



LEKÁRSKA FAKULTA
Univerzita Komenského
v Bratislave

**ZBORNÍK ŠTUDENTSKÝCH VEDECKÝCH PRÁC
2026**

64. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTskej VEDECKej ODBORNEJ ČINNOSTI

A

21. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK

2026

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

Zostavovateľ:

Recenzent zborníka

Práce boli posúdené v nezávislom recenznom konaní.

Ilustrácia na obálke



Publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 (vyžaduje sa: povinnosť uvádzať pôvodného autora, len nekomerčné použitie, nezasahovať do diela). Viac informácií o licencií a použití diela:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



<https://stella.uniba.sk/texty/.....>

Vydavateľ

Univerzita Komenského v Bratislave, 2026

ISBN (online)



LEKÁRSKA FAKULTA
Univerzita Komenského
v Bratislave

64. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
21. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV

VYŽIADANÁ PREDNÁŠKA

RNDr. Boris Klempa, DrSc.
Virologický ústav Biomedicínskeho centra SAV
v Bratislave

64. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
PREDKLINICKÁ SEKCIA

1. Úloha biochemického skríningu v odhade rizika chromozómových a vývojových porúch plodu

Adam Lukáč

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, LF UK a UNB, Bratislava

2. Nasal carriage screening of Staphylococcus aureus in the students of medicine at the Comenius University in Bratislava

Viktória Palkechová, Clara Anna Irmgard Schrey

Mikrobiologický ústav LF UK a UNB, Bratislava

3. Ultraštruktúrna analýza hipokampu myší s deficitom deoxyribonukleázy gamma

Patrik Krhút, Samuel Palkovič

Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LF UK, Bratislava

4. Systematická preparácia vybraných jemných neurovaskulárnych štruktúr ako metodicko-deskriptívny prístup v topografickej anatómii

Karol Babčan

Anatomický ústav LF UK, Bratislava

5. Advanced Preparation Techniques of the Abdominal Vascular System

Timotej Filip Janáč, Lukáš Duroška, Nikita Valerievič Berezhetskiy

Institute of Anatomy FM CU, Bratislava

6. Multilayered anatomical dissection of female pelvis using midline sagittal sectioning for educational demonstration of deep structures and organ topography for medical and surgical training: a methodical approach

Benjamin Mimler

Institute of Anatomy FM CU, Bratislava

7. A Comparative Model of Pulmonary Surface Topography versus the Internal Conducting Framework and Advanced Dissection and Preservation of the Laryngo-tracheal axis

Lukáš Duroška, Timotej Filip Janáč, Nikita Valerievič Berezhetskiy

Institute of Anatomy FM CU, Bratislava

**64. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
KLINICKÁ SEKCIA**

8. Tvorba oxidu dusnatého môže súvisieť s epitelovo-mezenchýmovou premenou nádorových buniek v karcinóme pankreasu

Natália Zorgovská

Ústav patologickej anatómie, LF UK a UNB, Bratislava

9. Retrospektívna analýza zlomenín mandibuly v súbore 660 pacientov

Matúš Lehoťák

Klinika ústnej, čeľustnej a tvárovej chirurgie LFUK a UNB, Bratislava

10. Vznik peritonzilárneho abscesu na kontralaterálnej strane po jednostrannej absces-tonzilektómii

Barbora Blšťáková

Detská otorinolaryngologická klinika LF UK a NÚDCH, Bratislava

11. Determinanty nemocničnej mortality u hospitalizovaných pacientov s COVID-19

Robert Kovács

V. interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

12. Úloha nádorového mikroprostredia v regulácii angiogenézy kolorektálneho karcinómu

Peter Bakič, Martina Šimková

Ústav patologickej anatómie, LF UK a UNB, Bratislava

13. The bidirectional relationship between type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke

Viktoriia Tiahur

Faculty of Medicine, Department of Faculty Therapy, Uzhhorod National University, Ukraine,
St. Martin Hospital, Mukachevo, Ukraine

VYŽIADANÁ PREDNÁŠKA

Mgr. Lenka Hrobárová

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK

Forbes Top Influencer 2025

„Skúmavka“

64. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ SEKCIA

14. Čo určuje degradáciu NETov počas sepsy? Úloha ich proteínového zloženia

Mgr. Letícia Hudecová

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

15. Modulácia receptoru pre formylované peptidy tlmí neutrofilovú chemotaxiu a tvorbu neutrofilových extracelulárnych pascí v sterilnom zápale, pričom zachováva antimikrobiálnu aktivitu pri sekundárnej infekcii

Mgr. Emil Bečka

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

16. Jaliliho syndróm: longitudinálne sledovanie atypického fenotypu a identifikácia nového variantu v CNNM4 géne

MUDr. Klára Hodálová

Klinika detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH, Bratislava

17. Štúdium antibakteriálnych vlastností enzýmov DNáza I a DNáza1L3

Mgr. Filip Baran

Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

18. Urinary biomarker panel for early detection of kidney injury in children with type 1 diabetes mellitus

Iryna Vikhrova

Sumy State University, Sumy, Ukraine

Umeå University, Sweden

**64. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
KLINICKÁ SEKCIA**

19. Tear film changes following anterior segment surgery

MUDr. Rafaella Datseri

University General Hospital of Heraklion PAGNI

20. Optimálne načasovanie chirurgickej korekcie kongenitálnej ezotropie: retrospektívna kohortová analýza 86 pacientov

MUDr. Daniel Havalda

Klinika detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH, Bratislava, Oftalmologické pracovisko Nemocnice Bory, Bratislava

21. Klinický prínos a diagnostická presnosť shear-wave elastografie v porovnaní s tranzientnou elastografiou (štúdia ASTEL)

MUDr. Dana Dudová

V. interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

22. Pars plana vitrektómia s peelingom vnútornej limitujúcej membrány so vzduchovou tamponádou v liečbe idiopatických makulárnych dier

MUDr. Peter Kadlic

Klinika oftalmológie LFUK a UNB, Bratislava

23. Znížená funkcia obličiek je spojená s nižšou denzitou stavca L1 podľa oportunistickej počítačovej tomografie: porovnanie rôznych klinicky dostupných nástrojov

MUDr. Alexander Jančuška

V. interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

24. The Role of the Pineal Gland in Cardiovascular Health

Francesca Sulas

Department of Clinical and Experimental Sciences, Università degli Studi di Brescia, Italy

VEDECKÉ PRÁCE

ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

1. Úloha biochemického skrínungu v odhade rizika chromozómových a vývojových porúch plodu

Adam Lukáč

(všeobecné lekárstvo, 2. ročník)

Spoluautori: MUDr. Katarína Melišová, CSc., MUDr. Pavol Ďurina, Ing. Dana Ivanišová, MUDr. Martina Čulenová, PhD.

Školiteľ: MUDr. Štefan Harsányi, PhD.

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB

Úvod

Prenatálny skrínung predstavuje súbor klinických, biochemických, ultrasonografických a genetických postupov, ktorých cieľom je včas identifikovať gravidity so zvýšeným rizikom chromozómových abnormalít a závažných vývojových porúch plodu. Vrodené poruchy sú definované ako štrukturálne alebo funkčné anomálie vznikajúce počas intrauterinného vývoja, ktoré možno zachytiť prenatálne, pri narodení alebo neskôr v dojčenskom veku. Približne 3 % až 5 % gravidít je komplikovaných vrodenou chybou [1] alebo genetickou poruchou a chromozómové abnormality sa vyskytujú približne u 1 zo 150 živonarodených detí. [2]

Najčastejšou chromozómovou abnormalitou kompatibilnou so životom je trizómia 21, teda Downov syndróm, ktorého incidencia sa v populácii uvádza približne 1 : 700 až 1 : 800 živonarodených detí.[3] Medzi ďalšie klinicky významné aneuploidie patria trizómia 18 (Edwardsov syndróm) a trizómia 13 (Patauov syndróm). Riziko numerických chromozómových abnormalít narastá s vyšším vekom matky, preto vek matky zostáva významnou súčasťou individuálneho odhadu rizika.[2, 3]

Rozvoj prenatálnej diagnostiky úzko súvisí so zdokonalením ultrasonografie a invazívnych diagnostických výkonov. Významný posun prinieslo zavedenie real-time gray-scale ultrasonografie v 70. rokoch 20. storočia, ktoré umožnilo presnejšie hodnotenie gravidity už v skorších štádiách a zlepšilo detekciu viacerých malformácií plodu.[4] V klinickej praxi sa na definitívne potvrdenie chromozómovej abnormality využívajú invazívne diagnostické metódy, najmä amniocentéza a odber choriových klkov. Amniocentéza patrí medzi najčastejšie používané invazívne prenatálne diagnostické výkony a vykonáva sa pod ultrazvukovou kontrolou.

Významným medzníkom bolo vydanie dokumentu ACOG Practice Bulletin No. 77 v roku 2007, ktorý odporučil ponúknuť skrínung aneuploidii alebo invazívne diagnostické testovanie všetkým tehotným ženám, ideálne už pri prvej prenatálnej návšteve. Tento prístup významne rozšíril dovtedajší model, v ktorom boli takéto vyšetrenia primárne odporúčané najmä ženám so zvýšeným rizikom vrodených a chromozómových porúch plodu. [3]

1 Materiál a metódy

2 Táto práca predstavuje predbežnú retrospektívnu analýzu databázy prenatalných vyšetrení
3 realizovaných v rokoch 2010 až 2012 na Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky
4 Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Do databázy boli zaradené prípady
5 indikované na prenátálne genetické vyšetrenie. Pre výsledkovo orientovanú analýzu boli
6 vyčlenené prípady s evidovaným cytogenetickým vyšetrením plodovej vody získanej
7 amniocentézou. V prípadoch, keď pacientka s navrhovaným invazívnym vyšetrením
8 nesúhlasila, prípadne nebol dostupný hodnotiteľný výsledok, bol takýto prípad v databáze
9 ponechaný len evidenčne a nebol zahrnutý do analýzy diagnostickej výťažnosti. Všetky údaje
10 boli pred spracovaním anonymizované.

11 Z databázy boli získané tieto premenné: rok vyšetrenia, vek pacientky, hlavná indikácia na
12 prenátálne vyšetrenie, doplnkové indikačné údaje, suspektná diagnóza, gestačný vek,
13 ultrazvukový gestačný vek, hodnota AFP (alfa-fetoproteínu) v plodovej vode, typ vyšetrenia,
14 typ cytogenetického vyšetrenia, výsledok vyšetrenia, doplnkový textový opis výsledku a
15 poznámky. Pre exploratívnu analýzu AFP v plodovej vode boli zahrnuté prípady s dostupnou
16 hodnotou AFP a s gestačným vekom 14.-20. týždeň, pre ktoré boli dostupné referenčné
17 hodnoty podľa gestačného veku. Výsledky boli rozdelené na negatívne nálezy, chromozómové
18 aberácie, pravdepodobne nepatogénne varianty, vývojové chyby alebo štrukturálne anomálie,
19 monogénové alebo iné genetické poruchy a nejasné alebo neúspešné výsledky. Pri analýze
20 gestačného veku boli z opisnej štatistiky vyradené zjavne chybné zapísané hodnoty.

21 Štatistické spracovanie bolo realizované pomocou programov MS Excel^[5] a IBM SPSS Statistics
22 for Windows, version 29.0.^[6] Kategorické premenné boli vyjadrené ako absolútne a relatívne
23 početnosti. Spojité premenné boli opisované pomocou priemeru a štandardnej odchýlky, resp.
24 mediánu a interkvartilového rozpätia podľa charakteru distribúcie. Na porovnanie spojitých
25 premenných medzi dvoma skupinami je vhodné použiť Mannov-Whitneyho U test, pri
26 viacerých skupinách Kruskalov-Wallisov test. Asociácie medzi kategorizovanými premennými
27 je vhodné hodnotiť chí-kvadrát testom, resp. Fisherovým exaktným testom pri nízkych
28 očakávaných početnostiach. Hladina štatistickej významnosti bola stanovená na $p < 0,05$.
29 Vzhľadom na predbežný charakter práce sú všetky inferenčné analýzy interpretované
30 exploratórne.

31

32 Výsledky

33 V študovanom súbore bolo analyzovaných 1249 záznamov, z toho 383 z roku 2010, 404 z roku
34 2011 a 462 z roku 2012. Cytogenetické vyšetrenie bolo realizované v 1192 prípadoch. Vek
35 matiek sa pohyboval od 15 do 46 rokov, s priemerným vekom 33,35 roka. Najpočetnejšie boli
36 pacientky vo veku 35 a 36 rokov. Amniocentéza bola vykonaná medzi 14. a 24. gestačným
37 týždňom, najčastejšie v 18. týždni gravidity. Hodnoty AFP v plodovej vode sa pohybovali v
38 rozmedzí 2677 až 254394 kIU/l, s priemernou hodnotou 11145 kIU/l. S rastúcim gestačným
39 vekom surové hodnoty AFP klesali, preto bola pri ďalšej analýze použitá aj gestačne
40 štandardizovaná hodnota AFP vyjadrená ako MoM. Okrem cytogenetického vyšetrenia boli v
41 menšom počte prípadov využité aj ďalšie metódy, najmä PCR, DNA analýza, FISH, vybrané
42 molekulárno-genetické vyšetrenia a metabolické testy podľa konkrétnej indikácie.

43 Najčastejšou hlavnou indikáciou prenatalného vyšetrenia bol vek matky ($n = 598$),
44 nasledovaný skupinou pozitívny biochemický skríning bez ďalších údajov ($n = 510$). Menej

často boli zastúpené indikácie na základe patologického ultrazvukového nálezu ($n = 29$) a indikácie pre poruchy neurálnej trubice ($n = 12$). Do skupiny iných špecifických indikácií bolo zaradených 43 prípadov. Vek matky sa medzi jednotlivými indikačnými skupinami významne líšil ($p < 0,001$). Najvyšší vek bol prítomný v skupine indikovanej pre vek matky. Rozdiel bol zaznamenaný aj pri gestačnom veku v čase odberu ($p < 0,001$), pričom mierne vyšší gestačný vek bol pozorovaný pri ultrazvukových a iných špecifických indikáciách.

Cytogenetické a doplnkové vyšetrenia

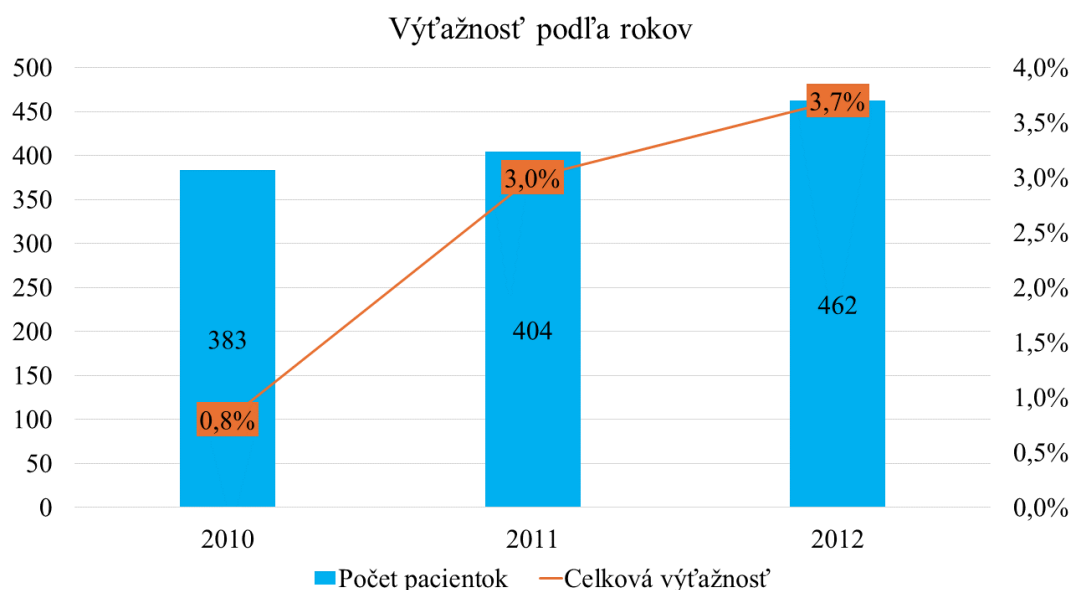
Vo väčšine prípadov bol zachytený normálny nález. Po harmonizácii výsledkov bolo identifikovaných 30 jednoznačných chromozómových aberácií, čo predstavovalo približne 2,5 % cytogeneticky vyšetrených prípadov. Najčastejšie bola potvrdená trizómia 21, nasledovaná trizómiou 18 a Turnerovým syndrómom. Menej často boli zachytené aj Patauov syndróm, Klinefelterov syndróm, Jacobsov syndróm a Pallisterov-Killianov syndróm. V menšej časti záznamov boli prítomné nepatologické chromozómové varianty alebo balansované translokácie. Ojedinele boli zachytené aj závažné vývojové chyby plodu pri normálnom karyotype, najmä poruchy neurálnej trubice a komplexné malformácie. Malú samostatnú skupinu tvorili monogénové alebo nechromozómové genetické poruchy.

Najvyššia miera diagnostického záchytu chromozómových aberácií bola zaznamenaná v skupine iných špecifických indikácií (viď. Tab. 1), kde výťažnosť dosiahla 16,3 %. Pri patologickom ultrazvukovom náleze bola výťažnosť 10,3 %. Pri indikácii z dôvodu veku matky bola výťažnosť 2,2 %, zatiaľ čo v skupine pozitívny biochemický skríning bez ďalších údajov dosiahla 1,4 %. V skupine indikovanej pre poruchy neurálnej trubice nebol zaznamenaný žiadny chromozómovo pozitívny nález. Rozdiel medzi skupinami bol významný ($p < 0,001$).

Tab. 1 - Výťažnosť chromozómových aberácií podľa hlavnej indikácie vyšetrenia

Hlavná indikácia	Pozitívne / všetci	Výťažnosť
Iné špecifické indikácie	7 / 43	16,3 %
USG nález	3 / 29	10,3 %
Vek matky	13 / 598	2,2 %
Pozitívny biochemický skríning bez ďalších údajov	7 / 510	1,4 %
NTD / porucha neurálnej trubice	5 / 42	11,9 %

V tejto selektovanej kohorte sa vek matky neukázal ako rozlišujúci faktor medzi chromozómovo pozitívnymi a negatívnymi prípadmi ($p = 0,814$). Rovnaký záver platil aj pri porovnaní skupín podľa hranice ≥ 35 rokov vs. < 35 rokov ($p = 1,000$). Pri porovnaní jednotlivých rokov bol pozorovaný nárast miery positivity z 0,8 % v roku 2010 na 3,0 % v roku 2011 a 3,7 % (viď. Obrázok 1.) v roku 2012 ($p = 0,026$).



Obrázok 1. Výťažnosť vyšetrení podľa rokov.

Pri analýze suspektnej diagnózy bola najvyššia výťažnosť zaznamenaná pri USG/VVCH náleze a pri suspektnej trizómii 18 (viď. Tab. 3). Nižšia výťažnosť bola prítomná pri NTD a pri suspektnej trizómii 21. Rozdiel medzi skupinami bol významný ($p < 0,001$).

Tab. 2 - Diagnostická výťažnosť podľa suspektnej diagnózy

Suspektná diagnóza	Pozitívne / všetci	Výťažnosť
USG / VVCH nález	6 / 21	28,6 %
Suspektná T18	4 / 21	19,0 %
NTD / porucha neurálnej trubice	5 / 42	11,9 %
Suspektná T21	12 / 391	3,1 %

Gestačne štandardizovaná analýza AFP bola realizovaná v podsúbore 1077 prípadov s dostupnou hodnotou AFP, hodnotiteľným gestačným vekom a jednoznačným zápisom AFP. Po prepočte na AFP MoM bol medián 1,04 a interkvartilové rozpätie 0,83–1,29. Surové hodnoty AFP signifikantne klesali s rastúcim gestačným vekom ($p = -0,435$, $p < 0,001$). Po prepočte na AFP MoM tento vzťah vymizol ($p = -0,023$, $p = 0,449$). Pri porovnaní prípadov s chromozómovou aberáciou a bez chromozómovej aberácie sa AFP MoM signifikantne nelíšilo. Medián AFP MoM bol pri chromozómových aberáciách 0,84 oproti 1,04 v ostatných prípadoch ($p = 0,052$). Nepotvrdila sa ani asociácia medzi chromozómovou aberáciou a prekročením hornej hranice referenčného intervalu AFP ($p = 1,000$).

Odlišná situácia bola pozorovaná pri skupine potvrdených štrukturálnych a vývojových porúch plodu. V tejto skupine boli hodnoty AFP MoM výrazne vyššie než v ostatných prípadoch. Medián AFP MoM dosiahol 12,94 oproti 1,04 v skupine bez štrukturálnej alebo vývojovej chyby ($p < 0,001$). Zároveň všetky hodnotiteľné prípady so štrukturálnou alebo vývojovou chybou mali AFP nad hornou hranicou referenčného intervalu ($p < 0,001$).

Tieto výsledky naznačujú, že AFP v plodovej vode malo v sledovanom súbore väčší význam pri zachytení štrukturálnych vývojových porúch plodu než pri odhade rizika chromozómových aberácií.

Diskusia

Predložené predbežné výsledky potvrdzujú, že biochemický skríning mal v sledovanom období význam najmä ako selektívny nástroj na identifikáciu gravidít so zvýšeným rizikom, ktoré následne smerovali k invazívnej prenatalnej diagnostike. Tento koncept zodpovedá dlhodobému vývoju prenatalného skríningu, ktorý sa od pôvodného využitia AFP pri detekcii porúch neurálnej trubice postupne rozšíril o kombinované algoritmy zahŕňajúce ultrazvukové a biochemické parametre a neskôr aj cfDNA (Cell-free DNA)/NIPT(Non-invasive Prenatal Testing). Základný princíp však zostáva rovnaký: skríning odhaduje riziko, zatiaľ čo amniocentéza a ďalšie invazívne metódy poskytujú presnejšiu diagnostickú informáciu. [7–12]

V našom súbore bola najčastejšou hlavnou indikáciou vyšší vek matky, avšak samotný vek sa v už selektovanej kohorte amniocentéz neukázal ako faktor, ktorý by ďalej rozlišoval medzi chromozómovo pozitívnymi a negatívnymi prípadmi. Tento výsledok je logický, pretože vek matky predstavuje najmä vstupný rizikový faktor pre indikáciu skríningu alebo invazívneho vyšetrenia, nie nevyhnutne diskriminačný parameter v už predselektovanom súbore pacientiek. Súčasné odporúčania aj novšie prehľady preto zdôrazňujú, že rozhodovanie by nemalo byť postavené iba na veku, ale na kombinácii klinických, ultrazvukových a biochemických údajov, prípadne na postupoch založených na stratifikácii. [9, 10, 12, 13]

Významným zistením našej analýzy je vyššia diagnostická výťažnosť pri patologickom ultrazvukovom náleze a pri iných špecifických klinických indikáciách v porovnaní s indikáciou založenou iba na veku matky. Tento výsledok podporuje názor, že ultrazvukové vyšetrenie má v prenatalnom skríningu zásadnú hodnotu nielen pri detekcii štrukturálnych chýb, ale aj ako významný doplnok pri odhade rizika chromozómových aberácií. Zároveň je v súlade s novšími údajmi, podľa ktorých kombinovaný skríning a detailný ultrazvuk dokážu zachytiť aj časť atypických chromozómových odchýlok, ktoré nemusia byť zachytiteľné iba testami zameranými na najčastejšie trizómie. To je dôležité najmä pri interpretácii výsledkov v ére NIPT, keď vysoká výkonnosť pre trizómie 21, 18 a 13 neznamena úplné nahradenie ultrazvuku ani invazívnej diagnostiky pri klinickom podozrení. [14–17]

Exploratívna analýza AFP po prepočte na MoM ukázala, že po štandardizácii podľa gestačného veku sa odstránil jeho vzťah ku gestačnému veku, čo podporuje správnosť zvoleného postupu. Zároveň sa AFP MoM v našom súbore nespájal s chromozómovými aberáciami, ale výrazne sa zvyšoval pri štrukturálnych a vývojových chybách plodu. Tento výsledok je v zhode s historickou aj súčasnou úlohou AFP, ktorý je tradične viazaný najmä na detekciu otvorených defektov neurálnej trubice a ďalších malformácií, kým pri aneuploidiách má význam skôr ako súčasť viaczožkových skríningových algoritmov než ako izolovaný marker. Naše údaje tak podporujú zachovanie interpretácie AFP najmä v kontexte morfológických abnormalít a nie ako samostatného ukazovateľa chromozómového rizika. [7, 8, 10]

Zaujímavým nálezom bol aj nárast podielu pozitívnych výsledkov v priebehu sledovaných rokov. Pri interpretácii tohto trendu je však potrebná opatrnosť. Môže odrážať skutočné zlepšenie selekcie pacientok na invazívne vyšetrenie, postupné zmeny v organizácii skríningu, meniacu sa vekovú štruktúru gravidít aj širšie využívanie cielenejších diagnostických metód.

Podobné časové trendy boli opísané aj v iných populáciách, kde sa spolu so zvyšujúcim podielom gravidít vo vyššom veku menil aj podiel invazívnych výkonov a prenatálna detekcia trizómie 21 a 18 sa v čase zvyšovala. Na druhej strane, naše výsledky stále odrážajú predovšetkým obdobie pred plošným rozšírením NIPT, a preto ich nemožno priamo porovnávať so súčasnými skríningovými algoritmami bez zohľadnenia tohto metodického posunu.^[12, 13, 17]

Pri interpretácii našich výsledkov treba zohľadniť aj viaceré limitácie. Ide o retrospektívnu analýzu databázy z jedného pracoviska, pričom časť údajov bola zaznamenaná vo forme voľného textu a vyžadovala dodatočnú harmonizáciu kategórií. Nie všetky indikácie boli presne špecifikované a časť záznamov mala skôr evidenčný alebo konziliárny charakter. AFP MoM bolo navyše potrebné vypočítať z dostupných referenčných intervalov len aproximáciou podľa stredu referenčného rozpätia. Napriek tomu má súbor dobrú výpovednú hodnotu ako obraz reálnej klinickej praxe v danom období. Zároveň predstavuje vhodný základ pre ďalšie rozšírenie analýzy o nasledujúce roky, ktoré umožní presnejšie posúdiť trendy v indikáciách, zachytnosti a postupnej transformácii prenatálneho skríningu. V tomto kontexte ostáva dôležité aj kvalitné genetické poradenstvo a zrozumiteľná komunikácia limitácií skríningových testov, na čo upozorňujú aj novšie prehľady venované skúsenosti pacientok a implementácii nových skríningových.^[12, 16, 18, 19]

Záver

Predbežná retrospektívna analýza prenatálnych vyšetrení z rokov 2010 až 2012 potvrdila, že biochemický skrínig predstavoval v sledovanom období významnú súčasť prenatálnej diagnostiky, najmä ako nástroj na výber gravidít so zvýšeným rizikom pre ďalšie vyšetrenie. Najčastejšou indikáciou prenatálneho vyšetrenia bol vek matky, avšak v už selektovanej kohorte pacientiek indikovaných na amniocentézu sa vek matky neukázal ako faktor, ktorý by významne odlišoval chromozómovo pozitívne a negatívne prípady.

Najvyššia diagnostická výťažnosť bola zaznamenaná pri patologickom ultrazvukovom náleze a pri iných špecifických klinických indikáciách, čo poukazuje na význam komplexného hodnotenia rizika. Exploratívna analýza zároveň ukázala, že AFP v plodovej vode malo v analyzovanom súbore väčší význam pri zachytení štrukturálnych a vývojových porúch plodu než pri identifikácii chromozómových aberácií.

Výsledky tejto práce je potrebné interpretovať ako predbežné, keďže ide o retrospektívnu analýzu databázy s čiastočne neúplnými a heterogénne zaznamenanými údajmi. Napriek tomu práca poskytuje cenný obraz o reálnej klinickej praxi v sledovanom období a vytvára vhodný základ pre ďalšie rozšírenie analýzy o nasledujúce roky.

Referencie

1. Update on Overall Prevalence of Major Birth Defects --- Atlanta, Georgia, 1978--2005. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5701a2.htm>. Accessed 6 Apr 2026
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2015) Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book: Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book. Elsevier Health Sciences
3. Carlson LM, Vora NL (2017) Prenatal Diagnosis. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.02.004>

- 1 4. Bianchi DW (2010) *Fetology : diagnosis and management of the fetal patient*, 2nd ed. McGraw-
- 2 Hill Medical Pub. Division
- 3 5. Microsoft Corp. Microsoft Excel.
- 4 6. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows.
- 5 7. Canick JA, Saller DN, Lambert-Messerlian GM (2003) Prenatal screening for Down syndrome:
- 6 current and future methods. *Clin Lab Med* 23:395–411
- 7 8. Cuckle H, Maymon R (2016) Development of prenatal screening--A historical overview. *Semin*
- 8 *Perinatol* 40:12–22
- 9 9. Rink BD, Norton ME (2016) Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol* 40:35–43
- 10 10. Maines J, Langaker MD (2026) Prenatal Genetic Screening. *StatPearls*
- 11 11. d’Ercole C, Shojai R, Desbriere R, Chau C, Bretelle F, Piéchon L, Boubli L (2003) Prenatal
- 12 screening: invasive diagnostic approaches. *Childs Nerv Syst* 19:444–447
- 13 12. Pande S, Bansal V, Sachdeva G (2025) Prenatal screening for genetic disorders: updated
- 14 guidelines, proposed counseling, a holistic approach for primary health care providers in
- 15 developing countries. *Diagnosis (Berl)* 12:295–303
- 16 13. An Q, Huang Y, Yu F, Tao Y, Li J, Li X (2025) A retrospective analysis of 6942 amniocentesis cases.
- 17 *BMC Pregnancy Childbirth* 25:838
- 18 14. Carmichael JB, Liu H-P, Janik D, Hallahan TW, Nicolaides KH, Krantz DA (2017) Expanded
- 19 conventional first trimester screening. *Prenat Diagn* 37:802–807
- 20 15. Gadsbøll K, Vogel I, Kristensen SE, Pedersen LH, Hyett J, Petersen OB, Danish Cytogenetic
- 21 Central Register study group (2024) Combined first-trimester screening and invasive
- 22 diagnostics for atypical chromosomal aberrations: Danish nationwide study of prenatal profiles
- 23 and detection compared with NIPT. *Ultrasound Obstet Gynecol* 64:470–479
- 24 16. Ghiasi M, Armour C, Walker M, Shaver N, Bennett A, Little J (2023) Issues associated with
- 25 possible implementation of Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) in first-tier screening: A rapid
- 26 scoping review. *Prenat Diagn* 43:62–71
- 27 17. Hsiao CH, Chen CH, Cheng PJ, Shaw SW, Chu WC, Chen RC (2022) The impact of prenatal
- 28 screening tests on prenatal diagnosis in Taiwan from 2006 to 2019: a regional cohort study.
- 29 *BMC Pregnancy Childbirth* 22:23
- 30 18. Shea TL (2017) Prenatal paradox: an integrative review of women’s experiences with prenatal
- 31 screening for fetal aneuploidy and neural tube defects. *Contemp Nurse* 53:235–261
- 32 19. Shahhosseini Z, Arabi H, Salehi A, Hamzehgardeshi Z (2016) Factors Affecting Improved
- 33 Prenatal Screening: A Narrative Review. *Glob J Health Sci* 8:160–165
- 34

2. Nasal carriage screening of *Staphylococcus aureus* in the students of medicine at the Comenius University in Bratislava

Viktória Palkechová, Clara Anna Irmgard Schrey

(General Medicine, 5th year)

Co-Authors: RNDr. Lucia Janošíková; Bronislava Kmeťková; Prof. MUDr. Adriána Liptáková, PhD., MPH.

Supervisor: Mgr. Marek Straka, PhD.; RNDr. Martina Dubinová, PhD.

Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Comenius University Bratislava

Introduction

Staphylococcus aureus is a ubiquitous opportunistic human pathogen that naturally colonises human skin and mucous membranes. While it often exists as part of the commensal microbiota, it is also a versatile pathogen capable of causing a wide spectrum of infections, ranging from minor skin infections like abscesses to life-threatening diseases such as bacteremia, ventilator-associated pneumonia and surgical site infections. These infections are a leading cause of prolonged hospital stays, increased morbidity and mortality, and higher healthcare-associated costs [1,4].

Nasal carriage is recognized as a significant risk factor for the development of subsequent infections, particularly in patients undergoing surgery or those with acquired or congenital immunodeficiencies. The anterior nares serve as the primary reservoir for this pathogen in humans. Approximately 20% to 30% of the human population are persistent nasal carriers, acting as a reservoir for both community-acquired and hospital-acquired (nosocomial) infections [2,4].

The ability of *S. aureus* to colonise host surfaces is mediated by various virulence factors, including cell wall-associated proteins known as MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). These proteins, such as clumping factor B (ClfB), fibronectin-binding proteins (FnbA), and iron-regulated surface determinants (IsdA), interact with host biomolecules to facilitate adherence and persistence on the nasal mucosa. Furthermore, horizontal gene transfer plays a vital role in establishing carriage and acquiring drug resistance [4].

In recent years, significant attention has been focused on *S. aureus* due to its increasing resistance to antimicrobial agents. The emergence and spread of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains, which carry the *mecA* gene, have become a major global health concern. These strains often exhibit multidrug resistance, making the resulting infections difficult to treat [3,6]. Medical students transitioning into clinical environments represent a critical population for epidemiological study, as they may act as vectors for the cross-transmission of both community-acquired and nosocomial strains [6].

The objective of this study was to determine the prevalence of *S. aureus* nasal carriage of medical students of the faculty of medicine at Comenius University in Bratislava and to

investigate the relationship between colonisation status and specific risk factors or the subsequent development of clinical infection.

Methodology

The presence of *S. aureus* strains on the nasal mucosa of medical students of the Faculty of Medicine at Comenius University in Bratislava was assessed by the following method:

The study was conducted in two sampling phases. The first phase started in February 2025 with the second-year students. After eight months, the second phase of collection followed in December 2025 with the now third year students.

Nasal swabs were collected from the anterior nares of each student, as this site is the primary reservoir for *S. aureus* colonisation [3,4]. The swabs were handled according to standard microbiological protocols to ensure the viability of the isolates [5].

After the collection of samples, the students were also asked to fill out a brief questionnaire regarding multiple lifestyle factors. The survey contained data on sex, smoking status, allergies (inhalation), chronic or recurrent respiratory infections (RTIs), excessive use of nasal sprays, presence of nose piercing, clinical placement in healthcare facilities and antimicrobial therapy within three months prior to sampling.

The collected nasal swabs were then transferred for primary cultivation onto blood agar plates (BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany)) and followed by inoculation into nutrient broth [1,2]. These cultures were incubated under aerobic conditions at 37 °C for a duration of 18–24 hours [2]. Phenotypic identification of *S. aureus* was established through systematic microbiological evaluation, assessing their morphological growth characteristics and the production of the characteristic carotenoid pigment, staphyloxanthin and β -hemolytic activity [1,2,3]. The isolates were further differentiated based upon enzymatic profiling, which included standard assays for hyaluronidase production [1,2].

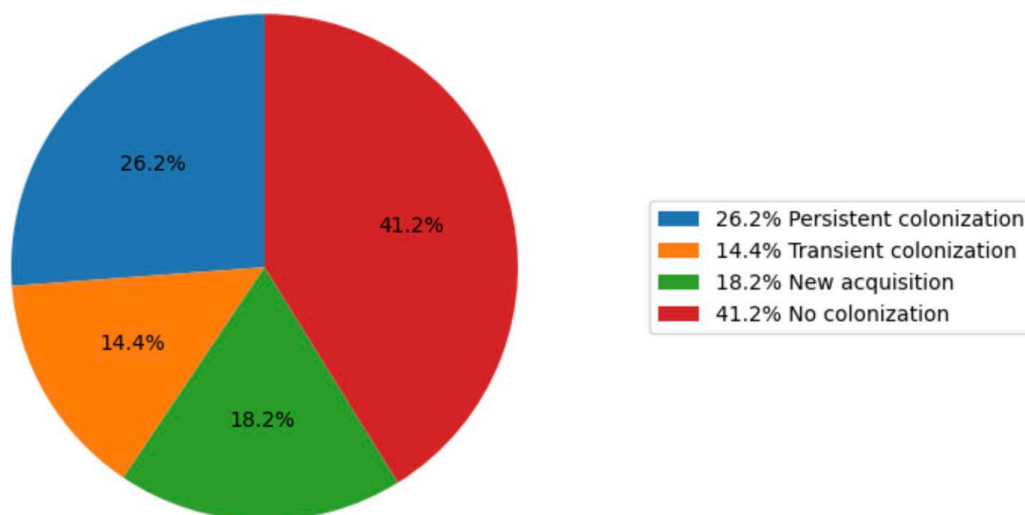
Following identification, the antimicrobial susceptibility of each isolate was determined via the Kirby-Bauer disk diffusion method on specialized agar plates [1]. This technique enabled the measurement of inhibition zones to classify the strains as sensitive, susceptible increased exposure, or resistant according to established international standards [1,4]. The antimicrobial susceptibility was assessed using the following agents: Trimethoprim-sulfamethoxazole (cotrimoxazole) (2 μ g + 23 μ g), erythromycin (15 μ g), clindamycin (2 μ g), gentamicin (10 μ g), tetracycline (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g) and mupirocin (200 μ g) (all Oxoid, Basingstoke, UK) according to EUCAST recommendations. Cefoxitin disk (30 μ g) testing was used to assess methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) [1,7].

The distribution of categorical variables between two groups was compared by using the Pearson χ^2 test. Fisher's exact test was used if the expected count was less than five in $\geq 20\%$ of cells of the 2 $\times$ 2 contingency table. All the statistical tests were performed at the level of statistical significance $\alpha = 0,05$. Data analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) [8].

Results

In the first sampling round, 138 *S. aureus* strains were isolated from the nasal mucosa of medical students, while 152 strains were isolated during the second course.

1 Persistent colonisation (i.e. detection of positive strains in both collections) was identified in
 2 89 students (26,2%). Colonisation was found in 49 students (14,4%) only in the first sampling
 3 and in 62 students (18,2%) showed newly acquired colonisation in the second sampling. A
 4 total of 140 students (41,2%) were not colonised. These results are presented in Figure 1.



5
 6 **Figure 1: Proportion of *Staphylococcus aureus* carriers among medical students based on nasal**
 7 **mucosa sampling.**

8
 9 The susceptibility of the isolated strains to the tested antimicrobial agents ranged from 55,4%
 10 to 100,0%. Most strains were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) (97,6% in the first round
 11 (R1) and 93,9% in the second round (R2)). High susceptibility was found for cotrimoxazole with
 12 100,0% in R1 and 98,6% in R2 and mupirocin with 98,5% in R1 and 100,0% in R2. The lowest
 13 susceptibility rates were observed for erythromycin with 55,4% and clindamycin with 65,6%
 14 in R1 and 58,1% and 67,6%, respectively in R2. These results are graphically depicted in Figure
 15 2.

16 During the first sample collection, the prevalence of *S. aureus* colonisation was significantly
 17 higher in male students compared to female students ($p = 0,018$).

18 No statistically significant associations were found between *S. aureus* colonisation and any of
 19 the investigated risk factors in either sampling. Similarly, no significant differences were
 20 observed between sexes in the second sampling. Detailed results are presented in Table 1.

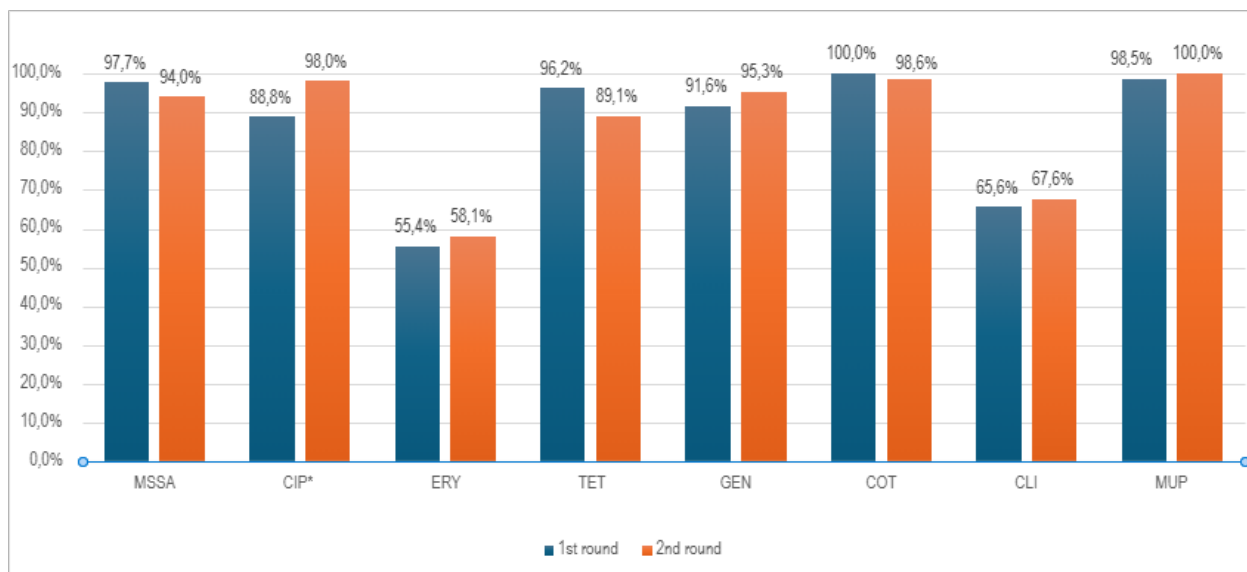


Figure 2: Antimicrobial susceptibility of *S. aureus* strains.

MSSA – methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; CIP – ciprofloxacin; ERY – erythromycin; TET – tetracycline; GEN – gentamicin; COT – cotrimoxazole; CLI – clindamycin; MUP – mupirocin. * Susceptible increased exposure

Table 1: Potential risk factors associated with *Staphylococcus aureus* colonisation.

Factor	1st round carriers	2nd round carriers
Sex	$p = 0,018$	$p = 0,052$
Smoking	$p = 0,641$	$p = 0,157$
Chronic respiratory tract infections	$p = 0,166$	$p = 0,548$
Asthma	$p = 0,266$	$p = 0,229$
Nasal spray usage	$p = 0,895$	$p = 0,634$
Inhalation allergy	$p = 0,248$	$p = 0,680$
Exposure to healthcare settings	$p = 0,199$	$p = 0,473$
Nose piercing	$p = 0,126$	$p = 0,241$
Antibiotics usage	$p = 0,286$	$p = 0,667$

Discussion

The present study investigates the prevalence of nasal carriage of *S. aureus* among medical students and the factors that may influence colonisation by this bacterium. Carriage of *S. aureus* among healthcare workers represents a significant risk factor for the development of infections in immunocompromised patients. During clinical internships, students encounter such patients and, if colonised with *S. aureus*, may act as a source of infection.

The investigation shows that 26,2% of students who were tested twice within one year were persistently colonised with *S. aureus* in their nasal mucosa. This finding is consistent with results reported in the available literature. For example, a study conducted in the United States with a similar focus, reporting with nasal colonisation in 21% of participants [10].

The overall prevalence of *S. aureus* nasal carriage increased slightly from 40,5% in the first sampling round to 44,9% in the second. Among the study population, 26,2% of students were identified as persistent carriers. Notably, 18,2% of students acquired *S. aureus* colonisation in the second round following exposure to the clinical environment. *S. aureus* is a well-known causative agent of infections in hospital settings. However, no statistically significant association was identified between exposure to the hospital environment and mucosal colonisation. On the other hand, there is evidence in the literature supporting this association, with studies identifying hospital stay or contact with a hospital environment as a significant risk factor for *S. aureus* carriage [10,11]. The difference in the findings may be attributed to the relatively young age of participants and their limited exposure to the healthcare environment.

A statistically higher rate of colonisation by *S. aureus* was present in males in comparison with females. This finding is supported by other studies. For example, a Brazilian study from 2020 identified male sex as a significant predisposing factor for nasal carriage of *S. aureus* [11].

The assessment of antimicrobial susceptibility patterns the isolated strains represents a key area of clinical importance, as determining current resistance profiles is crucial for guiding appropriate therapeutic choices and limiting the impact of antimicrobial resistance. The results indicate that the majority of isolates were methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, accounting for 97,6% in the first collection round and 93,9% in the second. Overall susceptibility to tested agents was high (55,4% - 100,0%), with near-universal sensitivity to cotrimoxazole (100,0% in R1; 98,6% in R2) and mupirocin (98,5% in R1; 100,0% in R2). In contrast, the lowest susceptibility rates were observed for erythromycin (55,4% - 58,1%) and clindamycin (65,6% - 67,6%) [2,3,4]. When compared to a study of a college-aged cohort at Hartford University (USA), the isolates in this population demonstrated higher susceptibility rates to cefoxitin, ciprofloxacin, and tetracycline. In contrast, resistance to gentamicin was markedly higher [10]. Further comparison with a 2020 Brazilian screening study revealed shared trends in the low susceptibility of erythromycin and clindamycin. However, the Brazilian cohort exhibited higher sensitivity to ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, and cotrimoxazole in comparison to our student group. A significant divergence was noted regarding cefoxitin resistance. While the student population in Bratislava remained predominantly MSSA, the Brazilian study reported a significantly higher proportion of MRSA strains, despite analysing a comparable number of isolates (n=139). This difference is likely due to the additional inclusion of hospital staff in the Brazilian study, as healthcare workers are more commonly carriers of resistant hospital-acquired strains than medical students coming from the community [11].

Based on our results, it can be concluded that students are not an exception in terms of nasal colonisation. During the second sampling (48,9%), a higher prevalence of carriage was observed compared to the first sampling (40,6%). These findings suggest that even the first semester of clinical internship, and thus regular exposure to the hospital environment, may influence the rate of colonisation.

In conclusion, a high prevalence of *S. aureus* nasal carriage was observed among medical students, with a substantial proportion of persistent carriers. Although most isolates were methicillin-susceptible, and overall antimicrobial susceptibility remained high, colonisation rates increased after clinical exposure. No significant associations with most investigated risk factors were identified, except for male sex in the initial sampling. These findings highlight the potential role of medical students in the transmission of *S. aureus* in healthcare settings and underscore the importance of awareness, infection control measures, and further monitoring during clinical training.

