitary enhancing brain lesions: preliminary study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30:1574-1579.
6. Kuker W, Nagele T, Korfel A, et al. Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. *J Neurooncol.* 2005;72:169-177.
7. Liao W, Liu Y, Wang X, et al. Differentiation of primary central nervous system lymphoma and high-grade glioma with dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion magnetic resonance imaging. *Acta Radiol.* 2008;50:2217-2225.
8. Mištinová J. Magnetická rezonancia - nové zobrazovacie postupy I. *Slovenský lekár.* 2008; 18(7-8):156-160.
9. Mištinová J., Fabčín J. Využitie magnetickej susceptability v magnetickej rezonancii. *Slovenská rádiológia.* 2008;15(1):27-33.
10. Paulson ES, Schmainda KM. Comparison of dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced MR methods: recommendations for measuring relative cerebral blood volume in brain tumors. *Radiology.* 2008;249:601-613
11. Senocak E, Oguz KK, Ozgen B, et al. Parenchymal lymphoma of the brain on initial MR imaging: a comparative study between primary and secondary brain lymphoma. *Eur J Radiol.* 2010, 79(2):288-294.
12. Stadnik TW, Chaskis C, Michotte A, et al. Diffusion-weighted MR imaging of intracerebral masses: comparison with conventional MR imaging and histologic findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001;22:969-976.
13. Soussain C, Suzan F, Hoang-Xuan K, Cassoux N, Levy V, Azar N, et al. Results of intensive chemotherapy followed by hematopoietic stem-cell rescue in 22 patients with refractory or recurrent primary CNS lymphoma or intraocular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2001;19:742-749.
14. Taillibert S, Guillemin R, Menuel C, et al. Brain lymphoma: usefulness of the magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol.* 2008;86:225-229.

Súčasný pohľad na liečbu chronických rán pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

Peter Záhorec¹, Martin Boháč^{2,3}, Luboš Danišovič⁴, Ján Koller¹

¹Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Pažítková 24, 821 01 Bratislava; ²Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Pažítková 4, 821 01 Bratislava; ³Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava; ⁴Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Abstrakt

Mesenchymálne kmeňové bunky sa zdajú v súčasnej medicíne ako vhodná alternatíva k štandardným farmakologickým prostriedkom. Tieto bunky sú dôležité mediátory na podporu regenerácie tkanív a sú pomerne ľahko dostupné z dospelého tkaniva. Mnohé predklinické aj klinické štúdie naznačujú možnosti využitia týchto buniek v regenerácii tkanív, hojení akútnych aj chronických rán a v remodelácii jaziev. Tento prehľadový článok sleduje súčasný stav liečby chronických rán mezenchymálnymi kmeňovými bunkami.

Kľúčové slová: hojenie rán, chronické rany, mezenchymálne kmeňové bunky

Abstract

Mesenchymal stem cells appear in contemporary medicine as a viable alternative to the regular pharmacological means. These cells are important mediators to promote tissue regeneration and are relatively easily accessible from adult tissue. Many preclinical and clinical studies suggest the possibility of using these cells in tissue regeneration, healing acute and chronic wounds and scar remodeling. This review article reviews the current state of treatment of chronic wounds using mesenchymal stem cells.

Key words: wound healing, chronic wounds, mesenchymal stem cells

Úvod

V súčasnosti predstavujú zle hojace sa rany veľký medicínsky problém, ktoré moderná medicína nevie uspokojivo liečiť. Napriek veľkej snahe, nákladnému výskumu a vysokému stupňu moderných technológií v zdravotníctve zostáva liečba chronických rán, veľkým medicínskym, ekonomickým a spoločenským problémom. Okrem štandardných postupov konzervatívnej medicíny sa skúšajú rôzne prístupy biologickej liečby, liečba, medom, liečba chronických rán s larvami muchy bzučavky (Čambal et al., 2012). Veľké nádeje sa vkladajú do bunkovej liečby s použitím mezenchymových kmeňových buniek (MKB). Bunková liečba znamená využitie zdravých a vitálnych ľudských kmeňových buniek na obnovenie funkcie tkanív, hojenie rán, na regeneráciu poškodených štruktúr a podpore hojacich procesov. V tejto práci chceme predstaviť experimentálne práce a klinické štúdie o využití kmeňových buniek v liečbe chronických rán.

Typy kmeňových buniek

Kmeňové bunky (KB) sú nediferencovanou skupinou buniek u všetkých mnohobunkových organizmov, ktoré majú schopnosť sebaobnovy a diferenciácie na akýkoľvek typ bunky. Tieto vlastnosti ich odlišujú od ostatných typov buniek. Vysoká proliferačná schopnosť, široký diferenciačný potenciál, schopnosť sebaobnovy dávajú KB kľúčovú úlohu v zachovávaní tvaru a funkcie orgánov a regenerácii poškodených štruktúr.