The study was approved by the Ethics Committee of Faculty of Medicine of Comenius University and University Hospital Bratislava (protocol code 74/2024). The informed consent was obtained from all participants. This research study was funded by the Slovak Research and Development Agency under contract No. APVV-23-0140.

References

1. Ford CA, Hurford IM, Cassat JE: Antivirulence strategies for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a mini review. *Front Microbiol* 2021; 11: 632706.
2. Bouiller K, Zeggay A, Gbaguidi-Haore H, Hocquet D, Chirouze C, Bertrand X: Epidemiology and risk factors of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* CC398 in two distinct cohorts in France. *Front Microbiol* 2022; 13: 1068420.
3. Westgeest AC, Schippers EF, Delfos NM, Ellerbroek LJ, Koster T, Hira V, Visser LG, de Boer MGJ, Lambregts MMC: Complicated carriage with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation of the effectiveness of decolonization regimens advised in the Dutch national guideline. *Antimicrob Agents Chemother* 2021; 65(9): e00257-21.
4. Cheung GYC, Bae JS, Otto M: Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 2021; 12(1): 547–569.
5. Fritz SA, Camins BC, Eisenstein KA, Fritz JM, Epplin EK, Burnham CA, Dukes J, Storch GA: Effectiveness of measures to eradicate *Staphylococcus aureus* carriage in patients with community-associated skin and soft-tissue infections: a randomized trial. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32(9): 872–880.
6. Legese H, Kahsay AG, Kahsay A et al.: Nasal carriage, risk factors and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among healthcare workers in Adigrat and Wukro hospitals, Tigray, Northern Ethiopia. *BMC Res Notes* 2018; 11: 250.
7. Straka M, Hubenáková Z, Janošíková L, Bugalová A, Minich A, Wawruch M, Liptáková A, Drahovská H, Slobodníková L: In vitro susceptibility of clinical and carrier strains of *Staphylococcus aureus* to STAFAL® phage preparation. *Int J Mol Sci* 2024; 25(23): 12885.
8. GraphPad Prism: GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Available at: <https://www.graphpad.com/>
9. Bloch N, Seneghini M, Rettenmund G, Männer J, Kuster SP, Flury D, Schlegel M, Kohler P: Success rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) decolonization and factors associated with failure over a 16-year period: an observational study. *J Hosp Infect* 2026; 167: 108–115
10. Congdon TS, Guaglione AJ, Ricketts AMO et al.: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with a college-aged cohort: lifestyle factors that contribute to nasal carriage. *Front Cell Infect Microbiol* 2023; 13: 1195758.
11. Danelli T, Duarte FC, de Oliveira TA, da Silva RS, Frizon Alfieri D, Gonçalves GB, de Oliveira CF, Tavares ER, Yamauchi LM, Perugini MRE, Yamada-Ogatta SF: Nasal carriage by *Staphylococcus*

Viktória Palkechová, Clara Anna Irmgard Schrey, Lucia Janošíková, Bronislava Kmeťková, Adriana Liptáková, Martina Dubinová, Marek Straka: Nasal carriage screening of *Staphylococcus aureus* in the students of medicine at the Comenius University in Bratislava. Zborník študentských vedeckých prác 2026. Univerzita Komenského v Bratislave, 2026.

- 1 aureus among healthcare workers and students attending a university hospital in Southern
- 2 Brazil: prevalence, phenotypic and molecular characteristics. Interdiscip Perspect Infect Dis
- 3 2020; 2020: 3808036.
- 4
- 5
- 6

3. Ultraštruktúrna analýza hipokampu myší s deficitom deoxyribonukleázy gama

Patrik Krhút, Samuel Palkovič

(všeobecné lekárstvo, 4.ročník)

Školiteľ: doc. RNDr. Martin Kopáni, PhD¹, Mgr. Jakub Szabó, PhD¹

¹Ústav lekárskej fyziky a biofyziky LF UK

Úvod

Hipokampus predstavuje kľúčovú štruktúru centrálného nervového systému, ktorá zohráva zásadnú úlohu v procesoch učenia, pamäti a priestorovej orientácie. Vzhľadom na svoju vysokú metabolickú aktivitu a citlivosť na vnútorné aj vonkajšie faktory patrí medzi oblasti mozgu obzvlášť náchylné na štrukturálne a funkčné poškodenie. Jedným z významných faktorov ovplyvňujúcich bunkovú homeostázu je správna funkcia deoxyribonukleázy gamma. Jej deficit je spájaný s narušením mitochondriálnej integrity, čo môže viesť k energetickému deficitu buniek, zvýšenej produkcii reaktívnych foriem kyslíka a následným ultraštruktúrnym zmenám v tkanive (1,2).

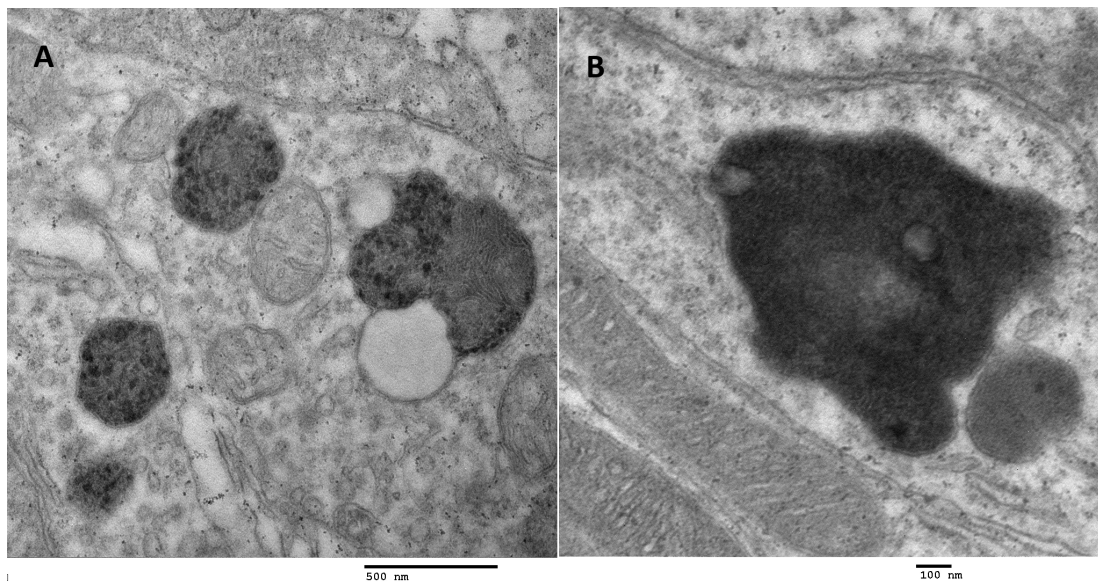
Cieľom tejto práce je analyzovať ultraštruktúrne zmeny v hipokampe myší so zameraním na štruktúru lipofuscínu v neurónoch hipokampu myší. Osobitná pozornosť je venovaná porovnaniu týchto zmien u jedincov s deficitom deoxyribonukleázy gama, s cieľom prispieť k lepšiemu pochopeniu mechanizmov vedúcich k neurodegenerácii na bunkovej úrovni.

Materiál a metódy

Vzorky hipokampu od dospelých myší oboch pohlaví s deficitom pre deoxyribonukleázu gama (n = 3) a od kontrol (n = 3) boli odobrané v stave hlbokkej inhalačnej anestézy (isoflurán) pri transkardiálnej perfundácii ľadovým fyziologickým roztokom. Následne boli vzorky fixované v 2,5 % glutaraldehydom pri teplote 4 °C a postfixované v 1 % tetroxide osmia (OsO₄), narezané na hrúbku 100 nm a vyšetrené transmisným elektrónovým mikroskopom H-7650 TEM (Hitachi, Nemecko) pri urýchľujúcom napätí 100 kV.

Výsledky

V cytoplazme neurónov hipokampu myší bez deficitu deoxyribonukleázy gama sme pozorovali tmavé oválne častice pravdepodobne lipofuscínu s malým počtom lipidových oválnych útvarov a nanometrových granúl. Vo vnútri častíc boli výrazné nanometrové, paralelne usporiadané vlákna (obr. 1A). V hipokampe neurónov myší s deficitom deoxyribonukleázy gama tieto štruktúry boli homogénnejšie s väčším počtom lipidových častíc a bez výrazných granúl (obr. 1B).



Obr.1 Hipokampus, myši, TEM.

A - lipofuscínové granuly v cytoplazme neurónov bez deficitu deoxyribonukleázy gama s lipidovými časticami, výraznou granulárnou štruktúrou a vláknami. B - homogénnejšie lipofuscínové granuly v cytoplazme neurónov s deficitom deoxyribonukleázy gama s väčším počtom lipidových častíc, bez výrazných granúl a vlákien.

Diskusia

Lipofuscín je heterogénny pigment nerozložiteľných produktov bunkového metabolizmu, ktorý sa fyziologicky hromadí v cytoplazme buniek. Pozostáva najmä z oxidovaných lipidov, denaturovaných proteínov a zvyškov membránových štruktúr, často s prítomnosťou stopových množstiev kovov, predovšetkým železa. Vzniká v lyzozómoch ako dôsledok neúplnej degradácie poškodených bunkových komponentov, pričom jeho tvorba úzko súvisí s oxidačným stresom a peroxidáciou lipidov (3).

Naše predbežné výsledky ukazujú zmeny v štruktúre lipofuscínu v hipokampe neurónov myší s deficitom deoxyribonukleázy gama oproti kontrolnej skupine. Výsledky naznačujú, že absencia tohto enzýmu vedie k výraznejšej homogenizácii a lipidizácii intracelulárnych depozitov. Zvýšený výskyt lipidových komponentov v týchto inklúziách, najmä u myší s deficitom deoxyribonukleázy gama, môže naznačovať poruchy lipidového metabolizmu alebo degradácie membránových štruktúr.

Ultraštruktúrne štúdie ukazujú, že lipofuscín môže obsahovať lamelárne usporiadané membránové zvyšky, elektrón-denzné granuly a variabilne organizované filamentózne štruktúry, čo odráža jeho komplexný pôvod a postupnú agregáciu v lyzozómoch (4). Paralelne usporiadané nanometrové vlákna vo vnútri lipofuscínových teliesok spolu s menším množstvom lipidových inklúzií a nanogranúl ukazuje na relatívne organizovanú a heterogénnu štruktúru týchto reziduálnych teliesok. Takáto organizácia môže odrážať postupné vrstvenie oxidovaných lipidov a proteínov počas ich lyzozomálneho spracovania. Tento proces je u myší s deficitom narušený a nedochádza k ich tvorbe. Poruchy mitochondriálnej funkcie, apoptózy

1 a oxidačného stresu môžu významne ovplyvniť procesy autofágie a lyzozomálnej degradácie
2 (5).

3 V nervovom tkanive je akumulácia lipofuscínu spájaná s neurodegeneratívnymi procesmi, ako
4 sú Alzheimerova a Parkinsonova choroba, kde prispieva k zvýšenej vulnerabilite neurónov.
5 Jeho prítomnosť teda nepredstavuje len pasívny dôsledok starnutia, ale aj potenciálny faktor
6 podieľajúci sa na patogenéze ochorení spojených s oxidačným stresom a poruchou
7 proteostázy. V kontexte súčasných poznatkov možno tieto nálezy interpretovať ako
8 potenciálny prejav progresívneho neurodegeneratívneho procesu.

9 V ďalšom výskume budeme analyzovať neurozápal (TNF- α a IL-1 β , prípadne GFAP a IBA-1
10 imunohistochemie) a oxidačného stresu (ROS), keďže oba procesy môžu významne prispievať
11 k dysfunkcii lyzozómov. Analýty by mohli vysvetľovať, prečo je lipofuscín v sledovanom modeli
12 homogénnejší a výraznejšie akumulovaný.

14 Referencie

- 15 1. Mizuta R, Araki S, Furukawa M, Furukawa Y, Ebara S, Shiokawa D, Hayashi K, Tanuma S, Kitamura
16 D: DNase γ is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis.
17 PLoS One. 2013; 8(12): e80223
- 18 2. Koyama R, Arai T, Kijima M, Sato S, Miura S, Yuasa M, Kitamura D, Mizuta R: DNase γ , DNase I
19 and caspase-activated DNase cooperate to degrade dead cells. Genes Cells. 2016; 21(11): 1150-
20 1163.
- 21 3. Singh Kushwaha S, Patro N, Kumar Patro I: A Sequential Study of Age-Related Lipofuscin
22 Accumulation in Hippocampus and Striate Cortex of Rats. Ann Neurosci. 2018; 25(4): 223-233.
- 23 4. Nunomura A, Miyagishi T: Ultrastructural observations on neuronal lipofuscin (age pigment)
24 and dense bodies induced by a proteinase inhibitor, leupeptin, in rat hippocampus. Acta
25 Neuropathol. 1993; 86: 319-328
- 26 5. Börner JH, Rawashdeh O, Rama A: Exacerbated Age-Related Hippocampal Alterations of
27 Microglia Morphology, β -Amyloid and Lipofuscin Deposition and Presenilin Overexpression
28 in *Per1*^{-/-} Mice. Antioxidants 2021; 10(9): 1330

4. Systematická preparácia vybraných jemných neurovaskulárnych štruktúr ako metodicko-deskriptívny prístup v topografickej anatómii

Karol Babčan

(všeobecné lekárstvo, 2.ročník)

Školitelia: Mgr. Tomáš Havránek, PhD., MUDr. Hisham El Falougy, PhD., MUDr. Olia El Hassoun Sečanská, PhD., prof. MUDr. Štefan Polák, CSc.

Anatomický ústav, Lekárska fakulta univerzity Komenského, Bratislava

Úvod

Makroskopická anatómia zohráva kľúčovú úlohu v medicínskom vzdelávaní a klinickej praxi. Presné poznanie topografických vzťahov anatomických štruktúr je nevyhnutné pre diagnostiku, chirurgické plánovanie a bezpečné vykonávanie invazívnych výkonov [1, 2, 3, 4]. V uplynulom období sa do popredia dostáva potreba detailného poznania jemných anatomických štruktúr, ktoré sa nachádzajú na rozhraní makroskopickej a submakroskopickej anatómie. Hoci existuje rozsiahla digitálna, atlasová a učebnicová literatúra, metodické postupy vedúce k precíznej preparácii týchto štruktúr sú často nedostatočne popísané alebo absentujú [5, 6, 7]. Mnohé drobné neurovaskulárne útvary sú v literatúre uvádzané bez jasného metodického kontextu ich identifikácie a preparácie, čo sťažuje ich identifikáciu v edukačnom procese [8, 9]. Viaceré publikácie, odborné texty a atlasy tieto drobné štruktúry popisujú, avšak ich pôvod je často zastretý chronologickými citáciami predošlých autorov, kde sa možno až následnou retroanalýzou dostať k pôvodnému autorovi, ktorý danú štruktúru detailne popísal, avšak konkrétne metodické postupy sa buď nezachovali, alebo sa stratili v čase [10, 11, 12, 13]. Systematická jemná preparácia predstavuje metodický prístup, ktorý umožňuje detailnú vizualizáciu jemných anatomických štruktúr pri zachovaní ich prirodzených topografických vzťahov.

Nástrojové a technické vybavenie moderných anatomických pracovísk dnes umožňuje mimoriadne detailné preparácie, a tým súčasne umožňuje poskytnúť lepšie a detailnejšie edukačné materiály pri výučbe anatómie, nakoľko využitie jemných mechanických techník bez farbiacich alebo špecifických fixačných metód umožňuje vytvoriť preparáty blízke klinickej realite. Predovšetkým univerzálnosť výkladu preparácie umožňuje jej širšie pochopenie a reprodukovateľnosť aj z pohľadu študenta so základnou teoretickou znalosťou anatomických štruktúr.

1 Ciele práce

2 Cieľom tejto práce je:

3 vytvoriť metodicko-deskriptívny rámec preparácie vybraných topografických oblastí ľudského
4 tela s dôrazom na edukačnú hodnotu, reprodukovateľnosť a objektívnu relevanciu
5 sumarizovať fotodokumentáciu makroskopických a submakroskopických neurovaskulárnych
6 štruktúr vybraných topografických oblastí ľudského tela s deskriptívou pre edukačné účely vo
7 forme atlasu

9 Materiál a metódy

10 Preparácie boli realizované na kadaveróznom materiáli dospeléj ženy v súlade s platnými
11 právnymi a etickými normami. Po štandardnej fixačnej procedúre bol materiál konzervovaný
12 v alkoholovom prostredí s cieľom zachovania integrity tkanív.

13 Detailné preparácie boli vykonávané bez použitia farbiacich metód, výhradne mechanickým
14 odstránením tukových a väzivových vrstiev. Použité boli jemné chirurgické nástroje, najmä
15 skalpelové čepele veľkosti 10 – 12, anatomické a chirurgické pinzety, sondy a preparačné ihly.
16 Preparácia prebiehala postupne po vrstvách, s dôrazom na zachovanie neurovaskulárnych
17 štruktúr s priemerom pod 1 mm.

18 Vybrané topografické oblasti zahŕňali ruku (*palma et dorsum manus*), nohu (*planta et dorsum*
19 *pedis*), povrchové a hlboké inguinálne lymfatické uzliny, mezentérium a vnútorné ženské
20 pohlavné orgány. Každá oblasť bola preparovaná systematickým spôsobom s cieľom
21 zachovania prirodzených topografických vzťahov so zreteľom na ich priestorové usporiadanie
22 [14, 15, 16, 17].

23 V procese bola realizovaná priebežná fotodokumentácia jednotlivých fáz preparácie, ktorá
24 umožnila zaznamenanie vrstiev a priestorových vzťahov. Súvisiaca aparátúra pozostávala zo
25 zdroja plošného osvetlenia a úchopového aparátu pre zaznamenávaciu techniku. Fotografie
26 boli následne spracované s cieľom zvýraznenia detailov a odstránenia rušivých prvkov; na
27 postprodukčnú úpravu záberov boli použité editačné softwarové nástroje vrátane pokročilých
28 algoritmov na vyladenie rušivého pozadia a kontrastné zvýraznenie detailov. Ilustračné
29 obrázky uvádzané v tejto práci sú prezentované ako natívne bez multiúrovňovej identifikácie.

31 Výsledky

32 Preparácia *palma et dorsum manus*

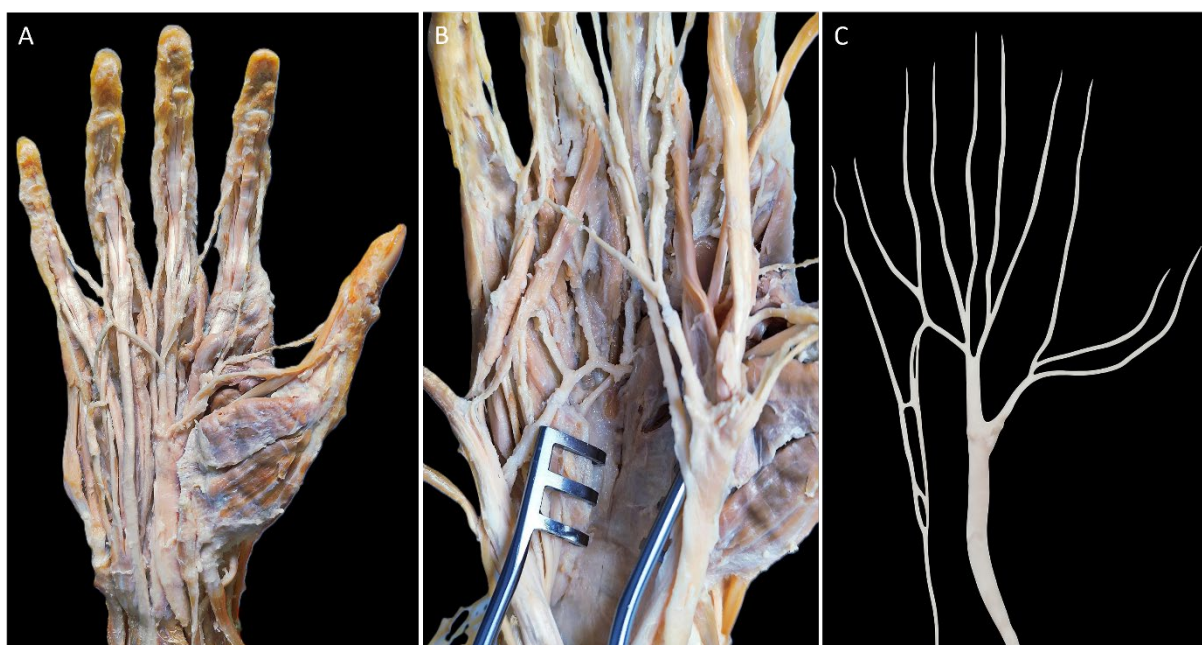
33 Preparácia ruky prebiehala systematickým vrstveným postupom od kožného krytu po hlboké
34 štruktúry. Po odstránení subkutánneho tuku boli identifikované povrchové žilové a nervové
35 siete, následne *retinacula musculorum flexorum et extensorum*, *aponeurosis palmaris*
36 a *vaginae synoviales* [6, 12, 18].

37 Kožná sekcia na *palma manus* bola vedená skalpelom od *plica digitalis proximalis digiti medii*
38 sagitálne po *linea restricta*, nasledovaná transversálnym rezom proximálne kopírujúcim
39 priebeh *linea flexionis palmaris* a distálnym cez spojnicu *articulationes metacarpophalangeae*
40 druhého až piateho prsta [14, 19]. Pomocné rezy vedené od *lineae flexionis digitorum* po
41 mediálnej rovine všetkých piatich prstov až po ich distálne konce [1, 14, 19]. Na dorzálnnej
42 strane ruky boli rezy vedené v rovnakom vzore zabezpečujúc otváranie kožného krytu

1 pomocou tenkej sondy a malej chirurgickej pinzety bez poškodenia jemných štruktúr v *tela*
2 *subcutanea* [10, 11, 15, 16, 20].

3 Osobitná pozornosť bola venovaná izolácii *arcus palmaris superficialis et profundus*,
4 digitálnych artérií a nervov, ako aj šliach flexorov a extenzorov. Preparácia umožnila detailnú
5 vizualizáciu vzťahov medzi neurovaskulárnymi zväzkami a svalovými skupinami ruky [1, 6, 7,
6 18]. Všeobecnou zásadou bola izolácia štruktúr v tejto oblasti z povrchu do hĺbky
7 v nasledovnom poradí: vény, nervy, artérie. Na oddialenie šliach svalov postupujúcich
8 z antebrachia bol použitý Weitlanerov retractor, podobne ako pri zabezpečení prístupu do
9 hlbokých vrstiev *canalis carpi*.

10 Konečným krokom bola chronologická a systematická detailná fotodokumentácia
11 preparovanej ruky z palmárnej, dorzálnej a laterálnych strán (obr.: 1).



Obrázok 1: Demonštračné zobrazenie fotodokumentácie topografickej preparácie palma manus s dôrazom na A) povrchové a B) hlboké neurovaskulárne štruktúry; C) grafická rekonštrukcia distribúcie nervus medianus et nervus ulnaris v regio palma manus.

Preparácia planta et dorsum pedis

Kožná sekcia na *planta pedis* bola vedená skalpelom sagitálne v mediáne od druhého *articulatio metatarsophalangea* proximálnym smerom k *tuber calcanei*, sledujúc ohyb päty pozdĺž *tendo calcaneus* do výšky spojnice *malleolus medialis/lateralis*; pokračujúc transverzálne ponad *articulationes metatarsophalangeales*; a v mediáne všetkých prstov od predošlého rezu po *margo liber unguis* [14, 19]. Na dorsum pedis sa pokračovalo sekciami v rovnakom topograficko-geometrickom rozsahu ako na planta pedis, s ohľadom na prítomnosť jemných kutaneálnych ciev a nervov [6, 7, 16, 18].

Preparácia nohy poukázala na výrazné rozdiely medzi plantárnou a dorzálnou stranou. Na *planta pedis* bola identifikovaná robustná *aponeurosis plantaris* (obr.: 2/A) a hlboko uložené neurovaskulárne štruktúry, zatiaľ čo *dorsum pedis* umožnilo vizualizáciu povrchových cievnych

a nervových sietí; vrátane variabilnej *a. sinus tarsi* [5, 14, 16, 20]. Pre lepší prístup do hlbších vrstiev na *planta pedis* sa využili rôzne druhy hákov a retraktorov s prerušením odstupu *aponeurosis plantaris* (obr.: 2/B) a *m. flexor digitorum brevis* (obr.: 2/C) a ich odklopením distálnym smerom, z dôvodu priebehu a vetvenia priamo do svalových skupín *musculi plantae pedis* väčšiny hlavných vetiev neurovaskulárnych zväzkov práve pod týmito muskulo-fibróznymi útvarmi.

Osobitná pozornosť bola venovaná retromaleolárnym priestorom, kde boli identifikované významné neurovaskulárne zväzky s bohatým vetvením do okolitých svalov aj kože. V oblasti *sulcus retromalleolaris medialis* boli izolované jemné splete sympatiku okolo *arteria tibialis posterior*. Preparácia umožnila presnú identifikáciu vrstiev a topografických vzťahov svalov, šliach a ciev [7, 8, 9, 14, 18].



Obrázok 2: Demonštračné zobrazenie fotodokumentácie topografickej preparácie *planta pedis* s dôrazom na A) povrchové a B) hlboké štruktúry; aponeurosis plantaris; C) prerušenie *m. flexor digitorum brevis*

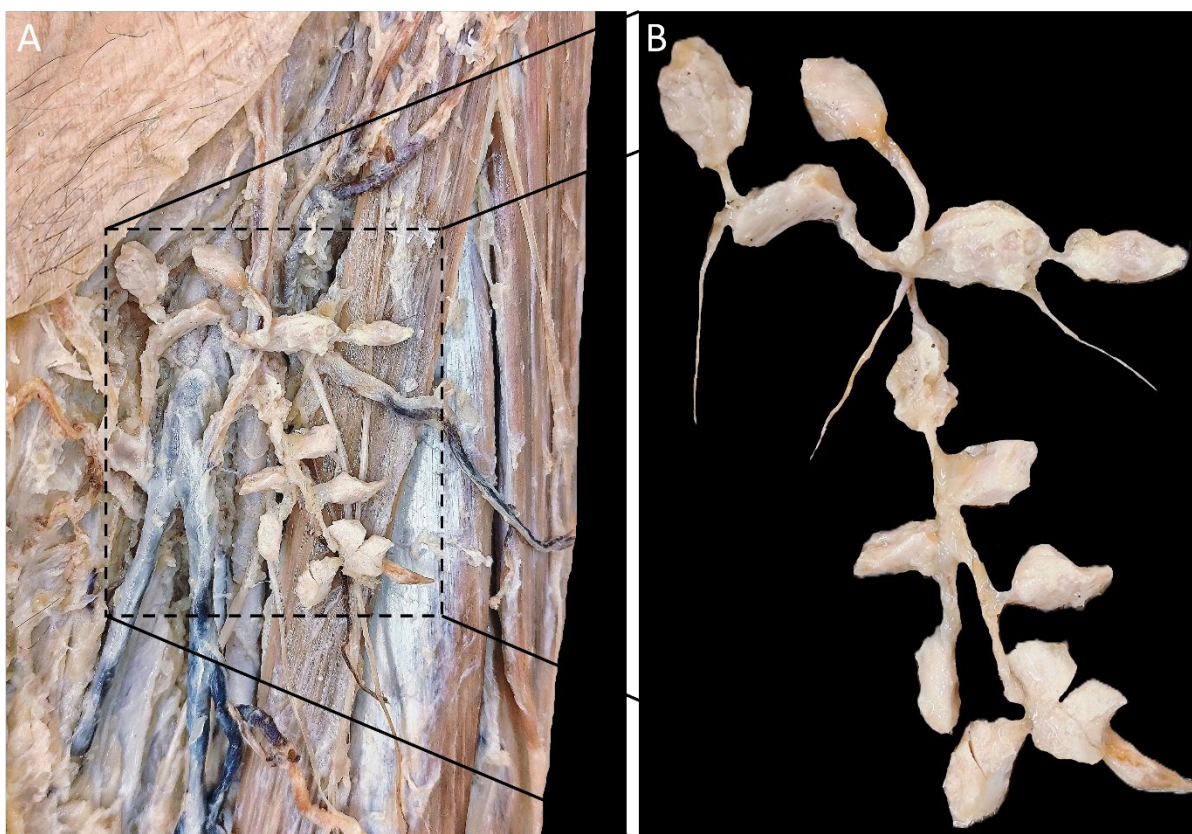
Preparácia *nodi lymphoidei inguinales superficiales et profundi*

Preparácia inguinálnej oblasti bola realizovaná kožnými rezmi kopírujúcimi projekciu *ligamentum inguinale* a rozsah *trigonum femorale* [14, 19]. Po otvorení kožného krytu a podkožia boli identifikované povrchové vrstvy tuku, v ktorých sa nachádzajú superficiálne neurovaskulárne štruktúry [16, 18]. Pri ich odstraňovaní bolo nevyhnutné zachovať jemné rr.

1 *cutanei*, povrchové venózne spleti a drobné artérie, ktoré slúžili ako orientačné body pri
2 vyhľadávaní *fascia cribrosa* a hlbších anatomických vrstiev [6, 8, 9, 13].

3 Lymfatické uzliny boli izolované na základe ich denznej konzistencie. Postupná palpácia
4 umožnila identifikovať 12 *nodi lymphoidei inguinales superficiales*, rozdelených do
5 laterálnych, mediálnych a centrálnych podskupín (obr.: 3) [5, 6, 17, 21]. Uzliny neboli
6 makroskopicky zreteľné, preto bol proces zdĺhavý. Po odstránení *fascia lata femoris* boli v
7 oblasti *fossa iliopectinea* identifikované dve *nodi lymphoidei inguinales profundi* uložené v
8 tesnom kontakte s *a., v. et n. femoralis* (obr.: 3/A) [16, 18]. Pri neistej lokalizácii bolo možné
9 sledovať priebeh *vasa lymphatica efferentia* zo superficiálnych uzlín, čo spoľahlivo viedlo k
10 hlbokéj skupine (obr.: 3/B).

11 Použité nástroje (skalpel 10 – 22 chirurgické pinzety, Kocherove svorky, Weitlanerov retraktor)
12 umožnili presnú manipuláciu v tukovom tkanive bez poškodenia jemných štruktúr. Zachovanie
13 dostatočného množstva tuku *in situ* bolo kľúčové na prevenciu nechcenej excízie uzlín.
14 Výsledkom bol detailný prehľad topografie povrchových a hlbokých inguinálnych lymfatických
15 uzlín a ich vzťahov k neurovaskulárnym štruktúram [6, 18].



17 **Obrázok 3: Demonštračné zobrazenie fotodokumentácie topografickej preparácie *nodi***
18 ***lymphoidei inguinales superficiales et profundi* s dôrazom na A) topografické vzťahy a B)**
19 **komplexnú grafickú rekonštrukciu.**

1 **Preparácia organa genitalia feminina interna et cavitas peritonealis**

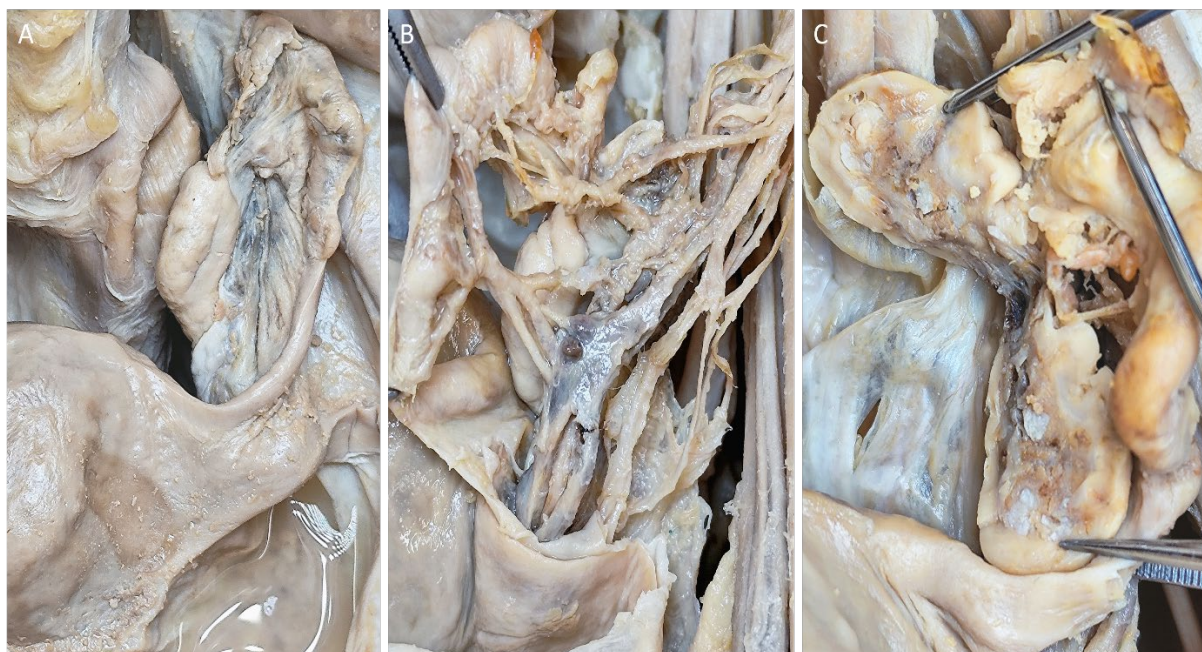
2 Po viacvrstvovej preparácii brušnej steny vedenou sagitálnym rezom cez *linea alba*
3 a systematickom viacvrstvom odseparovaní svalov a fascii brušnej steny bol vytvorený
4 široký prístup do *cavitas abdominalis* [14, 16, 18]. Po mobilizácii orgánov (*hepar, gaster, splen,*
5 *renes, pancreas, intestinum tenue et crassum a omentum majus*) bolo možné identifikovať
6 peritoneálne, retroperitoneálne a subperitoneálne štruktúry vrátane hlavných cievnych a
7 nervových zväzkov (*aorta abdominalis, v. cava inferior, aa. et vv. iliacae, plexus lumbalis*) až
8 po ich najjemnejšie vetvy [1, 5, 6, 7, 18].

9 Po vizualizácii *vesica urinaria* a *uterus* bola vykonaná ich natívna dokumentácia. Na maternici
10 boli prítomné viaceré myómy a v oblasti *mesosalpinxu* cysta. Nasledovala detailná preparácia
11 močového mechúra a jeho *aa. vesicales superiores et inferiores, plexus venosus vesicalis,*
12 *plexus hypogastricus inferior*, vrátane demonštrácie peritoneálnej duplikatúry medzi *uterus* a
13 *vesica urinaria* [6, 7]. Zachovaný bol aj subtilný rudiment *urachus* spoločne s vizualizáciou
14 *excavatio rectouterina* a *excavatio vesicouterina* (obr.: 4/A).

15 V ďalšej fáze boli izolované adnexálne štruktúry: *ovarium* (s identifikáciou *corpora albicantia*),
16 *tuba uterina, mesovarium, mesosalpinx et ligamenta*. Otvorením duplikatúr boli odkryté *a. et*
17 *vv. ovaricae*, vetvy *a. uterina*, súvisiace plexy, *epoophoron, appendix vesiculosa* (Morgagni) a
18 *ductuli transversi* (obr.: 4/B) [5, 6, 16, 18, 22]. Preparácia ciev uteru si vyžadovala postupné
19 narušenie parametria a perimetria pre identifikáciu všetkých anastomóz [6, 7, 16, 18].

20 Záverečným krokom bol sagitálny prierez ovaria, ktorý umožnil vizualizáciu cortexu, medully,
21 hilu a cievnych vstupov (obr.: 4/C); následne bolo možné izolovať *ostium abdominale tubae*
22 *uterinae* a *fimbriae tubae uterinae et fimbria ovarica* [15, 22].

23



24

25 **Obrázok 4: Demonštračné zobrazenie fotodokumentácie topografickej preparácie organa**
26 **genitalia feminina interna** s dôrazom na A) topografické vzťahy in situ, B) plexus vascularis et
27 nervosus derivatus ex arteria ovarica et ramis nervorum autonomicorum a C) sagitálny prierez
28 ovaria.

1 Diskusia

Detailné preparačné postupy sa ukázali ako mimoriadne efektívne pri odhaľovaní jemných anatomických štruktúr a ich presných priestorových vzťahov. Metodika umožnila zachovať neurovaskulárne útvary s priemerom 0,5 – 1 mm a odstrániť väzivové vrstvy bez narušenia morfolologickej integrity. Výsledné preparáty boli porovnateľné s detailmi uvádzanými v starších atlasoch, pričom sa potvrdila aj existencia štruktúr absentujúcich v súčasnej literatúre, často pre ich variabilitu, minimálny klinický význam alebo zmeny v nomenklatúre [6, 7, 8, 9, 12, 16, 18].

Priebežná fotografická dokumentácia umožnila presnú reprodukciu postupov a vytvorenie chronologických záznamov. Stabilizované snímanie, plošné biele osvetlenie a následná postprodukcia výrazne zvýšili kvalitu obrazového materiálu. Softvérové úpravy zlepšili kontrast, ostrosť a odstránili rušivé pozadie, čo bolo kľúčové pre vizuálne zvýraznenie drobných štruktúr.

Limitáciou boli fixačný proces a vysychanie tkanív, ktoré mohli poškodiť subtílné útvary ešte pred preparáciou. Časová náročnosť závisela od komplexnosti oblasti; orientačne bolo potrebných približne 16 – 20 hodín pracovného času na priestor s plochou 15 cm². Úspešná reprodukovateľnosť vyžaduje vysokú úroveň teoretických znalostí, štandardizovaný nástrojový set, adekvátne technické vybavenie a vhodné anatomické materiály.

Aplikácia metodík vo viacerých oblastiach a rozsiahla obrazová dokumentácia vytvárajú potenciál pre vznik detailného atlasu anatómie založeného na reálnych preparátoch, ktorý by doplnil súčasné edukačné zdroje a zvýraznil často prehliadané, no významné štruktúry.

Prípravná fáza predkladanej práce si vyžadovala systematické vyhľadávanie a porovnávanie relevantnej anatomickej literatúry s výsledkami preparačných postupov. Nedostatok detailných zobrazení jemných štruktúr v súčasných atlasoch a učebniciach predstavoval jeden z hlavných podnetov pre realizáciu štúdie. Väčšina novších diel sa sústreďuje na makroskopickú úroveň, zatiaľ čo detailné zobrazenia menších vetiev či subtílnych útvarov sú skôr výnimkou [6, 7, 8, 9].

Konfrontácia literatúry prebiehala v troch etapách: pred preparáciou (štúdium dostupných zdrojov), počas preparácie (vizuálna orientácia) a po jej ukončení (rekapitulácia a verifikácia identifikovaných štruktúr). Proces často viedol k izolácii jemných vetiev absentujúcich v súčasnej literatúre, čo možno pripísať buď ich domnelej bezvýznamnosti alebo pochopiteľnej individualite priebehu. Staršie texty poskytujú detailnejší popis, avšak pri terminologickej interpretácii je nevyhnutné rešpektovať aktuálnu nomenklatúru [5, 10, 11, 12, 16, 20, 24].

Publikácie venované moderným jemným preparačným technikám sú zriedkavé, často pre nízku metodickú precíznosť. Mnohí autori uprednostňujú zobrazovacie metódy pred preparáciou, čo sťažuje reprodukovateľnosť postupov [22]. Preto bolo potrebné vytvoriť vlastné metodické prístupy a opierať sa o chirurgickú literatúru pri výbere vhodných nástrojov [1, 2, 3]. Absencia detailných súčasných zdrojov tak zvýraznila význam praktickej skúsenosti, technickej vykonateľnosti a individuálnej zručnosti pri detailnej preparácii natoľko potrebnej pre presah do chirurgických odborov.

1 Referencie

1. PETROVICKÝ, Pavel. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi*. Praha: 2001. 463 s. ISBN 8080630461.
2. CARROLL, T. – LADNER, K. – MEYERS, A. D. Alternative surgical dissection techniques. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2005, 38(2), 397–411. DOI: 10.1016/j.otc.2004.10.001.
3. RAPOLTI, D. – NEUMEISTER, M. W. Technology in microsurgery. *Clinics in Plastic Surgery*. 2026, 53(1), 183–186. DOI: 10.1016/j.cps.2025.09.003.
4. SHIELDS, L. B. E.; IYER, V. G.; ZHANG, Y. P.; SHIELDS, C. B. Iatrogenic median and ulnar nerve injuries during carpal tunnel release: clinical, electrodiagnostic, and ultrasound features in 12 patients. *Journal of Neurosurgery: Case Lessons*. 2020 roč. 5, č. 10, DOI: 10.3171/CASE22543.
5. STANDRING, S.; TUBBS, R. S., eds. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 43. vyd. London: Elsevier, 2025. ISBN 978-0-443-12478-5.
6. NETTER, Frank H. *Netterov anatomický atlas človeka*. Bratislava: Lindeni, 2020. 535 s. ISBN 9788056617908.
7. PAULSEN, Friedrich – WASCHKE, Jens, eds. *Sobotta Atlas of Anatomy*. 17. vyd. München: Elsevier Urban & Fischer, 2023. ISBN 9780702067655; 9780702067662; 9780702067679.
8. AGUR, Anne M. R. – DALLEY, Arthur F. *Grant's Atlas of Anatomy*. 15. vyd. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2023. ISBN 9781975170813.
9. GILROY, Anne M. – MACPHERSON, Brian R. – ROSS, Lawrence M. *Atlas of Anatomy*. 4. vyd. Stuttgart: Thieme, 2023. ISBN 9783132429345.
10. BOROVSANÝ, Ladislav et al. *Soustavná anatomie člověka*. 3. přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 1967. 590 s.
11. BOROVSANÝ, Ladislav et al. *Soustavná anatomie člověka. Díl II*. 3. vyd. Praha: Avicenum, 1968. 1023 s.
12. CLARA, M. *Das Nervensystem des Menschen: ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1942.
13. PERNKOPF, Eduard. *Topographische Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas der regionär-stratigraphischen Präparation*. Wien: Urban & Schwarzenberg, 1941.
14. MRÁZ, Peter. *Pitevné cvičenia: učebnica pre lekárske fakulty*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2013. 199 s. ISBN 8021705507.
15. SINĚLNIKOV, R. D. *Atlas anatomie člověka 1–3*. Praha: Avicenum, 1980–1983. 467 s., 472 s., 399 s.
16. LEDÉNYI, Julius. *Pitevné cvičenia z topografickej anatomie*. Bratislava: 1936. 169 s.
17. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 1–3*. Praha: Grada, 2016. 534 s., 470 s., 673 s. ISBN 9788024738178; 9788024701431; 9788024711324.
18. MRÁZ, Peter. *Anatómia ľudského tela I–II*. Bratislava: SAP – Slovak Academic Press, 2021. 487 s., 509 s. ISBN 9788089607921; 9788089607891.
19. BALKO, Jan. *Memorix histologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2024. 555 s. ISBN 9788076842960.
20. HOLOMÁŇOVÁ, Anna. *Srdcovocievna sústava: anatomické názvy: latinsko-anglicko-slovenský slovník*. Bratislava: 2000. 65 s. ISBN 8085331268.
21. HOLOMÁŇOVÁ, Anna. *Anatomické názvy: latinsko-anglicko-slovenský slovník*. 1. vyd. Bratislava: 2001 – 2003. 93 s. ISBN 8085331292.
22. PIDVALNA, U.; MIRCHUK, M.; D'ANNA, G. Integrating radiological imaging techniques into anatomy education: medical training enhancement through early CT and MRI teaching. *Problems of Radiation Medicine and Radiobiology*. 2021,29, s. 473–481. DOI: 10.33145/2304-8336-2024-29-473-481.

5. Advanced Preparation Techniques of the Abdominal Vascular System

Timotej Filip Janáč

(general medicine, 2nd year)

Co-authors: Lukáš Duroška, Nikita Valerievič Berezhetskiy

Supervisor: Mgr. Tomáš Havránek, PhD., MUDr. Hisham El Falougy, PhD., MUDr. Olia El Hassoun Sečanská, PhD., prof. MUDr. Štefan Polák, CSc.

Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

Introduction

Anatomy is a fundamental part of medical education, as it provides the basis for further studies. This work outlines the methods used to fix and prepare the portal system for use in anatomical demonstration and education. The methodology includes appropriate preservation techniques using formalin and alcohol fixation. Emphasis is placed on careful preparation of the vascular system while preserving its connections to the organs of the digestive system.

The resulting preparation aims to provide a realistic representation of the portal venous system and the arterial supply to the gastrointestinal tract. By maintaining the natural position of anatomical structures, the finished anatomical model would be able to provide a three-dimensional visualization of this often hardly imaginable system.

The portal system represents a key component of the circulatory system, responsible for transporting blood from the gastrointestinal tract, spleen, pancreas and liver-related organs. In the liver, blood undergoes detoxification and metabolic processing before entering the systemic circulation. Its complex function and structure make it an important yet challenging topic of study. An in-depth knowledge of the portal system is essential for understanding physiological processes and all possible pathological conditions affecting portal blood flow, such as portal hypertension and the development of portocaval anastomoses. Furthermore, a precise understanding of portal networks is fundamental for surgeons specialising in abdominal surgery. As a result of our project, we prepared a highly detailed anatomical model that provides full-scale topographical visualization and supports more effective study progress in anatomy class.

Aims

The main goals of the presented study were:

to create a realistic, three-dimensional representation of the vascular supply of the gastrointestinal tract, including hepatic portal system

to evaluate durability and suitability of the combined silica/acrylic vascular-specific preservation in the condition of repeated educational use in anatomical curriculum

Materials and Methods

Preservation of the adult female cadaver, in accordance with all required legal and ethical standards, was achieved through systemic arterial embalming using a standardized fixative solution consisting of 38% formaldehyde, 96% ethanol and sodium chloride in aqueous mixture. Following a monitored fixation period, the specimen was treated with an alcohol-based solution to diminish residual formaldehyde concentrations, ensuring a safer environment for prolonged macroscopic analysis [1].

The female cadaver underwent initial preparation in the context of a student dissection curriculum, where the thoracic cavity (*cavitas thoracis*) and abdominal cavity (*cavitas abdominis*) were previously and carefully reflected. Surface-level inspection showed no signs of significant previous damage to structures of interest which would eventually interfere with aims of this work.

Preparation has been carried out without use of any special or commercial staining techniques, relying exclusively on the mechanical removal of tissue layers. Fine preparatory instruments were used, particularly scalpel blades of sizes 10 – 12, anatomical and surgical forceps, probes, and dissecting needles.

Further evaluation of abdominal organs revealed several challenging anatomical characteristics, thus requiring precise planning and accurate work with fragile internal structure, namely, thin vessels and an abundance of adipose tissue. Organs *in situ* were available for superficial yet meaningful preparation, such as removal of adipose capsules around both kidneys and suprarenal glands (*glandulae suprarenales*), leaving intact vessels supplying named organs and surrounding tissue. The same process of excision from soft tissue (holding ligaments and fat layers) was conducted on the liver, spleen, accessible part of the root of the mesentery and tail of the pancreas.

Organs and ribs prevented deeper precise dissection, therefore initial dissection must be performed. After cutting the aorta, thoracic duct (*ductus thoracicus*), ascending lumbar veins, the sympathetic trunk (*truncus sympaticus*), inferior *vena cava* and various descending nerves at the level of Th12; ureters, ovarian arteries, inferior *vena cava* and *aorta* at the level of L3 vertebra; the targeted block of abdominal organs and vessels was extracted. [2, 3, 4, 5, 6, 7]

The extracted abdominal structures needed to be cleansed and dissected until the targeted structures were reached. Next step was to release all available vessels from the soft tissues, specifically: splenic vein and artery (*arteria et vena splenica*), the celiac trunk (*truncus coeliacus*) with all its branches, inferior phrenic artery (*a. phrenica inferior*), superior artery and vein (*a. et v. suprarenalis superior*) and the visible accessible part of the mesenteric artery and vein (*a. et v. mesenterica*) (Fig.: 1) [2, 3, 4, 5, 6, 7]. In order to get access to structures ventral to the *aorta abdominalis*, we had to extract it from the portal system and the celiac trunk (*truncus coeliacus*), by severing these large vessels from the aorta, leaving the aorta connected to renal arteries (*arteriae renales*) and part of the inferior vena cava still attached to the renal veins, kidneys and the rest of the upper urinary tract, as well as the suprarenal glands and their corresponding blood supply vessels. To perform the extraction, we removed the peritoneal sack around the aorta, leaving the lymphatic vessels and dorsal arteries intact [7].



Figure 1: Example of the mesenteric vasculature in the process of the detailed preparation.

Following procedure exposed previously hidden root of the mesentery, specifically, the body and the head of the pancreas and the dorsal side of the portal system. Due to the extremely thin vascular matrix of the veins, they were mostly left *in situ* to prevent ruptures and other unwanted damage. The pancreas and its vessels could be extracted from the surrounding tissues only to some extent as a consequence of the nature of this organ; in addition, it was conjoined with the duodenum, leaving some pancreaticoduodenal vessels out of reach for future dissection. Uncinate process (*processus uncinatus*) usually goes downwards, but in our case, it instead flexes backwards and around the mesenteric artery and vein (*a. et v. mesenterica*) [2, 3, 4, 5, 6, 7]. This anatomical variability gives us easy access to all the intestinal vessels, which one by one were dissected from the mesentery.

Subsequently, to reach the portal system, the diaphragm was resected with its vessels cut at the beginning. Lastly, with all the surrounding structures removed and the hilum of the liver (*porta hepatis*) clearly visible, we debrided connecting tissue around the final length of the portal system, revealing the branching of hepatic artery (*a. hepatica*), portal vein (*v. portae*) (Fig.:2) and vesical artery (*a. vesicalis*) [2, 3, 4, 5, 6, 7].



Figure 2: Example of the portal system and venous confluence in the process of the detailed preparation.

With the aim of presenting a clear and easy-to-comprehend model of the blood supply and nutrient collecting vessels of the gastrointestinal tract, we decided to leave the entirety of intestines intact, however for expected longevity of our anatomical model we had to clean the tract of the remaining biological waste by performing a longitudinal section in the anterior caecal region and flushing the caecum (*intestinum caecum*) and a part of the ascending colon (*colon ascendens*) [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Results

The anatomical preparation presented in this study resulted in a comprehensive topographical model of the hepatic portal system and the vascular supply of the gastrointestinal tract, extending from the cardiac opening (*ostium cardiacum*) to the sigmoid colon (*colon sigmoideum*). This integrated approach enables students to better visualize both the spatial organization of major abdominal vessels and the physiological principles governing blood flow within the abdominal cavity.

During preparation, several clinically relevant anatomical variabilities were documented, reflecting (not only) the elderly nature of the cadaver. Marked hepatomegaly and

splenomegaly were present, evidenced by distinct costal impressions on the diaphragmatic surfaces of both organs. These volumetric changes altered the topographical relationships within the left hypochondrium and contributed to atypical vascular trajectories. The splenic artery (*a. splenica*) (Fig.: 3) displayed pronounced tortuosity, forming a convoluted course consistent with advanced atherosclerotic remodeling. The splenic vein (*v. splenica*) followed an unusual pathway emerging from the cauda pancreatis and exhibited an extremely thin venous wall, which significantly complicated its preparation.



Figure 3: Anatomical variation of the splenic artery presented as a convoluted shape, in the process of the detailed preparation.

Similar fragility was observed across the venous system: even large-caliber vessels such as the inferior vena cava (*v. cava inferior*), portal vein (*v. portae*), and inferior mesenteric vein (*v. mesenterica inferior*) would rupture under minimal mechanical stress, necessitating meticulous and minimally invasive manipulation.

An additional anatomical variation was identified in the pancreaticoduodenal region. The uncinate process (*processus uncinatus*) of the pancreas projected posteriorly and partially enveloped the superior mesenteric artery and vein (*a. et v. mesenterica*), deviating from the more commonly described inferior curvature.

Despite these obstacles, the preparation successfully exposed the confluence of the splenic vein (*v. splenica*) and superior mesenteric vein (*v. mesenterica superior*), as well as the major arterial branches supplying the gastrointestinal tract.

The resulting model provides a durable and pedagogically valuable tool, bridging theoretical vascular morphology with clinically relevant topography. It enhances the learner's ability to understand portal circulation, recognize surgical landmarks, and appreciate the variability inherent in human anatomy.

In the next stage of our project, the already isolated vascular portal system will undergo combined silica / acrylic fixation which would secure reliable natural organization, as well as

the needed rigidity required for teaching purposes. Prepared model will be observed and closely monitored for an extended period of time, at least two full semesters with expected to be up to 80 hours of direct guided use. Stability and rigidity of the preparation and secondary post processing will be evaluated in the manner of future use of this in-house developed method.

Discussion

The anatomical preparation of the portal system highlights a critical intersection between fundamental anatomy and clinical pathology. While textbooks often present a mostly median anatomical view, this preparation underscores the anatomical variability that future clinicians and surgeons will encounter in their practice [8].

A primary finding was the pronounced tortuosity of the splenic artery (*a. splenica*). This convoluted morphology is a classic hallmark of advanced age and is frequently associated with atherosclerosis or hypertension. The increased hemodynamic strain likely contributes to such remodeling, which was further evidenced by the calcific changes spotted near the aorta [2, 3, 4, 5, 6].

The presence of hepatomegaly and splenomegaly significantly altered the topographical landmarks within the abdominal cavity. From a pedagogical perspective, these findings allow students to visualize how organ enlargement impacts surrounding vascular trajectories. Such deviations are clinically suggestive of underlying systemic conditions, ranging from chronic cardiovascular disease to probable metabolic syndromes or possible infections [8].

The discovery of intestinal diverticula (or potential polyps) serves as a reminder of the limitations of macroscopic analysis; without histological confirmation, these structures highlight the necessity of differential diagnosis [8].

In conclusion, this topographical model does more than illustrate the portal network; it serves as a bridge to clinical education. By preserving these abnormalities rather than seeking a "perfect" specimen, we provide students with a realistic, three-dimensional tool that fosters a deeper understanding of how aging and disease may reshape human anatomy [8].

References

1. Rahman, M. A., Sultana, N., Ayman, U., Bhakta, S., Afrose, M., Afrin, M., & Haque, Z. (2022). Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphologic and molecular analysis of tissues. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.075>
2. MRÁZ, P. a kol. *Anatómia ľudského tela 2*. Bratislava: Slovak Academic Press, 2012. 487 s. ISBN 978-80-8910-496-3.
3. ROHEN, J. W., YOKOCHI, C. a LÜTJEN-DRECOLL, E. *Color Atlas of Anatomy: A Photographic Study of the Human Body*. 7. vyd. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 556 s. ISBN 978-1582558561.
4. NETTER, F. H. *Atlas of Human Anatomy*. 7. vyd. Philadelphia: Elsevier, 2018. 672 s. ISBN 978-0323393225.
5. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 1–3*. Praha: Grada, 2016. 534 s., 470 s., 673 s. ISBN 9788024738178; 9788024701431; 9788024711324.
6. SINĚLNIKOV, R. D. *Atlas anatomie člověka 1–3*. Praha: Avicenum, 1980–1983. 467 s., 472 s., 399s.

- 1 7. MRÁZ, Peter. Pitevné cvičenia: učebnica pre lekárske fakulty. Bratislava: Univerzita
- 2 Komenského, 2013. 199 s. ISBN 8021705507.
- 3 8. Standring, S. (Ed.). (2016). Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice (41st ed.).
- 4 Elsevier.
- 5
- 6

6. Multilayered anatomical dissection of female pelvis using midline sagittal sectioning for educational demonstration of deep structures and organ topography for medical and surgical training: a methodical approach

Benjamin Mimler

(General Medicine, 3. Year)

Supervisors: MUDr. Olia El Hassoun Secanska PhD., Mgr. Tomas Havranek, PhD.,

MUDr. Hisham El Falougy, PhD., prof. MUDr. Stefan Polak, CSc.

Institute of Anatomy, LFUK Bratislava

Introduction

Human anatomy serves as the cornerstone of medical training, providing medical professionals with the basic knowledge for clinical practice (1). Despite the advancement of teaching techniques, wide use of digitalization methods and virtual models, the use of traditional anatomical methods remains indispensable. Trainees require live view anatomical structures with spatial distribution, topographic relations and anatomical boundaries on cadaveric specimens which they can physically examine and participate in dissecting.

The human pelvis is considered a complex anatomical region encompassing several organ systems in close relations with the pelvic diaphragm. Understanding the anatomy of this region is vital for medical doctors in general but also for various subspecialties including urology, gynecology and gastroenterology, not to mention surgical, vascular and trauma specialties (2). Classical anatomical dissecting techniques for the pelvis often use the anterior approach with intact pelvic bones. This comes at the expense of poor visualization of deep pelvic and subperitoneal structures. In addition, further dissection by removing pelvic organs compromises the topographic correlations, vascular and neural connections as well as the deep pelvic organ ligament system (3).

This paper introduces a technically challenging and time-consuming dissection method for the small pelvis, which is the preparation of sagittal sections. The methodical approach will be presented with detailed instructions for sectioning with close attention to organ alignment, followed by multilayered reveal of deep pelvic structures while preserving topographic integrity and parietal relations. The result is an optimal educational specimen with enhanced visibility for use in medical and surgical training.

Materials and methods

The cadaver specimen was obtained by our anatomy department through the national donation system, with adherence to legal and ethical requirements. After external examination, the body was deemed suitable for anatomic demonstration. The cadaver was processed using the three-step anatomic fixation protocol, starting with intraarterial

1 embalming, then full body fixation with standard solution: 38% formalin, 96% alcohol,
2 glycerine oil, sodium chloride in water. After sufficient fixation, the cadaver is transferred to
3 an alcohol glycerine-based solution to neutralize excess formalin (4).

4 After fixation is complete, the cadaver is dissected using classical approach by anatomic layers
5 and anterior dissection of abdominal organs.

7 ***Separation of Pelvis from cadaver:***

8 The specimen was divided at the midline of the L1 vertebra, and inferiorly at mid length of the
9 femur.

10 Anterior view: superficial tissue, skin and subcutaneous tissue were removed. Muscle,
11 vascular and neural structures intact.

12 Posterior view: superficial tissue, skin and subcutaneous tissue were removed. Thoracolumbar
13 fascia intact.

14 Inferior view: Skin removed, external genitals removed to the level of medial labia minora. Fat
15 tissue of the ischioanal fossa is preserved to maintain structural integrity.

17 ***Sagittal sectioning***

18 For this step we used an oscillating autopsy saw and a manual bone saw, long autopsy knife,
19 urinary catheter and two plastic probes for the wider orifices.

20 This multilevel step is dependent on the parameter of the available pelvis and the choice of
21 length of attached vertebral column. Attention must be paid to axial alignment of bone as well
22 as organ alignment within the pelvic space. Both of the above mentioned are variable and
23 must be adapted to the available specimen. For this reason, each segment should be divided
24 separately. It must be mentioned that the use of band saw for sagittal sectioning will not yield
25 midline section of all the structures. Therefore, is not the optimal instrument for this special
26 preparation.

27 1. Vertebral column: the highest point of every vertebra was marked and the points
28 connected. It was noted that there is slight diversion from axis in the lower lumbar and
29 sacrococcygeal region. The space between consequent vertebrae was divided from cranial to
30 caudal only to the depth of the intervertebral canal. After this alignment path was established,
31 deeper sectioning through the body of the vertebrae was performed also craniocaudally with
32 careful attention to maintain soft tissue intact.

33 2. Pubic symphysis: this was separated at midline using an autopsy knife, once again with
34 preservation of soft tissue intact.

35 3. Soft tissue: after the bone was divided, it is time to alight and separate the organs together
36 with the pelvic floor. Probes and catheters were placed for orientation and we approached
37 sectioning from posterior to anterior through the superficial perineal cleft.

38 4. Rectum: inserts through the peritoneal reflection laterally to the right and realigns with the
39 anal canal in the inferior segment (ampulla). The superior segments were diverted to the left
40 side to preserve inferior mesenteric vasculature with associated mesenteric plexus. Sagittal
41 section was achieved through the anal canal and rectal ampulla.

5. Vagina, cervix and uterus: note that while the cervix is usually aligned at midline, the body and fundus of the uterus can have a lateral tilt (usually to the right), which was our case. A wide probe was placed for orientation caudally and clips on lateral sides of the palpated cervix cranially. The section was made from caudal to cranial. Once the cervix was reached, the uterus was fixed on a small cutting board, and the section proceeded to fundus.

6. Urethra and urinary bladder: a urinary catheter was placed (specially adjusted for fixed tissue) until the internal sphincter. The bladder superiorly was oriented by median umbilical ligament. Sectioning was posteroanterior, with catheterised urethra on the right and continued cranially to apex through the incision in pubic symphysis.

Dissection of the lateral pelvic wall

Now that the midline approach has been achieved, we can dissect the lateral pelvic wall with careful attention to neurovascular structures and surgical layers (5):

Removal of peritoneum: on fixed cadavers, soft pressure is applied on the peritoneal surfaces to disrupt the superficial thin layer of fat tissue (already liquified by fixation). Gentle blunt lifting is applied to separate the serosa before peeling. Once separated, careful peeling is applied from posterior to anterior, roughly at the site of the peritoneal reflection. This process is exclusively blunt. No sharp instruments should be used. With careful dissection, the result is a transparent serosal membrane (6).

Appreciation of the lateral pelvic wall structures in their respective layers:

Superior level, medial view: By removing the peritoneum we immediately encounter fibres of the superior and inferior hypogastric plexuses, the superior communicates with the mesenteric plexus. This delicate autonomic structure is embedded in the soft fatty tissue and very careful manipulation is required for its preservation. Roughly, we start seeing the superior hypogastric plexus fibres below the aortic bifurcation (7).

Middle level, superior view: In this view the peritoneum is flipped from posterior to anterior, remains attached as uterine broad ligament. We can also see the ovarian suspensory ligament and uterine round ligament. We are viewing the level of the endopelvic fascia. The ureter was moved anteriorly to better appreciate the iliac arteries external and internal, the latter sends the anterior division: first is the obturator artery, followed by the umbilical and vesical arteries, later the uterine artery, middle rectal artery then internal pudendal artery. From the posterior division we can appreciate the inferior gluteal artery. These branches are well engulfed by minute fibres of the inferior hypogastric plexus (7).

Results

This specimen (Fig. 1) represents the first and only sagittal section of the pelvis available in our anatomy department. This preparation method allows us to appreciate superficial and deep pelvic structures and correlate clinically. Methodical approach with careful attention to delicate neurovascular structures allowed us for the first time to visualise components of the superior and inferior hypogastric plexus as well as the pathway of the hypogastric nerve, which is the most laterally situated component connecting the plexuses.

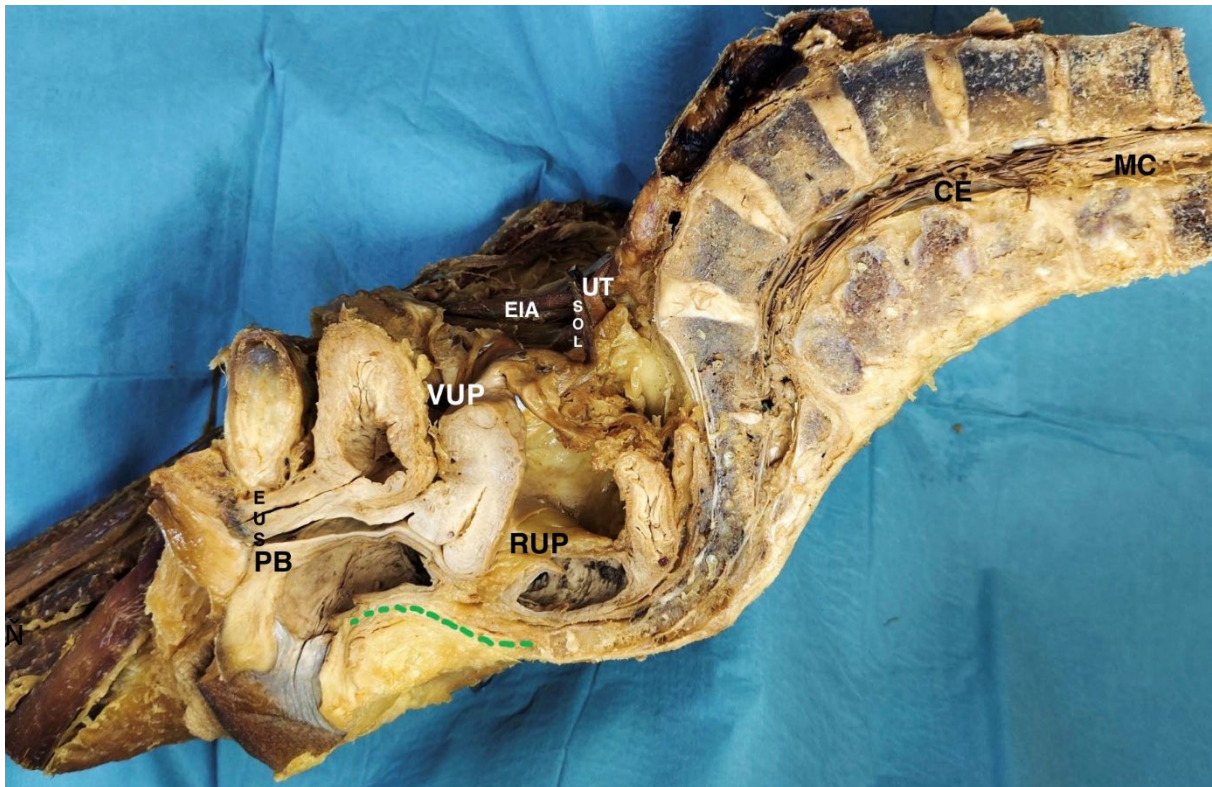


Fig.1 Overview of the sagittal section from L1 to mid thigh. We can appreciate the vertebral canal, with intact medullary conus (MC) and cauda equina (CE). The pelvic floor is appreciated with the dotted line at the level of levator ani muscle. A triangular perineal body can be appreciated (PB) in the rectovaginal space. The external urethral sphincter (EUS) can be palpated at the level of the inferior margin of the pubic symphysis. Vesicouterine (VUP) and rectouterine (RUP) can be readily appreciated. The ureter (UT) crosses the external iliac artery (EIA) into the pelvis and is adjacent to the suspensory ovarian ligament (SOL).

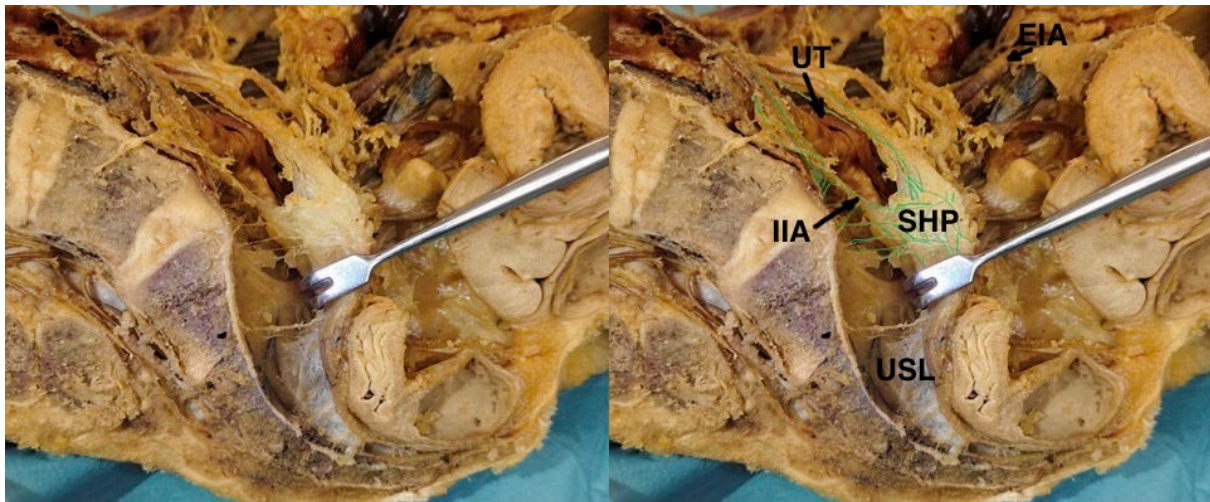


Fig. 2: Medial view, we can appreciate the superior hypogastric plexus (SHP), with few fibres attached to posterior wall. We can observe the ureter (UT) descending into the pelvis as it crosses the external iliac artery (EIA) and passes along the internal iliac artery (IIA). Below it we can visibly appreciate the uterosacral ligament (USL), which divides the space into pararectal and retrorectal spaces.



Fig. 3: Superolateral view of the lateral pelvic wall: the common iliac artery divides into external (EIA) and internal (IIA) iliac arteries, the internal iliac further divides into obturator (O), umbilical/vesical (UV), uterine (U), middle rectal (R), internal pudendal (P) and inferior gluteal (G). The hypogastric nerve (HN) descends from the superior to the inferior hypogastric plexus (green mesh).

Clinical correlation

Medial view as presented in fig.1 is vital for the understanding of the depth of the pelvic diaphragm and the relations between skeletal muscle and internal organs. It also enhances the understanding of the clinically relevant spaces such as the vesicouterine and rectouterine pouches. For clinical training, simulation of the puncture of Douglas space can be performed with possibility of direct feedback (8).

Pelvic splanchnic nerves represented in both superior and inferior hypogastric plexuses (Fig. 2 and 3) belong to the autonomous nervous system and provide sympathetic and parasympathetic innervation to the pelvic organs (9). One of the main nerves in this area is the hypogastric nerve, which passes in the prerectal space, medial to the ureter, in close contact to the uterosacral ligament. Damage to the hypogastric nerve is usually a complication of a pelvic procedure such as hysterectomy or cancer surgery. Such injury can cause serious functional damage to pelvic structures, including chronic constipation, urine incontinence and sexual dysfunction. Knowledge of the nerve pathway and topography is vital for surgical training of pelvic procedures (7,8,10).

Discussion

Live preparation of cadaveric structures remains the gold standard in medical training.

The presented work offers a manual for the sagittal sectioning of female pelvis for the purpose of teaching of anatomy and training for pelvic procedures in surgery. Sagittal sectioning offers the possibility for dissecting superficial and deep structures without compromising the topography or having to discard or detach superficial structures, which allows for the training of simulation procedures within the pelvic space (11).

Modified sagittal sectioning and various window approaches have been implemented in anatomic dissection of the pelvis with indication based on the target structure (3). The addition of sagittal sections in anatomical specimens to CT or MRI imaging has been reported to enhance student capabilities of memorising anatomical structures (12). The use of sagittal sectioning of the pelvis can also be implemented for further utilisation of cadaveric specimens deemed for final disposition.

Vertical integration in the form of clinical correlation offers a direct application of anatomic knowledge which enhances learning and makes the student experience more enjoyable and more meaningful (13). Preparation of cadaveric specimen sections in parallel to clinical imaging is a pathway for optimising the educational experience and stretching the value along several subspecialties of medical training.

References

1. Arráez-Aybar, L. A. (2025). Evolving anatomy education: bridging dissection, traditional methods, and technological innovation for clinical excellence. *Anatomia*, 4(2), 9.
2. Fritsch, H. (2007). Clinical anatomy of the female pelvis. In *MRI and CT of the Female Pelvis* (pp. 1-24). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
3. Foskey, J., & Loomis, M. (2023). An Open-Book Approach to Pelvic Dissection for the Male Genitourinary System. *Cureus*, 15(5).

4. Rahman, M. A., Sultana, N., Ayman, U., Bhakta, S., Afrose, M., Afrin, M., & Haque, Z. (2022). Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphologic and molecular analysis of tissues. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.075>
5. Rogers RM, Pasic RPP, Pelvic Retroperitoneal Dissection: A Hands-On Primer, *The Journal of Minimally Invasive Gynecology* (2017), doi: 10.1016/j.jmig.2017.01.024.
6. Zhou, Z., Li, B., Zhou, J., Ma, Y., Zhao, Y., Tong, C., ... & Yan, L. (2023). Anatomical investigation of the pelvic urogenital fascia in 10 formalin-fixed female cadavers: novel insights into the laparoscopic total mesometrial resection. *BMC surgery*, 23(1), 329.
7. Centini, G., Cannoni, A., Giorgi, M., Ginetti, A., Moros, J. C., Habib, N., & Lazzeri, L. (2023). Surgical Anatomy of the Pelvis. *Global library of women's medicine*.
8. Ferla, S., Raimondo, D., Virgilio, A., Timoh, K. N., Seracchioli, R., & Rabischong, B. (2025). Comprehensive cadaveric dissection of female pelvic neuroanatomy: the autonomic system. *International Journal of Gynecological Cancer*.
9. Paulsen, F., Waschke, J., Klonisch, T., & Hombach-Klonisch, S. (2011). Sobotta - Atlas of Human Anatomy, General anatomy and musculoskeletal system.
10. Kostov, S., Kornovski, Y., Yordanov, A., Watrowski, R., Slavchev, S., Ivanova, Y., ... & Selçuk, I. (2023). Surgical anatomy and dissection of the hypogastric plexus in nerve-sparing radical hysterectomy. *Diagnostics*, 14(1), 83.
11. Aziz, M. A., McKenzie, J. C., Wilson, J. S., Cowie, R. J., Ayeni, S. A., & Dunn, B. K. (2002). The human cadaver in the age of biomedical informatics. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 269(1), 20-32.
12. Graziani, G. C., Bocchi, M., Gouvêa-e-Silva, L. F., Fornaziero, C. C., & Fernandes, E. V. (2024). Technologies for studying and teaching human anatomy: implications in academic education. *Medical Science Educator*, 34(5), 1203-1214.
13. Chytas, D., Noussios, G., Paraskevas, G., Vasiliadis, A. V., Salmas, M., Lyrtzis, C., & Troupis, T. (2025). Vertical integration of anatomy teaching in the clinical phase of undergraduate medical education: An overview. *Morphologie*, 109(366), 100969.

7. A Comparative Model of Pulmonary Surface Topography versus the Internal Conducting Framework and advanced Dissection and Preservation of the Laryngo-tracheal axis

Lukáš Duroška

(general medicine, 2nd year)

Coauthors: Timotej Filip Janáč, Nikita Valerievič Berezhetskiy

Supervisor: Mgr. Tomáš Havránek, PhD., MUDr. Hisham El Falougy, PhD., MUDr. Olia El Hassoun Sečanská, PhD., prof. MUDr. Štefan Polák, CSc.

Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

Introduction

Anatomy serves as an essential part of medical studies, establishing the framework for all subsequent clinical disciplines. This work details specialised techniques for preserving and preparing the respiratory system for use in anatomical education and demonstration. Our methodology focuses on the dissection of the left bronchial tree, while maintaining the structural integrity of the trachea, the larynx and associated lingual attachments.

The resulting anatomical preparation is designed to offer a realistic representation of the lower respiratory tract's internal and external morphology.

The pedagogical value of preparation is enhanced by a dual-methodological approach to the lungs. The right lung (*pulmo dexter*) is preserved in its intact state to demonstrate external morphological features, including the oblique fissure (*fissura obliqua*) and the horizontal fissure (*fissura horizontalis*), which demarcate the superior, middle, and inferior lobes (*lobi superior, medius et inferior*). In contrast, the left lung (*pulmo sinister*) undergoes extensive dissection of the pulmonary parenchyma; systematic removal of the alveolar tissue is required to isolate the left bronchial tree (*arbor bronchialis sinister*). This approach reveals the branching pattern of the left main bronchus (*bronchus principalis sinister*), leading into the lobar bronchi (*bronchi lobares*) and the subsequent segmental bronchi (*bronchi segmentales*).

Furthermore, the trachea and larynx remain integral parts of the anatomical model. The larynx is specifically incised along its posterior wall to allow for a detailed description of its internal structure, which is often difficult to conceptualise. Hence, providing a better visual representation in anatomical study for understanding the fundamentals for specialists in radiology, pulmonology and thoracic surgery, helping the diagnosis in pathological conditions and variations.

Aims

The main goals of the presented study were:

1. To prepare a complex anatomical model of the lower respiratory tract and larynx suitable for use as a teaching tool in the anatomy curriculum.
2. To establish a suitable *en bloc* preparation procedure for the anatomical dissection curriculum.
3. To evaluate suitable post-processing techniques for anatomical models' longevity.

Materials and Methods

Preservation of the adult female cadaver, in accordance with applicable legal and ethical standards, was achieved through systemic arterial embalming using a standardised fixative solution consisting of 38% formaldehyde, 96% ethanol and sodium chloride aqueous solution. Following a regulated fixation period, the specimen was treated with an aqueous alcohol solution to diminish residual formaldehyde concentrations, ensuring a safer environment for prolonged macroscopic analysis. The female cadaver underwent initial preparation in the context of a student dissection curriculum, where the thoracic cavity (*cavitas thoracis*) and abdominal cavity (*cavitas abdominis*) were previously reflected [1].

Microdissections were carried out without the use of any special or commercial staining techniques, relying exclusively on the mechanical removal of tissue layers. Fine preparatory instruments were used, particularly scalpel blades of sizes 10–12, anatomical and surgical forceps, probes, and dissecting needles.

Dissection of the Cephalic and Cervical Attachments

The initial phase of preparation involved the mobilisation of the upper respiratory tract from its cranial attachments. The superior limit of the dissection was defined at the pharyngeal tubercle (*tuberculum pharyngeum*) of the basilar part of the occipital bone (*pars basilaris ossis occipitalis*) and the soft palate (*palatum molle*). By establishing this plane, the nasal cavity (*cavitas nasi*) and nasopharynx (*nasopharynx*) were maintained in situ, while the oropharynx (*oropharynx*) and the root of the tongue (*radix linguae*) were prepared for mobilisation [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Extraction of the respiratory tract

To maintain the anatomical integrity of the tracheobronchial tree, the cervical and thoracic viscera were extracted as a singular *en bloc* preparation. This necessitated the systematic preparation and division of major vascular structures. In the cervical region, the vagus nerves (*nn. vagi*) and the carotid sheaths were dissected. The thyroid gland (*glandula thyroidea*) and parathyroid glands (*glandulae parathyroidae*) were reflected to expose the laryngeal cartilages and the commencement of the trachea (*trachea*) [7].

In the thoracic compartment, the mobilisation of the lower respiratory tract required the simultaneous removal of the cardiovascular system. The following vascular divisions were performed to release the block:

The axillary arteries and veins (*aa. et vv. axillares*) at the lateral thoracic wall

The descending aorta (*aorta descendens*), and the inferior vena cava (*v. cava inferior*) at the level of the diaphragm (*diaphragma*)

The posterior intercostal arteries (*aa. intercostales posteriores*) arising from the thoracic aorta

Upon removal of the visceral block, the heart (*cor*) was separated from the pulmonary structures. This was achieved by careful dissection at the hilum of the lung (*hilum pulmonis*), where the pulmonary veins (*vv. pulmonales*) and pulmonary arteries (*aa. pulmonales*) were divided. The oesophagus (*oesophagus*) was maintained in its posterior relation to the trachea to demonstrate the tracheoesophageal interface [2, 3, 4, 5, 6, 7].

To demonstrate the inner anatomical structures of the larynx (Fig.: 1), incision was made on the posterior wall of the lower pharynx, right under the uvula, and the oesophagus. By doing so, we revealed the epiglottis and the glottis apparatus in remarkable detail.



Figure 1: Example of the posterior view of the dissected larynx and its internal anatomical structures.

Morphological Demonstration of the Bronchial Tree

The final stage of the preparation focused on the comparative anatomy of the lungs (*pulmones*). The right lung (*pulmo dexter*) was preserved in its anatomical state to demonstrate the lobar architecture (superior, middle, and inferior lobes) [8].

The left lung (*pulmo sinister*), however, was selected for the exposure of the bronchial tree (*arbor bronchialis*). Starting at the left main bronchus (*bronchus principalis sinister*), the pulmonary parenchyma (*parenchyma pulmonis*) was systematically removed using blunt dissection. This procedure followed the branching pattern into the superior and inferior lobar bronchi (*bronchi lobares superior et inferior*) and further into the segmental bronchi (*bronchi segmentales*). By removing the pulmonal tissue while preserving the bronchial cartilages, the preparation provides a stereophonic model of the internal conduction pathways, essential for understanding pulmonary segmentectomy and bronchoscopic topography [8].

In the next stage of the preparation, the already isolated left bronchial tree will undergo combined silica / acrylic fixation, which will secure reliable natural orientation, as well as the needed rigidity required for teaching purposes. The prepared model will be observed and

114 closely monitored for an extended period of time, at least two full semesters, with an expected
115 up to 60 hours of guided use. Stability and rigidity of the preparation and secondary post-
116 processing will be evaluated in the manner of future use of this in-house developed method.

117 118 **Results**

119 Macro-anatomical inspection of the right lung (pulmo dexter) demonstrated clearly defined
120 lobar architecture, with the oblique fissure (fissura obliqua) and horizontal fissure (fissura
121 horizontalis) demarcating the superior, middle, and inferior lobes (lobi superior, medius et
122 inferior). In the left lung (pulmo sinister), the blunt debridement of the pulmonary
123 parenchyma (parenchyma pulmonis) allowed for the successful exposure of the left bronchial
124 tree (arbour bronchialis sinister). Specifically, the branching of the superior and inferior lobar
125 bronchi (bronchi lobares superior et inferior) and their subsequent segmental bronchi
126 (bronchi segmentales) were clearly visualised.

127 However, complete isolation of the basal segments, including the medially and laterally
128 oriented bronchi (bronchi segmentales basales anteromedialis, lateralis et posterior), was
129 partially obscured by parenchymal density and post-mortem tissue consolidation. Despite
130 these limitations, the preparation achieved its pedagogical objective, offering a direct
131 comparison between intact pulmonary morphology and the internal conduction framework
132 (Fig.: 2), suitable for advanced medical training in bronchoscopic topography and thoracic
133 surgery (chirurgia thoracica).



134
135 *Figure 2: Example of dorsal and ventral views of the lungs with comparison of the intact lung*
136 *compared to the dissected arbor bronchialis.*

137 138 **Discussion**

The preparation of the respiratory system (*systema respiratorium*) can be considered as a bridge between theoretical morphological study and clinical application. By employing a dual-methodological approach, this model addresses the inherent difficulty medical students face when transitioning from the two-dimensional surface anatomy of the lungs (*pulmones*) to the complex, three-dimensional architecture of the bronchial tree (*arbor bronchialis*) [8].

The preservation of the right lung (*pulmo dexter*) in its natural state allows for the clear identification of the fissures (*fissurae*) and lobes (*lobi*), which are critical for surface projection and auscultation points. Conversely, the systematic debridement of the left pulmonary parenchyma (*parenchyma pulmonis*) offers a rare, high-fidelity view of the bronchial ramifications. This exposure is particularly vital for conceptualising the topography of the bronchopulmonary segments (*segmenta bronchopulmonalia*). The inability to fully recover the basal segments (*segmenta basalia*) in this specific specimen highlights the challenges posed by post-mortem tissue changes and underlying pathologies, yet it also provides a realistic clinical lesson in anatomical variation and the limitations of cadaveric study [8].

Furthermore, the *en bloc* extraction of the cervical and thoracic viscera maintains the vital spatial relationships between the trachea (*trachea*) and the oesophagus (*oesophagus*), as well as the vascular landmarks at the hilum of the lung (*hilum pulmonis*). The posterior incision of the larynx (*larynx*) specifically demystifies the glottic apparatus, an area frequently misunderstood in student dissections. Future integration of silica and acrylic fixation will likely enhance the durability of the specimen, ensuring its longevity as an in-house teaching tool for bronchoscopic and surgical training. Ultimately, this preparation provides a superior visualisation platform that fosters a deeper, more intuitive understanding of human respiratory morphology [1].

References

1. Rahman, M. A., Sultana, N., Ayman, U., Bhakta, S., Afrose, M., Afrin, M., & Haque, Z. (2022). Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphologic and molecular analysis of tissues. *Saudi journal of biological sciences*, 29(1), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.075>
2. MRÁZ, P. a kol. *Anatómia ľudského tela 2*. Bratislava: Slovak Academic Press, 2012. 487 s. ISBN 978-80-8910-496-3.
3. ROHEN, J. W., YOKOCHI, C. a LÜTJEN-DRECOLL, E. *Color Atlas of Anatomy: A Photographic Study of the Human Body*. 7. vyd. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 556 s. ISBN 978-1582558561.
4. NETTER, F. H. *Atlas of Human Anatomy*. 7. vyd. Philadelphia: Elsevier, 2018. 672 s. ISBN 978-0323393225.
5. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 1–3*. Praha: Grada, 2016. 534 s., 470 s., 673 s. ISBN 9788024738178; 9788024701431; 9788024711324.
6. SINĚLNIKOV, R. D. *Atlas anatomie člověka 1–3*. Praha: Avicenum, 1980–1983. 467 s., 472 s., 399 s.
7. MRÁZ, Peter. *Pitevné cvičenia: učebnica pre lekárske fakulty*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2013. 199 s. ISBN 8021705507
8. Standring, S. (Ed.). (2016). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice* (41st ed.). Elsevier.

8. Tvorba oxidu dusnatého môže súvisieť s epitelovo-mezenchýmovou premenou nádorových buniek v karcinóme pankreasu.

Natália Zorgovská

(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta UK a UNB, Bratislava

Úvod

Nádory pankreasu predstavujú mimoriadne heterogénnu skupinu ochorení, ktoré sa líšia histologickým pôvodom, biologickým správaním aj odpoveďou na liečbu. Ich klasifikácia vychádza z charakteru bunkovej diferenciácie (duktálna, acinárna, neuroendokrinná) a rastového vzoru nádoru. Väčšina epitelových nádorov vykazuje jednu alebo viac líníí diferenciácie, pričom prekursorové lézie sa hodnotia na základe stupňa dysplázie ako low-grade a high-grade intraepiteliálne neoplázie. Najčastejšou malignitou pankreasu je duktálny adenokarcinóm (PDAC), ktorý tvorí približne 95 % exokrinných nádorov a patrí medzi najagresívnejšie nádory tráviaceho traktu. Okrem neho sa v pankrease vyskytujú aj cystické, intraduktálne a neuroendokrinné nádory, ktoré majú odlišnú biologickú povahu a klinický priebeh (1).

Progresia PDAC je výsledkom komplexnej interakcie molekulárnych a bunkových mechanizmov, ktoré vedú k transformácii normálnych buniek na invazívny nádor. Kľúčovým procesom je epitelovo-mezenchymálna premena (EMT), pri ktorej nádorové bunky strácajú epitelové vlastnosti a nadobúdajú schopnosť migrácie a invázie. V nádoroch sa typicky uplatňuje parciálna EMT, pri ktorej bunky kombinujú epitelové aj mezenchymálne znaky, čo podporuje metastázovanie, vznik cirkulujúcich nádorových buniek a rezistenciu na liečbu. Tento proces úzko súvisí s nádorovým mikroprostredím, ktoré je charakterizované chronickým zápalom, hypoxiou a dynamickou signalizáciou medzi nádorovými bunkami a stromálnymi zložkami (2).

Významnú úlohu v regulácii týchto procesov zohráva oxid dusnatý (NO), krátko žijúca signálna molekula produkovaná NO syntázami. Indukovateľná izoforma NOS2 je schopná produkovať vysoké a dlhodobo udržiavané koncentrácie NO v podmienkach zápalu a stresu, ktoré sú typické pre nádorové mikroprostredie. NO ovplyvňuje proliferáciu, angiogénu, apoptózu aj imunitnú odpoveď a jeho účinok je výrazne závislý od koncentrácie a miesta produkcie. NOS2 tak predstavuje dôležitý regulátor nádorovej biológie, pričom môže pôsobiť dualisticky – na jednej strane tumoricídne, na druhej strane podporovať progresiu nádoru prostredníctvom podpory angiogénu, metastázovania a imunosupresie (3, 4).

1 Metodika

Na základe dostupných poznatkov predpokladáme, že oxid dusnatý (NO) a jeho syntázy NOS2 a NOS3 zohrávajú významnú úlohu v biológii duktálneho adenokarcinómu pankreasu (PDAC). Ich aktivita môže byť spojená s epitelovo-mezenchymálnou premenou (EMT) a prispievať k invazívnemu a metastatickému potenciálu nádoru. Predpokladáme, že expresia NOS2 a NOS3 je zvýšená nielen v nádorových bunkách, ale aj v nádorovom mikroprostredí, vrátane fibroblastov a extracelulárnej matrix. Zvýšená aktivita týchto enzýmov môže byť asociovaná so zmenami typickými pre EMT, najmä s poklesom expresie E-kadherínu a zvýšenou expresiou transkripčného faktora ZEB1. NO signalizácia môže predstavovať významný mechanizmus podporujúci progresiu nádoru, ako aj potenciálny prognostický marker a terapeutický cieľ.

Základný súbor práce tvorilo 40 pacientov s histopatologicky potvrdeným PDAC z archívnych vzoriek Národného onkologického ústavu v Bratislave. Po spracovaní bolo k dispozícii 37 hodnotiteľných vzoriek. Najpočetnejšiu skupinu tvorili tumory s nízkym stupňom diferenciácie (G1), menej zastúpené boli G2 a G3 nádory. V časti prípadov bola prítomná výrazná desmoplázia, zatiaľ čo cystické zmeny boli zriedkavé. Zápalový fenotyp bol prítomný približne u štvrtiny pacientov. Celkovo súbor poukazuje na výraznú morfológickú heterogenitu PDAC, pričom väčšina nádorov vykazovala typické histopatologické znaky tohto ochorenia.

Tkanivové vzorky boli spracované z FFPE blokov a analyzované pomocou techniky tissue microarray (TMA), ktorá umožňuje paralelné hodnotenie viacerých prípadov. Rezy boli štandardne farbené hematoxylínom-eozínom na overenie diagnózy a následne analyzované fluorescenčnou mikroskopiou. Imunohistochemické farbenie bolo realizované na parafínových rezoch s hrúbkou 3 μ m po ich odparafíňovaní v xyléne a rehydratácii v klesajúcej koncentrácii etanolu. Antigénová demaskácia prebehla v citrátovom pufrí (pH 6,0) pri zvýšenej teplote (96–98 °C) počas 20 minút. Po blokovaní endogénnej peroxidázovej aktivity a nespecifickej väzby boli rezy inkubované s primárnymi protilátkami: anti-NOS2 (iNOS; Merck Millipore, klon ABN26, riedenie 1:100), anti-NOS3 (eNOS; Bios, riedenie 1:100), anti-E-cadherín (napr. klon NCH-38, Dako/Agilent, riedenie 1:100) a anti-ZEB1 (napr. Abcam, riedenie 1:100). Inkubácia prebiehala pri laboratórnej teplote počas 60 minút. podľa optimalizovaného protokolu výrobcu. Následne boli aplikované sekundárne protilátky konjugované s detekčným systémom (HRP/DAB), pričom vizualizácia reakcie bola dosiahnutá použitím chromogénu 3,3'-diaminobenzidínu (DAB). Jadrá buniek boli kontrastne dofarbované hematoxylínom. Po dehydratácii a uzatvorení preparátov boli rezy hodnotené svetelným mikroskopom, pričom sa analyzovala lokalizácia a intenzita expresie jednotlivých markerov v nádorových bunkách a nádorovom mikroprostredí.

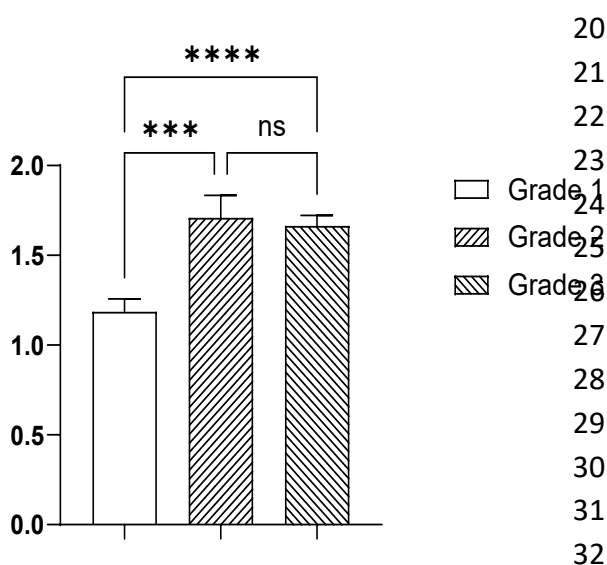
Expresia NOS2 a NOS3 bola kvantifikovaná morfometricky pomocou softvéru ImageJ, pričom intenzita signálu bola vyjadrená v arbitrárnych jednotkách. Súčasné hodnotenie markerov EMT (E-kadherín a ZEB1) prebiehalo semikvantitatívne na základe podielu pozitívnych buniek.