Podľa pôvodu môžeme KB rozdeliť na embryonálne alebo adultné. Embryonálne KB patria do skupiny pluripotentných kmeňových buniek. Pochádzajú z vnútornej vrstvy embrya v štádiu

blastocysty, 4-5 deň po fertilizácii. Ich terapeutických potenciál doposiaľ nebol využitý či už z náboženských alebo etických dôvodov, riziko môže predstavovať aj rozvoj teratómov po podaní embryonálnych KB. Adultné KB sa nachádzajú v dospelom organizme. Sú zodpovedné za regeneráciu orgánov a obnovu "starých" a poškodených buniek. Počas bunkového cyklu ostávajú v pokojovej fáze bunkového cyklu, čomu sa pripisuje ich schopnosť sebaobnovy a diferenciácie na špecializované bunky. Na rozdiel od EKB nachádzajú v modernej medicíne čoraz väčšie terapeutické uplatnenie. Podľa diferenciačného potenciálu možno kmeňové bunky rozdeliť na totipotentné, pluripotentné a multipotentné. Medzi totipotentné bunky zaradujeme embryonálne KB, schopné vytvoriť celý organizmus vrátane tkanív potrebných na vývoj jedinca. Pluripotentné bunky su schopné sa diferencovať do všetkých viac ako 200 typov buniek organizmu. Nie su však schopné "vytvoriť" nového jedinca, pretože nie su schopné vytvoriť embryonálne tkanivá (trofoblast). Pre svoje neobmedzené samoobnovovanie v nediferencovanej forme a pre širokú diferenciačnú schopnosť (pluripotencia) sa môžu diferencovať do všetkých buniek zárodočných listov. Multipotentné kmeňové bunky sú obmedzené ako v raste tak v diferenciacii. Dávajú vznik tkanivovo špecifickým bunkám (hematopoetické, mezenchymové, epiteliálne, hepatálne, neuronálne). Pre liečbu chronických a zle hojajících sa rán sú biologicky vhodné a pre dostupnosť aj klinicky použiteľné mezenchymové kmeňové bunky (MKB).

MKB a chronické rany

Chronické a nehojajících rany môžeme definovať ako defekty pri, ktorých dôchádza ku spomaleniu alebo zastaveniu fyziologického procesu hojenia. Podľa Európskej asociácie pre manažment rán ide o trvanie minimálne 6 týždňov. Len v USA sa počet pacientov liečených na chronické rany odhaduje na 5,7 milióna, pričom celkové náklady spojené so zdravotnom starostlivosťou predstavujú 20 miliárd dolárov ročne. Viac ako 50% týchto rán nereaguje na konzervatívnu liečbu. Príčiny vzniku chronických rán sú multifaktoriálne. Rôzne faktory predlžujú jednu alebo všetky fázy hojenia, čím spomaľujú celý proces uzatvárania rán. Z lokálnych príčin sa jedná najmä o infekciu v rane, nekrózu, zvýšenú exsudáciu, tkanivovú hypoxiu, zvýšenú infiltráciu rany zápalovými cytokínmi (Diegelmann et al., 2004). Taktiež komorbidita pacienta, malnutricia, imobilita, pridružené ochorenia, ako aj zlý manažment terapie prípadne „non-compliance“ pacient vedie ku nárastu pacientov s chronickými ranami. Nadmerná infiltrácia neutrofilmi, zodpovednými za chronický zápal, sú dnes považované za marker chronických rán. Neutrofily uvoľňujú značné množstvo enzýmov ako napr. kolagenázy, ktoré rozkladajú extracelulárnu matrix. Okrem toho neutrofily uvoľňujú enzým elastázu ktorý je schopný deštruovať faktory ako PDGF a TGF, potrebné na regeneráciu tkanív a bunkovú diferenciáciu.