Štatistická analýza bola realizovaná v programe GraphPad Prism, verzia 10.6.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Na začiatku bola posúdená distribúcia dát D'Agostino-Pearsonovým testom normality. V prípade ak dáta vykazovali normálne rozdelenie bola použitá jednofaktorová analýza rozptylu (one-way ANOVA), po ktorej nasledoval Tukeyho post hoc test. V prípadoch, keď dáta nespĺňali kritériá normality, bol aplikovaný neparametrický Kruskal-Wallisov test. Korelácie boli realizované pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu (Spearman r).

Výsledky

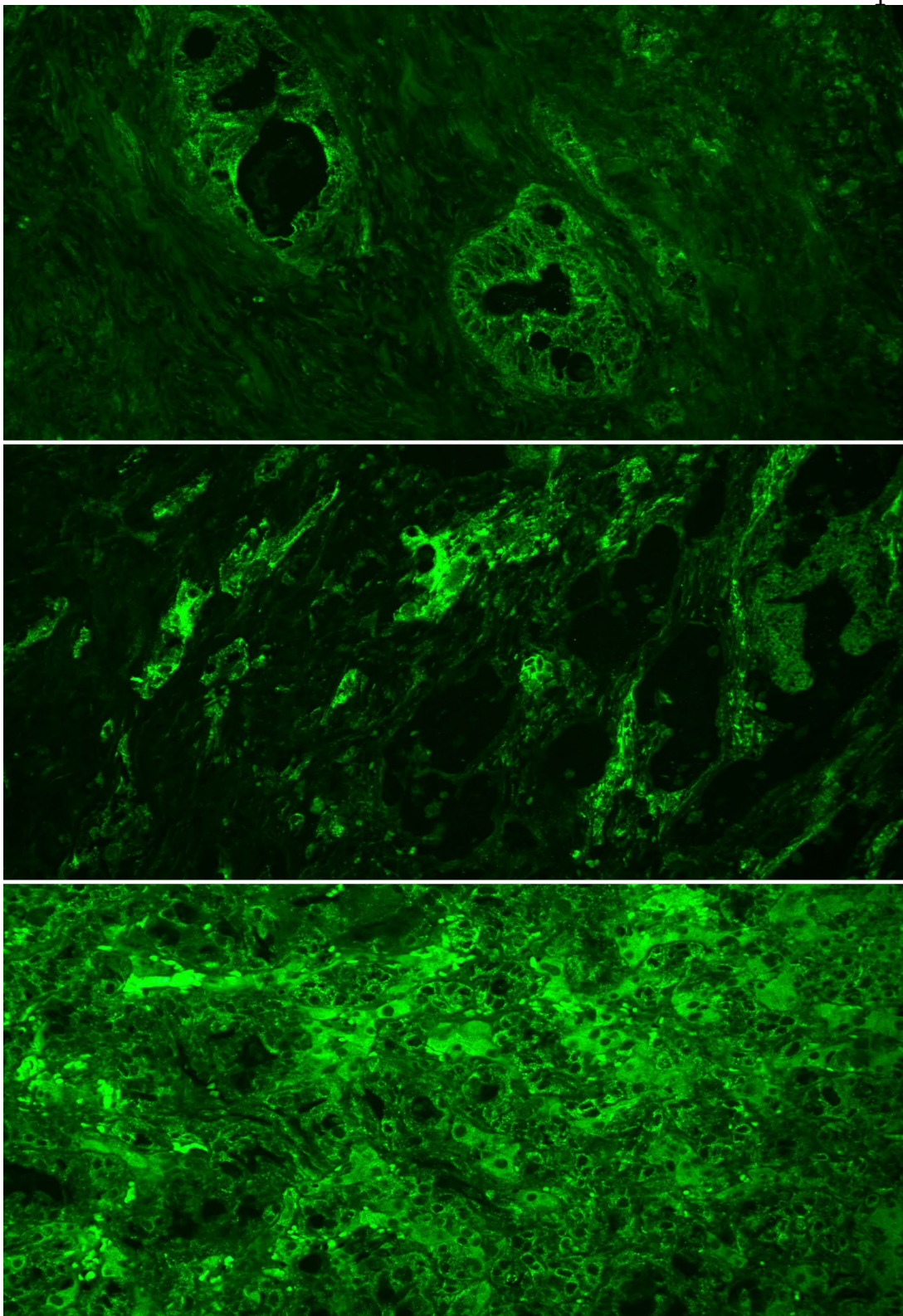
V analyzovaných prípadoch sme pozorovali pravidelnú expresiu NOS2 v nádorových bunkách duktálneho adenokarcinómu pankreasu nezávisle od stupňa diferenciácie. Expresia bola prítomná ako difúzna cytoplazmová pozitivita, pričom intenzita signálu kolísala od miernej až po silnú. Kvantifikácia ukázala signifikantne vyššiu intenzitu fluorescenčného signálu pri tumoroch s vyšším stupňom malignity. Pri grade 1 bola nameraná intenzita $1,19 \pm 0,07$ AU, pri grade 2 $1,71 \pm 0,13$ AU a pri grade 3 $1,67 \pm 0,06$ AU. Rozdiel medzi grade 2 a grade 3 nebol štatisticky významný, avšak obe skupiny vykazovali významne vyššiu expresiu v porovnaní s grade 1 ($p < 0,001$). Napriek štatistickým rozdielom sme zaznamenali aj výraznú interindividuálnu variabilitu exprese NOS2 v rámci jednotlivých skupín.

Duálne imunofluorescenčné farbenie umožnilo vo všetkých hodnotených prípadoch jednoznačne identifikovať populáciu nádorových buniek s pravidelnou membránovou pozitivitou E-cadherínu. Súčasne boli detegované aj bunky exprimujúce ZEB1, pričom táto expresia vykazovala vyššiu morfológickú variabilitu. Pozorovali sme odlišné vzory positivity ZEB1, a to od difúzne cytoplazmovej distribúcie, cez výraznú jadrovú lokalizáciu až po jemnozrnutú cytoplazmovú pozitivitu. Podiel ZEB1-pozitívnych buniek sa medzi jednotlivými prípadmi výrazne líšil, čo poukazuje na heterogénnosť nádorových buniek v kontexte epitelovo-mezenchýmovej prestavby.



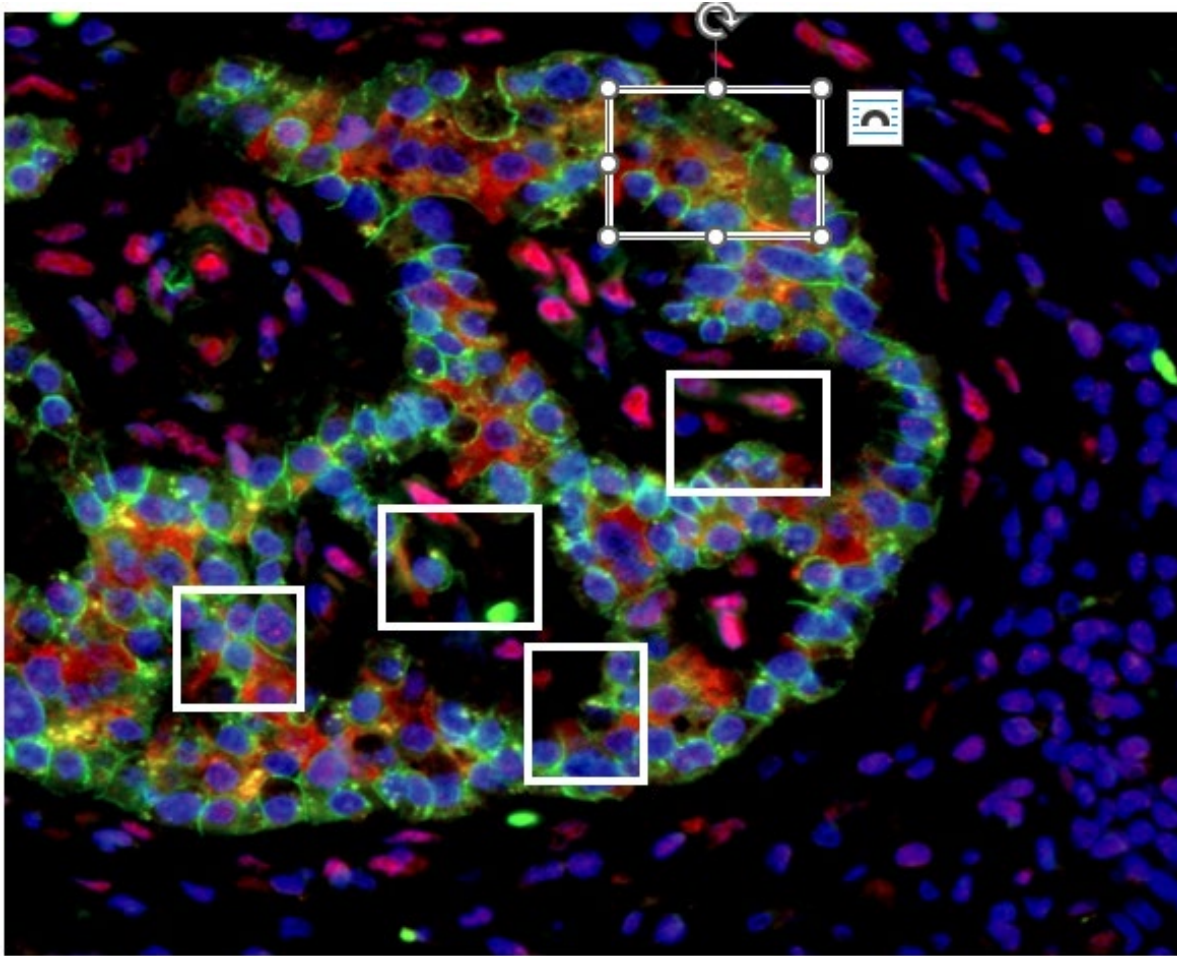
Obrázok 1 Intenzita NOS2 v adenokarcinóme pankreasu

Graf znázorňuje kvantifikovanú intenzitu fluorescenčného signálu NOS2 v epiteliálnych bunkách duktálneho adenokarcinómu pankreasu v závislosti od stupňa diferenciácie (Grade 1, Grade 2 a Grade 3). Pozorovali sme signifikantne vyššiu expresiu NOS2 pri nádoroch Grade 2 a Grade 3 v porovnaní s nádormi Grade 1 ($***p < 0,001$; $****p < 0,0001$), pričom medzi skupinami Grade 2 a Grade 3 nebol zistený štatisticky významný rozdiel (ns).



18 **Obrázok 2** *Expresia NOS2 v duktálnom adenokarcinóme pankreasu.*

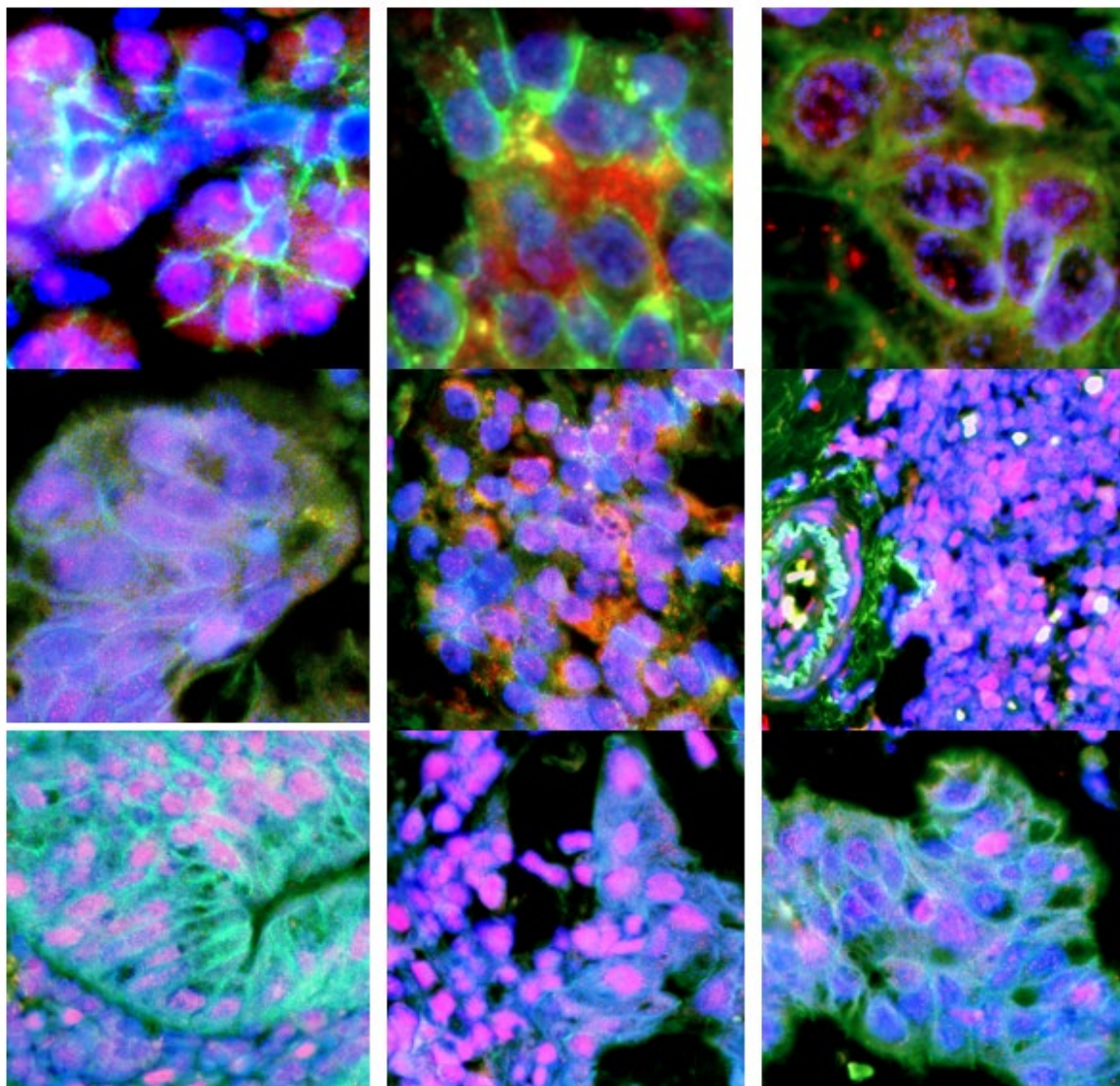
19 Pozorujeme pravidelnú difúznú cytoplazmovú pozitivitu v nádorových bunkách. a) adenokarcinóm
20 pankreasu grade 1, b) adenokarcinóm pankreasu grade 2, c) adenokarcinóm pankreasu grade 3, NOS2,
21 fluorescenčná imunohistochemia (IF), zväčšenie 200x.



Obrázok 3 Duálna expresia E-cadherínu a ZEB1 v duktálnom adenokarcinóme pankreasu. Dobre diferencovaný adenokarcinóm pankreasu s kribriformným rastovým vzorom. Identifikujeme nádorové epiteliálne bunky so známami epitelovo-mezenchýmovej transformácie (obdĺžnik). E-cadherín (zelená farba) / ZEB1 (červená farba), IF, 200×.

Pri porovnaní expresie NOS2 a indexu E-cadherín/ZEB1 sme preukázali pozitívnu koreláciu medzi intenzitou tvorby NOS2 a počtom ZEB1-pozitívnych buniek v nádorových tkanivách (Pearson $r = 0,7476$; $p < 0,0001$). Vyššie hladiny NOS2 boli spojené s vyšším zastúpením buniek s mezenchymálnym fenotypom, čo podporuje úlohu NOS2 v procese epitelovo-mezenchýmovej transformácie. Ide o veľmi zaujímavý nález, ktorý naznačuje možný biologický vzťah medzi produkciou oxidu dusnatého a nádorovou progresiou spojenou so stratou epiteliálneho fenotypu.

1

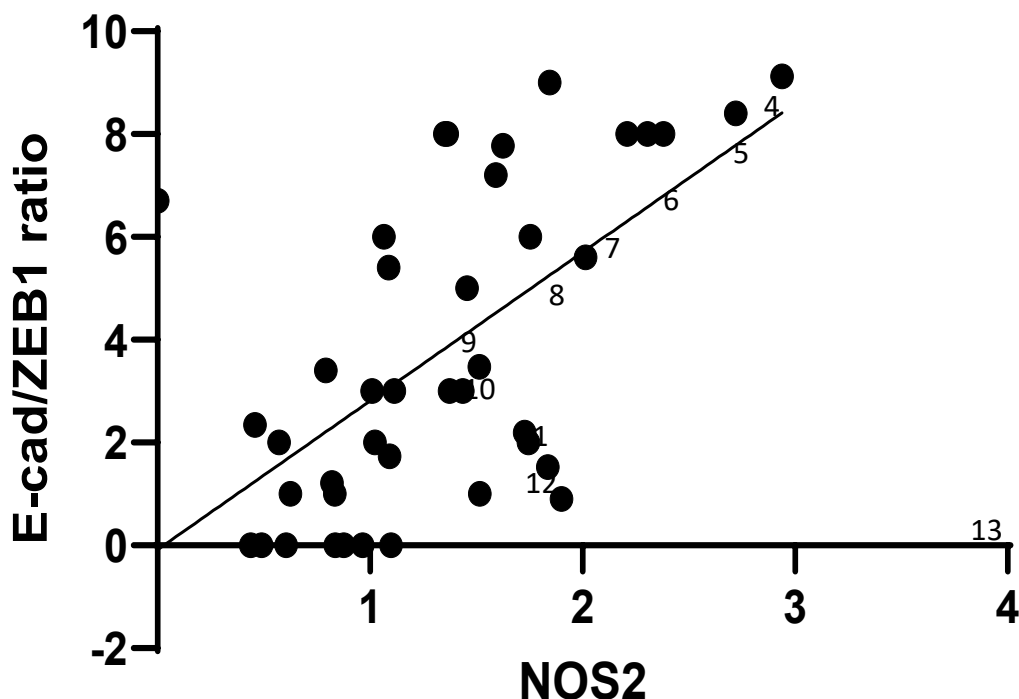


2

3

4 **Obrázok 4 Variabilita vzorov expresie ZEB1 v duktálnom adenokarcinóme pankreasu**

5 ZEB1-pozitívne nádorové bunky vykazujú výraznú morfológickú heterogenitu expresie. Pozorované
6 boli rôzne vzory pozitivity ZEB1 vrátane difúznej cytoplazmovej distribúcie, jemnozrnitej cytoplazmovej
7 pozitivity ako aj jadrovej lokalizácie a . ZEB1, IF, 200x.



Obrázok 5 Korelácia medzi expresiou NOS2 a indexom E-cadherín/ZEB1 v duktálnom adenokarcinóme pankreasu

Graf ilustruje signifikantný pozitívny vzťah medzi intenzitou exprese NOS2 a pomerom E-cadherín/ZEB1 v nádorových bunkách. Vyššia expresia NOS2 bola asociovaná s vyšším podielom buniek so známkami epitelovo-mezenchýmovej transformácie (Pearson $r = 0,7476$; $p < 0,0001$).

Diskusia

Na základe našich výsledkov možno konštatovať, že duktálny adenokarcinóm pankreasu je spojený so zvýšenou expresiou indukovateľnej NO-syntázy (NOS2) v nádorových bunkách, pričom tento vzostup koreluje s histologickým gradingom tumoru. Súčasne sme pozorovali stratu alebo oslabenie membránovej exprese E-cadherínu a zvýšenú expresiu transkripčného faktora ZEB1, čo poukazuje na aktiváciu epitelovo-mezenchýmovej transformácie (EMT). Variabilita exprese ZEB1, vrátane nukleárnej aj cytoplazmatickej positivity, odráža heterogenitu nádorového tkaniva a dynamický charakter EMT. Významným nálezom bola aj prítomnosť ZEB1 v stromálnych fibroblastoch, čo naznačuje úlohu nádorového mikroprostredia v regulácii invazívneho správania nádoru. Pozitívna korelácia medzi expresiou NOS2 a počtom ZEB1 pozitívnych buniek podporuje hypotézu o prepojení NO signalizácie s EMT procesmi.

Naše výsledky sú v súlade s publikovanými štúdiami, ktoré poukazujú na úlohu NOS2 v progresii nádoru, jeho agresivite a nepriaznivej prognóze. Oxid dusnatý má v nádorovom mikroprostredí duálny účinok – pri nižších koncentráciách podporuje proliferáciu, angiogénzu a invazivitu, zatiaľ čo vo vyšších koncentráciách môže pôsobiť cytotoxicky. ZEB1 ako kľúčový regulátor EMT potláča expresiu E-cadherínu a podporuje invazívny fenotyp nádorových buniek, čo sa potvrdilo aj v našom súbore. Zároveň sa ukazuje, že stromálne bunky

exprimujúce ZEB1 môžu aktívne participovať na remodelácii extracelulárnej matrix a podpore nádorovej invazivity. Kombinácia zvýšenej expresie NOS2 a ZEB1 spolu so stratou E-cadherínu tak môže predstavovať marker agresívneho biologického správania nádoru (5–7).

Limitáciou práce je relatívne malý počet vzoriek a semikvantitatívny charakter hodnotenia, ktorý môže byť ovplyvnený preanalytickými faktormi. Chýba tiež priame funkčné overenie mechanizmov prepojenia NOS2 a EMT, ako aj korelácia s klinickými údajmi, napríklad prežívaním pacientov. Do budúcnosti by bolo vhodné rozšíriť kohortu, doplniť kvantitatívne metódy a realizovať funkčné in vitro a in vivo štúdie. Perspektívnym smerom je aj skúmanie interakcií medzi NOS2 a regulačnými sieťami EMT, ako aj potenciálne terapeutické ovplyvnenie NO dráh. Naše výsledky však naznačujú, že modulácia NOS2 by mohla predstavovať možný cieľ adjuvantnej liečby a prispieť k zlepšeniu prognózy pacientov s karcinómom pankreasu.

Podakovanie

Ďakujeme Národnému onkologickému ústavu za pomoc pri realizácii tejto práce a za poskytnutie cenného materiálu. Osobitné poďakovanie patrí Patrícii Füleovej a prof. MUDr. Michalovi Megovi, DrSc., a jeho tímu za ich ochotu, podporu a pomoc, ktoré významne prispeli k vypracovaniu tejto práce.

Zoznam použitej literatúry

1. Nagtegaal I.D., Odze R.D., Klimstra D., Paradis V., Rugge M., Schirmacher P., et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76:182–8; doi: 10.1111/his.13975.
2. Saitoh M. Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2023;97:21–9; doi: 10.1016/j.semcancer.2023.10.001.
3. Thomas D.D., Wink D.A. NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26:963–5; doi: 10.1089/ars.2016.6835.
4. Vannini F., Kashfi K., Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*. 2015;6:334–43; doi: 10.1016/j.redox.2015.08.009.
5. Wang J., He P., Gaida M., Yang S., Schetter A.J., Gaedcke J., et al. Inducible nitric oxide synthase enhances disease aggressiveness in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7:52993–3004; doi: 10.18632/oncotarget.10323.
6. Fujita M., Somasundaram V., Basudhar D., Cheng R.Y.S., Ridnour L.A., Higuchi H., et al. Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive phenotype. *Redox Biol*. 2019;22:101158; doi: 10.1016/j.redox.2019.101158.
7. Krebs A.M., Mitschke J., Lasierra Losada M., Schmalhofer O., Boerries M., Busch H., et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol*. 2017;19:518–29; doi: 10.1038/ncb3513.

9. Retrospektívna analýza zlomenín mandibuly v súbore 660 pacientov

Matúš Lehoťák

(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Spoluautori: MDDr. Bronislava Dvoranová, PhD.,¹ doc. MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD.,^{2,3}
doc. MUDr. Ladislav Czakó, PhD., MPH¹

Školiteľ: MDDr. Michal Vavro, PhD.¹

¹Klinika ústnej, čeľustnej a tvárovej chirurgie LFUK a UNB

²Fyziologický ústav LFUK

³Ústav molekulárnej biomedicíny LFUK

Úvod

Zlomeniny mandibuly patria medzi najčastejšie úrazy tvárovej časti lebky a predstavujú významnú časť traumatológie v maxilofaciálnej chirurgii. Mandibula ako jediná pohyblivá kosť tvárového skeletu zohráva zásadnú úlohu pri žuvaní, artikulácii a estetike tváre. Poranenia tejto oblasti preto môžu viesť k funkčným aj estetickým komplikáciám, vrátane nevyhovujúcej oklúzie, obmedzenia pohybu temporomandibulárneho kĺbu, chronickej bolesti, alebo okoločelústneho zápalu.

Zlomeniny mandibuly vznikajú najčastejšie v dôsledku dopravných nehôd, pádov, športových úrazov alebo násilných poranení [1,2]. Epidemiologické štúdie dlhodobo poukazujú na vyšší výskyt týchto úrazov u mužov, najmä v mladšom veku, čo súvisí s vyššou mierou rizikového správania a expozíciou traumatickým situáciám [3,4].

Klasifikácia zlomenín mandibuly vychádza z anatomickej lokalizácie, počtu lomných línií a biomechanických vlastností kosti [5-7]. V súčasnosti je široko využívaný klasifikačný systém AOCMF, ktorý umožňuje štandardizované hodnotenie zlomenín a pomáha pri plánovaní liečby [5,7]. Terapeutické možnosti zahŕňajú konzervatívny postup alebo chirurgickú liečbu pomocou otvorenej repozície a vnútornej fixácie (ORIF) [8].

Epidemiológia maxilofaciálnych úrazov nie je statická a mení sa v závislosti od sociálnych, kultúrnych a ekonomických faktorov. Významnú úlohu zohrávajú aj sezónne vplyvy a zmeny životného štýlu populácie. Z tohto dôvodu je dôležité pravidelne analyzovať aktuálne epidemiologické údaje, ktoré umožňujú optimalizovať diagnostické a terapeutické postupy [1,9].

Metodika

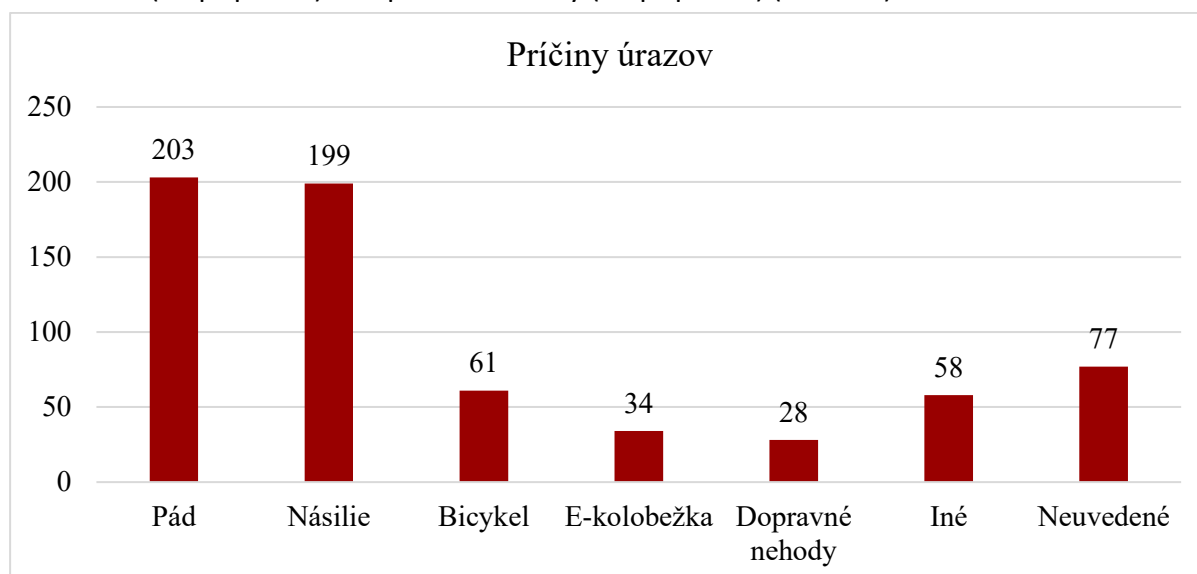
Štúdia bola realizovaná ako retrospektívna kohortová analýza pacientov liečených na Klinike ústnej, čeľustnej a tvárovej chirurgie LFUK a UNB. Analyzované boli zdravotné záznamy pacientov s diagnózou zlomeniny mandibuly v období január 2020 až august 2025. Do štúdie boli zahrnutí pacienti s potvrdenou diagnózou zlomeniny mandibuly na základe klinického

vyšetrenia a zobrazovacích metód. Do konečného súboru bolo zaradených 660 pacientov, ktorí spĺňali stanovené kritériá. Z analýzy boli vylúčené patologické zlomeniny spôsobené nádorovým procesom a prípady s neúplnou zdravotnou dokumentáciou. Analyzované boli nasledujúce parametre: pohlavie, vek, mechanizmus vzniku úrazu, anatomická lokalita zlomeniny mandibuly, typ zlomeniny (jednoduchá/viacnásobná), spôsob liečby (konzervatívna/chirurgická), sezónnosť úrazov a časové rozloženie výskytu. Mechanizmus úrazu bol rozdelený do niekoľkých kategórií: pády, násilné poranenia, dopravné nehody, úrazy na bicykli, úrazy na elektrickej kolobežke, ostatné príčiny a nešpecifikované prípady. Lokalizácia zlomenín mandibuly bola klasifikovaná podľa anatomickej oblasti na zlomeniny symfýzy, tela mandibuly, uhla mandibuly, ramus mandibulae, processus condylaris a processus coronoideus.

Získané údaje boli spracované pomocou deskriptívnej štatistiky. Na porovnanie kategorizovaných premenných bol použitý chi-kvadrát test a na porovnanie vekových skupín neparametrické testy. Hladina štatistickej významnosti bola stanovená na $p < 0,05$.

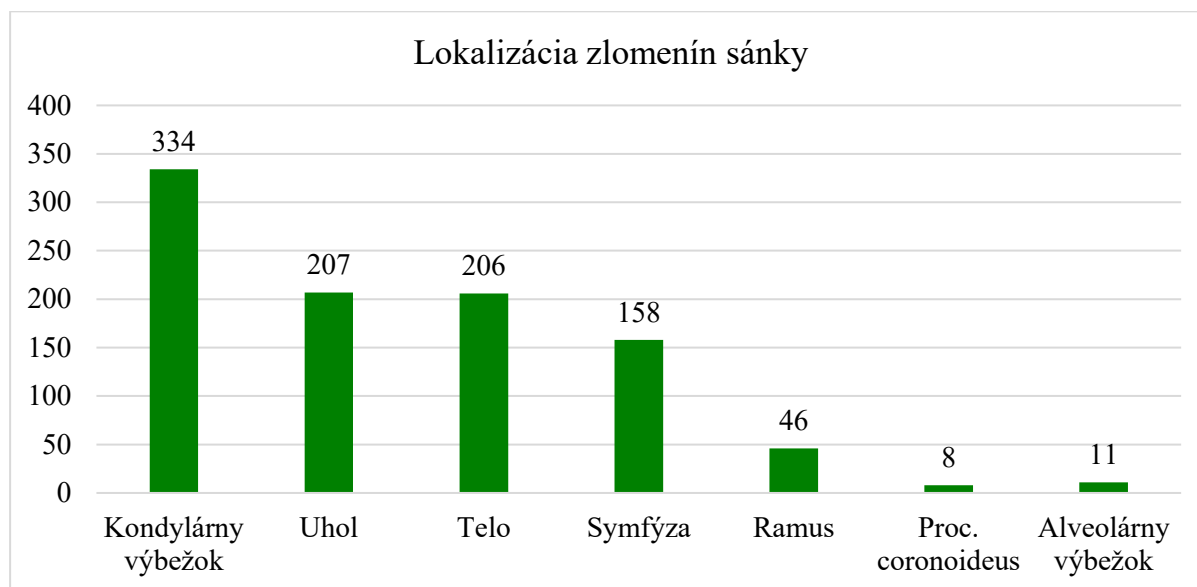
Výsledky

V analyzovanom súbore 660 pacientov bola zaznamenaná výrazná prevaha mužov v porovnaní so ženami. Mužské pohlavie predstavovalo väčšinu pacientov so zlomeninami mandibuly. Do analyzovaného súboru bolo zaradených 660 pacientov, z toho 478 mužov (72,4 %) a 182 žien (27,6 %). Pomer mužov a žien bol 2,6 : 1, rozdiel v zastúpení pohlaví bol štatisticky významný. Priemerný vek pacientov bol $37,5 \pm 18,3$ rokov, pričom vekové rozpätie súboru bolo od 6 do 93 rokov. Analýza závislosti medzi pohlavím a mechanizmom úrazu pomocou chí-kvadrát testu preukázala významné rozdiely medzi mužmi a ženami ($p < 0,0001$). U mužov boli najčastejšou príčinou úrazu násilné poranenia, zatiaľ čo u žien dominovali pády. Najčastejšou príčinou zlomenín mandibuly boli pády (203 prípadov), nasledované násilnými poraneniami (199 prípadov). Medzi ďalšie mechanizmy patrili úrazy na bicykli (61 prípadov), úrazy na elektrickej kolobežke (34 prípadov) a dopravné nehody (28 prípadov) (Graf č.1).



Graf č. 1: Príčiny úrazov

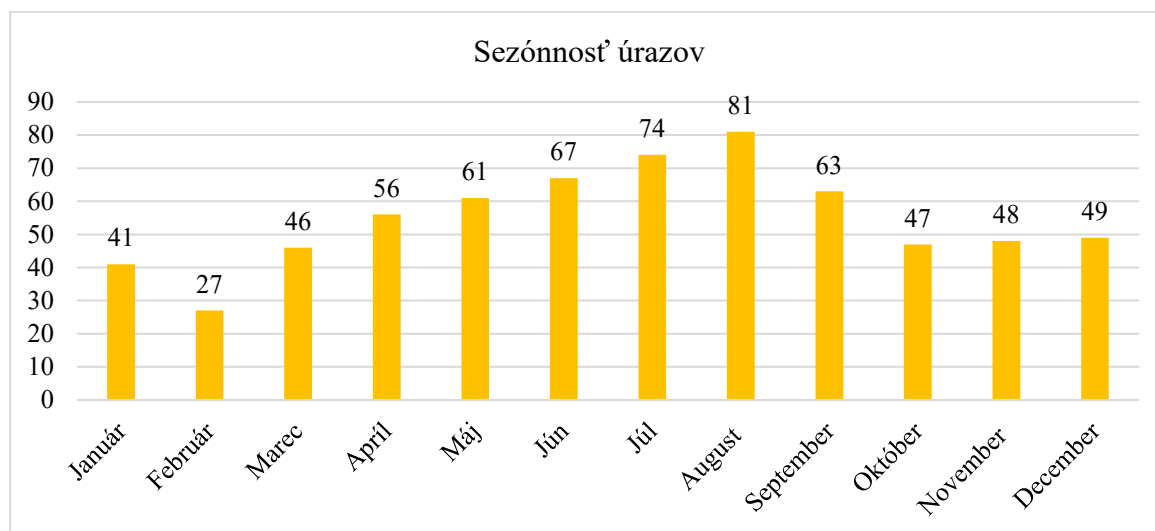
Zaujímavým zistením bol aj výskyt úrazov súvisiacich s elektrickými kolobežkami, ktoré predstavovali významnú časť traumatických mechanizmov najmä u mladších pacientov. Najčastejšou lokalizáciou zlomeniny bol processus condylaris (334 prípadov), nasledovaný uhlom mandibuly (207 prípadov) a telom mandibuly (206 prípadov). Ďalšie lokalizácie zahŕňali zlomeniny symfýzy (158 prípadov), ramus mandibulae (46 prípadov), alveolárneho výbežku (11 prípadov) a processus coronoideus (8 prípadov) (Graf č. 2).



Graf č. 2: Lokalizácia zlomenín sánky

V analyzovanom súbore bolo zastúpenie jednoduchých a multiplexných zlomenín rovnomerné, pričom každá skupina tvorila 330 pacientov (50 %). Viacnásobné zlomeniny sa vyskytovali najmä pri úrazoch spôsobených násilím, kde tvorili 52,3 % všetkých prípadov ($n = 104$), a pri dopravných nehodách, kde predstavovali 46,4 % prípadov ($n = 13$), čo poukazuje na význam vysokoenergetických úrazov.

Z terapeutického hľadiska bola u 456 pacientov (69 %) indikovaná chirurgická liečba, najčastejšie vo forme otvorenej repozície a vnútornej fixácie osteosyntetickými dlahami a skrutkami. Konzervatívna liečba bola indikovaná u 204 pacientov (31 %) v indikovaných prípadoch (žiadna alebo minimálna dislokácia) a u pacientov vo vyššom veku, kde chirurgický zákrok predstavoval vyššie riziko. Analýza rozdelenia výskytu úrazov podľa ročných období pomocou chí-kvadrát testu preukázala vyšší výskyt traumatických poranení mandibuly v letných mesiacoch ($p < 0,0001$), čo môže súvisieť s vyššou mierou spoločenských aktivít a športových činností počas tohto obdobia.



Graf č. 3: Sezónnosť úrazov

Diskusia

Výsledky tejto štúdie potvrdzujú epidemiologické trendy popisované v literatúre týkajúcej sa traumatológie tvároveho skeletu. Dominancia mužského pohlavia medzi pacientmi so zlomeninami mandibuly je dlhodobou pozorovaným javom a súvisí najmä s vyšším výskytom rizikového správania, fyzických konfliktov a športových aktivít [3,4]. Najvyšší výskyt úrazov v mladšej vekovej skupine dospelých je taktiež v súlade s publikovanými štúdiami. Mladí dospelí sú častejšie vystavení rizikovým situáciám, čo vedie k vyššiemu výskytu maxilofaciálnych poranení [4,10].

Z hľadiska etiológie úrazov dominovali pády a násilné poranenia. Násilné úrazy predstavujú významný faktor pri vzniku zlomenín mandibuly najmä v mestskom prostredí. V posledných rokoch sa v literatúre objavujú aj zmienky o rastúcom počte úrazov súvisiacich s používaním elektrických kolobežiek, čo potvrdzujú aj výsledky tejto štúdie [11].

Distribúcia anatomických lokalizácií zlomenín v našom súbore zodpovedá biomechanickým vlastnostiam mandibuly. Kondylárna oblasť patrí medzi najčastejšie postihnuté miesta, najmä pri nepriamom mechanizme úrazu, keď sila pôsobiaca na symfýzu alebo corpus mandibuly vedie k zlomenine kondylu [12].

Chirurgická liečba vo forme otvorenej repozície a vnútornej fixácie predstavuje v súčasnosti štandardný terapeutický postup pri liečbe dislokovaných zlomenín mandibuly [13-15]. Táto metóda umožňuje presnú repozíciu fragmentov, stabilnú fixáciu a skorú funkčnú rehabilitáciu pacienta [14,15].

Výsledky tejto práce poukazujú na význam epidemiologického sledovania traumatických poranení mandibuly, ktoré môže prispieť k lepšiemu pochopeniu etiológie úrazov a optimalizácii terapeutických postupov v klinickej praxi.

Záver

Táto retrospektívna štúdia poskytuje prehľad o epidemiológii, typoch zlomenín a liečbe zlomenín mandibuly. Výsledky potvrdzujú prevahu mužov a rozdiely v mechanizmoch úrazu,

pričom u mužov dominuje interpersonálne násilie a u žien pády. Najčastejšou lokalizáciou boli zlomeniny processus condylaris mandibulae, často kombinované s ďalšími lomnými líniami. Liečba bola ovplyvnená najmä vekom pacienta a lokalizáciou zlomeniny, pričom konzervatívny postup bol častejší u starších pacientov a pri izolovaných kondylárnych zlomeninách. Zaznamenaná bola aj sezónna variabilita s vyšším výskytom v letných mesiacoch. Zlomeniny mandibuly predstavujú heterogénnu skupinu poranení vyžadujúcich individuálny prístup, pričom poznanie epidemiologických a klinických súvislostí môže prispieť k lepšiemu manažmentu pacientov.

Referencie

1. Morris C, Bebeau NP, Brockhoff H, Tandon R, Tiwana P. Mandibular fractures: an analysis of the epidemiology and patterns of injury in 4,143 fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015;73:951.e1–951.e12.
2. Wusiman P, Maimaituerxun B, Saimaiti A, Moming A. Epidemiology and pattern of oral and maxillofacial trauma. *J Craniofac Surg.* 2020;31:e517–e520.
3. Cirignaco G, Catarzi L, Monarchi G, Committeri U, Frosolini A, Togni L, et al. Interpersonal violence-related facial fractures. *Medicina.* 2025;61:1443.
4. Lai BR, Liao HT. Functional outcomes of surgical management of mandibular condylar head fractures. *Ann Plast Surg.* 2020;84:S69–S73.
5. Neff A, Cornelius CP, Rasse M, Torre D, Audigé L. AOCMF classification system: condylar process fractures. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr.* 2014;7:44–58.
6. Brown JS, Khan A, Wareing S, Schache AG. A new classification of mandibular fractures. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2022;51:78–90.
7. Cornelius CP, Audigé L, Kunz C, Rudderman R, Buitrago-Téllez CH, Frodel J, et al. AOCMF classification system: mandible fractures. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr.* 2014;7:31–43.
8. Fonseca RJ, Barber HD, Powers MP, Frost DE. *Oral and Maxillofacial Trauma.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2012.
9. Juncar M, Tent PA, Juncar RI, Harangus A, Mircea R. Epidemiological analysis of maxillofacial fractures. *BMC Oral Health.* 2021;21:128.
10. Cleveland CN, Kelly A, DeGiovanni J, Ong AA, Carr MM. Maxillofacial trauma in children. *Am J Otolaryngol.* 2021;42:102874.
11. Janickova M, Czako L, Borza B, Simko K, Kalmanova S, Juricek R, et al. Maxillofacial injuries associated with electric scooters. *Bratisl Med J.* 2025. Epub ahead of print.
12. Chen I. Biomechanical analysis of fixation in subcondylar fractures. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2025;54:54.
13. Sembadani YM, Barus L. Dynamic elastic therapy in mandibular fractures. *Int J Surg Case Rep.* 2025;128:110912.
14. Al-Moraissi EA, Ellis E. Surgical vs closed treatment of condylar fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015;73:482–493.
15. Al-Moraissi EA, Neff A, Kaur A, Falci SGM, de Souza GM, Ellis E. Treatment of mandibular condylar fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2023;81:1252–1269

10. Vznik peritonzilárneho abscesu na kontralaterálnej strane po jednostrannej absces-tonzilektómii.

Barbora Blštáková

(všeobecné lekárstvo, 6.ročník)

Spoluautori: MUDr. Dimitrios Paouris PhD. ^{1, 2}, MUDr. Adam Jančovič ¹

Školiteľ: MUDr. Irina Goljerová CSc., MPH. ¹

¹ Detská otorinolaryngologická klinika LF UK a NÚDCH, ² Klinika otorinolaryngológie, chirurgie hlavy a krku LF UK a UNB

Úvod

Peritonzilárny absces (PTA) patrí k najzávažnejším komplikáciám akútnej tonzilitídy, ktorá vedie k najčastejším dôvodom akútneho prijatia pacientov na otorinolaryngologické pracoviská. Incidencia PTA sa v rôznych krajinách pohybuje v rozmedzí 17–30 prípadov na 100 000 obyvateľov ročne. U detí je priebeh veľmi špecifický z dôvodu rozdielov imunitného systému, anatomických pomerov či obmedzeniu spolupráce pri vyšetrení alebo chirurgickej intervencie v porovnaní s dospelými pacientami. Klinicky sa PTA subjektívne prejavuje jednostrannou bolesťou hrdla a objektívnymi príznakmi ako je trizmus a deviácia uvuly.

Včasná diagnostika a adekvátna liečba sú zásadné pre prevenciu ďalších komplikácií. Z terapeutického hľadiska sa uplatňujú tri prístupy: incízia s drenážou abscesu, aspirácia abscesu ihlou a absces-tonzilektómia (ATE). U detí sa preferuje ATE v celkovej anestézii.

Diskutovanou otázkou zostáva rozsah výkonu – či je vhodné odstrániť iba postihnutú mandľu (homolaterálna ATE) alebo vykonať aj kontralaterálnu tonzilektómiu (ATE + TE). V literatúre sú popísané prípady, keď sa po jednostrannej ATE objavil PTA na kontralaterálnej strane, avšak výskyt tejto komplikácie je zriedkavý a dostupné dáta sú limitované. Pandémia COVID-19 zároveň výrazne ovplyvnila výskyt infekcií horných dýchacích ciest vrátane PTA, čo vytvára ďalšiu otázku na analýzu epidemiologických trendov. Cieľom tejto práce bolo retrospektívne vyhodnotiť výskyt kontralaterálneho PTA po jednostrannej ATE u detských pacientov, analyzovať súvisiace rizikové faktory, porovnať údaje v kontexte pandémie COVID-19 a posúdiť výskyt pooperačných komplikácií, najmä pooperačného krvácania. Získané výsledky môžu prispieť k optimalizácii a zjednoteniu chirurgického postupu a osobitného prístupu u detských pacientov s peritonzilárnym abscesom.

Materiál a metódy

Štúdia má charakter retrospektívnej observačnej kohortovej analýzy, ktorá je realizovaná podľa odporúčaní STROBE. Do súboru boli zahrnutí všetci po sebe nasledujúci pediatričtí

pacienti (≤ 18 rokov a 364 dní) hospitalizovaní a chirurgicky liečení s dg. peritonzilárny absces (MKCH 10 - J36) v období od 1. januára 2015 do 31. marca 2025 na Detskej otorinolaryngologickej klinike LF UK a NÚDCH v Bratislave. Vylúčení boli pacienti so závažnými komplikáciami pri prijatí (napr. hlboký krčný absces alebo mediastinitída), nekompletná zdravotná dokumentácia, nedostatočné sledovanie (< 3 roky po operácii). Na zabezpečenie minimálneho trojročného sledovania bola maximálna veková hranica pri prvej operácii stanovená na 15 rokov.