Mezenchymálne kmeňové bunky (MKB) nachádzame v rôznych tkanivách ako tukové tkanivo, kostná dreň, svaly, synoviálna tekutina, pupečníková krv a iné. V in vivo štúdiách bol zistený významný regeneračný potenciál v dôsledku rôznych mechanizmov, ktoré budú aktivované pri pôsobení biochemických faktorov, ktoré sú charakteristické pre prostredie poranených tkanív. MSC sa zapájajú do všetkých troch fáz procesu hojenia. Transplantované MKB lokálne vplývajú na hojenie piatimi rôznymi spôsobmi: (1) podpora zvýšenia angiogenézy, (2) pokles miestneho zápalu, (3) anti-apoptotická a chemotaktická signalizácia, (4) zloženie extracelulárnej matrix. Štúdie preukázali, že aplikácia MSC počas aktívnej imunitnej odpovede vedie ku poklesu sekrécie prozápalových cytokínov ako TNF, IFN a IL-2 a súčasne sa zvyšuje tvorba protizápalových cytokínov ako IL-10 a IL-4 (Aggarwal et al., 2005) Práve tieto protizápalové vlastnosti môžu zabezpečovať progresiu hojenia do ďalšej fázy. V súčasnej dobe je zrejmé, že MKB majú antimikrobiálnu aktivitu, čo má zásadný význam pre hojenie pri redukcii infekcie v rane. Antimikrobiálna aktivita je sprostredkovaná dvoma mechanizmami: priamo, cez sekrécie antimikrobiálnych proteínov ako LL-37 patriacich do skupiny katelicidínov (Krasnodembskaya et al. 2010), a alebo nepriamo prostredníctvom sekrécie imunomodulačných faktorov, ktoré ovplyvňujú fagocytózu imunitných buniek (Mei et al., 2010) MKB in vivo môžu migrovať do miesta poranenia ako reakcia na chemotaktické signály spojené so zápalom, obnovou poškodených tkanív a regeneráciou tkanív. Vplyv MKB sa pozoroval rovnako na T-buniek aj B-buniek (Ren et al., 2008; Chamberlain et al., 2007). T-bunky MKB podporujú v proliferácii a aktivite v mieste poranenia, naopak pri B-bunkách a NK-bunkách dochádza ku potlačeniu ich proliferácie, teda ku zmierneniu akútnej zápalovej odpovede. MKB podľa mnohých štúdií vylučujú rastové faktory podieľajúce sa na regenerácii tkanív ako sú VEGF, PDGF, bFGF, EGF, keratinocytový rastový faktor (KGF), a TGF. Štúdie ukazujú, že mnoho typov buniek, vrátane epitelových buniek,

endotelových buniek, keratinocytov a fibroblastov odpovedajú na parakrinné signály MKB, ktoré regulujú množstvo rôznych bunkových odpovedí vrátane proliferácie, migrácie, a expresie génov. MKB vplyvajú aj na angiogénu a vaskularitu. Angiogéna je nutná na zabezpečenie dodávky fibroblastov zodpovedných za vytváranie granulačnej matrix. Nedostatočná mikrovaskularita na spodine rany môže inhibovať hojenie a viesť k rozvoju chronických rán. MKB produkujú tiež cytokíny FGF a VEGF-A, ktoré podporujú mitogénnu aktivitu, diferenciáciu a proliferáciu cievnych endotelových buniek (Gruber et al., 2003, Keigler et al., 2003). MKB tiež exprimujú adrenomedulín ako parakrinný faktor na podporu cievnej stability a vazoprotekcie (Renault et al., 2003). Preto MKB v lôžku rany môžu prispievať ku tvorbe dobre vaskularizovaného granulačného tkaniva, podporujú reepitelizáciu v rane, zmiernujú tvorbu fibrózneho tkaniva. Existujú in vitro štúdie podľa, ktorých je možné predpokladať diferenciáciu MKB do dermálnych typov buniek. Na základe in vitro definovaných podmienok došlo ku transdiferenciácii MKB do keratinocytov, mikrovaskulárnych endoteliálnych buniek a epidermálnych buniek (Sasaki et al., 2008; Fu et al., 2009; Lozito et al., 2006). Napokon sa MKB môžu tiež transdiferencovať do keratinocytov schopných komunikovať s prirodzenými epidermálnymi bunkami (Wu et al., 2010). Tieto štúdie naznačujú, že MKB sa môžu priamo zúčastňovať štruktúrnej regenerácie dermálneho a epidermálneho tkaniva.

Yoshigaw et al. (2008) vykonali jednu z najväčších štúdií na súbore 20 pacientov z chronickými ranami rôznej etiológie aplikovali autológne MKB získane z kostnej drene, kultivované na kolagénovej špongii. 90% rán sa zhojilo kompletne práve po pridaní MKB. Dash et al. (2000) uskutočnili randomizovanú jednu z prvých kontrolných štúdií na súbore 24 pacientov s anamnézou diabetes melitus s nehojacimi sa ulkusmi predkola. Podávané boli autológne MKB z kostnej drene intramuskulárne a priamo na defekt. Po 12 týždňoch došlo k výraznému zmenšeniu rán (72% verzus 25%) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Iná randomizovaná kontrolná štúdia realizovaná v roku 2011 na vzorke 41 pacientov s diabetickými nohami a kožnými ulkusmi, sledovala systémové podávanie autológnych MKB z kostnej drene. Do jednej dolnej končatiny bolo intramuskulárne aplikované autológne MKB a do druhej dolnej končatiny bol aplikovaný fyziologický roztok ako placebo. U skupiny s autológnymi MKB bola znížená bolestivosť pri chôdzi postihnutej končatiny a významný nárast rýchlosti hojenia ulkusov po 24 týždňoch, v porovnaní s kontrolnou skupinou. Dohromady tieto klinické štúdie naznačujú prospešnosť využitia MKB v liečbe chronických rán či už pri systémovom alebo lokálnom aplikácii.