Primárnym výsledkom bol vznik metachrómneho kontralaterálneho PTA po jednostrannej ATE. Sekundárne výsledky zahŕňali pooperačné krvácanie a čas jeho vzniku, PTA v precovidovom období (2015-2019), počas pandémie COVID-19 (2020-2022) a v postcovidovom období (2023-2025), ako aj vzťah rekurentnej tonzilitídy (splnenie Paradiseho kritérii) k výskytu PTA.

Sledované premenné zahŕňali vek, pohlavie, index telesnej hmotnosti (BMI), stranu abscesu (pravá/ľavá/bilaterálna), sezónnu distribúciu (jar, leto, jeseň, zima), typ výkonu (ATE+TE vs. ATE), použitie antibiotík pred hospitalizáciou (aspoň 4 dávky) a hodnotu C- reaktívneho proteínu (CRP) pri prijatí. Dáta boli získané z nemocničného elektronického systému NIS MEDEA so súhlasom etickej komisie NÚDCH. Pacienti boli poučení dostaviť sa v prípade krvácania po operácii späť na pracovisko. Zohľadnili sa viaceré možné zdroje zaujatosti. Retrospektívny charakter a nízky počet udalostí (recidív aj krvácaní) limitujú štatistickú silu. V ojedinelých prípadoch mohlo dôjsť k strate sledovania, ak pacient vyhľadal zdravotnú starostlivosť mimo Slovenska. Nebol realizovaný formálny výpočet veľkosti vzorky.

Spojité premenné (vek, BMI, CRP, operačný čas, interval medzi abscesmi a počet dní do začiatku krvácania) boli testované na normalitu pomocou Shapiro–Wilkovho testu. Nenormálne rozdelené údaje boli prezentované ako medián a medzikvartilové rozpätie (IQR). Kategorické údaje boli uvádzané v absolútnych počtoch a percentách.

Vykonala sa deskriptívna analýza celého súboru a následne podľa typu operačného výkonu. Porovnania spojitých premenných skupín boli realizované pomocou Mann–Whitneyho U testu a Kruskal–Wallisovho testu podľa potreby. Porovnania kategorických premenných boli vykonané χ^2 testom alebo Fisherovým exaktným testom. Po Kruskal–Wallisovom teste boli pri potrebe realizované post-hoc analýzy (DSCF test).

Pre recidívu a krvácanie boli vykonané jednorozmerné analýzy a následne exploratívna binárna logistická regresia, ktorá odhadovala odds ratio (OR) s 95 % intervalom spoľahlivosti. Vzhľadom na nízky počet udalostí boli viacrozmerné analýzy považované za exploratívne. Chýbajúce údaje sa nevyskytli. Všetky štatistické analýzy boli spracované v programe jamovi (verzia 2.3.28.0). Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p < 0,05$; všetky testy boli dvojstranné.

Výsledky

Do retrospektívnej štúdie bolo zaradených 312 pediatrických pacientov s peritonzilárnym abscesom (PTA). Medián veku pri prijatí bol 12 rokov [IQR 7 - 15]. U pacientov s jednostrannou operáciou (ATE) bol medián 9 rokov [IQR 7,4 – 14,4] a u pacientov po obojstrannej operácii (ATE + TE) 14 rokov [IQR 8 - 15]. Rozdelenie pohlaví bolo vyrovnané, a to 49,4% chlapcov a 50,6% dievčat. Medián indexu telesnej hmotnosti (BMI) bol 18,6 [IQR 15,9 – 21,5]. Z hľadiska chirurgickej terapie 194 pacientov (62,2%) podstúpilo simultánnu absces-tonzilektómiu a

kontralaterálnu tonzilektómiu (ATE + TE), kým 118 pacientov (37,8%) absolvovalo jednostrannú absces-tonzilektómiu (ATE). U pacientov liečených ATE bol medián operačného času 30 minút [IQR 25 - 40].

Tabuľka 1: Vznik peritonzilárneho abscesu na kontralaterálnej strane

Výkon (ATE/ ATE + TE)	Vznik PTA kontralaterálne?		Spolu
	Áno	Nie	
ATE	6	112	118
ATE + TE	0	194	194
Spolu	6	306	312

Pred hospitalizáciou dostalo 37,8% detí viac ako 4 dávky antibiotík. Paradiseho kritéria pre rekurentnú akútnu tonzilitídu spĺňalo 17,9% prípadov. Medián hodnoty C- reaktívneho proteínu (CRP) pri prijatí bol 49,6 mg/l [IQR 30,4 – 77,0].

Pooperačné krvácanie sa vyskytlo u 17 pacientov (5,4%) z 312 pacientov. Z toho 2 prípady zo 118 pacientov (1,7% zo všetkých ATE) nastali po jednostrannej ATE. Kým u 15 prípadov zo 194 pacientov (7,7% zo všetkých ATE + TE) sa krvácanie objavilo kontralaterálne po ATE + TE. Medián času od operácie do výskytu krvácania bol 7 dní [IQR 6 - 11]. Absolútne riziko bolo po ATE nižšie o **6,0 p. b.** (RD = -0,060; 95 % CI -0,105 až -0,016). Relatívne riziko krvácania po ATE bolo 0,22 (95 % CI 0,051–0,942) a pomer šancí (OR) 0,21 (95 % CI 0,046–0,916), v porovnaní s ATE+TE. Medzi pacientami s pooperačným krvácaním sa deň vzniku krvácania štatisticky významne nelíšil medzi jednostrannou ATE a obojstrannou ATE + TE (Mann-Whitneyho U =12,5; p= 0,762).

Tabuľka 2: Výskyt krvácania po operačnom výkone (ATE/ATE+TE)

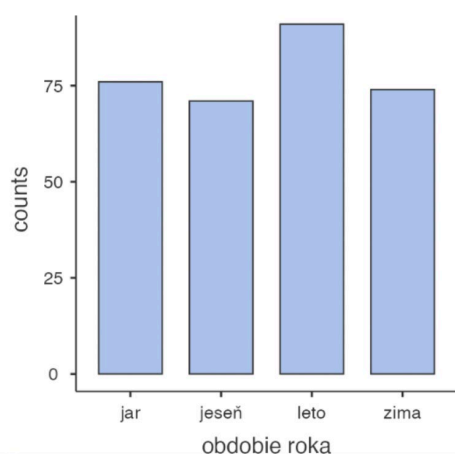
Výkon	Krvácanie		Spolu
	Áno	Nie	
ATE	2	116	118
ATE + TE	15	179	194
Spolu	17	295	312

Špecifické sledovanie odhalilo 6 pacientov (5,1% zo skupiny ATE), u ktorých sa po jednostrannej operácii vyvinul kontralaterálny metachrómny PTA, kým v skupine (n= 194) po kombinovanej ATE + TE sa nevyskytol žiadny prípad. Medián intervalu medzi primárnym a kontralaterálnym abscesom bol 4,5 mesiaca [IQR 2,5 – 16,3]. Rozdiel bol **štatisticky významný** podľa Fisherovho exaktného testu (p=0,003). Absolútne riziko po jednostrannej ATE bol teda 5,1 % (95%. CI 1,1 – 9,1%). U pacientov po jednostrannej ATE sa metachrómny kontralaterálny PTA vyskytol u 5 zo 112 (4,5%) pacientov bez splnených Paradiseho kritérií a u 1 zo 6 (16,7%) pacientov s rekurentnou tonzilitídou podľa Paradiseho. Rozdiel nebol štatisticky významný (Fisherov ekzaktný test p= 0,274). Relatívne riziko bolo 1,15 % (95% CI 0,80 – 1,64).

Premenná	N (%) / Medián [IQR]
Vek (roky)	12 (7–15)
Vek pacientov - ATE	9 (7,4 – 14,4)
Vek pacientov – ATE/TE	14 (8-15)
Pohlavie – muži	154 (49,4 %)
Pohlavie – ženy	158 (50,6 %)
BMI	18,6 (15,9–21,5)
Obdobie v roku – jar	76 (24,4 %)
Obdobie v roku – leto	91 (29,2 %)
Obdobie v roku – jeseň	71 (22,8 %)
Obdobie v roku – zima	74 (23,7 %)
Antibiotiká >4 dávky pred prijatím	118 (37,8 %)
Splnené Paradiseho kritériá	56 (17,9 %)
CRP pri prijatí (mg/l)	49,6 30,4–77,0
Typ výkonu – jednostranná ATE	118 (37,8 %)
Typ výkonu – simultánna ATE+TE	194 (62,2 %)
Operačný čas (min, iba ATE)	30 (25–40)
Pooperačné krvácanie – celkovo	17 (5,4 %)
Krvácanie po jednostrannej ATE	2/17
Krvácanie po ATE+TE	15/17
Interval do kontralat. PTA (mesiace)	4,5 (2,5–16,3)
Kontralaterálny PTA po ATE	6 (5,1 % z ATE)

Tabuľka 3: Výsledky deskriptívnej analýzy retrospektívnej kohortovej štúdie

V prípade sezónnej distribúcie, najvyšší podiel prípadov bol zaznamenaný v lete (29,2%), nasledovala jar (24,4%), zima (23,7%) a jeseň (22,8%).



Graf 1: Grafické znázornenie počtu pacientov (counts) počas období roka

Počet prípadov PTA sa medzi rokmi výrazne líšil. V precovidovom období (2015 – 2019) bol medián počtu pacientov 2 prípady/mesiac [IQR 2]. Počas obdobia pandémie (2020 – 2022) počet pacientov klesol na 1 prípad/mesiac [IQR 2]. Avšak v postcovidovom období (2023 – 2024) bol zaznamenaný výrazný nárast počtu prípadov u pediatrických pacientov, a to 4 prípady/mesiac [IQR 3]. Kruskal- Wallisov test potvrdil **štatisticky významné** rozdiely v mesačnom počte prípadov peritonzilárneho abscesu medzi obdobiami ($\chi^2(2) = 30,6$; $p < 0,001$; $\epsilon^2 = 0,257$). Post-hoc (Dwass-Steel-Critchlow-Flinger pairwise comparisons) porovnania ukázali, že počas pandémie bol počet prípadov **signifikantne nižší** v porovnaní s precovidovým obdobím ($p = 0,014$) a s postcovidovým obdobím ($p < 0,001$). Počet prípadov v postcovidovom období bol zároveň **signifikantne vyšší** než v precovidovom období ($p < 0,001$).



Graf 2: Grafické znázornenie počtu pacientov a ich medián počas jednotlivých rokov

Diskusia

V kohorte pediatrických pacientov sa po jednostrannej ATE vyskytla metachrónna kontralaterálna recidíva PTA približne u 5 % pacientov. Tento výsledok podporuje záver, že ponechanie kontralaterálnej mandle vo väčšine prípadov nevedie k recidíve, hoci u malej skupiny pacientov môže predstavovať riziko jej neskoršej manifestácie. Voľba medzi jednostranným a bilaterálnym výkonom si vyžaduje individuálne zhodnotenie klinického stavu a rizikových faktorov pacienta. Naše výsledky sú v súlade so literatúrou, ktorá uvádza výskyt metachrónneho kontralaterálneho PTA u 4,4 % pacientov po jednostrannej ATE [1]. V systematickej revízii, kde autori zahrnuli liečebné prístupy ako punkciu abscesu, drenáž abscesu alebo absces-tonzilektómiu, popisujú mieru recidívy od 2 % do 15,8 % [2], resp. mieru recidívy 5% v štúdiách kde ako primárna liečba bola použitá jednostranná ATE, čo potvrdzuje vysokú efektivitu a nízku mieru relapsov u detí. V ďalšej retrospektívnej štúdii zaznamenali

potrebu kontralaterálnej ATE iba u 0,8 % pacientov [3]. Tieto údaje potvrdzujú, že jednostranná ATE je spoľahlivou a efektívnou liečebnou stratégiou s nízkym rizikom recidívy. V kohorte sa nepreukázala štatisticky významná súvislosť medzi stranou primárneho PTA a rozvojom kontralaterálneho metachrómného PTA ($p=0,421$), čo naznačuje, že anatomická lokalizácia sa nejaví ako relevantný faktor pri rozhodovaní v chirurgickej liečbe.

Po jednostrannej ATE bol zaznamenaný vyšší výskyt metachrómného PTA u pacientov spĺňajúcich Paradiseho kritériá (16,7%) vs. tí, ktorí ich neplnili (4,5%). Tento trend naznačuje možnú súvislosť medzi opakovanými tonzilitídami a vyšším rizikom PTA, čo podporil aj logistický model ($OR = 6,98$; 95 % CI 0,49–99,3; $p = 0,152$), avšak bez štatistickej významnosti pre nízky počet prípadov, avšak štúdia nie je dostatočne silná na vyvodenie jednoznačných záverov. Výsledok naznačuje potenciálnu prediktívnu hodnotu rekurentných tonzilitíd, ktorú by mohli potvrdiť multicentrické štúdie. Tento predpoklad a výsledky prispievajú k rastúcemu množstvu dôkazov, že splnenie Paradiseho kritérií môžu mať veľký význam pri stratifikácii rizika komplikácií tonzilitíd, vrátane vzniku PTA a indikácie tonzilektómie [4]. Napriek aktualizovaným odporúčaniam zostávajú Paradiseho kritéria základným orientačným rámcom v klinickej praxi a ich význam pretrváva v dobe medicíny založenej na dôkazoch [5,6]. Súčasné európske smernice zdôrazňujú individualizovaný prístup k pacientovi, ktorý zohľadňuje počet a frekvenciu epizód, ich závažnosť, priebeh, odpoveď na konzervatívnu liečbu a dopad na kvalitu života dieťaťa. Takýto prístup môže prispieť k presnejšej identifikácii pacientov so zvýšeným rizikom komplikácii a optimalizácii liečebného rozhodovania [5].

Pooperačné krvácanie sa zaznamenalo u 5,4 % pacientov, pričom po jednostrannej ATE bolo menej časté ako po bilaterálnom výkone ATE + TE (2,5 % vs 7,7 %), čo predstavuje absolútny rozdiel približne -6 p. b., t.j. približne o 6 prípadov menej na 100 operovaných pacientov a relatívne riziko 0,22, a 4- až 5-krát nižšiu pravdepodobnosť krvácania po ATE. Deň vzniku krvácania sa medzi skupinami nelíšil. Napriek nízkemu počtu udalostí ($n = 17$) intervaly spoľahlivosti už neobsahovali nulový efekt, čo naznačuje vyššie riziko krvácania po bilaterálnom výkone. V analýze jednostranných výkonov sa nepreukázali žiadne významné asociácie medzi pooperačným krvácaním a sledovanými parametrami. Žiadny z nich nebol identifikovaný v logistickom modeli ako nezávislý prediktor krvácania. Výsledky štúdie sú v súlade s publikovanými údajmi, potvrdili nižší výskyt krvácania po jednostrannej ATE v porovnaní s ATE + TE [3,7], hoci niektoré publikácie nepotvrdili medzi výkonom významné rozdiely [1,8]. Celková incidencia pooperačného krvácania po tonzilektómii (bez špecifikácie typu výkonu) sa uvádza v rozmedzí približne 1–5 % [9]. Naše výsledky sa pohybujú na hornej hranici rozsahu rozmedzia pre tonzilektómiu ako celok, pričom bilaterálny výkon sa javí ako rizikovejší. Súčasné odporúčania zdôrazňujú vplyv operačnej techniky, najmä pri tzv. „hot“ technológiách v porovnaní s parciálnymi alebo intrakapsulárnymi technikami je vyššie riziko pooperačného krvácania, a preto mal by byť rozsah výkonu individualizovaný podľa lokálneho nálezu, techniky operátora a rizikového profilu dieťaťa [5].

Demografické a laboratórne parametre (vek, pohlavie, BMI, CRP, > 4 dávky antibiotík pri prijatí) nevykazovali štatisticky významný vplyv na riziko recidívy a ani pooperačného krvácania. Medián veku 12,8 rokov bol porovnateľný s publikovanými údajmi [4] a posun k adolescentnému obdobiu môže súvisieť so zmenami v orofaryngeálnej mikroflóre, hormonálnymi vplyvmi na slizničnú imunitu [10]. Medián BMI kohorty pacientov bol 18,6 (IQR 15,9 – 21,5), čo zodpovedá pediatrickým súborom pacientov, ale opäť sa nepreukázali žiadne štatisticky významné asociácie, čo korešponduje aj s literatúrou, ktorá nedefinuje BMI

ako rizikový faktor vzniku PTA. Medián CRP pri prijatí na hospitalizáciu bol 49,6 mg/l. V zahraničnej prospektívnej štúdii sa uvádza, že jeho vyššia hladina bola spojená s horšou rekonvalescenciou a hojením tkaniva u pacientov (priemerná hodnota CRP u pacientov s PTA zodpovedala hodnote 85 mg/l) [11], avšak v kohorte pacientov sa nevyskytla žiadna štatisticky významná korelácia s PTA, jeho liečbou, rekonvalescenciou, prípadným výskytom komplikácií. Pred hospitalizáciou dostalo viac ako 4 dávky antibiotickej liečby 37,8% pacientov. Literatúra upozorňuje na variabilitu dĺžky podávania antibiotík a zdôrazňuje ich racionálne užívanie v klinickej praxi. Nemecké usmernenie preferuje symptomatický manažment akútnej tonzilofaryngitídy, keďže ide najčastejšie o vírusovú etiológiu. Antibiotickú liečbu by sa malo indikovať cielene v prípade potvrdenia bakteriálnej infekcie alebo riziku vzniku komplikácií [5].

Pri porovnaní pacientov s recidívou ($n = 6$) a bez recidívy ($n = 112$) sa nepreukázali štatisticky významné rozdiely vo veku ($p = 0,892$), BMI ($p = 0,792$), v hodnote CRP pri prijatí ($p = 0,840$), s pohlavím ($p = 0,100$), počtom podaných antibiotík pred prijatím ($p = 1,000$) a ani so stranou abscesu ($p = 0,421$). Tieto výsledky naznačujú, že bežné demografické a klinické ukazovatele nemajú zásadný vplyv na riziko kontralaterálnej recidívy PTA. V exploratívnych modeloch ani jeden z bežne hodnotených klinických ani demografických ukazovateľov (vek, BMI, pohlavie, CRP, antibiotická liečba, strana abscesu či sezónnosť) nevykázal štatisticky významný vplyv ani na vznik pooperačného krvácania. Široké intervaly spoľahlivosti odrážajú nízky počet udalostí, a preto tieto výsledky treba interpretovať opatrne, no slúžia ako základ pre väčšie multicentrické štúdie. Pozorované trendy ako vyššie riziko recidívy pri splnených Paradiseho kritériách, naopak nižšie riziko recidívy u dievčat sú hypotézy generujúce a vyžadujúce verifikáciu v ďalších štúdiách. Tieto rozdiely by mohli byť spojené s rozdielnou orofaryngeálnou mikrobiotou, hormonálnymi vplyvmi alebo odlišnú reaktivitu lymfatického tkaniva na cudzorodé častice medzi pohlaviami. Zohľadnenie týchto faktorov by mohlo v budúcnosti prispieť k presnejšej identifikácii rizikových skupín detských pacientov so sklonom k recidivujúcim tonzilitidám, zápalovým ochoreniam horných dýchacích ciest, rozvinutiu PTA či iným komplikáciám po tonzilektómii alebo absces-tonzilektómii.

V prípade sezónnosti najviac prípadov sme zaznamenali v lete (29,2%), nasledovala jar (24,4%), ďalej zima (23,7%) a na koniec jeseň (22,8%). Iná analýza v rokoch 2019 - 2023 zaznamenávala sezónnosť a demografické faktory vzniku akútnej tonzilitídy a peritonzilárneho abscesu, ale väčšinu pacientov tvorili dospelí, kde pozorovali najvyšší výskyt oboch diagnóz v zime a na jar s poklesom počas leta, hoci v prípade PTA zostup nebol významný. Štúdia sa sústredila aj na rozvoj výskytu diagnóz počas pandémie COVID-19, kedy počet prípadov rekurentnej tonzilitídy a PTA bol výrazne nižší. V postcovidovom období sa výskyt prípadov naopak výrazne zvýšil [12]. Tento trend sme mohli sledovať aj v našej kohorte pacientov, kde v precovidovom období bol medián pacientov 2 prípady/mesiac, počas pandémie došlo k významnému poklesu na 1 prípad/mesiac a po pandémii došlo k nárastu pacientov na 4 prípady/mesiac. Počet prípadov v postcovidovom období bol významne vyšší než v precovidovom období. Iná retrospektívna analýza z obdobia 2019-2020 zaznamenala významný pokles výskytu PTA počas COVID-19 lockdownu vplyvom epidemiologických opatrení na incidencia PTA [13]. Ďalšie štúdie s veľkými kohortami pacientov porovnali výskyt infekcií horných dýchacích ciest pred a počas pandémie. Preukázali výrazný pokles infekcií v dôsledku opatrení ako sociálny odstup, nosenie rúšok a iné epidemiologické opatrenia, ktoré znížili počet prípadov respiračných infekcií aj o 51% počas

obdobia pandémie COVID-19, čo podporuje aj naše získané údaje [14,15]. Súhrne tieto zistenia potvrdzujú štatisticky významný vplyv pandémie COVID-19 na výskyt PTA v populácii, u detských pacientov, pričom naše výsledky korelujú s trendom opísaných štúdií a potvrdzujú, že výskyt PTA u detí vykazoval epidemiologické výkyvy v súvislosti s pandemiou. Po období pandémie nasledoval „rebound“ efekt s poklesom výskytu PTA v pediatrickej populácii, ktorý mnohí autori vysvetľujú ako dlh imunity vzniknutý zníženou expozíciou bežným respiračným patogénom počas dodržiavania epidemiologických opatrení [16,17]. Analogicky možno predpokladať, že po ich uvoľnení deti reagovali zvýšenou incidenciou respiračných infekcií, vrátane tonzilitíd, čo mohlo sekundárne zvýšiť aj riziko rozvoja PTA.

Individualizovaný prístup k liečbe detského pacienta, vrátane racionálnej antibiotickej terapie a indikácie chirurgického zákroku podľa aktuálnych odporúčaní zostáva kľúčovým aj v prevencii komplikácií. Rozhodovanie o rozsahu chirurgického výkonu by preto malo byť vždy vychádzať z anamnézy (prípadnej prítomnosti rizikových faktorov, počet dávok antibiotík v minulosti, frekvencii tonzilitíd, atď.), klinického stavu a fyzikálneho vyšetrenia detského pacienta. Kombinácia objektívnych laboratórnych ukazovateľov, klinickej skúsenosti a odporúčaní založených na dôkazoch môže prispieť k optimalizácii liečby a zníženiu počtu komplikácií. Naše výsledky tak poskytujú cenný príspevok k lepšiemu pochopeniu klinických charakteristík a prognózy detských pacientov s peritonzilárnym abscesom a zároveň vytvárajú dobrý základ pre ďalší výskum a multicentrické štúdie v oblasti peritonzilárneho abscesu, jeho liečby a komplikácií.

Zoznam literatúry

1. Rudhart A, Weber A, Schick B, et al. Metachronous contralateral peritonsillar abscess in pediatric patients: a retrospective analysis of 150 children. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2025;282:153–161.
2. Galluzzi, F., Garavello, W., 2024. Treatment of Peritonsillar Abscess in Children: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 13, 7361. <https://doi.org/10.3390/jcm13237361>.
3. Fauck, V., Schinz, K., Alexiou, C., Mantsopoulos, K., Iro, H., Mueller, S.K., 2022. [Abscesstonsillektomy: Uni- or bilateral?]. *Laryngorhinootologie.* 101, 896–901. <https://doi.org/10.1055/a-1841-6419>.
4. Segal, N., El-Saied, S., Puterman, M., 2009. Peritonsillar abscess in children in the southern district of Israel. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 73, 1148–1150. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2009.04.021>.
5. Deutschsprachige Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals- Chirurgie e. V. (2024)., 2024. . Deutschsprachige Ges. Für Hals-Nasen-Ohren- Heilkd. Kopf- Hals-Chir. E V S2k-Leitlin. Ther. Tonsillo-Pharyngitis AWMF- Register-Nr. 017-024. Ver. 4.1, gültig bis 15.01.2029. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF).
6. Betz, V., Boeger, D., Buentzel, J., Hoffmann, K., Jecker, P., Kaftan, H., Mueller, A., Radtke, G., Geißler, K., Guntinas-Lichius, O., 2023. Effect of the German tonsillitis guideline on indication for tonsil surgery in patients with recurrent acute tonsillitis: a population-based study. *Sci. Rep.* 13, 17612. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44661-y>.
7. Hahn, J., Barth, I., Wigand, M.C., Mayer, B., Hoffmann, T.K., Greve, J., 2021. The Surgical Treatment of Peritonsillar Abscess: A Retrospective Analysis in 584 Patients. *The Laryngoscope* 131, 2706–2712. <https://doi.org/10.1002/lary.29677>.
8. Slouka D, Čejková Š, Hanáková J, Hrabačka P, Kormunda S, Kalfeřt D, Skálová A, Šimánek V, Kucera R. Risk of Postoperative Bleeding in Tonsillektomy for Peritonsillar Abscess, as Opposed to in Recurrent and Chronic Tonsillitis-A Retrospective Study. *Int J Environ Res Public Health.*

- 2021 Feb 17;18(4):1946. doi: 10.3390/ijerph18041946. PMID: 33671349; PMCID: PMC7921921.
9. Johnson, R.F., Beams, D.R., Zaniletti, I., Chorney, S.R., Kou, Y.-F., Lenes-Voit, F., Ulualp, S., Liu, C., Mitchell, R.B., 2023. Estimated Probability Distribution of Bleeding After Pediatric Tonsillectomy: A Retrospective National Cohort Study of US Children. *JAMA Otolaryngol.-- Head Neck Surg.* 149, 431–438. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2023.0268>.
10. Klug, T.E., 2014. Incidence and microbiology of peritonsillar abscess: the influence of season, age, and gender. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 33, 1163–1167. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2052-8>.
11. Sanmark, E., Wikstén, J., Välimaa, H., Aaltonen, L.-M., Ilmarinen, T., Blomgren, K., 2020. Peritonsillar abscess may not always be a complication of acute tonsillitis: A prospective cohort study. *PloS One* 15, e0228122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228122>.
12. Seidel, D.U., Bode, S., Kostev, K., 2025. Seasonal variation and demographic characteristics of acute tonsillitis and peritonsillar abscess in ENT practices in Germany (2019–2023). *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto- Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 282, 317–326. <https://doi.org/10.1007/s00405-024-09034-9>.
13. Kiss, P., Moser, U., Habenbacher, M., Walla, K., Pock, J., Andrianakis, A., 2024. Impact of COVID-19 Lockdown Measures on the Incidence of Peritonsillar Abscess: A Retrospective Study. *Life Basel Switz.* 14, 1554. <https://doi.org/10.3390/life14121554>.
14. Kelloniemi, S., Heikkilä, P., Palmu, S., 2021. COVID-19 restrictions probably brought the 2019–2020 Finnish influenza season to an early end and led to fewer respiratory viruses among infants. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 110, 3327–3328. <https://doi.org/10.1111/apa.16061>.
15. Haapanen, A., Uttamo, J., Furuholm, J., Mäkitie, A., Snäll, J., 2022. Effect of COVID-19 pandemic on orofacial and respiratory infections in ear, nose, and throat and oral and maxillofacial surgery emergency departments: a retrospective study of 7900 patients. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino- Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 279, 1615–1620. <https://doi.org/10.1007/s00405-021-07107-7>.
16. Yue, Y., Wu, D., Zeng, Q., Li, Y., Yang, C., Lv, X., Wang, L., 2025. Changes in children respiratory infections pre and post COVID-19 pandemic. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15, 1549497. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1549497>.
17. Metz, C., Schmid, A., Veldhoen, S., 2024. Increase in complicated upper respiratory tract infection in children during the 2022/2023 winter season-a post coronavirus disease 2019 effect? *Pediatr. Radiol.* 54, 49–57. <https://doi.org/10.1007/s00247-023-05808-1>.

11. Determinanty nemocničnej mortality u hospitalizovaných pacientov s COVID-19

Robert Kovács

(všeobecné lekárstvo, 6.ročník)

Školiteľ: prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP, FEFIM¹, MUDr. Juraj Smaha, PhD²

¹ V. interná klinika LF UK a UNB

Úvod

Pandémia ochorenia COVID-19 predstavovala jednu z najväčších výziev pre zdravotnícke systémy za posledné desaťročie. Toto ochorenie sa vyznačovalo vysokou mortalitou, najmä u hospitalizovaných pacientov. Tento trend sme mohli pozorovať aj na Slovensku, kde bolo v období rokov 2020–2024 zaznamenaných podľa oficiálnych štatistík celkovo 22 205 úmrtí v súvislosti s infekciou COVID-19 a 213 úmrtí klasifikovaných ako „stav po COVID-19“. [1]

Priebeh ochorenia je variabilný a ovplyvnený viacerými faktormi, vrátane veku, pohlavia a prítomnosti komorbidít. Vyšší vek je konzistentne identifikovaný ako jeden z najsilnejších prediktorov mortality, pričom riziko úmrtia progresívne narastá a dosahuje najvyššie hodnoty u najstarších pacientov.[2–4] Zvýšené riziko mortality bolo opakovane preukázané aj u mužov.[3,5,6]

Okrem demografických faktorov zohráva významnú úlohu aj prítomnosť komorbidít. Viaceré štúdie poukazujú na vyššie riziko úmrtia u pacientov s ochoreniami ako: diabetes mellitus, chronickými pľúcnymi, kardiovaskulárnymi, renálnymi a neurologickými ochoreniami. Nemalú úlohu zohráva aj imunosupresia pacientov. [3,7]

Cieľom práce bolo identifikovať faktory spojené s nemocničnou mortalitou u pacientov s COVID-19, určiť ovplyvniteľné rizikové faktory a zlepšiť stratifikáciu rizika s cieľom umožniť ciele opatrenia a zlepšiť prežívanie pacientov.

Metódy

Do retrospektívnej observačnej štúdie bolo zaradených 700 pacientov hospitalizovaných s ochorením COVID-19 na V. internej klinike LF UK a UNB Ružinov v rokoch 2020–2022. Z elektronickej zdravotnej dokumentácie boli získané údaje o veku, pohlaví, vakcinačnom statuse, type hospitalizácie, komorbiditách a výsledku hospitalizácie. Primárnym sledovaným ukazovateľom bola nemocničná mortalita.

Kvantitatívne premenné boli vyjadrené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka, resp. medián (IQR), kategorické premenné ako počet a percento. Rozdiely medzi skupinami boli analyzované pomocou Studentovho t-testu, Mannovho–Whitneyho U testu, ANOVA, χ^2 testu alebo Fisherovho exaktného testu podľa typu premenných. Na identifikáciu nezávislých faktorov asociovaných s nemocničnou mortalitou bola použitá multivariabilná logistická

regresia. Výsledky sú uvádzané ako odds ratio (OR) s 95 % intervalom spoľahlivosti. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p < 0,05$.

Výsledky

Do analýzy bolo zaradených 700 pacientov hospitalizovaných s ochorením COVID-19 v rokoch 2020–2022. Celková nemocničná mortalita dosiahla 38,6 % (270/700), pričom medzi jednotlivými rokmi klesala z 47,1 % v roku 2020 na 36,6 % v roku 2021 a 34,3 % v roku 2022 ($p = 0,04$). Mortalita mužov bola 39,3 % a mortalita žien 37,7 %, bez štatisticky významného rozdielu ($p = 0,73$). Naopak, vek bol významným faktorom úmrtnosti: u pacientov mladších ako 65 rokov bola mortalita 21,8 %, zatiaľ čo u pacientov vo veku 65 rokov a viac dosiahla 46,1 % ($p < 0,001$). Významne nižšia mortalita bola zistená aj u očkovaných pacientov v porovnaní s neočkovanými (22,3 % vs. 41,1 %; $p < 0,001$).

Počet hospitalizácií vykazoval výrazný sezónny charakter, s najvyšším počtom prijatí v zimných mesiacoch (január, február, november a december). Zároveň sa časom menil aj charakter hospitalizácií. V roku 2020 to bolo 59,0 % pacientov prijatých primárne pre COVID-19, v roku 2021 až 89,2 %, zatiaľ čo v roku 2022 tento podiel klesol na 17,6 % a výrazne vzrástol podiel nozokomiálne získaných infekcií na 68,5 %.

Tab.1: Multivariačná logistická regresná analýza faktorov nezávisle asociovaných s úmrtnosťou počas hospitalizácie

Premenná	OR (95 % CI)	p-hodnota
Vek (roky)	1,05 (1,04–1,07)	<0.001
Mužské pohlavie	1,44 (1,02–2,04)	0.04
Vakcinovaný	0,28 (0,15–0,51)	<0.001
Chronické pečeneové ochorenie	2,15 (1,44–3,21)	<0.001
Prijatý s COVID-19	0,53 (0,28–1,01)	0.05
Diabetes mellitus 2. typu	1,36 (0,96–1,92)	0.09
Chronické srdcové zlyhávanie	1,37 (0,87–2,15)	0.2
Malignita	1,36 (0,83–2,22)	0.23
Koronárna choroba srdca	1,28 (0,84–1,93)	0.25
Chronická obličková choroba	1,26 (0,84–1,90)	0.26
Arteriová hypertenzia	0,89 (0,58–1,36)	0.58
Chronické neurologické ochorenie	0,93 (0,62–1,37)	0.71
COVID-19 akviroval počas hospitalizácie	1,01 (0,64–1,61)	0.9

1 **Tab.2: Multivariačná logistická regresná analýza rozšírená o liečbu a úroveň oxygenoterapie**

Premenná	OR (95 % CI)	p-hodnota
COVID-19 akviroval počas hospitalizácie	2.26 (1.22–4.19)	0.01
Baricitinib	0.23 (0.07–0.74)	0.01
Konvenčná oxygenoterapia	1.71 (1.03–2.84)	0.04
Cholekalciferol	0.58 (0.33–1.02)	0.06
Diabetes mellitus 2. typu	1.33 (0.89–1.98)	0.17
Pohlavie (muž)	1.31 (0.87–1.98)	0.19
nirmatrelvir/ritonavir	2.48 (0.48–12.93)	0.30
Artériová hypertenzia	0.77 (0.46–1.29)	0.32
Remdesivir	1.41 (0.66–3.00)	0.38
Chronické pľúcne ochorenie	0.78 (0.44–1.37)	0.38
Anakinra	1.40 (0.57–3.44)	0.46
Molnupiravir	0.59 (0.14–2.46)	0.47
Chronické srdcové zlyhávanie	1.18 (0.68–2.04)	0.55
Koronárna choroba srdca	1.13 (0.70–1.83)	0.62
Malignita	0.94 (0.53–1.67)	0.83
Chronická obličková choroba	1.02 (0.63–1.64)	0.94
Umelá ventilácia pľúc	1.04 (0.33–3.25)	0.95
Prijatý s COVID-19	1.02 (0.48–2.14)	0.96
HFNV/NIV	9.43 (5.25–16.93)	<0.001
Vek (roky)	1.07 (1.05–1.10)	<0.001
Chronické pečenevé ochorenie	2.31 (1.45–3.69)	<0.001
Vakcinovaný	0.22 (0.10–0.50)	<0.001
Glukokortikoidy	3.08 (1.65–5.78)	<0.001
Vazopresory	10.08 (4.96–20.49)	<0.001

2
3 Priemerná dĺžka hospitalizácie bola $10,7 \pm 19,0$ dní. Medzi mužmi a ženami sa významne
4 nelíšila, avšak medzi jednotlivými rokmi bola štatisticky významne odlišná (2020: $12,0 \pm 20,2$
5 dní; 2021: $9,1 \pm 14,2$ dní; 2022: $15,1 \pm 28,2$ dní; $p < 0,001$). Najdlhšia hospitalizácia bola
6 zaznamenaná u pacientov, ktorí akvirovali COVID-19 počas hospitalizácie ($18,9 \pm 28,0$ dní), v
7 porovnaní s pacientmi prijatými pre COVID-19 ($8,6 \pm 13,0$ dní) alebo s COVID-19 ($9,5 \pm 14,0$
8 dní) ($p < 0,001$).

9 V sledovanom súbore mal pacient v priemere $3,1 \pm 2,0$ komorbidít. Najčastejšími boli
10 artériová hypertenzia (74,4 %), koronárna choroba srdca (35,4 %), diabetes mellitus 2. typu

(35,3 %), chronická obličková choroba (31,4 %) a chronické neurologické ochorenie (26,0 %). U pacientov, ktorí zomreli, sa významne častejšie vyskytovali diabetes mellitus 2. typu, artériová hypertenzia, chronické srdcové zlyhávanie, koronárna choroba srdca, chronická obličková choroba, chronické pečenné ochorenie a chronické neurologické ochorenie.

V multivariačnom logistickom regresnom modeli (Tabuľka 1) boli s vyšším rizikom nemocničnej mortality nezávisle asociované vyšší vek (OR 1,05; 95 % CI 1,04–1,07; $p < 0,001$), mužské pohlavie (OR 1,44; 95 % CI 1,02–2,04; $p = 0,04$) a chronické pečenné ochorenie (OR 2,15; 95 % CI 1,44–3,21; $p < 0,001$). Naopak, očkovanie bolo spojené s významne nižším rizikom úmrtia (OR 0,28; 95 % CI 0,15–0,51; $p < 0,001$). Model dosiahol primeranú diskriminačnú schopnosť (AUC = 0,733) a dobrú kalibráciu.

Počas hospitalizácie väčšina pacientov dostávala glukokortikoidy (77,3 %) a cholekalciferol (74,4 %). Konvenčnú oxygenoterapiu potrebovalo 59,0 % pacientov, HFNV/NIV 31,1 % a invazívnu ventiláciu 3,0 %. Pacienti, ktorí zomreli, častejšie vyžadovali glukokortikoidy, vazopresory a HFNV/NIV, čo pravdepodobne odráža závažnejší klinický priebeh. V rozšírenom multivariačnom modeli boli s vyšším rizikom mortality asociované vyšší vek, chronické pečenné ochorenie, nozokomiálny pôvod infekcie, glukokortikoidy, konvenčná oxygenoterapia, HFNV/NIV a vazopresory, zatiaľ čo očkovanie a liečba baricitinibom boli spojené s nižším rizikom úmrtia. (Tabuľka 2) Rozšírený model vykazoval veľmi dobrú diskriminačnú schopnosť (AUC = 0,850).

Diskusia

V našom súbore 700 pacientov hospitalizovaných s COVID-19 v rokoch 2020–2022 dosiahla celková nemocničná mortalita 38,6 %, pričom v priebehu sledovaného obdobia postupne klesala. Tento trend pravdepodobne odráža kombinovaný vplyv viacerých faktorov, najmä zavedenia vakcinácie, zlepšenia terapeutických postupov a zmien v charaktere hospitalizovaných pacientov.

Pozorovaná výrazná sezónnosť prijatí so zimnou kulmináciou korešponduje s epidemiologickým priebehom pandémie. Viaceré populačné analýzy potvrdzujú, že COVID-19 vykazuje sezónne vrcholy najmä v období od novembra do apríla, čo je rovnako ako iné respiračné vírusy. [8] Zároveň sa ukazuje, že priebeh pandémie nemusí byť striktne jednovrcholový, ale môže zahŕňať viacero vln ročne, typicky s dominantným zimným vrcholom a menšími vrcholmi na jar a v lete. [9] Tento komplexný sezónny charakter ochorenia pravdepodobne odráža kombináciu environmentálnych faktorov, zmien v správaní populácie a dynamiky vírusových variantov.

Kľúčovým zistením práce je potvrdenie veku ako najsilnejšieho nezávislého prediktora nemocničnej mortality. Riziko úmrtia významne narastalo s pribúdajúcim vekom, čo je v súlade s poznatkami o nižšej fyziologickej rezerve, vyššej multimorbidite a dysregulácii imunitnej odpovede u starších pacientov. Tento nálež korešponduje s veľkými populačnými analýzami, ktoré ukazujú exponenciálny nárast mortality s vekom a charakteristickú J-krivku rizika. [10]

Mužské pohlavie bolo identifikované ako ďalší nezávislý faktor asociovaný s vyššou mortalitou, čo je v súlade s publikovanými údajmi poukazujúcimi na horší priebeh ochorenia u mužov. [2–6]

Z hľadiska komorbidít sa v neadjustovaných analýzach preukázal u pacientov, ktorí zomreli, vyšší výskyt viacerých chronických ochorení, najmä diabetu mellitus 2. typu, artériovej hypertenzie, chronického srdcového zlyhávania, koronárnej choroby srdca, chronickej obličkovej choroby, chronického pečeneového ochorenia a chronických neurologických ochorení. Ako ukazuje Tabuľka 1, po adjustácii však ako nezávislý prediktor mortality ostalo významné predovšetkým chronické pečeneové ochorenie, čo poukazuje na jeho zásadnú úlohu pri zhoršení prognózy. Tento výsledok je v súlade s medzinárodnými kohortami, ktoré preukázali výrazne vyššiu mortalitu u pacientov s cirhózou, pričom riziko úmrtia narastá so zhoršujúcim sa Child-Pugh skóre. [11]

Na druhej strane, populačné štúdie poukazujú na širšie spektrum komorbidít ako nezávislé rizikové faktory mortality. Celkovo, prítomnosť komorbidít zvyšuje riziko úmrtia približne 2–3-násobne a riziko narastá s ich počtom. [12] Tento rozdiel môže byť vysvetlený charakterom našej hospitalizačnej kohorty, vyššou koncentráciou závažných pacientov a prekrytím efektov jednotlivých komorbidít v multivariabilnom modeli.

Významný protektívny efekt mala vakcinácia, ktorá bola spojená s výrazne nižším rizikom úmrtia aj po zohľadnení ostatných premenných. Tento nález potvrdzuje jej zásadný význam aj u hospitalizovaných pacientov a je v súlade s novšími štúdiami, ktoré dokumentujú zníženie mortality, potreby intenzívnej starostlivosti a dĺžky hospitalizácie u vakcinovaných pacientov. [13]

V multivariačnom modeli (Tabuľka 2) rozšírenom o klinické a terapeutické premenné bol s vyšším rizikom mortality asociovaný aj nozokomiálny pôvod infekcie. Tento nález zdôrazňuje význam dôslednej prevencie nemocničného prenosu. Je tak isto aj v súlade s publikovanými údajmi, podľa ktorých je nozokomiálny COVID-19 spojený s vyšším rizikom mortality v porovnaní s komunitne získanou infekciou. [14]

Asociácie medzi intenzívnymi liečebnými modalitami (glukokortikoidy, oxygenoterapia, HFNV/NIV, vazopresory) a mortalitou pravdepodobne odrážajú závažnosť klinického stavu pacientov (tzv. confounding by indication), a nie nepriaznivý účinok samotnej liečby. Naopak, niektoré intervencie, ako napríklad baricitinib, môžu mať potenciálny benefit, avšak vzhľadom na retrospektívny dizajn štúdie nemožno vyvodzovať kauzálne závery.

Silnou stránkou práce je analýza kompletnej nemocničnej kohorty a využitie multivariabilných modelov na identifikáciu nezávislých rizikových faktorov. Limitáciou je jednocentrický retrospektívny dizajn a možnosť reziduálneho skreslenia. Napriek tomu výsledky konzistentne ukazujú, že vek, mužské pohlavie, chronické pečeneové ochorenie a vakcinačný status patria medzi kľúčové faktory asociované s nemocničnou mortalitou pri COVID-19.

Záver

Táto práca bola zameraná na identifikáciu faktorov asociovaných s nemocničnou mortalitou u pacientov hospitalizovaných s ochorením COVID-19 na internej klinike. V analyzovanej kohorte 700 pacientov bola zaznamenaná vysoká nemocničná mortalita (38,6 %), pričom v priebehu sledovaného obdobia dochádzalo k jej postupnému poklesu.

Výsledky preukázali, že mortalita je podmienená multifaktoriálne. Najsilnejším nezávislým prediktorom bol vyšší vek, pričom riziko úmrtia významne narastalo s pribúdajúcimi rokmi. Ako ďalší nezávislý faktor sa potvrdilo mužské pohlavie. Naopak, významný protektívny efekt

1 mala vakcinácia, ktorá bola spojená s výrazne nižším rizikom úmrtia aj po zohľadnení ostatných
2 premenných.

3 Po adjustácii bolo chronické pečenné ochorenie jedinou komorbiditou nezávisle asociovanou
4 so zvýšeným rizikom mortality, zatiaľ čo ostatné komorbidity stratili štatistickú významnosť.

5 Medzi ďalšie faktory asociované s nepriaznivým priebehom patrila nozokomiálna pôvoda
6 infekcie, ktorý bol spojený s vyššou mortalitou a dlhšou hospitalizáciou. Asociácia intenzívnych
7 liečebných modalít s mortalitou pravdepodobne odráža závažnosť klinického stavu pacientov,
8 a nie nepriaznivý účinok samotnej liečby.

9 Získané výsledky potvrdzujú, že nemocničná mortalita pri COVID-19 je výsledkom komplexnej
10 interakcie demografických faktorov, komorbidít a klinického priebehu ochorenia. Identifikácia
11 týchto faktorov umožňuje lepšiu stratifikáciu rizika už pri prijatí pacienta. Zároveň, môže
12 prispieť k optimalizácii klinického manažmentu a efektívnejšiemu využitiu zdravotníckych
13 kapacít.

14 Hoci dominantné rizikové faktory, ako vek a pohlavie, nie sú ovplyvniteľné, identifikácia
15 modifikovateľných faktorov, ako vakcinačný status a prevencia nozokomiálneho prenosu, má
16 zásadný význam pre zlepšenie klinických výsledkov.

18 Referencie:

- 19 1. DATAcube. [Internet]. [cit 04. apríl 2026]. <https://datacube.statistics.sk/>. Cit 4 apr 2026
- 20 2. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult
21 inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*.
22 2020;395:1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- 23 3. Kim L, Garg S, O'Halloran A, Whitaker M, Pham H, Anderson EJ, et al. Risk Factors for Intensive
24 Care Unit Admission and In-hospital Mortality Among Hospitalized Adults Identified through
25 the US Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Associated Hospitalization Surveillance Network
26 (COVID-NET). *Clin Infect Dis*. 2021;72:e206–14. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1012>
- 27 4. Mesas AE, Cavero-Redondo I, Álvarez-Bueno C, Sarriá Cabrera MA, Maffei de Andrade S, Sequí-
28 Dominguez I, et al. Predictors of in-hospital COVID-19 mortality: A comprehensive systematic
29 review and meta-analysis exploring differences by age, sex and health conditions. *PLoS One*.
30 2020;15:e0241742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241742>
- 31 5. Rosenthal N, Cao Z, Gundrum J, Sianis J, Safo S. Risk Factors Associated With In-Hospital
32 Mortality in a US National Sample of Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open*.
33 2020;3:e2029058. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.29058>
- 34 6. Velasco-Rodríguez D, Alonso-Dominguez J-M, Vidal Laso R, Lainez-González D, García-Raso A,
35 Martín-Herrero S, et al. Development and validation of a predictive model of in-hospital
36 mortality in COVID-19 patients. *PLoS One*. 2021;16:e0247676.
37 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247676>
- 38 7. Corradini E, Ventura P, Ageno W, Cogliati CB, Muiesan ML, Girelli D, et al. Clinical factors
39 associated with death in 3044 COVID-19 patients managed in internal medicine wards in Italy:
40 results from the SIMI-COVID-19 study of the Italian Society of Internal Medicine (SIMI). *Intern
41 Emerg Med*. 2021;16:1005–15. <https://doi.org/10.1007/s11739-021-02742-8>
- 42 8. Wiemken TL, Khan F, Puzniak L, Yang W, Simmering J, Polgreen P, et al. Seasonal trends in
43 COVID-19 cases, hospitalizations, and mortality in the United States and Europe. *Sci Rep*.
44 2023;13:3886. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31057-1>
- 45 9. Shamsa EH, Shamsa A, Zhang K. Seasonality of COVID-19 incidence in the United States. *Front
46 Public Health*. 2023;11:1298593. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1298593>

10. Variation in the COVID-19 infection–fatality ratio by age, time, and geography during the pre-vaccine era: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399:1469–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02867-1)
11. Marjot T, Moon AM, Cook JA, Abd-Elsalam S, Aloman C, Armstrong MJ, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: An international registry study. *J Hepatol*. 2021;74:567–77. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.024>
12. Ge E, Li Y, Wu S, Candido E, Wei X. Association of pre-existing comorbidities with mortality and disease severity among 167,500 individuals with COVID-19 in Canada: A population-based cohort study. *PLoS One*. 2021;16:e0258154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258154>
13. Maleki B, Sadeghian AM, Ranjbar M. Impact of vaccination against SARS-CoV-2 on mortality risk, ICU admission rate, and hospitalization length in hospitalized COVID-19 patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2025;25:144. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-10530-4>
14. Ponsford MJ, Ward TJC, Stoneham SM, Dallimore CM, Sham D, Osman K, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Inpatient Mortality Associated With Nosocomial and Community COVID-19 Exposes the Vulnerability of Immunosuppressed Adults. *Front Immunol*. 2021;12:744696. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744696>

12. Úloha nádorového mikroprostredia v regulácii angiogenézy kolorektálneho karcinómu.

Peter Bakič, Martina Šimková

(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta UK a UNB, Bratislava

Úvod

Kolorektálny karcinóm je malígna choroba, pri ktorej zo sliznice hrubého čreva a konečníka vzniká novotvar, charakterizovaný invazívnym rastom (1). Väčšina pacientov s týmto ochorením je diagnostikovaná po 50. roku života, u mužov je priemerný vek 68 a u žien 72 rokov (2). V rebríčku najčastejších zistených nádorových ochorení sa kolorektálny karcinóm nachádza na treťom mieste a pri úmrtiach, súvisiacich s rakovinou na druhom mieste (3).

Angiogenéza je proces novotvorby ciev, prísne regulovaný rovnováhou medzi lokálnymi pro- a proti-angiogénnymi faktormi. Práve kolorektálny karcinóm je jednou z malignít, pri ktorej sa preukázal veľký význam tohto procesu v rôznych štádiách vývoja ochorenia, pretože umožňuje rast, inváziu aj metastázovanie nádorového tkaniva (4). Spomedzi faktorov, stimulujúcich angiogenézu sa uplatňuje predovšetkým VEGF-A a hlavným podnetom pre spustenie novotvorby ciev je nedostatok kyslíka v nádorovom prostredí (5). V regulácii angiogenézy zohráva významnú úlohu oxid dusnatý (NO), ktorý sa uvoľňuje z endotelových buniek a následne ovplyvňuje viaceré kľúčové časti angiogenézy (6).

V priebehu nádorovej transformácie dochádza k zvýšenej expresii indukovateľnej NO-syntázy (NOS2/iNOS) a to priamo v nádorových bunkách alebo v sprevádzajúcom zápalovom infiltráte. Zvýšená NOS2 produkuje NO, ktorý prostredníctvom aktivácie Akt kinázy a následnej stabilizácie transkripčného faktora HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) zvyšuje transkripciu génu pre VEGF-A. NO teda v normoxických podmienkach napodobňuje účinok hypoxie, klasického aktivátora VEGF syntézy. Navyše, NO stimuluje aktivitu COX-2, čím zvyšuje produkciu prostaglandínu E₂, ktorý ďalej nezávisle indukuje VEGF, vzniká tak kooperatívna pozitívna spätná väzba medzi dráhami NOS2 a COX-2 v prospech angiogenézy. Účinok NO je ale dávkovo závislý: nízke koncentrácie podporujú rast a angiogenézu, vysoké môžu byť cytotoxické, čo komplikuje jednoduchý lineárny model vzťahu NOS2–VEGF–cievy(7–9).

Na kvantitatívnu analýzu angiogenézy prebiehajúcej v nádorovom tkanive slúži mikrovaskulárna denzita (MVD), ktorá je považovaná za mimoriadne významný marker (10). V prípade kolorektálneho karcinómu je však prognostická hodnota MVD stále nejednoznačná a naďalej ostáva predmetom intenzívneho výskumu (11).

1 Metodika

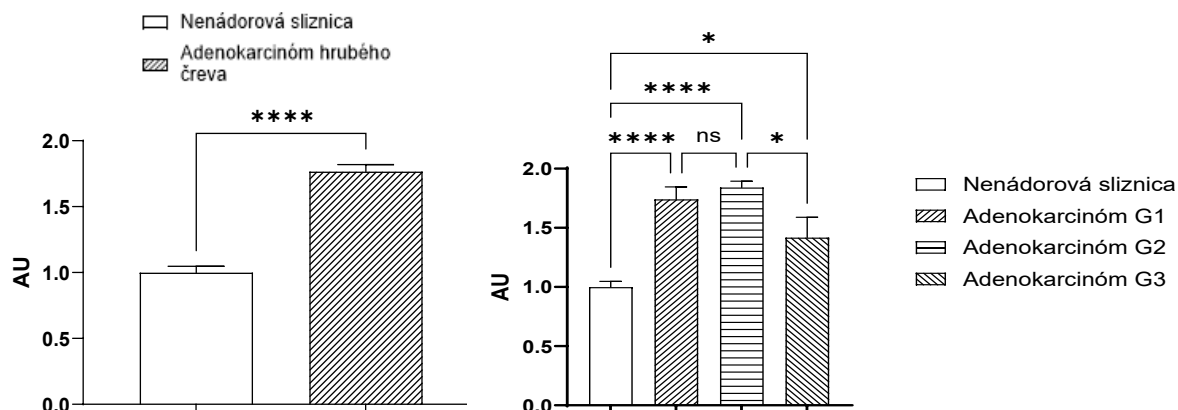
V štúdiu boli použité tkanivé vzorky 28 pacientov s histologicky potvrdeným kolorektálnym adenokarcinómom. Vek pacientov sa pohyboval v rozmedzí 39–89 rokov (priemer 68,5 roka, medián 71 rokov). Súbor tvorilo 18 mužov a 10 žien. Z hľadiska histologickej diferenciácie bol u 4 pacientov diagnostikovaný grade 1, u 20 pacientov grade 2 a u 4 pacientov grade 3. Najčastejším TNM štádiom bolo T3N0Mx (14 prípadov). Z klinických štádií prevládalo štádium IIA (14 pacientov). Celkovo súbor reprezentuje typický obraz kolorektálneho karcinómu u starších pacientov s prevahou stredne pokročilých štádií bez vzdialených metastáz.

Tkanivé vzorky boli fixované vo 4 % formaldehyde a zaliate do parafínu. Na štandardizáciu analýzy boli pripravené tissue microarray (TMA) blok obsahujúce nádorové tkanivo spolu s príľahlým nenádorovým tkanivom. Rezy boli odparafínované v xyléne a rehydratované v klesajúcej koncentrácii etanolu, následne premyté vo fosfátovom pufri (PBS, pH 7,4). Antigénová retrievalizácia prebehla v prístroji PT Link (Dako/Agilent) v citrátovom pufri (10 mM, pH 6,0) pri 98 °C počas 20 minút. Po ochladení boli rezy inkubované 60 minút pri laboratórnej teplote s primárnymi protilátkami: anti-CD31 (klon JC70A, Agilent Technologies, RTU), anti-VEGF-A (Sigma-Aldrich, 1:100), anti-NOS2 (Merck Millipore ABN26, 1:100) a anti-NOS3 (Bios bsm-33176M, 1:100). Po premytí nasledovala inkubácia so sekundárnymi fluorescenčne značenými protilátkami (DyLight 488 a DyLight 594, VectaFluor™ Excel, VECTOR Laboratories) s amplifikačným krokom. Preparáty boli zaliate krycím médiom obsahujúcim DAPI.

Hodnotenie farbenia prebehlo na fluorescenčnom mikroskope Nikon Eclipse (Nikon, Tokio, Japonsko). Mikrovaskulárna denzita (MVD) bola kvantifikovaná ako podiel plochy CD31-pozitívnej vaskulatury k celkovej analyzovanej ploche a normalizovaná na nenádorovú sliznicu ($AU = 1$). Expresia VEGF-A, NOS2 a NOS3 bola hodnotená meraním intenzity imunofluorescenčného signálu v arbitrárnych jednotkách (0–255). Pozitivita bola analyzovaná v nádorovom a nenádorovom epiteli, stróme a cievnych štruktúrach. Z každého rezu bolo analyzovaných viacero náhodne vybraných oblastí v softvéri ImageJ (Fiji 1.54r). Štatistická analýza bola vykonaná v programe GraphPad Prism (verzia 10). Údaje sú prezentované ako priemer $\pm$ SEM. Normalita rozloženia bola testovaná D'Agostino-Pearsonovým testom. Pri normálnom rozložení bola použitá jednosmerná ANOVA s Tukeyho post-testom, v opačnom prípade Kruskal-Wallisov test. Vzťahy medzi parametrami boli hodnotené lineárnou regresnou analýzou alebo Spearmanovým korelačným koeficientom. Za štatisticky signifikantné sa považovali hodnoty $p < 0,05$.

35 Výsledky

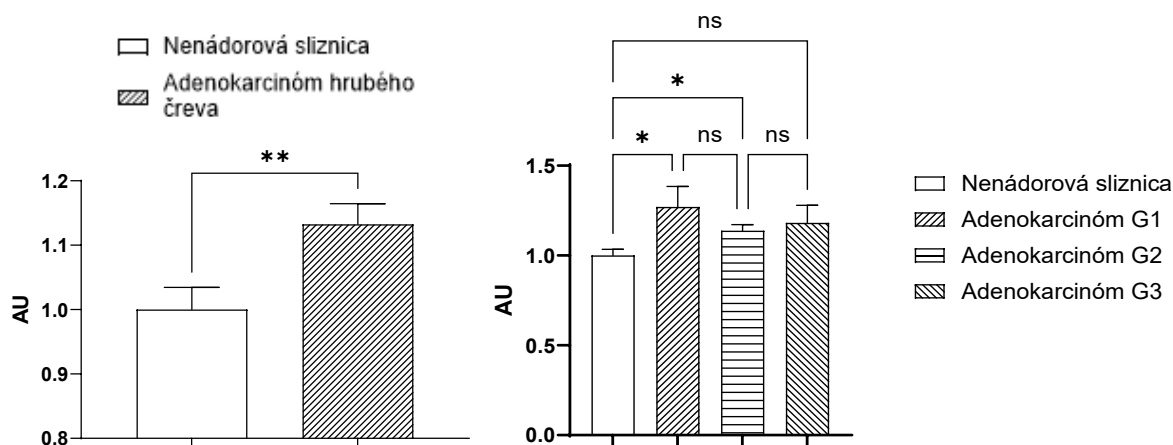
Mikrovaskulárna denzita hodnotená pomocou CD31 je v kolorektálnych adenokarcinómoch signifikantne zvýšená v porovnaní s nenádorovou sliznicou ($p < 0,001$), čo odráža aktivovanú angiogenézu v nádorovom mikroprostredí. Tento nárast je najvýraznejší v low grade nádoroch (G1 a G2), kde je vaskularizácia signifikantne vyššia oproti kontrole ($p < 0,0001$). V nádoroch G3 dochádza k miernemu poklesu mikrovaskulárnej denzity v porovnaní s G2 ($p < 0,05$), avšak hodnoty zostávajú stále zvýšené oproti nenádorovému tkanivu ($p < 0,05$). Uvedené nálezy naznačujú, že angiogenéza je výrazne aktivovaná už v skorších štádiách diferenciácie a pretrváva aj v menej diferencovaných nádoroch, pričom predstavuje jeden z kľúčových mechanizmov podporujúcich rast a progresiu tumoru.



Obr. 1. Mikrovaskulárna densita v kolorektálnom adenokarcinóme

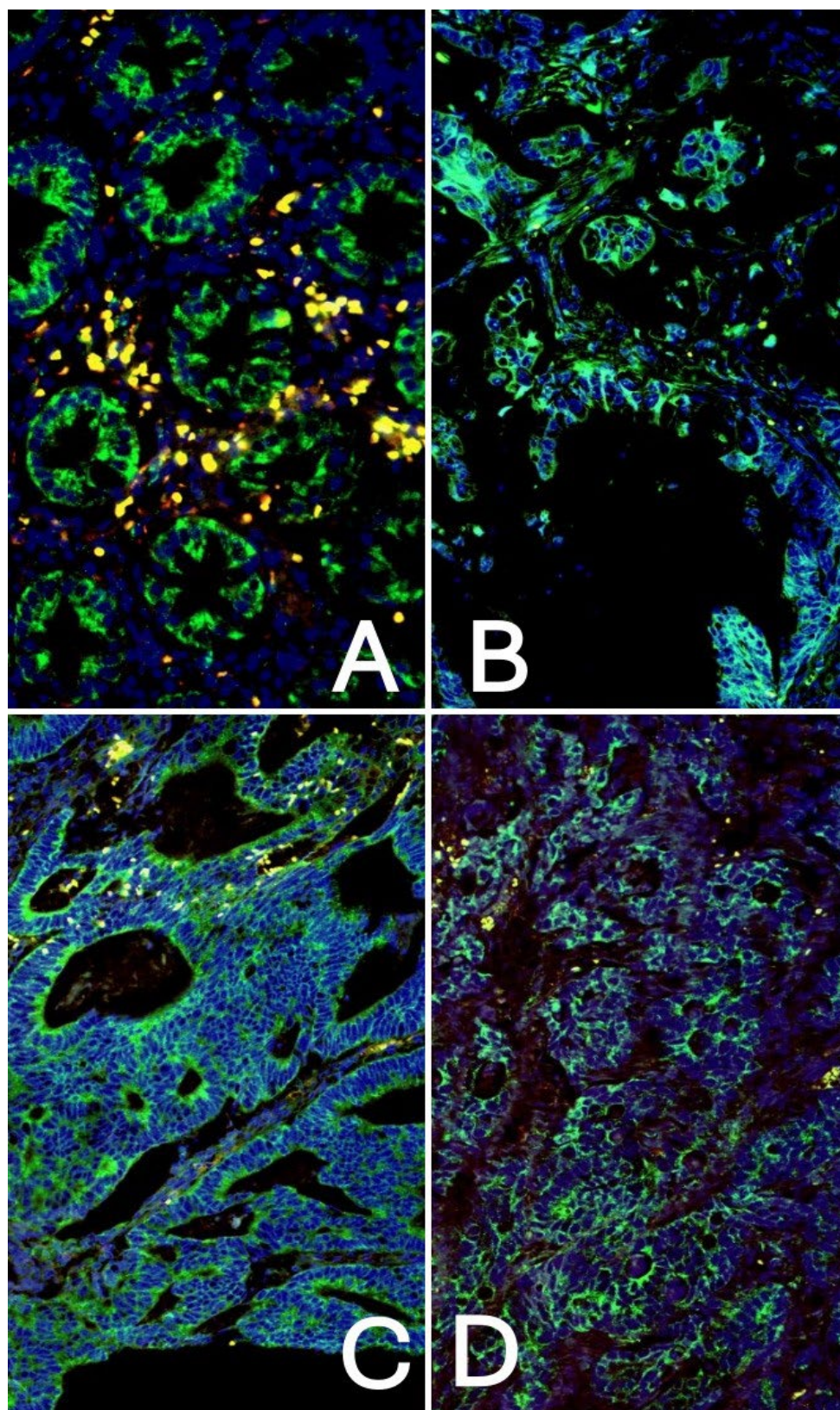
Pozorujeme štatisticky významné zvýšenie mikrovaskulárnej denzity v nádoroch stupňa G1 a G2 oproti nenádorovej sliznici ($p < 0,001$).

Expresia NOS2 je v kolorektálnom adenokarcinóme zvýšená v porovnaní s nenádorovou sliznicou, so signifikantným nárastom najmä v low grade nádoroch. Oxid dusnatý produkovaný NOS2 môže prispievať k nádorovej angiogenéze viacerými mechanizmami, vrátane modulácie expresie proangiogénnych faktorov a ovplyvnenia vaskulárnej permeability. Skutočnosť, že expresia NOS2 nie je signifikantne zvýšená v high grade nádoroch, môže súvisieť s biologickou heterogenitou alebo odlišnými regulačnými mechanizmami v pokročilejších štádiách nádoru. Tieto výsledky podporujú hypotézu, že NOS2 zohráva významnejšiu úlohu v skorších fázach nádorovej progresie, kde môže participovať na iniciácii a podpore angiogenézy.



Obr.2 Expresia NOS2 v nenádorovej sliznici a kolorektálnom adenokarcinóme

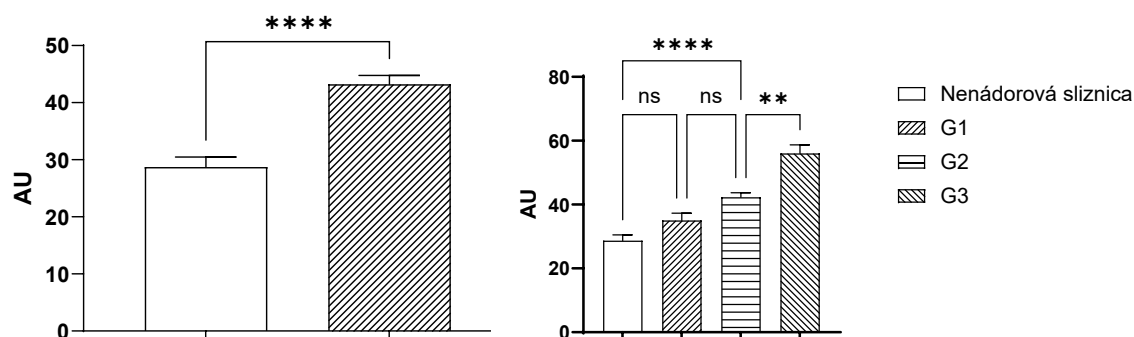
Signifikantne zvýšenú expresiu NOS2 pozorujeme v nádorovom tkanive kolorektálneho karcinómu v porovnaní s nenádorovou sliznicou hrubého čreva ($p < 0,01$).



Obr. 3 Expresia NOS2 v adenokarcinóme hrubého čreva

Pozorujeme zvýšenú cytoplazmatickú expresiu NOS2 v dobre diferencovaných nádorových bunkách s relatívne zachovanou žľazovou architektúrou. (A) nenádorová sliznica, (B) adenokarcinóm grade 1, (C) grade 2, (D) grade 3, NOS2, IF, 200x

Kľúčovým mediátorom týchto procesov je aj VEGF-A, ktorý predstavuje centrálny regulačný faktor angiogenézy v nádoroch. Zvýšená expresia NOS2 môže viesť k upregulácii VEGF-A prostredníctvom signálnych dráh závislých od hypoxie a zápalu, čím sa podporuje proliferácia endoteliálnych buniek a novotvorba ciev. Pozorovaná zvýšená mikrovaskulárna denzita tak môže odrážať výsledok koordinovaného pôsobenia NOS2, COX-2 a VEGF-A v nádorovom mikroprostredí. Tento vzťah je najvýraznejší v low grade nádoroch, kde dochádza k paralelnému nárastu angiogénnych stimulov, zatiaľ čo v high grade léziách môže byť regulácia angiogenézy komplexnejšia a menej závislá od NOS2. Súhrnne možno konštatovať, že prepojenie medzi NOS2, VEGF-A a mikrovaskulárnou denzitou predstavuje dôležitý mechanizmus regulácie angiogenézy v kolorektálnom karcinóme s potenciálnym diagnostickým a prognostickým významom.

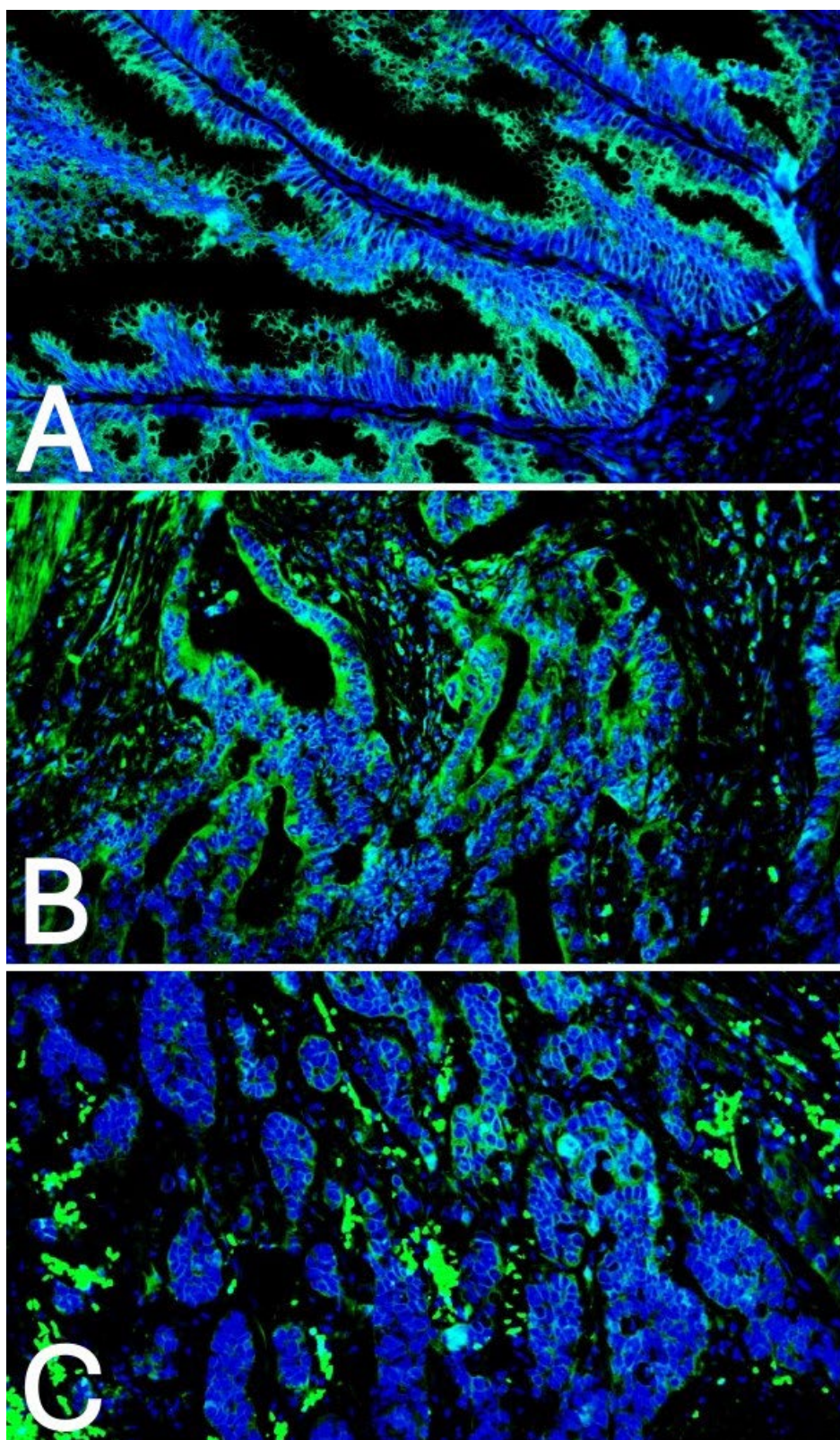


Obr. 4 Expresia VEGF-A v normálnej sliznici a v kolorektálnom karcinóme

Porovnanie ukazuje signifikantný nárast expresie VEGF-A v nádorovom tkanive oproti nenádorovej sliznici. Výsledky potvrdzujú zvýšenú angiogénnu aktivitu spojenú s nádorovou transformáciou epiteliálnych buniek.

Diskusia

V našej práci sme hodnotili mikrovaskulárnu denzitu kolorektálnych karcinómov a skúmali sme jej vzťah k stupňu diferenciácie a štádiu nádoru. Predmetom nášho výskumu bolo taktiež hodnotenie expresie enzýmu oxidu dusnatého – NOS2. Zistili sme, že MVD sa zvyšuje od normálnej sliznice až po karcinóm, čo potvrdzuje významnú úlohu angiogenézy pri progresii tohto malígneho ochorenia. Medzi karcinómami bola MVD najvyššia v stredne diferencovaných nádoroch (G2), zatiaľ čo zle diferencované (G3) vykazovali najnižšiu hustotu mikrociev, čo naznačuje, že vzťah medzi stupňom diferenciácie a angiogénzou nie je lineárny a môže byť ovplyvnený mikroprostredím nádoru. Tento nález je konzistentný s publikovanými údajmi a spomínaný pokles v G3 nádoroch môže odrážať prechod k alternatívnym mechanizmom vaskularizácie, ako je vaskulárna mimikria, ktorá bola dokumentovaná v stredne diferencovaných kolorektálnych karcinómoch, kde v polovici prípadov chýbali proliferujúce endotelové bunky v intratumorálnej oblasti. V tejto súvislosti má význam aj expresia NOS2 nádorovými bunkami.



Obr.5 Expresia VEGF-A v nádorových bunkách CRC, grade 1

V adenokarcinóme hrubého čreva pozorujeme pravidelnú expresiu VEGF-A. (A) adenokarcinóm grade1, (B) grade 2, (C) grade 3, VEGF-A, IF, 400x

Expresia NOS2 bola signifikantne vyššia v karcinómoch v porovnaní s normálnou sliznicou a pozitívne korelovala s vyšším stupňom diferenciácie, čo poukazuje na jej rolu v procese angiogenézy a skorších štádiách progresie nádoru. V high grade nádoroch nebol rozdiel v expresii NOS2 štatisticky signifikantný, čo môže súvisieť aj s duálnou funkciou NO v procesoch angiogenézy. Bolo však preukázané, že downregulácia NOS2 paradoxne podporuje epiteliálno-mezenchymálnu tranzíciu (EMT) a metastázovanie.

V našej práci sme sa taktiež sústredili na hodnotenie expresie VEGF-A v súvislosti s angiogenézou a progresiou nádoru. Naše výsledky preukázali, že expresia VEGF-A je zvýšená v kolorektálnych karcinómoch v porovnaní s normálnou sliznicou hrubého čreva, čo jednoznačne poukazuje na aktiváciu angiogénnych mechanizmov v nádorovom mikroprostredí. Zvýšená expresia VEGF-A bola spojená s horším histologickým gradingom a vyššou mierou mikrovaskulárnej denzity. Zistili sme koreláciu medzi VEGF-A a mikrovaskulárnou denzitou, ktorá potvrdzuje jeho úlohu v angiogenéze. Výsledky podporujú význam VEGF-A aj ako biomarkera progresie a invazivity kolorektálneho karcinómu.

Kľúčovým mechanizmom prepojenia NOS2 a angiogenézy je stimulácia COX-2 dráhy oxidom dusnatým. COX-2 reguluje expresiu VEGF prostredníctvom svojho hlavného produktu – prostaglandínu E2 (PGE2). Našou hypotézou je, že progresia kolorektálneho karcinómu je ovplyvnená vzájomným prepojením hypoxie a zápalovej odpovede v nádorovom mikroprostredí. Predpokladáme, že zápalová aktivácia vedie k zvýšenej expresii NOS2 a produkcii oxidu dusnatého, ktorý môže následne modulovať angiogenézu nielen priamo, ale aj nepriamo prostredníctvom aktivácie COX-2 dráhy. Úloha COX-2 v tomto mechanizme predstavuje potenciálny smer pre ďalší výskum.

Praktický význam našej práce spočíva v identifikácii NOS2 ako potenciálneho prognostického markera a terapeutického cieľa a v možnosti využitia MVD ako ukazovateľa rizika vzdialených metastáz. Naše výsledky podporujú význam VEGF-A ako biomarkera angiogenézy v nádoroch kolorekta a jeho potenciál ako cieľa antiangiogénnej terapie pri liečbe nádorov kolorekta. Naše zistenia tak prispievajú k lepšiemu pochopeniu angiogenézy a jej regulácie v kolorektálnych karcinómoch a môžu byť podkladom pre ďalší výskum a rozvoj cielenej terapie.

Zoznam použitej literatúry

1. Gupta S. Screening for Colorectal Cancer. Hematol Oncol Clin North Am. 01. jún 2022;Colorectal Cancer36(3):393–414. doi:10.1016/j.hoc.2022.02.001
2. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. Cancers. január 2022;14(7):1732. doi:10.3390/cancers14071732
3. Matsuda T, Fujimoto A, Igarashi Y. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Public Health Strategies. Digestion. 12. február 2025;106(2):91–9. doi:10.1159/000543921
4. Balasubramanian S, Priyathersini N, Johnson T, Balasubramanian S, Priyathersini N, Johnson T. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Colorectal Adenoma and Carcinoma in a Tertiary Care Center. Cureus. 11. november 2022;14(11). doi:10.7759/cureus.31393

5. Battaglin F, Puccini A, Intini R, Schirripa M, Ferro A, Bergamo F, et al. The role of tumor angiogenesis as a therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 04. marec 2018;18(3):251–66. doi:10.1080/14737140.2018.1428092 PubMed PMID: 29338550.
6. Gao Y, Zhou S, Xu Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer. *Nitric Oxide.* 01. február 2019;83:33–9. doi:10.1016/j.niox.2018.12.008
7. Dulak J, Józkowicz A. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. *Antioxid Redox Signal.* február 2003;5(1):123–32. doi:10.1089/152308603321223612 PubMed PMID: 12626124.
8. Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, et al. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15. apríl 2004;10(8):2694–704. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0192 PubMed PMID: 15102673.
9. Tatode A, Chaudhary AA, Qutub M, Trivedi R, Umekar M, Ali MAM, et al. Dissecting the opposing regulatory functions of endogenous nitric oxide production in colorectal cancer initiation, adaptive immune response alterations, and ferroptosis execution. *Oncol Rev.* 2025;19:1671235. doi:10.3389/or.2025.1671235 PubMed PMID: 41268067; PubMed Central PMCID: PMC12627049.
10. Yang Y, Yuan J, Jiang Y, Hu SS, Yang XY, Liu XC, et al. Expression and significance of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in colorectal adenoma and cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 15. marec 2024;16(3):670–86. doi:10.4251/wjgo.v16.i3.670
11. den Uil SH, van den Broek E, Coupé VMH, Vellinga TT, Delis-van Diemen PM, Bril H, et al. Prognostic value of microvessel density in stage II and III colon cancer patients: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 16. august 2019;19(1):146. doi:10.1186/s12876-019-1063-4

13. The bidirectional relationship between type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke

Viktoriia Tiahur

(4th year student of the Faculty of Medicine, Uzhhorod National University, Ukraine)

Supervisor: prof. Mariia Derbak, MD, Head of the Department of Faculty Therapy¹,
assoc. prof. Myroslava Bletska, PhD in Medicine, Department of Faculty Therapy.¹

¹Uzhhorod National University, Uzhhorod, Ukraine

Introduction.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the leading risk factors for ischemic stroke and significantly affects its course, prognosis, and recurrence rate. The global prevalence of T2DM is steadily increasing, contributing to a rise in cerebrovascular complications. Chronic hyperglycemia, insulin resistance, and associated metabolic disorders contribute to the development of endothelial dysfunction, oxidative stress, and accelerated atherosclerosis. Patients with long-standing T2DM are at significantly increased risk of developing macrovascular and microvascular complications, including ischemic stroke. The coexistence of arterial hypertension, dyslipidemia, and obesity plays a crucial role, forming metabolic syndrome. The interaction of these factors has a synergistic effect, which not only increases the risk of stroke but also leads to a more severe disease course, more pronounced neurological deficits and worse functional outcomes.

Methods.

A total of 38 patients (22 women and 16 men) who were hospitalized in the stroke department of St. Martin Hospital in Mukachevo with a confirmed diagnosis of ischemic stroke and type 2 diabetes mellitus were examined. Among them, 9 patients had newly diagnosed T2DM, 21 patients had a disease duration of 5-10 years, and 8 patients had T2DM for more than 10 years. The mean age of the patients was 66.7 ± 1.3 years. The inclusion criteria were the presence of confirmed ischemic stroke and T2DM. Stroke severity was assessed using the NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale). Neuroimaging was performed using computed tomography or magnetic resonance imaging of the brain. Laboratory tests included determination of blood glucose levels upon admission, as well as baseline biochemical parameters. Additionally, anthropometric measurements were performed with calculation of body mass index (BMI), allowing assessment of obesity as a risk factor. Statistical analysis was performed using descriptive statistics, and the results are presented as mean $\pm$ standard deviation ($M \pm SD$).

Results.

On admission, all patients had elevated blood pressure: 12 patients had stage I hypertension (31.6%), 10 had stage II hypertension (26.3%), and 16 had stage III hypertension (42.1%). This distribution indicates the predominance of severe forms of arterial hypertension among the examined patients and the presence of high cardiovascular risk, which requires careful blood pressure monitoring and individualized management.

The BMI distribution showed that normal body weight was observed in 18 patients (47.4%), overweight in 14 (36.8%), and obesity in 6 patients (15.8%). Thus, more than half of the examined patients (52.6%) were overweight or obese. Blood glucose levels at admission were 7.0-8.5 mmol/L in 14 patients (36.8%) and above 8.6 mmol/L in 24 patients (63.2%). Obese patients had a longer duration of T2DM (more than 10 years) and higher glycemic levels in the acute period of stroke (above 12.5 mmol/L). Primary ischemic stroke was observed in 29 patients (76.3%), while recurrent stroke was observed in 9 patients (23.7%). Analysis of stroke severity showed that in patients with T2DM duration of more than 10 years, the mean NIHSS score was 16.5 ± 2.1 points, which corresponds to a moderate-to-severe or severe neurological deficit. In patients with a duration of 5-10 years, this indicator was 15.2 ± 1.7 points, and in patients with newly diagnosed T2DM – 14.7 ± 1.5 points.

Discussion.

The obtained results confirm a close relationship between the duration of T2DM, glycemic levels, blood pressure, and the severity of ischemic stroke. T2DM is not only a risk factor for stroke but also a determinant of its clinical course. Current evidence suggests that patients with T2DM have a significantly higher risk of ischemic stroke compared with individuals without carbohydrate metabolism disorders. A large cohort study showed that the risk of stroke in patients with T2DM is 37% higher [1]. This is consistent with our findings, which demonstrate a high frequency of severe forms of stroke among patients with a long duration of type 2 diabetes. Hyperglycemia plays a key role in the pathogenesis of brain tissue injury. Elevated glucose levels activate anaerobic glycolysis, which leads to lactate accumulation, acidosis, and neuronal damage. In addition, hyperglycemia contributes to oxidative stress, endothelial dysfunction, and increased permeability of the blood-brain barrier. Our results also showed that elevated glucose levels at admission were associated with more severe neurological deficits. Hyperglycemia plays a key role in prognosis in the acute period of ischemic stroke, regardless of a previous diagnosis of T2DM. Elevated glucose levels on admission are associated with worse functional outcomes and increased mortality. In a meta-analysis that included patients with and without diabetes, elevated glycemia was identified as an independent predictor of adverse outcomes in the acute period of stroke [2].

The duration of T2DM is a key factor determining the severity of vascular changes and the severity of ischemic stroke. Our data confirm that patients with T2DM duration of more than 10 years have higher NIHSS scores. This is consistent with current literature data showing that a longer duration of type 2 diabetes is associated with worse clinical outcomes of stroke. For example, Zhang Y et al. (2022) analyzed a national registry of more than 14,000 patients with ischemic stroke and found that individuals with T2DM duration ≥ 8 years had a significantly increased risk of stroke recurrence and adverse functional outcomes compared with patients without diabetes ($p < 0.001$) [3]. Similar results were obtained in a large prospective cohort

study by Gao X et al. (2025), where a longer duration of diabetes (≥ 15 years) was associated with an increased risk of ischemic stroke and a worse prognosis, especially in patients with poor glycemic control [4]. Particular attention should be paid to arterial hypertension. In our study, all patients had elevated blood pressure, with a significant proportion presenting with stage II-III hypertension ($\geq 160/100$ mm Hg). This highlights the importance of strict blood pressure control as one of the key components of stroke prevention and secondary prevention of its recurrence. According to current studies, an increase in systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg is associated with a 1.5-2-fold increase in stroke risk, while a decrease of 10 mm Hg is associated with a 20-30% reduction in stroke risk. In addition, achieving a target level of $<130/80$ mm Hg in high-risk patients, particularly those with diabetes, reduces the risk of recurrent stroke by approximately 30-40% [5].

Obesity is also an important modifiable risk factor for ischemic stroke. The high proportion of overweight and obese patients identified in our study indicates the need for lifestyle and metabolic interventions, as obesity, especially in combination with other metabolic risk factors (hypertension, hyperglycemia, dyslipidemia), significantly increases the risk of cerebrovascular events, including ischemic stroke. According to recent meta-analyses, overweight is associated with an approximately 20-30% increased risk of stroke, while obesity is associated with a 40-60% increased risk compared with individuals of normal body weight, highlighting the importance of BMI control as a component of primary and secondary prevention of cerebrovascular events [6]. Thus, the results of the study support the concept of a synergistic and bidirectional interaction between type 2 diabetes mellitus and ischemic stroke, which requires a comprehensive approach to treatment and prevention.

References

1. Mavridis A, Viktorisson A, Eliasson B, von Euler M, Sunnerhagen KS. Risk of Ischemic and Hemorrhagic Stroke in Individuals With Type 1 and Type 2 Diabetes: A Nationwide Cohort Study in Sweden. *Neurology*. 2025;104(7):e213480. doi:10.1212/WNL.000000000000213480.
2. Ferrari F, Moretti A, Villa RF. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: physiopathological and therapeutic complexity. *Neural Regen Res*. 2022;17(2):292-299. doi:10.4103/1673-5374.317959.
3. Zhang Y, Jin A, Meng X, Wang M, Li H, Pan Y, Wang YJ. Association between diabetes duration and 1-year prognosis of stroke: A national registry study. *Brain Behav*. 2022;12(9): e2725. doi:10.1002/brb3.2725.
4. Gao X., Yang, HH., Xie, F. et al. Diabetes duration, glycemic control, and risk of stroke and stroke subtypes: a nationwide prospective cohort study. *Sci Rep* 2025;15: 43633. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-27547-z>
5. Ahmad M, Yadav I, Lashari UG, Sabra S, et al. Hypertension and Risk of Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus*. 2025;17(12):e99863. doi:10.7759/cureus.99863.
6. Cao L, Zhu L, Zhang W, Zhang M, Hu D, Wang Q. Metabolic obesity phenotypes and risk of ischemic stroke: The Rural Chinese Cohort Study. *Front Nutr*. 2026; 12:1749472. doi: 10.3389/fnut.2025.1749472.

**VEDECKÉ PRÁCE
DOKTORANDOV**

14. Čo určuje degradáciu NETov počas sepsy? Úloha ich proteínového zloženia

Mgr. Letícia Hudecová

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Emil Bečka¹, Tomáš Strečanský¹, Tetiana Pidlypska¹, Zuzana Matulová¹,
Gergó Borka¹

Školiteľ: doc. Mgr. Michal Pastorek, PhD.¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

Úvod

Celosvetovo zomiera na sepsu približne 11 miliónov ľudí ročne. Sepsa je akútny, život ohrozujúci stav, kedy dysregulovaná odpoveď na infekciu vedie k zlyhaniu orgánov až smrti [1]. Tretia medzinárodná konsenzuálna definícia (Sepsis-3) definuje sepsu ako život ohrozujúce zlyhávajúce orgánov spôsobené neadekvátnou odpoveďou imunitného systému hostiteľa na infekciu [2]. Zavedenie tejto definície prispelo k rýchlejšej diagnostike a včasnej liečbe, čo pomohlo znížiť mortalitu sepsy [2]. Napriek tomu incidencia sepsy naďalej narastá. Štatistiky preukázali, že patogén je identifikovaný približne v 47% prípadov, pričom väčšina z nich boli bakteriálneho pôvodu [3]. V prospektívnej kohorte pacientov so sepsou a bakterémiou bolo približne 89% infekcií monomikrobiálnych [4]. Štúdia z roku 2022 preukázala, že spomedzi 60 dospelých septických pacientov bola u 65% detekovaná sepsa spôsobená Gram-pozitívnymi baktériami, najčastejšie *Staphylococcus aureus*, zatiaľ čo Gram-negatívne baktérie, najmä *Escherichia coli*, boli prítomné u 21% pacientov [5].

Počas sepsy dochádza k nerovnováhe medzi pro- a protizápalovými mechanizmami imunitného systému, čo vedie k nekontrolovanému uvoľňovaniu cytokínov až k vzniku cytokínovej búrky [6]. Tá následne indukuje nadmernú aktiváciu imunitných buniek, ich migráciu, expresiu adhezívnych molekúl na endotelových bunkách a leukocytoch, ako aj produkciu reaktívnych foriem kyslíka, serínových proteáz, antimikrobiálnych peptidov a neutrofilových extracelulárnych pascí (NETov) [7]. Prítomnosť NETov bola potvrdená aj v plazme septických pacientov [8]. NETy sú produkované neutrofilmi za účelom zastavenia diseminácie patogénov a za fyziologických podmienok sú následne štiepené DNázou I a IL3 na krátke fragmenty, ktoré sú fagocytované makrofágmi [9]. Problém nastáva vtedy, keď NETy nie sú efektívne odstraňované. NETy totiž obsahujú DNA, serínové proteázy, históny a antimikrobiálne peptidy, ktoré vo vysokých koncentráciách pôsobia cytotoxicky na endotel a epitel, čím podporujú chaos vyvolaný cytokínovou búrkou [10].

Je niekoľko hypotéz zaoberajúcimi sa nedostatočným odstraňovaním NETov počas sepsy. Jednou z nich je znížená expresia a aktivita DNázy I, ktorá bola pozorovaná u septických pacientov, avšak jej príčina zatiaľ nie je objasnená [11]. Druhou možnou príčinou je samotný proteóm NETov. Jedným z proteínov ochraňujúcich degradáciu NETov nukleázami je aktívna

forma ľudského katelicidínu, LL37 [12], ktorý je počas NETózy uvoľňovaný zo sekundárnych granúl neutrofilov. LL37 má silný pozitívny náboj, vďaka čomu vytvára interakcie k negatívne nabitej DNA. Lande a kol. preukázali, že komplex DNA:LL37 je rezistentný voči DNáze I a zároveň aktivuje receptor TLR9 [13]. Našou hypotézou je, že znížená degradácia NETov počas sepsy odráža nielen zníženú aktivitu DNázy I, ale aj charakteristiky proteómu NETov, ktoré závisia viac od indukujúceho podnetu než od miesta infekcie. Katiónové antimikrobiálne peptidy tak môžu predstavovať kľúčové faktory ovplyvňujúce ich rezistenciu voči degradácii. Pochopenie týchto mechanizmov by mohlo prispieť k optimalizácii načasovania DNázovej terapie pri sepe.

Materiál a metódy

Neutrofily boli izolované z periférnej krvi zdravých dospelých dobrovoľníkov pomocou sedimentácie v 3% dextránsulfáte (Mw 400 000–600 000) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) vo fyziologickom roztoku (1:1, 40 min, 37 °C). Leukocytová vrstva bola následne separovaná centrifugáciou na Ficoll-Paque (Cytiva Life Sciences, Marlborough, MA, USA) (hustota 1,077 g/ml; 400 g, 20 min, bez brzd). Zvyšné erytrocyty boli odstránené pomocou lyzačného roztoku erytrocytov (15 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,01 mM EDTA) (10 min, 4 °C). Po centrifugácii (400 g, 10 min) boli získané čisté neutrofily.

Neutrofily (1×10⁶/ml) boli rozdelené na krycie sklíčka v 6-jamkovej platničke a stimulované s *E. coli*, *S. aureus*, mitochondriami (8×10⁷/ml) alebo forbol-12-myristát-13-acetátom (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) (500 nM). Po 3 h inkubácii boli vzorky premyté PBS a fixované v 2% PFA cez noc (4 °C).