Diskusia a záver

Hojenie rán prebieha fyziologicky pod dohľadom rôznych druhov buniek, rastových faktorov a ECM. Predklinické a klinické štúdie potvrdzujú zapojenie MKB do viacerých oblastí procesov hojenia. Ako uvádza literatúra mezenchýmálne kmeňové bunky sa zapájajú do všetkých troch fáz hojenia rán. Koordinujú účinky zápalových buniek, inhibujú účinky prozápalových cytokínov ako sú TNF a IFN. Ovplyvňujú infekčný potenciál v chronických ranách priamou sekréciou antimikrobiálnych faktorov zo skupiny katelicidínov a stimuláciou fagocytózy. Podporujú prechod zo zápalovej do proliferatívnej fázy hojenia, prostredníctvom rastových faktorov ako sú VEGF, bFGF, KGF. Podporujú remodeláciu fázu ovplyvňovaním zloženia ECM. Podporujú angiogénu a vaskularitu v mieste rany. V neposlednom rade je to schopnosť diferenciácie MSC do rôznych typov buniek, vrátane epiteliálnych či dermálnych.

Biomedicínsky výskum kmeňových buniek sa snaží preniesť získané skúsenosti o pozitívnych vlastnostiach MKB pri liečbe chronických chorobných stavov z experimentov na zvieratách do humánnej medicíny. Jednou z výnimočných vlastností MKB je, že svojim pôsobením dokážu nahradiť pôsobenie mnohých liekov, bez vedľajších a nežiadúcich účinkov. Klinické použitie MKB na liečbu chronických rán si vyžaduje náročný a komplexný výskum. Okrem hľadania nových biologických vlastností MKB treba vyriešiť, akým spôsobom, v akej indikácii, v akej dávke a frekvencii treba MKB správne používať na liečbu zle hojajúcich sa rán u chronických pacientov. Treba riešiť tiež medicínsko-etické a zdravotnícko-legislatívne aspekty aplikácie MKB pri biomedicínskom použití u pacientov. Biomedicínsky výskum MKB ako metóda autológnej alebo allogénnej transplantácie buniek je otvorený pre nové prístupy a riešenia. Musíme zdôrazniť, že regeneratívna medicína a bunková liečba má podporu aj v Európskej únii, ktorá vyžaduje zakladanie verejných tkanivových bánk pre izoláciu, kultiváciu a skladovanie dospelých MKB. Kmeňové bunky môžu byť kľúčom k liečbe mnohých ochorení pri ktorých je potrebná obnova poškodeného tkaniva. Preto sú čoraz dôležitejšie pri liečbe

viacerých ochorení, regenerácii postihnutého organizmu a efektívnom hojení zle sa hojacích rán. Vzhľadom na rozsah a náročnosť liečby chronických a zle hojacích sa rán o MKB uvažovať ako jednej z možností liečby.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom MZ SR č. 2007/36-UK-07 a grantom VEGA č. 1/0706/11.

Použitá literatúra

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-1822.
2. Čambal M, Zonča P, Labaš P, et al. Metódy debridementu v liečbe chronických rán. *Slov. chir.* 2012; 9(4):126-129.
3. Dash NR, Dash SN, Routray P et al. Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res.* 2009;12:359-366.
4. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-289.
5. Fu X, Fang L, Li X, et al. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen.* 2006;14:325-335.
6. Gruber R, Kandler B, Holzmann P, et al. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng.* 2005, 11:896-903.
7. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-2749.
8. Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, Mooney DJ. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng.* 2003;9:95-103.
9. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010;28:2229-38.
10. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem.* 2009;107:714-722.
11. Lu D, Chen B, Liang Z et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92:26-36.
12. Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1047-1057.
13. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Stem Cell.* 2008;2:141-150.
14. Renault MA, Roncalli J, Tongers J, et al. The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. *Circ Res.* 2009;105:818-826.
15. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008;180(4):2581-7.
16. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I et al. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121:860-877.