Po premytí boli vzorky blokované (5% BSA, 0,1% Tween v PBS, 1 h) a inkubované s primárnymi protilátkami: FITC anti-human MPO (0,2 µg/ml) (Abcam, Cambridge, Spojené kráľovstvo) a anti-human LL37 (0,2 µg/ml) (Innovagen, Lund, Švédsko) (1 h, tma). Následne boli po premytí inkubované so sekundárnou protilátkou (Donkey PE anti-rabbit IgG, 0,05 µg/ml, 1 h) (BioLegend, San Diego, USA). Vzorky boli následne premyté a montované vo Vectashielde s DAPI (Vector Laboratories, California, USA). Fotky NETov boli získané pomocou systému Cytation 7 (BioTek/Agilent).

Tab. 1: Zoznam použitých fluoroforov, ktorými boli značené primárne a sekundárne protilátky a laserov, ktorými boli fluorofoxy excitované.

Farba kanálu	Fluorofor	Excitácia (nm)	Emisia (nm)
Modrá	DAPI/DNA	360-400	~447
Zelená	FITC/MPO	456-490	~515-530
Žltá - oranžová	PE/LL37	530-560	~575-590

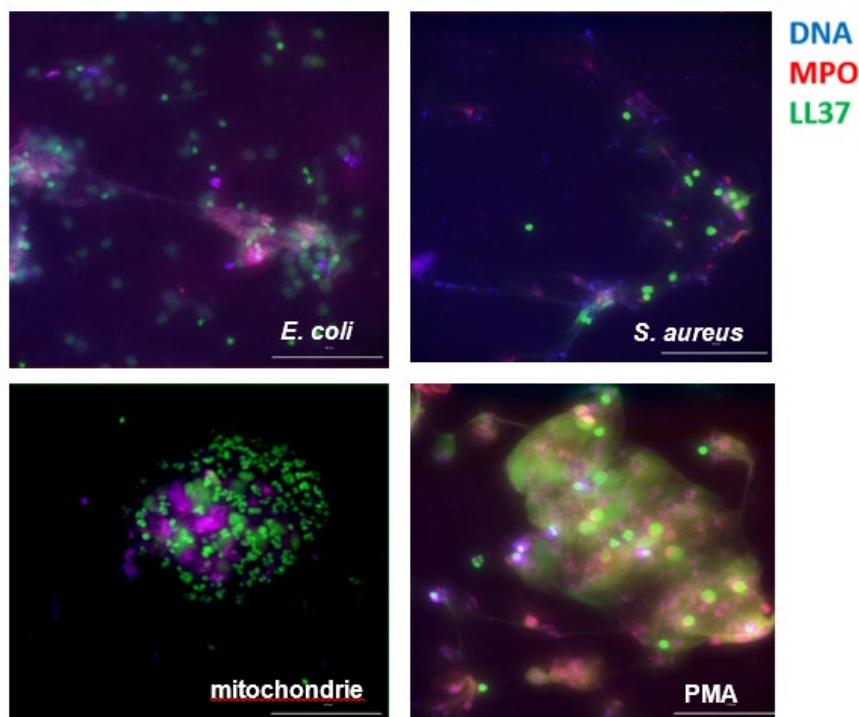
Na analýzu rezistencie NETov boli neutrofily po izolácii nasadené do 6-jamkovej platničky a stimulované rovnakým spôsobom ako pri fluorescenčnej mikroskopii. Po 3 h inkubácii boli NETy mechanicky uvoľnené a prenesené do 2 ml Eppendorf skúmaviek. Vzorky boli

centrifugované (400 g, 10 min), supernatant následne centrifugovaný (20 000 g, 10 min) a pelety obsahujúce NETy boli použité na kvantifikáciu DNA. NETy boli upravené na koncentráciu 10 ng/μl (100 μl) a inkubované s nukleázami: DNáza I (Qiagen; 2,5 μl/reakciu) / DNáza IL3 (Abxexa; 10 μg/ml) / 10 μl autológnej plazmy, doplnené s PBS do 100 μl. Na aktiváciu boli použité príslušné pufre (DNáza I: 2 mM Ca²⁺, 2 mM Mg²⁺; DNáza IL3: 200 mM Tris-HCl, 5 mM Mg²⁺, 2 mM Ca²⁺). Po 1 h inkubácii (37 °C) bola reakcia zastavená pridaním 20 mM EDTA a 20 mM EGTA. Rezistencia NETov bola hodnotená na základe množstva nezdegradovanej DNA pomocou Qubit dsDNA HS (Invitrogen, Waltham, USA).

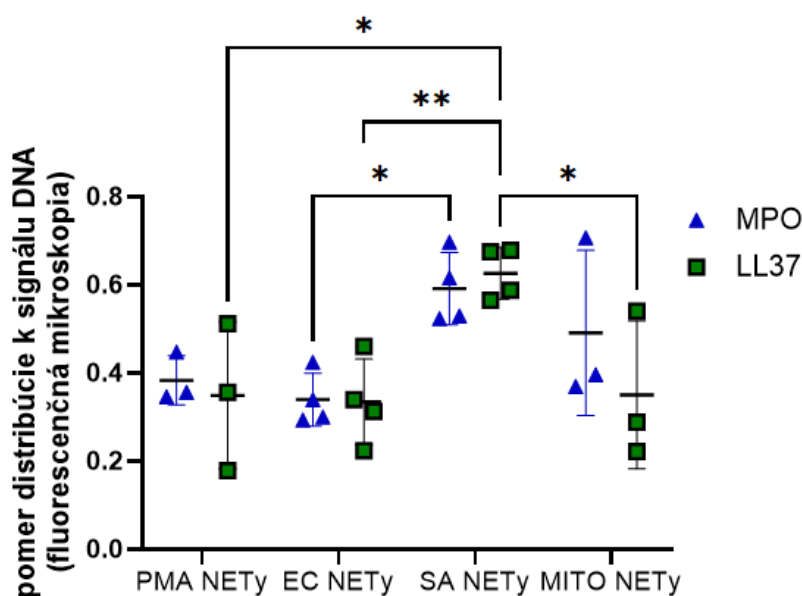
Dopad nezdegradovaných NETov na priebeh zápalu bol analyzovaný pomocou TLR9 reportérového systému (InvivoGen, San Diego, USA). Jednotlivé skupiny NETov (*S. aureus* / *E. coli* / mitochondriami – indukované NETy a rovnaké skupiny NETov po štiepení DNázou I / IL3 / autológnou plazmou) boli riedené na rovnakú koncentráciu 0,5 ng/μl a v 10 μl boli pridané k bunkovej kultúre HEK-2933 Blue hTLR9. Po 16h inkubácii za podmienok 5% CO₂, 37°C, bola meraná koncentrácia produktu signalizačnej dráhy TLR9 systému.

Výsledky

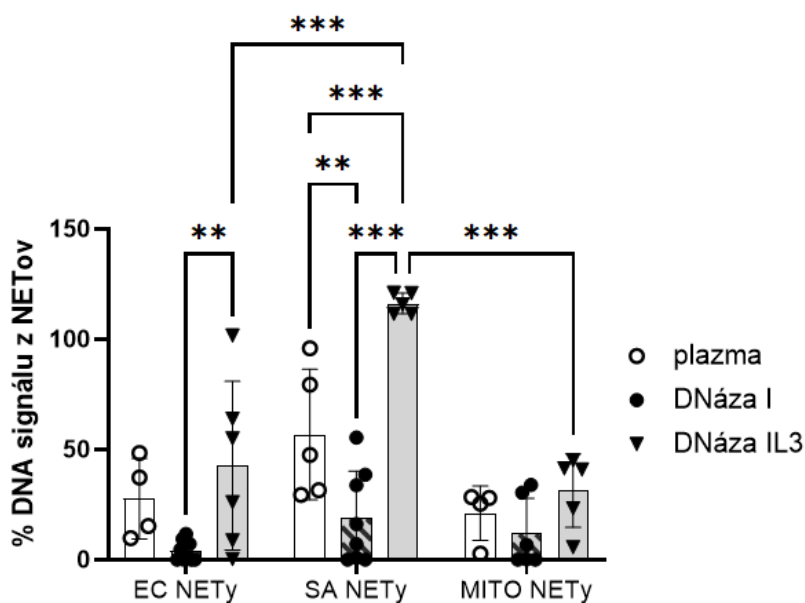
Prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie sme preukázali, že LL37 sa prirodzene vyskytuje v NEToch, ktoré sú indukované akýmkoľvek stimulom (Obrázok A). *S. aureus* – indukované NETy obsahujú najvyššiu koncentráciu LL37 v porovnaní s ostatnými testovanými skupinami. *S. aureus* – indukované NETy majú 2x vyššiu koncentráciu LL37 v porovnaní s *E. coli* – indukovanými NETmi (Graf B).



Obrázok A: Distribúcia MPO a LL37 v NEToch indukovaných bakteriálnymi, sterilnými a chemickými stimulmi. NETy boli značené primárnymi protilátkami: anti-human MPO a anti-human LL37. DNA = modrý signál, MPO = červený signál, LL37 = zelený signál, kanály sú spojené.



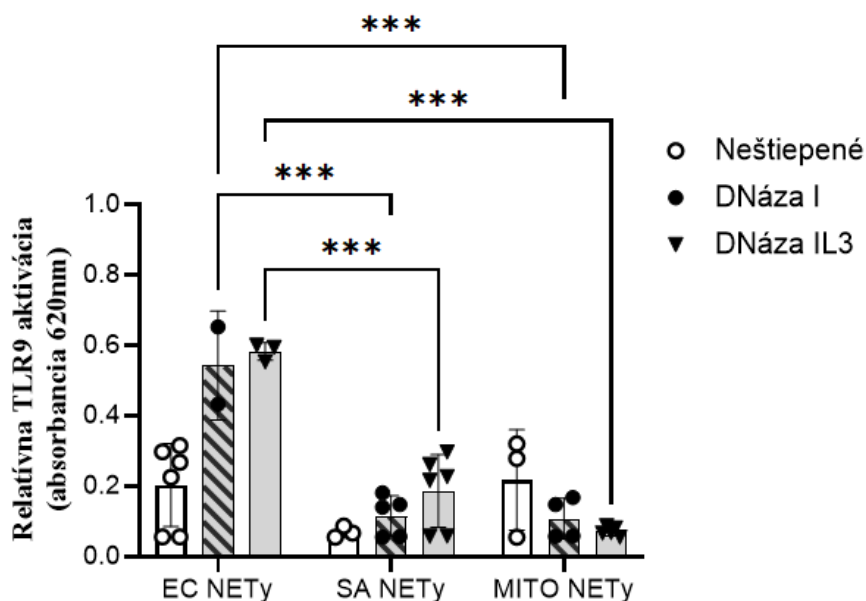
Graf B: Pomer distribúcie LL37 a MPO k signálu DNA nameraného fluorescenčnou mikroskopiou v NEToch indukovaných rôznymi stimulmi. Údaje sú uvedené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné ($n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).



Graf C: Vplyv odlišného proteómu NETov v dôsledku rozličného stimulu na rezistenciu NETov voči degradácii plazmatickými nukleázami. Údaje sú uvedené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné ($n=6$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

S. aureus – indukované NETy majú najvyššiu rezistenciu voči degradácii vo všetkých troch testovaných skupinách – voči degradácii DNázou I, IL3 a nukleázami v plazme (Graf C).

Po inkubácii NETov s TLR9 reportérovým systémom sme pozorovali, že *S. aureus* – indukované NETy len veľmi slabo aktivovali TLR9 receptor. Paradoxne najvyššiu aktiváciu TLR9 receptoru sme pozorovali po inkubácii s *E. coli* a aktivácia sa zvyšovala po inkubácii so štiepenými EC-NETmi (Graf D).



Graf D: Aktivácia TLR9 receptoru fragmentami nezdegradovaných NETov s odlišným proteómom. Bunková kultúra HEK-293 bola inkubovaná s neštiepenými NETmi a aj NETmi štiepenými plazmatickými nukleázami DNáza I a DNáza IL3. Údaje sú uvedené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka, p-hodnoty menšie ako 0,05 sa považujú za štatisticky významné (n=6, *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001).

Diskusia a záver

Sepsa je charakteristická hyperzápalovou odpoveďou sprevádzanou nadmernou produkciou NETov. Znížená aktivita DNázy I počas sepsy predstavuje jeden z mechanizmov nedostatočného odstraňovania NETov z cirkulácie, čo môže prispievať k perpetuácii cytokínovej búrky a zhoršeniu klinického stavu pacienta. V našom výskume sme sa zamerali na vplyv proteómu NETov na ich degradáciu nukleázami. V štúdiu z roku 2019 (14), v ktorej sledovali proteóm NETov indukovaných stimulmi PMA, A23187, LPS a spontánna NETóza preukázali, že je určitá skupina proteínov, ktoré sa nachádzajú vo všetkých typoch NETov. Ale väčšina proteínov sú špecifické pre daný podnet. Ich výsledkom je, že NETy indukované odlišným stimulom obsahujú rôzne zloženia proteínov [14]. Rovnaký výsledok, že proteóm NETov sa líši od typu stimulu, sme potvrdili aj v našich podmienkach. Pomocou fluorescenčnej mikroskopie sme preukázali, že NETy indukované *S. aureus* obsahovali najvyššiu koncentráciu LL37 v porovnaní s ostatnými stimulmi. Našou hypotézou je, že rôzne bakteriálne signály,

rozpoznávané špecifickými receptormi, aktivujú rozdielne signalizačné dráhy, ktoré vedú k variabilite mechanizmov NETózy a naviazania proteínov na DNA.

V ďalšom experimente sme sledovali rezistenciu NETov na ich degradáciu endogénnymi nukleázami, konkrétne DNázou I, IL3 a autológnou plazmou. NETy indukované *S. aureus* s najvyšším obsahom LL37, boli najviac chránené pred degradáciou všetkými testovanými nukleázami. Ochranná funkcia LL37 bola popísaná už skôr, pričom komplex DNA:LL37 je vysoko kompaktný a znižuje prístupnosť DNA pre nukleázy [13, 16]. Tento mechanizmus je špecifický pre LL37, pretože iné kationické peptidy ako β -defenzín alebo lyzozým nevykazujú porovnateľnú ochrannú schopnosť [15].

Analýza aktivácie TLR9 ukázala, že NETy s vysokým obsahom LL37 aktivovali receptor len minimálne, pravdepodobne v dôsledku cytotoxického účinku vysokých koncentrácií kationových peptidov [15]. Napriek tomu sme pozorovali zvýšenú aktiváciu receptora po inkubácii s NETmi indukovaných *E. coli* a dokonca štiepená skupina indukovala najvyššiu aktiváciu TLR9 receptora spomedzi všetkých testovaných skupín. Práve *E. coli* baktérie neboli silným induktorom vysokého obsahu LL37, preto NETy nimi indukované boli takmer úplne zdegradované po spoločnej inkubácii s nukleázami. Našou hypotézou je, že krátke štiepené nemetylované fragmenty sú najlepšie rozpoznávané TLR9 receptorom.

Naše výsledky naznačujú, že degradácia NETov počas sepsy je ovplyvnená nielen aktivitou nukleáz, ale aj ich proteínovým zložením, ktoré závisí od indukčného stimulu. Lepšie pochopenie týchto mechanizmov by mohlo prispieť k optimalizácii terapeutického využitia DNáz, najmä z hľadiska ich načasovania. Na potvrdenie týchto hypotéz sú však potrebné ďalšie in vivo štúdie zamerané na dynamiku degradácie NETov a ich interakciu s fagocytujúcimi makrofágmi.

Práca bola podporená grantom APVV č. APVV-21-0378

Referencie

1. Meyer NJ, Prescott HC. Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 2024 Dec 5;391(22):2133-2146. doi: 10.1056/NEJMra2403213. PMID: 39774315.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
3. Rhee C, Jones TM, Hamad Y, Pande A, Varon J, O'Brien C, Anderson DJ, Warren DK, Dantes RB, Epstein L, Klompas M; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention Epicenters Program. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. *JAMA Netw Open*. 2019 Feb 1;2(2):e187571. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2018.7571.
4. Lee SY, Park MH, Oh DK, Lim CM; Korean Sepsis Alliance (KSA) investigators. Polymicrobial bloodstream infections per se do not increase mortality compared to monomicrobial bloodstream infections in sepsis patients: a Korean nationwide sepsis cohort study. *BMC Infect Dis*. 2024 Mar 5;24(1):285. doi: 10.1186/s12879-024-09130-5.
5. Gupta E, Kumar S, Srivastava VK, Saxena J, Siddiqui AJ, Mehta S, Kaushik S, Jyoti A. Unravelling the Differential Host Immuno-Inflammatory Responses to *Staphylococcus*

- aureus* and *Escherichia coli* Infections in Sepsis. *Vaccines* (Basel). 2022 Oct 1;10(10):1648. doi: 10.3390/vaccines10101648.
6. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2013 Oct;43(10):260–3.
7. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016 May 23;353:i1585. doi: 10.1136/bmj.i1585.
8. Kaufman T, Magosevich D, Moreno MC, Guzman MA, D'Atri LP, Carestia A, Fandiño ME, Fondevila C, Schattner M. Nucleosomes and neutrophil extracellular traps in septic and burn patients. *Clin Immunol*. 2017 Oct;183:254-262. doi: 10.1016/j.clim.2017.08.014. Epub 2017 Aug 30.
9. B, Fadeel B. Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2019 Oct 15;203(8):2276-2290. doi: 10.4049/jimmunol.1800159.
10. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366. doi:10.1371/journal.pone.0032366
11. Sohrabipour S, Muniz VS, Sharma N, Dwivedi DJ, Liaw PC. Mechanistic Studies of DNase I Activity: Impact of Heparin Variants and PAD4. *Shock*. 2021 Dec 1;56(6):975-987. doi: 10.1097/SHK.0000000000001804.
12. Neumann A, Völlger L, Berends ET, Molhoek EM, Stapels DA, Midon M, Friães A, Pingoud A, Rooijackers SH, Gallo RL, Mörgelin M, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun*. 2014;6(6):860-8. doi: 10.1159/000363699.
13. Lande R, Ganguly D,V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 9;3(73):73ra19. doi: 10.1126/scitranslmed.3001180.
14. Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, Migliorini P. Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One*. 2019 Jul 8;14(7):e0218946. doi: 10.1371/journal.pone.0218946. PMID: 31283757; PMCID: PMC6613696.
15. Lande R, Chamilos G, Ganguly D, Demaria O, Frasca L, Durr S, Conrad C, Schröder J, Gilliet M. Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *Eur J Immunol*. 2015 Jan;45(1):203-13. doi: 10.1002/eji.201344277. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25332209.
16. Zielke C, Nielsen JE, Lin JS, Barron AE. Between good and evil: Complexation of the human cathelicidin LL-37 with nucleic acids. *Biophys J*. 2024 Jun 4;123(11):1316-1328. doi: 10.1016/j.bpj.2023.10.035. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37919905; PMCID: PMC11163296.

15. Modulácia receptoru pre formylované peptidy tlmí neutrofilovú chemotaxiu a tvorbu neutrofilových extracelulárnych pascí v sterilnom zápale, pričom zachováva antimikrobiálnu aktivitu pri sekundárnej infekcii

Mgr. Emil Bečka

(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Mgr. Letícia Hudecová¹, Ing. Karolína Bíla¹, Patrik Bertovič¹

Školiteľ: doc. Mgr. Michal Pastorek, PhD.¹

¹Ústav Molekulárnej Biomedicíny LF UK

Úvod

Traumatické poškodenie tkaniva vedie k uvoľňovaniu alarmínov a molekulových vzorov asociovaných s poškodením (DAMPs). K ich uvoľňovaniu dochádza nielen pri úrazoch, ale aj počas chirurgických zákrokov či pri ischemicko-reperfúznom poškodení [1, 2]. Prítomnosť DAMPs, vrátane molekúl mitochondriálneho pôvodu (mtDAMPs), predstavuje kľúčový krok k vyvolaniu sterilného zápalu v absencii infekcie. Takto uvoľnené molekuly následne indukujú migráciu a hromadenie buniek vrodenej imunity, najmä neutrofilov, v mieste poškodenia [1].

Zápalová odpoveď na poranenie je nevyhnutnou reakciou na poškodenie tkaniva, pričom vykazuje značnú podobnosť s odpoveďou na infekciu. Neutrofily reagujú na signály poškodenia nešpecificky a nedokážu striktné rozlíšiť medzi endogénnymi a exogénnymi stimulmi [3]. Mitochondrie sú podľa endosymbiotickej teórie asimilované baktérie odvodené od triedy *alfa-proteobaktérií*, čo potvrdzuje aj ich genetická príbuznosť s radom *Rickettsiales* [4, 5]. Evolučne konzervované mtDAMPs sú podobné zložkám baktérií, ktoré sú rozpoznávané neutrofilmi.

Medzi kľúčové mtDAMPs patria formylované peptidy, rozpoznávané receptormi pre formylované peptidy (FPRs), a mitochondriálna DNA, ktorá je ligandom pre Toll-like receptor 9. Aktivácia týmito stimulmi spúšťa imunitnú odpoveď neutrofilov vo forme fagocytózy, degranulácie alebo tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí (NETs) [6].

Pri procese NETózy dochádza k uvoľneniu neutrofilovej DNA spolu s granulárnymi a cytozolovými proteínmi do extracelulárneho priestoru. Úlohou NETs je imobilizácia a eliminácia invadujúcich patogénov, ktoré však pri sterilnom zápale absentujú [7]. Dysregulovaná a perzistujúca tvorba NETs má navyše deštruktívny účinok na okolité tkanivá. Nadmerná stimulácia cez FPR1 a tvorba NETs môže viesť k desenzitizácii receptorov a vyčerpaniu imunitnej odpovede voči sekundárnym infekciám, vedúcej k neadekvátnej reakcii na následný bakteriálny infekt, čoho dôsledkom sú napríklad nozokomiálne infekcie u pacientov po chirurgických zákrokoch [8-10].

Cieľom našej práce je identifikovať špecifické mechanizmy rozpoznávania mtDAMPs a následne navrhnúť ciele intervencie na potlačenie nežiaducej neutrofilovej odpovede a nadmernej tvorby NETs bez obmedzenia ich funkcie voči patogénom.

Materiál a metódy

Odber krvi a izolácia neutrofilov

Heparinizovaná krv dobrovoľníkov (EK 218/2020, UNB) bola spracovaná do 1 h od odberu. Neutrofilý boli izolované pomocou 1-Step Polymorphs (Serumwerk) podľa optimalizovaného protokolu [11] a resuspendované v médiu RPMI 1640 + 10 % FBS.

Izolácia ľudských a myšacích mitochondrií

Mitochondrie boli izolované zo 100 mg placentárneho tkaniva (ľudské) alebo pečeneového tkaniva (myšacie). Tkanivo bolo homogenizované v STE pufri (250 mM sacharóza, 2 mM EGTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) a frakcionované diferenciálnou centrifugáciou (500 × g, 3 min; následne supernatant 8 000 × g, 10 min, 4 °C). Pelet bol resuspendovaný v STE pufri a táto séria centrifugácií bola dvakrát zopakovaná. Častice kvantifikované prietokovou cytometriou (DxFlex, Beckman & Coulter).

Bakteriálna kultúra

Bakteriálna kultúra *S. aureus* (NCTC 8530) bola kultivovaná v LB médiu počas noci pri 37 °C. Suspenzia bola použitá po dosiahnutí optickej hustoty OD₆₀₀ = 1,0 (približne 7,8 × 10⁸ CFU/ml). Bunky boli následne centrifugované (5 000 × g, 5 min) a resuspendované v médiu RPMI + 10% FBS.

Live cell zobrazovanie tvorby NETs

Na sledovanie tvorby NETs boli neutrofilý (2 × 10⁴/jamka) značené Hoechst 33342 (1,25 µg/ml) a SYTOX Green (200 nM, Invitrogen). Po predinkubácii s FPR1 ligandami (500 nM FPRA14, 10 µM cyklosporín H) boli pridané mitochondrie (1×10⁷ častíc) (MITO) a snímané prístrojom Cytation 7 (BioTek) počas troch hodín v intervale 20 minút.

Chemotaxia neutrofilov

Neutrofilý boli predinkubované s 500 nM FPRA14 a MITO (1×10⁷ častíc). Následne sa do hornej komory 96-jamkovej membránovej platne Multiscreen® (Merck) napipetovalo 75 µl bunkovej suspenzie v koncentrácii 0,7 × 10⁶ buniek/ml. Do spodnej komory sa pridalo 150 µl suspenzie *S. aureus* (1×10⁷ častíc). Po 60-minútovej inkubácii pri 37 °C sa migrácia neutrofilov vyhodnotila stanovením počtu buniek v spodnej komore pomocou prietokovej cytometrie.

Animálny model sterilného poranenia s následnou indukciou pneumónie

Imobilizovaným myšiam bol intravenózne (i.v.) podaný agonista FPR1 FPRA14 (16,18 µg/kg) jednu hodinu pred intraperitoneálnym (i.p.) podaním 100 µl suspenzie izolovaných MITO (približne 4 × 10⁸ častíc). Po troch hodinách bolo v intraperitoneálnej anestézii (kombinácia 50

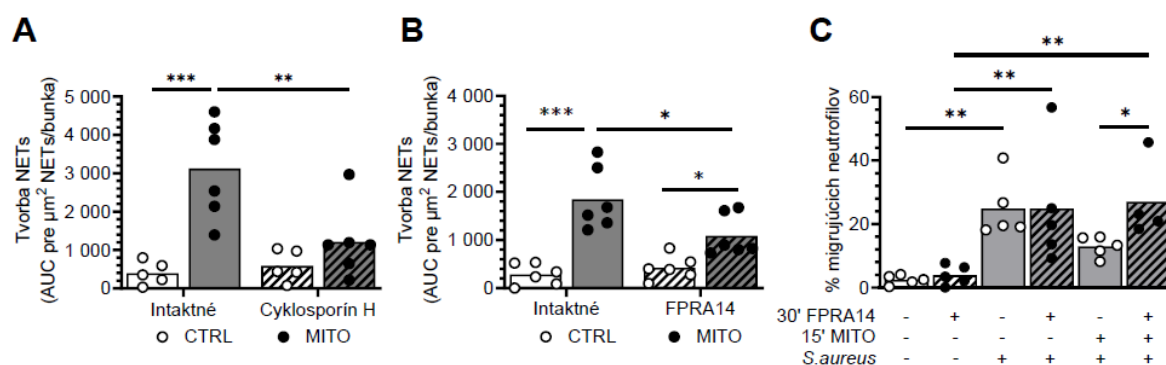
mg/kg ketamínu a 5 mg/kg xylazínu) vykonané intratracheálne podanie 50 μ l bakteriálnej suspenzie. Po 19 hodinách boli myši v inhalačnej anestézii usmrtené exsanguináciou z retroorbitálneho plexu s následnou cervikálnou dislokáciou. Bronchoalveolárna laváž (1 ml) a peritoneálna laváž (2 ml) boli vykonané výplachom fosfátovým tlmivým roztokom (PBS). Ľavé pľúcne krídlo bolo homogenizované na 10 % (w/v) homogenát a vysiate na LB médium na stanovenie počtu baktérií (CFU/mg tkaniva). Celkový počet neutrofilov v lavážach bol stanovený pomocou prietokovej cytometrie, pričom bunky boli identifikované na základe pozitivity markerov Ly-6G a CD11b (anti-mouse Ly-6G Alexa Fluor® 647, 127610, BioLegend; anti-mouse CD11b BV605, 101257, BioLegend). NETotické neutrofilové boli identifikované na základe ko-pozitivity pre extracelulárny citrulinovaný histón H3 (anti-histone H3; ab219407, Abcam) a DNA (50 nM Sytox Green).

Štatistická analýza

Dáta boli spracované v GraphPad Prism v10.0 a prezentované ako individuálne hodnoty. Na porovnanie skupín sa použil Kruskal-Wallisov test s Dunnovým post-hoc testom alebo dvojfaktorová ANOVA so Šidákovým testom podľa charakteru dát.

Výsledky

Formylované peptidy sú neutrofilmi rozpoznávané prostredníctvom receptora FPR1. Otestovali sme neutrofilovú tvorbu NETs indukovanú izolovanými MITO pri zablokovaní FPR1 receptora. Po 30-minútovej predinkubácii neutrofilov so selektívnym antagonistom receptora FPR1, cyklosporínom H, sme pozorovali výrazné zníženie tvorby NET indukovanej MITO (3 121 AU vs. 1 216 AU; $p < 0,01$) (Obr. 1A).

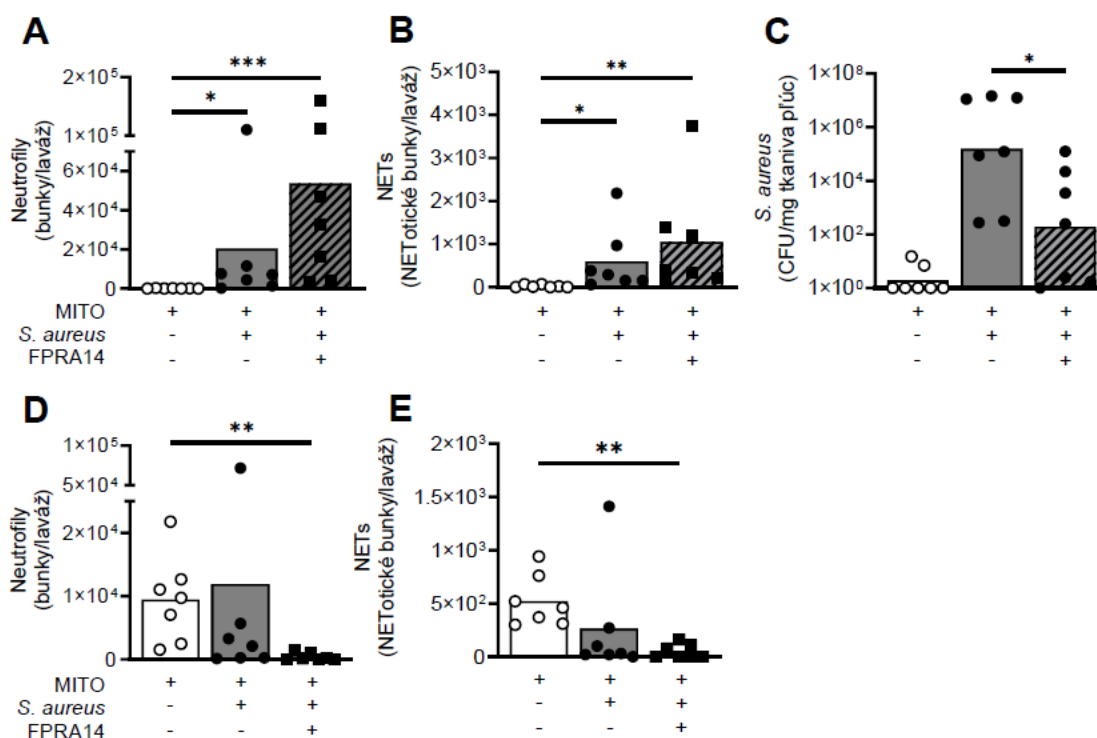


Obr. 1 Inhibícia a saturácia FPR1 znižuje tvorbu NETs a migrácie neutrofilov voči mitochondriám

(A) Neutrofilové boli predinkubované s cyklosporínom H alebo (B) FPR14 počas 30 min pred ich vystavením mitochondriám (MITO). Absolútna tvorba NETs (AUC pre μ m²/bunka). (C) Chemotaktická aktivita neutrofilov po 30-minútovej predinkubácii s FPR14 s následným 15-minútovým pôsobením MITO pred samotným testom chemotaxie k *S. aureus*. Dáta sú zobrazené ako individuálne hodnoty. ** $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; dvojfaktorová ANOVA s Šidákovým testom pre viacnásobné porovnávanie.

Keďže desenzitizácia buniek je často spojená so saturáciou receptorov a následnou neschopnosťou reagovať na ďalšie stimuly, testovali sme, či má na tvorbu NET vplyv samotná predaktivácia receptora FPR1. Pozorovali sme, že neutrofilové predinkubované s agonistom FPR1, FPRA14, po následnej stimulácii MITO mali zníženú tvorbu NET (1 850 AU vs. 1 089 AU; $p < 0,05$). Samotný FPRA14 tvorbu NET neindukoval (Obr. 1B).

Otestovali sme efekt FPRA14 na migračnú schopnosť neutrofilov, keďže receptor FPR1 hrá kľúčovú úlohu v indukcii chemotaxie. Predinkubácia neutrofilov s FPRA14 nezmenila migračnú schopnosť voči samotným baktériám *S. aureus* (24,88% vs. 24,86%, $p > 0,05$). Otestovali sme aj migračnú schopnosť neutrofilov, ktoré boli vystavené MITO 15 minút pred migráciou voči *S. aureus*. Neutrofilové predinkubované s MITO vykazovali zníženú migráciu k *S. aureus* (24,88% vs. 13%). Avšak predinkubáciou neutrofilov s 500 nM FPRA14 bola migračná schopnosť voči *S. aureus* po stimulácii MITO obnovená (13% vs. 27,05%) (Obr. 1C).



Obr. 2. Profylaktické podanie FPRA14 znižuje imunitnú odpoveď neutrofilov voči mitochondriami (MITO) indukovanému sterilnému zápalu a zlepšuje antimikrobiálnu aktivitu pri sekundárnej pneumonii.

(A) Celkový počet neutrofilov v bronchoalveolárnej laváži. (B) Počet NETotických neutrofilov v bronchoalveolárnej laváži. (C) Bakteriálna nálož v homogenáte pľúc vyjadrená ako CFU/mg tkaniva. (D) Celkový počet neutrofilov v bronchoalveolárnej laváži. (E) Počet NETotických neutrofilov v peritoneálnej laváži. Dáta sú zobrazené ako individuálne hodnoty. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Dáta sú zobrazené ako individuálne hodnoty. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Kruskalov-Wallisov test s Dunnovým post-hoc testom.

Účinok FPRA14 sme testovali aj na zvieracom modeli sterilného poranenia s následnou indukciou pneumónie. V pľúcach infikovaných myší sme zaznamenali zvýšený počet neutrofilov, pričom aplikácia FPRA14 tento počet ešte signifikantne zvýšila (CTRL: $1,03 \times 10^2$ vs. $2,04 \times 10^4$ vs. $5,35 \times 10^4$ buniek/laváž, $p < 0,05$) (Obr. 2A). Podobne stúpol aj počet NETotických neutrofilov v pľúcach po podaní FPRA14 (CTRL: $2,4 \times 10^2$ vs. $5,97 \times 10^3$ vs. $1,05 \times 10^4$, $p < 0,05$) (Obr. 2B). Aplikácia FPRA14 zároveň viedla k výraznému zlepšeniu bakteriálneho klírensu v pľúcnom tkanive ($1,53 \times 10^5$ vs. $1,9 \times 10^2$ CFU/mg, $p < 0,05$) (Obr. 2C).

Naopak, v peritoneálnej laváži podanie FPRA14 redukovalo počet migrujúcich ($9,47 \times 10^3$ vs. $4,07 \times 10^2$ buniek/laváž, $p < 0,01$) aj NETotických neutrofilov ($523 \rightarrow 51$ buniek/laváž; $p < 0,01$) v peritoneálnej dutine (Obr. 2D, E).

Diskusia

Mitochondrie resp. mtDAMPs sú vyplavované pri poškodení tkaniva a iniciujú zápalovú odpoveď spojenú s migráciou neutrofilov a tvorbou NETs. V *in vitro* časti našej štúdie sme objasnili mechanizmus rozpoznávania mitochondriálnych formylovaných peptidov prostredníctvom receptora FPR1, ktorý vedie k aktivácii neutrofilov a následnej produkcii NETs. Túto neutrofilovú odpoveď sme dokázali zredukovať nielen použitím špecifického antagonistu, ale aj agonistu receptora FPR1, pričom samotná aktivácia FPR1 nevedla k indukcii tvorby NETs [12]. Na základe týchto zistení sa domnievame, že stratégia cielenej saturácie a následnej desenzitizácie receptora FPR1 môže slúžiť na efektívne potlačenie nadmernej imunitnej odpovede vyvolanej mtDAMPs.

Kľúčovým predpokladom úspešného boja proti bakteriálnej infekcii je schopnosť neutrofilov migrovať do miesta zápalu procesom chemotaxie. mtDAMPs, ako endogénne chemoatraktanty, síce aktivujú neutrofilov, avšak tie následne nedokážu adekvátne reagovať na sekundárny stimul [9, 13]. Z našich výsledkov vyplýva, že predaktiváciou FPR1 je možné znížiť migráciu voči mitochondriám. Navyše, predinkubácia s agonistom FPR1 úspešne zvrátila imunosupresívny stav neutrofilov vystavených mtDAMPs a zachovala ich chemotaktickú aktivitu voči baktériám.

Pri testovaní klinickej relevancie sme vytvorili model mitochondriami indukovaného zápalu, napodobňujúci chirurgický zákrok, s následnou indukciou sekundárnej pneumónie intratracheálnym podaním *S. aureus*. V tomto modeli podanie látky FPRA14 preukázateľne zlepšilo bakteriálny klírens v pľúcach infikovaných myší a zvýšilo migráciu neutrofilov do miesta infekcie aj napriek prítomnosti primárneho sterilného zápalu. Naopak, profylaktické podanie FPRA14 viedlo k redukcii celkového počtu neutrofilov v peritoneálnej dutine, kde boli podané mitochondrie a k potlačeniu tvorby NETs [10, 13].

Tieto výsledky naznačujú, že profylaktické podanie agonistu FPR1 pred očakávaným invazívnym zákrokom môže posilniť odolnosť a imunitnú odpoveď pacienta voči potenciálnej sekundárnej infekcii počas hospitalizácie. Tento prístup predstavuje inovatívnu terapeutickú intervenciu, ktorá nahrádza konvenčnú generálnu inhibíciu imunitného systému cieľenou moduláciou špecifickej signalizačnej dráhy.

Podporené čiastočne grantom UK/1222/2025 a APVV-21-0378

Emil Bečka, Letícia Hudecová, Karolína Bíla, Patrik Bertovič, Michal Pastorek: Modulácia receptoru pre formylované peptidy tlmí neutrofilovú chemotaxiu a tvorbu neutrofilových extracelulárnych pascí v sterilnom zápale, pričom zachováva antimikrobiálnu aktivitu pri sekundárnej infekcii. Zborník študentských vedeckých prác 2026. Univerzita Komenského v Bratislave, 2026.

1 Referencie

1. Zhao C, Itagaki K, Gupta A, Odom S, Sandler N, Hauser CJ. Mitochondrial damage-associated molecular patterns released by abdominal trauma suppress pulmonary immune responses. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014;76(5):1222-7. doi: 10.1097/TA.0000000000000220.
2. Sandler N, Kaczmarek E, Itagaki K, Zheng Y, Otterbein L, Khabbaz K, et al. Mitochondrial DAMPs Are Released During Cardiopulmonary Bypass Surgery and Are Associated With Postoperative Atrial Fibrillation. *Heart Lung Circ.* 2018;27(1):122-9. doi: 10.1016/j.hlc.2017.02.014.
3. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.005015.
4. Martijn J, Vosseberg J, Guy L, Offre P, Ettema TJG. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature.* 2018;557(7703):101-5. doi: 10.1038/s41586-018-0059-5.
5. Renvoise A, Merhej V, Georgiades K, Raoult D. Intracellular Rickettsiales: Insights into manipulators of eukaryotic cells. *Trends Mol Med.* 2011;17(10):573-83. doi: 10.1016/j.molmed.2011.05.009.
6. Hauser CJ, Sursal T, Rodriguez EK, Appleton PT, Zhang Q, Itagaki K. Mitochondrial damage associated molecular patterns from femoral reamings activate neutrophils through formyl peptide receptors and P44/42 MAP kinase. *J Orthop Trauma.* 2010;24(9):534-8. doi: 10.1097/BOT.0b013e3181ec4991.
7. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385.
8. Becka E, Hudecova L, Pastorek M. Mitochondria as Inducers of Neutrophil Extracellular Traps. *Inflammation.* 2026;49(1):67. doi: 10.1007/s10753-025-02432-z.
9. Kaczmarek E, Hauser CJ, Kwon WY, Rica I, Chen L, Sandler N, et al. A subset of five human mitochondrial formyl peptides mimics bacterial peptides and functionally deactivates human neutrophils. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;85(5):936-43. doi: 10.1097/TA.0000000000001971.
10. Kwon WY, Suh GJ, Jung YS, Park SM, Oh S, Kim SH, et al. Circulating mitochondrial N-formyl peptides contribute to secondary nosocomial infection in patients with septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(17). doi: 10.1073/pnas.2018538118.
11. Janko J, Becka E, Kmetova K, Hudecova L, Konecna B, Celec P, et al. Neutrophil extracellular traps formation and clearance is enhanced in fever and attenuated in hypothermia. *Front Immunol.* 2023;14:1257422. doi: 10.3389/fimmu.2023.1257422.
12. Itagaki K, Kaczmarek E, Kwon WY, Chen L, Vlkova B, Zhang Q, et al. Formyl Peptide Receptor-1 Blockade Prevents Receptor Regulation by Mitochondrial Danger-Associated Molecular Patterns and Preserves Neutrophil Function After Trauma. *Crit Care Med.* 2020;48(2):e123-e32. doi: 10.1097/CCM.0000000000004094.
13. Hazeldine J, Dinsdale RJ, Harrison P, Lord JM. Traumatic Injury and Exposure to Mitochondrial-Derived Damage Associated Molecular Patterns Suppresses Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front Immunol.* 2019;10:685. doi: 10.3389/fimmu.2019.00685.

16. Jaliliho syndróm: longitudinálne sledovanie atypického fenotypu a identifikácia nového variantu v *CNNM4* géne

MUDr. Klára Hodálová
(oftalmológia)

Spoluautori: Beáta Bušányová¹, Gabriela Hrčková², Daniel Havalda³, Filip Kecer¹, Veronika Popová¹, Dana Tomčíková¹, Anton Gerinec¹

Školiteľ: prof. MUDr. Anton Gerinec, CSc., FEBO

¹Klinika detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH, Limbová 1, Bratislava - Nové Mesto

²Ambulancia klinickej genetiky, Detská klinika LF UK a NÚDCH, Limbová 1, Bratislava - Nové Mesto

³Oftalmologické pracovisko, Nemocnica Bory, Bratislava

Úvod

Jaliliho syndróm (JS) predstavuje zriedkavé autozomálne recesívne ochorenie charakterizované kombináciou progresívnej dystrofie čapíkov a tyčínok (cone-rod dystrophy, CRD) a amelogenesis imperfecta (AI) [1]. Od jeho prvého popisu v roku 1988 došlo k postupnému objasneniu genetického podkladu, pričom kľúčovú úlohu zohráva gén *CNNM4*, ktorý kóduje transportér horčíka dôležitý pre iónovú homeostázu v sietnici a ameloblastoch [2,3]. Patogénne varianty vedú k poruche funkcie fotoreceptorov a vývoja zubnej skloviny [3,4].

Klinicky sa ochorenie manifestuje už v detstve fotofóbiou, poruchou farebného videnia a progresívnym poklesom centrálnej zrakovéj ostrosti [1,4,5]. Zobrazovacie metódy, ako optická koherentná tomografia (OCT) a autofluorescencia očného pozadia (FAF), odhaľujú postupnú degeneráciu vonkajších vrstiev sietnice [6,7]. Dentálny fenotyp je typicky charakterizovaný hypoplastickou formou AI bez systémového postihnutia [1,4,5].

Cieľom práce je prezentovať longitudinálne sledovanie pacienta, chlapca zo Slovenska, s JS s dôrazom na multimodálnu charakteristiku fenotypu a identifikáciu nového pravdepodobne patogénneho variantu v géne *CNNM4*.

Materiál a metódy

U pacienta bola realizovaná detailná anamnéza vrátane rodinnej záťaže a komplexné klinické vyšetrenie.

Oftalmologické vyšetrenia zahŕňali: najlepšie korigovanú centrálnu zrakovú ostrosť (BCVA), autorefraktometriu, vyšetrenie farebného videnia (Ishihara, Lanthony D-15), biomikroskopiou,

vyšetrenie očného pozadia, fundus fotografie, FAF, OCT, statickú perimetriu a full-field elektroretinogram (ffERG) podľa štandardov International Society for Clinical Electrophysiology of Vision.

Dentálne vyšetrenie pozostávalo z klinického vyšetrenia a realizácie ortopantomogramu.

Systémové vyšetrenie v rámci diferenciálnej diagnostiky pokrývalo základné biochemické parametre (sérový vápnik, fosfor, horčík, vitamín D, alkalická fosfatáza a parathormón), skeletálny a nefrologický skrining.

Genetická analýza bola realizovaná metódou sekvenovania novej generácie prostredníctvom sekvenátora Illumina NextSeq 550 s hybridizačným prístupom s využitím kitu Illumina Nextera Flex for Enrichment a panelu TruSight One Expanded, pričom následne bola vykonaná cieľená bioinformatická analýza vybraných génov asociovaných s dedičnými dystrofiami sietnice vrátane syndrómových. Sekvenačné dáta boli spracované pomocou softvéru bcl2fastq v2.20 (Illumina) a SEQNEXT v5.0.0 (JSI Medical Systems), s použitím referenčného genómu Homo sapiens (GRCh37/hg19) a databázy RefSeq. Interpretácia variantov bola vykonaná podľa odporúčaní American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.

Výsledky

Klinický priebeh z oftalmologického hľadiska

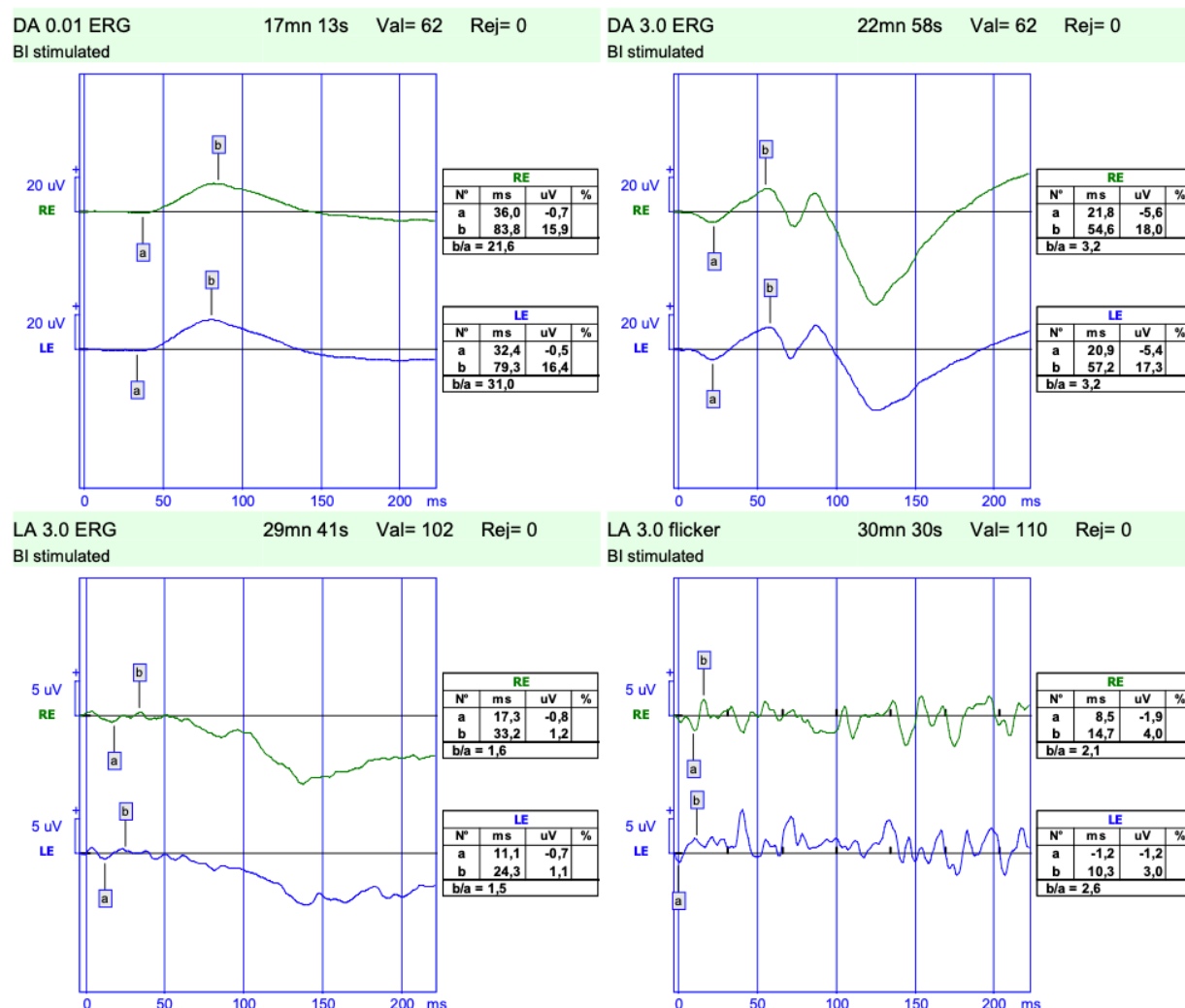
Prvé príznaky sa objavili v dojčenskom veku vo forme výraznej fotofóbie. V predškolskom veku bola diagnostikovaná vysoká hypermetropia s astigmatizmom (+6.00 Dsph +1.50 Dcyl ax 100 na pravom oku; +7.00 Dsph +1.50 Dcyl ax 70 na ľavom oku) a esotropiou. Postupne sa rozvinuli úplná porucha farebného videnia a nystagmus.

BCVA sa znížila z 5/30 Snellen (0.17 decimal, 0.78 logMAR) v 6 rokoch na 5/40 Snellen (0.12 decimal, 0.90 logMAR) v 17 rokoch na obidvoch očiach, pričom pokles bol relatívne mierny vzhľadom na pokročilé morfológické zmeny.

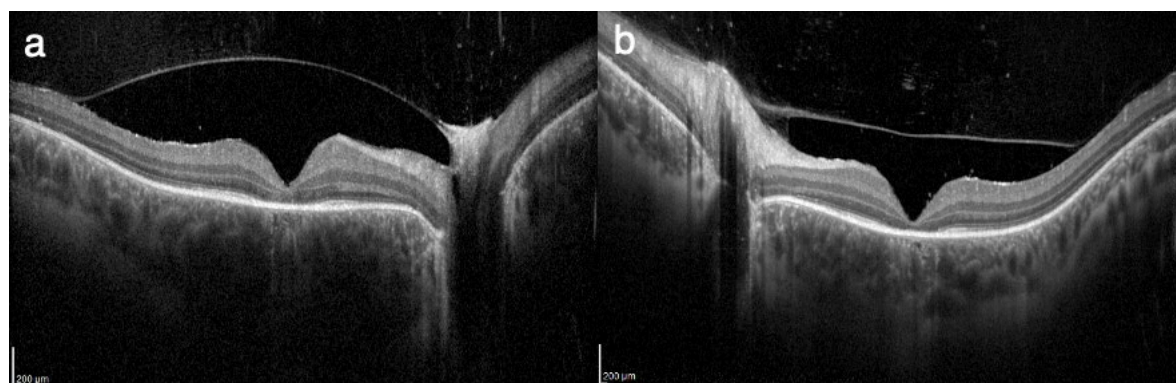
Funkčné a zobrazovacie oftalmologické nálezy

ffERG preukázal spočiatku normálne odpovede (v 5 rokoch), následne selektívne postihnutie čapíkov (okolo 11 rokov), progresiu do generalizovanej dysfunkcie sietnice (od 12 rokov) obidvoch očí (Obr. 1). OCT zobrazila bilaterálne progresívne stenčovanie centrálnej hrúbky makuly zapríčinené stratou elipsoidnej zóny a stenčovaním vonkajších vrstiev sietnice, ako aj odlúčenie zadnej sklovцovej membrány (Obr. 2). Prostredníctvom FAF bol demonštrovaný typický nález hypoautofluorescenčného centra makuly s hyperautofluorescenčnými prstencami spolu so škvŕnitou hypoautofluorescenciou v strednej periférii ako aj hyperautofluorescenčné ložisko v terči zrkovitého nervu v každom oku (Obr. 3).

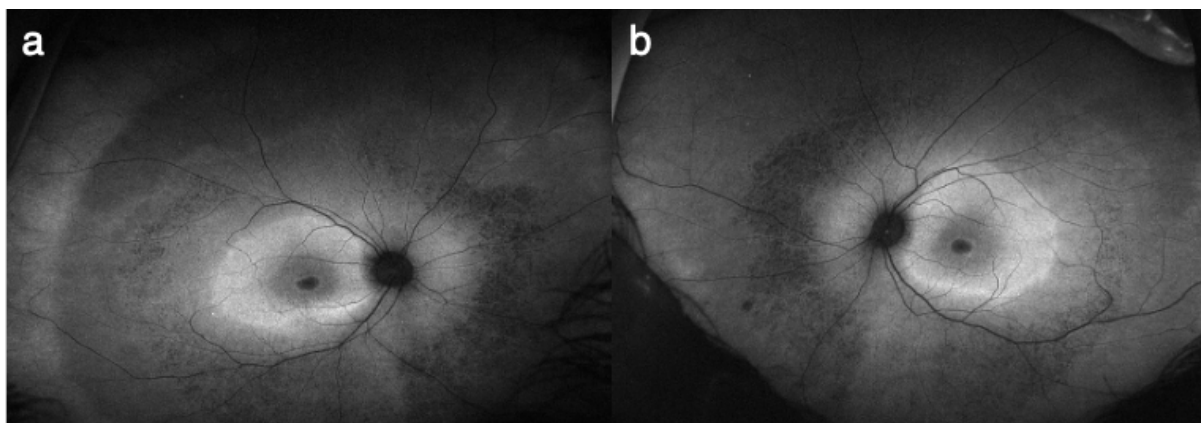
"Klára Hodálová, Beáta Bušányová, Gabriela Hrkčová, Daniel Havalda, Filip Kecer, Veronika Popová, Dana Tomčíková, Anton Gerinec: Jaliliho syndróm: longitudinálne sledovanie atypického fenotypu a identifikácia nového variantu v CNM4 gène. Zborník študentských vedeckých prác 2026. Univerzita Komenského v Bratislave, 2026."



Obr. 1 Full-field elektroretinogram zobrazujúci značné zníženie amplitúd fotopických (LA) aj skotopických (DA) odpovedí. (Zdroj: archív Kliniky detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH)



Obr. 2 Optická koherentná tomografia zobrazujúca prierez sítnicou cez oblasť makuly, viditeľné stenčenie vonkajších vrstiev sítnice s narušením elipsoidnej zóny centrálne a v smere na perifériu, ako aj odlúčenie zadnej sklovцovej membrány (a – pravé oko, b – ľavé oko) (Zdroj: archív Kliniky detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH)



Obr. 3 Fundus autofluorescencia demonštrujúca centrálnu hypoautofluorescenciu s okolitými hyperautofluorescenčnými prstencami ako aj škvrnitú hypoautofluorescenciu v strednej periférii. V centre zrakových nervov je zobrazené jemné bodovité hyperautofluorescenčné ložisko (a – pravé oko, b – ľavé oko) (Zdroj: archív Kliniky detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH)

Dentálne nálezy

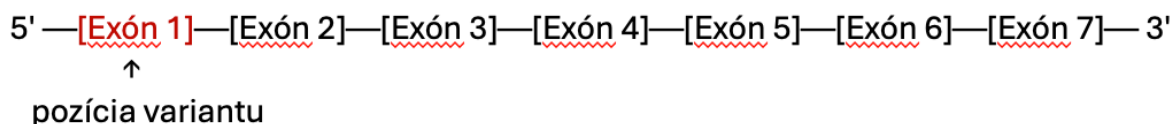
Vo veku 11 rokov bola diagnostikovaná hypoplastická AI. V ďalšom priebehu došlo k progresívnej degenerácii permanentnej dentície vrátane straty predného horného rezáka.

Systémové nálezy

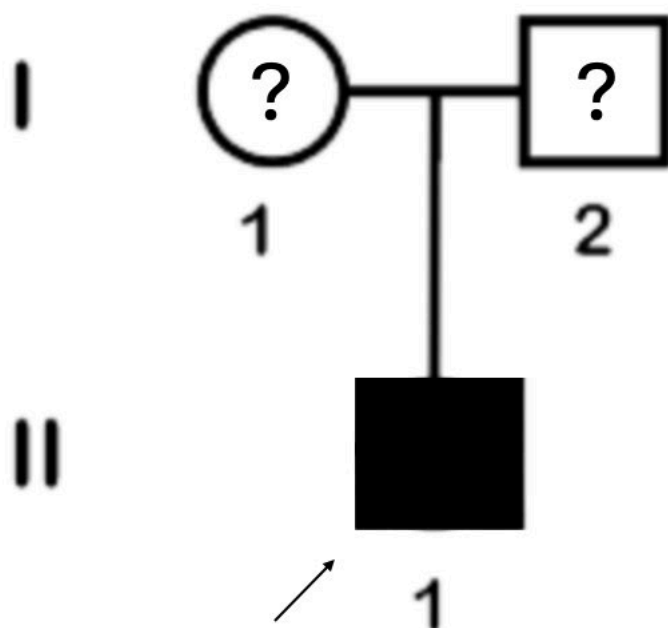
Skríningové vyšetrenie v rámci diferenciálnej diagnostiky a pri pátraní po možných pridružených systémových abnormalitách bolo bez pozoruhodností vrátane základných laboratórnych parametrov.

Genetický nálež

Identifikovaný bol homozygotný frameshift variant c.788_814delinsCCTCCTCCACCAT (p.Asn263ThrfsTer54) v exóne 1 génu *CNNM4* (Obr. 4), aktuálne klasifikovaný ako pravdepodobne patogénny. Jedná sa o doposiaľ nepublikovaný variant v tomto géne. Segregáciu v rodine nebolo možné vykonať, nakoľko rodičia a príbuzní pacienta odmietli genetické vyšetrenie (Obr. 5).



Obr. 4 Schematické znázornenie pozície variantu c.788_814delinsCCTCCTCCACCAT (p.Asn263ThrfsTer54) v exóne 1 génu CNNM4 (pozostávajúceho zo 7 exónov) (Zdroj: vlastné spracovanie)



Obr. 5 Grafické znázornenie rodokmeňa probanda označeného šípkou (II./1). I. generácia, 1 – matka, 2 – otec, neboli doposiaľ geneticky testovaní. (Zdroj: vlastné spracovanie)

Diskusia

Longitudinálne sledovanie poukazuje na postupnú transformáciu diagnózy z izolovanej dysfunkcie čapíkov na generalizovanú CRD. Navyše, pri definitívnej diagnostike AI bola izolovaná dedičná dystrofia sietnice prehodnotená na syndrómovú, ktorou sa ukázalo, že aj v skutočnosti bola. Molekulárno-genetické testovanie následne potvrdilo klinické nálezy a doplnilo konkrétnu genetickú diagnózu pacienta. Multidisciplinárny prístup k pacientom s dedičnými dystrofiami sietnice je pre správnu diagnostiku a následný manažment ochorenia kľúčový.

Diskrepancia medzi slabo progresívnym znižovaním BCVA a výraznou progresiou štrukturálnych ako aj elektrofyziologických zmien sa javí byť celkom častý fenomén pri centrálnych dedičných dystrofiách sietnice [8,9].

Včasné špecifické štrukturálne OCT zmeny predchádzali funkčným abnormalitám, čo zdôrazňuje význam multimodálneho prístupu predovšetkým v počiatočných štádiách ochorenia.

OCT okrem iného zobrazilo aj bilaterálne zmeny na vitreoretinálnom rozhraní v zmysle odlúčenia zadnej sklovцovej membrány, čo je pomerne raritný nález u detského pacienta a jeho spojitosť s JS zatiaľ zostáva nejasná.

U prezentovaného pacienta bola zistená vysoká hyperopia ako opakovane zmieňovaný, avšak pomerne podhodnotený, fenotypový refrakčný nález u pacientov s JS [10].

Ďalším atypickým nálezom sú možné drúzy terča zrakového nervu, ktoré zatiaľ neboli popísané u pacientov s JS a so syndrómom nie sú jednoznačne asociované.

Identifikovaný variant v *CNNM4* géne nebol doposiaľ publikovaný, čo podporuje jeho význam pri rozširovaní genetického spektra tohto raritného syndrómového ochorenia.

"Klára Hodálová, Beáta Bušányová, Gabriela Hrčková, Daniel Havalda, Filip Kecer, Veronika Popová, Dana Tomčíková, Anton Gerinec: Jaliliho syndróm: longitudinálne sledovanie atypického fenotypu a identifikácia nového variantu v CNNM4 géne. Zborník študentských vedeckých prác 2026. Univerzita Komenského v Bratislave, 2026."

Podporené čiastočne grantom Lekárskej fakulty UK č.1024/2024

Referencie

1. Jalili IK, Smith NJ. A progressive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta: a new syndrome. *J Med Genet.* 1988;25(11):738-740.
2. Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, et al. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2009;84(2):266-273.
3. Polok B, Escher P, Ambresin A, et al. Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2009;84(2):259-265.
4. Jalili IK. Cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta (Jalili syndrome): phenotypes and environs. *Eye (Lond).* 2010;24(11):1659-1668.
5. Michaelides M, Bloch-Zupan A, Holder GE, Hunt DM, Moore AT. An autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with amelogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2004;41(6):468-473.
6. Hirji N, Aboshiha J, Georgiou M, et al. Jalili syndrome: cross-sectional and longitudinal features of seven patients with cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Ophthalmol.* 2018;188:123-130.
7. Prasov L, et al. Expanding the genotypic spectrum of Jalili syndrome. *Am J Med Genet A.* 2020;182(3):548-555.
8. Fujinami K, Lois N, Davidson AE, et al. A longitudinal study of Stargardt disease: clinical and electrophysiologic assessment, progression, and genotype correlations. *Am J Ophthalmol.* 2013;155(6):1075-1088.e13.
9. Strauss RW, Ho A, Muñoz B, et al. The Natural History of the Progression of Atrophy Secondary to Stargardt Disease (ProgStar) Studies: Design and Baseline Characteristics: ProgStar Report No. 1. *Ophthalmology.* 2016;123(4):817-828.
10. Tawfik CA, Aly HS, Kabeel M, Yousri I, Mohamed SA. A novel mutation in CNNM4 is associated with a case of Jalili syndrome in Egypt. *Doc Ophthalmol.* 2025;150(3):189-196.

17. Štúdium antibakteriálnych vlastností enzýmov DNáza I a DNáza1L3

Mgr. Filip Baran

(Normálna a patologický fyziológia)

Spoluautori: Patrik Hains¹, Emma Skybová¹, Ľubica Janovičová¹, Peter Celec^{1,2}

Školiteľ: Mgr. Ľubica Janovičová, PhD¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, ²Ústav patologickej fyziológie LF UK

Úvod:

Bakteriálne infekcie sú v súčasnosti primárnym pôvodcom sepsy na svete [1]. Sepsa predstavuje veľmi závažný, život ohrozujúci stav orgánovej dysfunkcie, ktorý vzniká práve v dôsledku nadmernej a nekontrolovanej imunitnej odpovede na prebiehajúcu infekciu [2]. Imunitný systém je stimulovaný nielen komponentmi bakteriálnych buniek, ako napr. lipopolysacharidmi, ale aj endogénnymi, s poškodením asociovanými molekulárnymi vzorcami (DAMPs) [3]. Potentný DAMP predstavuje aj extracelulárna DNA (ecDNA) jadrového alebo mitochondriálneho pôvodu uvoľňovaná z aktivovaných imunitných, alebo poškodených hostiteľských buniek. Vo zvýšených koncentráciách má ecDNA imunogénny charakter, a jej rozpoznanie receptormi vrodeného imunitného systému vedie k umocneniu celkového prozápalového stavu v organizme [4]. U septických pacientov prijatých na jednotky intenzívnej starostlivosti boli zvýšené hodnoty plazmatickej ecDNA asociované so zhoršenou prognózou a priebehom sepsy [5]. Výsledky animálnych septických *in vivo* experimentov poukazujú na to, že použitie deoxyribonukleáz (DNáz), by v tomto kontexte mohlo predstavovať formu doplnkovej liečby sepsy. DNáza I a DNáza 1L3, DNázy najviac aktívne v krvi, sú svojou hydrolytickou aktivitou schopné štiepiť a odstraňovať imunogénne fragmenty ecDNA [6]. Podávanie DNázy I septickým myšiam viedlo k zníženiu koncentrácie cirkulujúcej ecDNA a následnému utlmeniu prozápalového stavu, zníženému orgánovému poškodeniu a zvýšenej miere prežitia jedincov, u ktorých bola bakteriálna sepsa vyvolaná [7-9]. V kontexte systémových bakteriálnych infekcií je DNáza I taktiež schopná degradovať ecDNA prítomnú v bakteriálnych biofilmoch, a exponovať tak nechránené baktérie antimikrobiálnym látkam [10]. Prospešnosť podávania DNáz (primárne DNázy I) v priebehu sepsy a systémových bakteriálnych infekcií je na základe spomínaných štúdií primárne pripisovaná štiepeniu imunogénnej ecDNA, či už vo forme fragmentov alebo ako štrukturálneho komponentu bakteriálnych biofilmov. To, či spomínané enzýmy vykazujú aj priame antibakteriálne účinky doposiaľ nebolo dostatočne prebádané. Cieľom predkladanej práce preto bolo sledovať vplyv enzýmov DNázy I a DNázy1L3 na rast baktérií či už v tekutých médiách alebo na pevných agarových pôdach. Primárnou hypotézou bolo, že ani jeden z enzýmov nevyvolá inhibíciu rastu baktérií v tekutých médiách. Naopak, v prípade rastu baktérií na agarových pôdach sme predpokladali, že prostredníctvom DNázovej aktivity a absencie ecDNA ako štrukturálneho komponentu vznikne väčší počet menších bakteriálnych kolónií.

Metodika:

V experimentoch sme pracovali s dvoma modelovými organizmami – Gram-negatívnou baktériou *E. coli* CFT073 (ATCC 700928) a Gram-pozitívnou baktériou *S. aureus* subspecies *aureus* Rosenbach (NCTC 8530), ktoré boli počas rastu v tekutých médiách a na agarových pôdach vystavené rozličným koncentráciám enzýmu DNázy I a DNázy1L3. DNáza I získaná z bovínneho pankreasu a myšacia DNáza1L3 produkovaná prostredníctvom expresného vektora boli rozsuspendované v tekutom LB médiu do finálnych koncentrácií 2.5, 5, 25 a 50 µg/ml (DNáza I), a 0.1, 1, 5, 10, 15 a 20 µg/ml (DNáza1L3). Pripravené roztoky boli obohatené o dvojmocné kationy (CaCl_2 a MgCl_2) v koncentrácií 1 mM/ml a 5 mM/ml a následne prefiltrované cez 20µm filter.

Rast baktérií v tekutých médiách bol zaznamenávaný prostredníctvom rastových kriviek. Nočné bakteriálne kultúry (kultivované v aeróbných podmienkach, pri 37°C za stáleho miešania) boli zriedené v pomere 1:100 čerstvým LB médiom a ich optická denzita (OD_{600}) bola zmeraná. Dvadsať µl zriedenej bakteriálnej kultúry s $\text{OD}_{600} < 0.05$ a 180 µl jednotlivých zásobných roztokov DNázy I alebo DNázy1L3 boli napipetované do 96 jamkovej platničky do finálneho objemu 200 µl. Rast baktérií v takto pripravených suspenziách bol zaznamenávaný prostredníctvom spektrofotometra (*Synergy H1 Hybrid Microplate Reader*). Meranie prebiehalo po dobu 48 hod, počas ktorých boli bakteriálne kultúry kultivované za stáleho miešania pri teplote 37°C, hodnoty OD_{600} boli merané každých 30 minút.

Rast baktérií na pevných agarových pôdach bol pozorovaný prostredníctvom tzv. *drop-plate* metódy. Nočné bakteriálne kultúry boli zriedené rovnakým postupom opísaným vyššie, a následne boli kultivované v aeróbných podmienkach pri 37°C za stáleho miešania, pokiaľ ich OD_{600} nedosiahlo hodnoty v rozmedzí 600-650. Bakteriálne suspenzie boli následne spolu so zásobnými roztokmi DNázy I alebo DNázy1L3 napipetované do 96-jamkovej platničky v pomere 1:10, a následne bolo vykonané 10-násobné sériové riedenie. Desäť µl suspenzie z riedení 10^{-2} až 10^{-8} bolo multikanálovou pipetou v podobe malých kvapiek vysiatych na Petriho misky v kvadruplikátoch, s následnou kultiváciou v statických podmienkach po dobu 24 hodín pri teplote 37°C. Po uplynutí kultivačnej doby boli vyrastené bakteriálne kolónie odfotené a analyzované prostredníctvom softvéru *Fiji-ImageJ*. Sledovaný bol počet bakteriálnych kolónií a ich veľkosť (Feretov priemer) v porovnaní s kontrolnými skupinami bez pridania enzýmov.

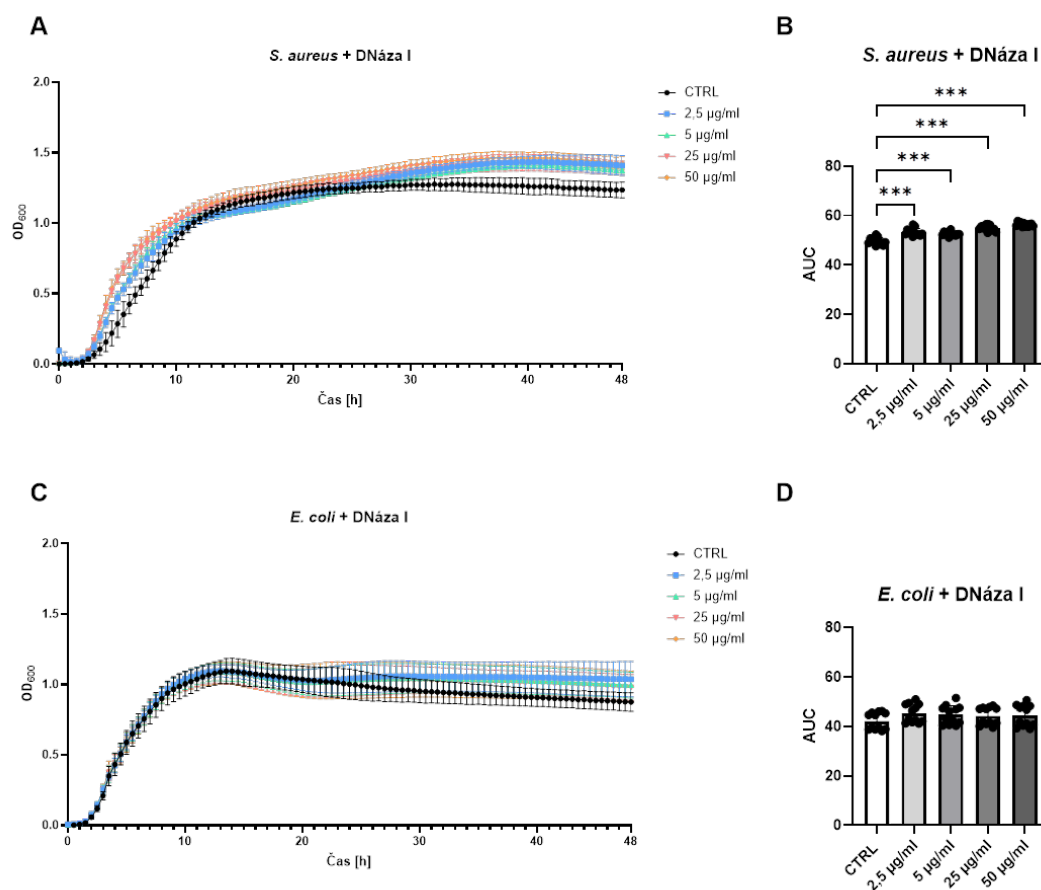
Výsledky experimentov boli analyzované prostredníctvom softvéru GraphPad Prism 11. Na porovnanie rozdielov medzi jednotlivými skupinami boli použité parametrické štatistické testy - jednofaktorová ANOVA analýza, prípadne Welch's ANOVA s Dunnettovým, prípadne Dunnettovým T3 post-hoc testom. Celková bakteriálna biomasa bola v prípade rastových kriviek analyzovaná prostredníctvom plochy pod krivkou (AUC – *area under the curve*). Za signifikantný rozdiel medzi skupinami bola považovaná hodnota $p < 0.05$.

Výsledky:

Vplyv enzýmov DNáza I a DNáza1L3 na dynamiku bakteriálneho rastu v tekutom médiu

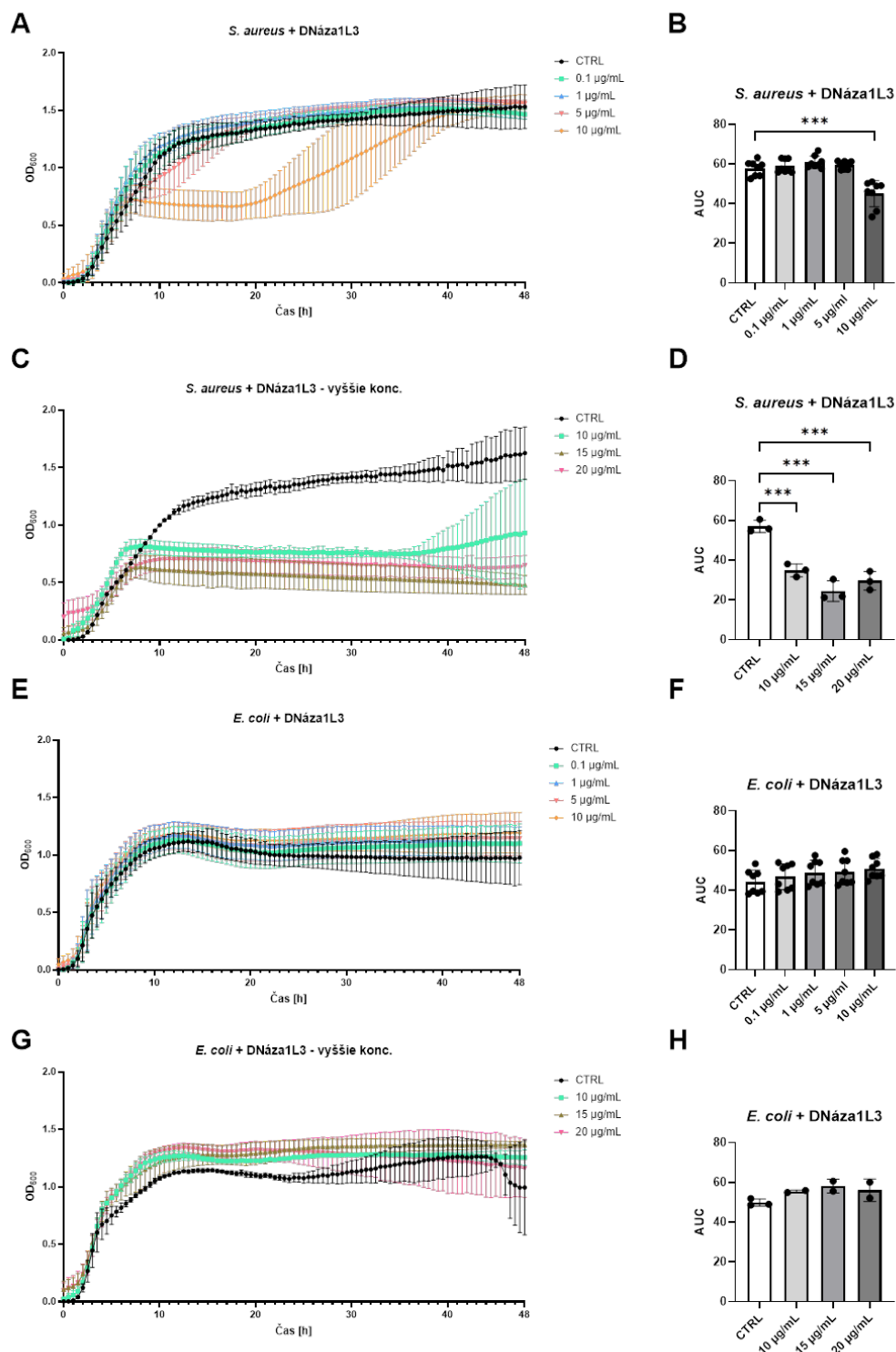
DNáza I nemala negatívny vplyv na bakteriálny rast ako v prípade *S. aureus* tak v prípade *E. coli*, pričom v priebehu experimentu nevykazoval tento enzým žiadne bakteriostatické či baktericídne vlastnosti (Obr. 1A a 1C). Rast oboch bakteriálnych druhov mal v prípade kontrolných skupín aj skupín s pridaným enzýmom okrem menších odchýlok rovnakú dynamiku s dobre rozlíšiteľnými fázami – lag, exponenciálnou a stacionárnou fázou rastu. V

- 1 prípade *S. aureus* bola celková bakteriálna biomasa vyššia u skupín so všetkými testovanými
- 2 koncentráciami enzýmu DNáza I v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 1B; $F=56.03$,
- 3 $p<0.001$, post-hoc: CTRL vs DNáza I – $p<0.001$ pre všetky koncentrácie). Tento efekt nebol
- 4 pozorovaný v prípade *E. coli* (Obr. 1D; $F=1.418$, $p=0.25$).



Obrázok 1. Rastové krivky baktérií *S. aureus* (A) a *E. coli* (C) inkubovaných s rozličnými koncentráciami DNázy I, a kontrolných skupín bez enzýmu. Analýza celkovej bakteriálnej biomasy v rámci všetkých fáz rastových kriviek v prípade *S. aureus* (B) a *E. coli* (D). *** $p<0.001$, CTRL – kontrolná skupina, AUC – plocha pod krivkou (area under the curve)

Potentný bakteriostatický efekt vykazovala DNáza1L3 s koncentráciou 10 µg/ml u baktérií *S. aureus*. Exponenciálna fáza rastu sa v prípade tejto skupiny zastavila po 7 hodinách a bola nasledovaná stacionárnou fázou trvajúcou približne 11 hodín, po ktorej sa bakteriálny rast obnovil (Obr. 2A). Rast baktérií v prípade kontrolnej skupiny a skupín s nižšou koncentráciou tohto enzýmu prebiehal bez prerušenia. Celková bakteriálna biomasa bola v tejto skupine nižšia v porovnaní s kontrolnou (Obr. 2B; $F=20.11$, $p<0.001$, post-hoc: CTRL vs 10 µg/ml – $p<0.001$). Rovnaký bakteriostatický efekt bol pozorovaný aj v prípade zvýšenej koncentrácie tohto enzýmu (Obr. 2C), pričom exponenciálna fáza baktérií s prídavkom 10, 15 a 20 µg/ml DNázy1L3 bola skrátená takmer o polovicu. Bakteriostatickým účinkom viedli zvýšené koncentrácie DNázy1L3 k signifikantnému zníženiu celkovej bakteriálnej biomasy v priebehu experimentu (Obr. 2D; $F=35.97$, $p<0.001$, post-hoc: CTRL vs DNáza1L3 – $p<0.001$ pre všetky koncentrácie).

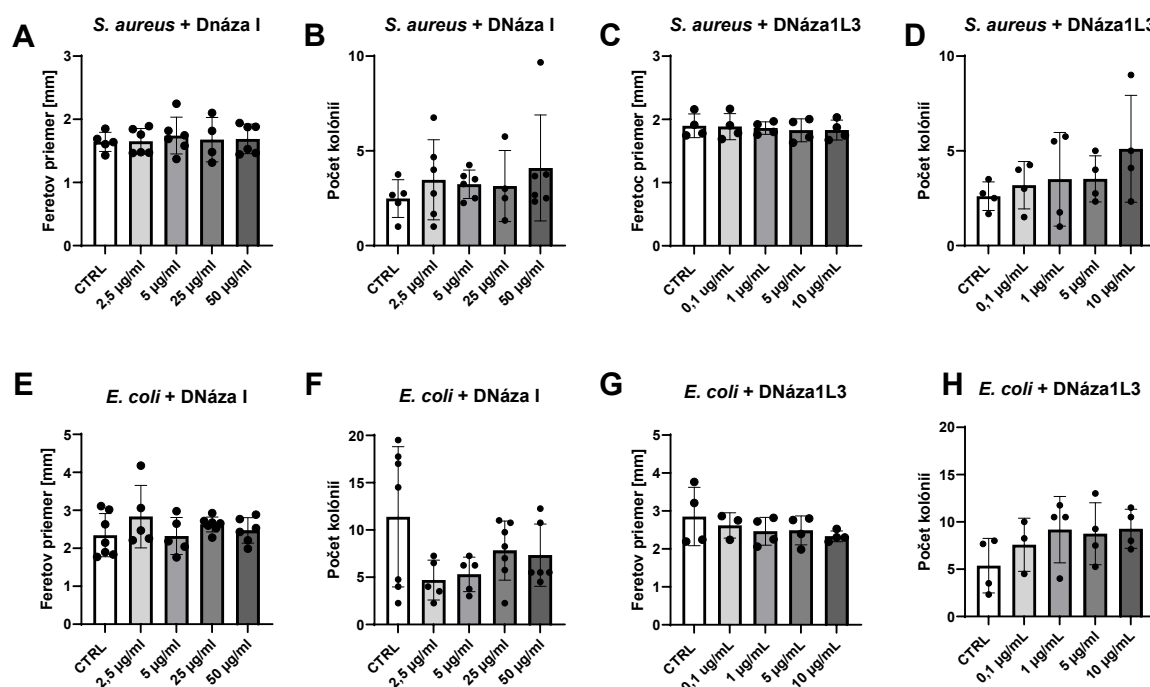


Obrázok 2. Rastové krivky baktérií *S. aureus* (A, C) a *E. coli* (E, G) inkubovaných s nízkymi a vyššími koncentraciami enzýmu DNáza1L3, a kontrolných skupín bez enzýmu. Analýza celkovej bakteriálnej biomasy v rámci všetkých fáz rastových kriviek v prípade *S. aureus* (B, D) a *E. coli* (F, H). *p<0.001, CTRL – kontrolná skupina, AUC – plocha pod krivkou (area under the curve)**

V prípade *E. coli* nedošlo vplyvom DNáza1L3 k inhibícii rastu, a to ani v pri zvýšených koncentráciách tohto enzýmu (Obr. 2E a 2G). Napriek väčším odchýlkam v rastových krivkách nebola počas priebehu experimentu ovplyvnená ani celková bakteriálna biomasa (Obr. 2F; $F=1.418$, $p=0.25$; Obr. 2H; $F=3.190$, $p=0.12$).

Vplyv DNázy I a DNázy1L3 na rast baktérií na agarových pôdach

Rovnako ako v prípade tekutých bakteriálnych kultúr, DNáza I nevykazovala žiadne známky antibakteriálnych vlastností ani v prípade rastu *S. aureus* a *E. coli* na agarových pôdach. Kultivácia v prítomnosti rozličných koncentrácií tohto enzýmu nemala vplyv na veľkosť jednotlivých bakteriálnych kolónií (Obr. 3A; $F=0.1419$, $p=0.96$; Obr. 3E; $F=0.9753$, $p=0.44$) ani na ich počet (Obr. 3B; $F=0.5195$, $p=0.72$; Obr. 3F; $W=2.090$, $p=0.14$).



Obrázok 3. Feretove priemery bakteriálnych kolónií *S. aureus* a *E. coli* inkubovaných s DNázou I (A, E) alebo DNázou 1L3 (C, G), a priemerný počet bakteriálnych kolónií *S. aureus* a *E. coli* po 24-hodinovej inkubácii s rozličnými koncentraciami DNázy I (B, F) alebo DNázy1L3 (D, H). CTRL – kontrolná skupina

Bakteriostatický efekt enzýmu DNáza1L3 nebol v prípade rastu baktérií na agarových pôdach pozorovaný, a to ani v prípade koncentrácie 10 µg/ml. Veľkosť bakteriálnych kolónií zostala v porovnaní s kontrolnou skupinou signifikantne nezmenená u oboch bakteriálnych druhov (Obr. 3C; $F=0.1400$, $p=0.96$; Obr. 3G; $W=0.7511$, $p=0.59$). Rozličné koncentrácie tohto enzýmu nemali vplyv ani na počet vyrastených bakteriálnych kolónií (Obr. 3D; $F=0.9744$, $p=0.420$; Obr. 3H; $F=1.211$, $p=0.35$).

1 Diskusia:

2 V predkladanej práci sme prostredníctvom série *in vitro* experimentov sledovali potenciálne
3 antibakteriálne vlastnosti enzýmov DNázy I a DNázy1L3. V súlade s našou primárnou
4 hypotézou DNáza I neovplyvnila rast baktérií v tekutých médiách, navyše taktiež neovplyvnila
5 veľkosť a ani počet bakteriálnych kolónií vyrastených na pevných agarových pôdach.
6 Prekvapivé výsledky sme však obdržali v prípade enzýmu DNáza1L3, ktorého vyššie
7 koncentrácie signifikantne inhibovali rast baktérií *S. aureus* v tekutých médiách. Avšak
8 podobne ako DNáza I, DNáza1L3 nemala vplyv na rast kolónií na agarových pôdach.

9 Nami obdržané výsledky o tom, že DNáza I nemá priame antibakteriálne vlastnosti, sú v súlade
10 s doposiaľ publikovanými vedeckými prácami. Kultivácia rozličných bakteriálnych druhov (*P.*
11 *aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *K. pneumoniae*) s koncentráciou DNázy I v rozmedzí od 6.25
12 po 200 U/ml neovplyvnila dynamiku rastu baktérií v tekutých médiách, ani neovplyvnila počet
13 kolónií formujúcich jednotiek vyrastených na agarových pôdach. [11, 12] Napriek podstatnej
14 úlohe pri odstraňovaní DNA uvoľnenej do extracelulárneho priestoru (napr. ecDNA prítomná
15 v bakteriálnych biofilmoch), tento enzým s molekulárnou hmotnosťou približne 31kDa
16 nedokáže penetrovať cez intaktné membrány živých baktérií, čím je ich genomická DNA pred
17 účinkom DNáz chránená [13, 14].

18 Experimentmi sme taktiež zistili, že DNáza1L3 má vo zvýšených koncentráciách potentné
19 bakteriostatické vlastnosti v prípade tekutých kultúr baktérií *S. aureus* ale nie v prípade
20 baktérií *E. coli*. DNáza1L3 svojou aktivitou zabezpečuje jednu zo základných vlastností
21 imunitného systému – imunitnú toleranciu k vlastným antigénom, čím zamedzuje vzniku
22 autoimunitných chorôb [15]. Úloha tohto enzýmu v prípade systémových bakteriálnych
23 infekcií je v porovnaní s DNázou I veľmi málo prebádaná. Výsledky nedávnej publikácie
24 poukazujú na to, že v prípade systémových bakteriálnych infekcií je esenciálna synergia oboch
25 enzýmov – ako DNázy I tak DNázy1L3, ktoré spoločnou aktivitou degradujú bakteriálne
26 biofilmy [16]. Iné publikácie zaoberajúce sa potenciálnymi antibakteriálnymi vlastnosťami
27 enzýmu DNáza1L3 v čase písania tohto príspevku neboli k dispozícii. Veľkosť tohto
28 rekombinantného enzýmu je 33.9 kDa, podobne ako DNáza I by preto nemal byť schopný
29 penetrovať špecificky cez stenu Gram-pozitívnych baktérií, keďže k inhibícii rastu v prípade *E.*
30 *coli* nedošlo. Napriek tomu že katalytické jadro enzýmu DNáza I a DNáza1L3 je podobné,
31 DNáza1L3 obsahuje pozitívnu, C-terminálnu viažucu doménu (CTD), ktorá je značne
32 konformačne flexibilná, a zabezpečuje väzbu tohto enzýmu k DNA v komplexoch s proteínmi
33 alebo lipidmi [17]. To, či by práve táto pozitívne nabitá CTD mohla viesť k asociácii medzi
34 DNázou1L3 a negatívne nabitou vrstvou teicholových a lipoteicholových kyselín na povrchu
35 Gram-pozitívnych bakteriálnych buniek je čisto špekulatívne, a v budúcnosti by mohlo byť
36 predmetom ďalšieho výskumu.

37 Jednou z hypotéz, prečo by DNáza1L3 mohla viesť k špecifickej inhibícii rastu baktérií *S. aureus*
38 je prítomnosť Sarkosylu (Lauroylsarkozinátu sodného) v zakúpenom lyofylizáte rekombinantnej
39 DNázy1L3. Sarkosyl je aniónový saponát s antimikrobiálnymi vlastnosťami [18]. Bolo
40 preukázané, že Gram-pozitívne baktérie sú celkovo náchylnejšie na baktericídny efekt
41 aniónových saponátov v porovnaní s Gram-negatívnymi baktériami v dôsledku rozdielnych
42 štruktúr bakteriálnych stien [19, 20]. Sarkosyl v koncentrácií 0.1% bol schopný úplne inhibovať
43 rast Gram-pozitívnej baktérie *E. faecalis*, pričom v prípade Gram-negatívnej *E. coli* je
44 minimálna inhibičná koncentrácia tohto saponátu až 10% [21]. Finálne koncentrácie Sarkosylu
45 v nami pripravených zásobných roztokoch DNázy1L3 v koncentráciách 10, 15, and 20 µg/ml

boli 0.0005%, 0.00075% a 0.001%. To, či by aj takto nízke koncentrácie Sarkosylu mohli v priebehu 48 hodinovej inkubácie viesť k inhibícii rastu baktérií *S. aureus* je však nateraz neznáme.

Na základe výsledkov našich experimentov môžeme konštatovať, že DNáza I nemá priame antibakteriálne vlastnosti, pozitívny účinok v prípade sepsy preto môže byť pripísaný jej schopnosti štiepiť a odstraňovať ecDNA z rozličných zdrojov. V prípade DNázy1L3 by sme v budúcich experimentoch chceli rozšíriť repertoár našich modelových baktérií o viacero Gram-pozitívnych a Gram-negatívnych kmeňov, aby sme zistili, či je bakteriostatický efekt tohto enzýmu závislý na štruktúre bakteriálnej steny. Taktiež by sme sa pozreli na inkubáciu jednotlivých bakteriálnych kmeňov so spomínanými nízkymi koncentraciami čistého Sarkosylu.

Referencie:

1. Gatica S, Fuentes B, Rivera-Asin E, Ramirez-Cespedes P, Sepulveda-Alfaro J, Catalan EA, et al. Novel evidence on sepsis-inducing pathogens: from laboratory to bedside. *Front Microbiol.* 2023;14:1198200. doi: 10.3389/fmicb.2023.1198200.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
3. Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:2536. doi: 10.3389/fimmu.2019.02536.
4. Pisetsky DS. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin Immunol.* 2012;144(1):32-40. doi: 10.1016/j.clim.2012.04.006.
5. Janikova M, Pribulova N, Kmetova K, Macakova K, Dobisova A, Kopcova M, et al. Extracellular DNA and Deoxyribonuclease Activity as Prognostic Markers in Sepsis. *Biomedicines.* 2024;12(11). doi: 10.3390/biomedicines12112565.
6. Han DSC, Lo YMD. The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends Genet.* 2021;37(8):758-70. doi: 10.1016/j.tig.2021.04.005.
7. Willemsen JF, Wenskus J, Lenz M, Rhode H, Trochimiuk M, Appl B, et al. DNases improve effectiveness of antibiotic treatment in murine polymicrobial sepsis. *Front Immunol.* 2023;14:1254838. doi: 10.3389/fimmu.2023.1254838.
8. Mai SH, Khan M, Dwivedi DJ, Ross CA, Zhou J, Gould TJ, et al. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis Shock. 2015;44(2):166-72. doi: 10.1097/SHK.0000000000000396.
9. Laukova L, Konecna B, Babickova J, Wagnerova A, Meliskova V, Vlkova B, et al. Exogenous deoxyribonuclease has a protective effect in a mouse model of sepsis. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:8-16. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.009.
10. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113.
11. Wongkaewkhiaw S, Kanthawong S, Bolscher JGM, Nazmi K, Taweechaisupapong S, Krom BP. DNase-mediated eDNA removal enhances D-LL-31 activity against biofilms of bacteria isolated from chronic rhinosinusitis patients. *Biofouling.* 2020;36(9):1117-28. doi: 10.1080/08927014.2020.1857741.
12. Deng W, Lei Y, Tang X, Li D, Liang J, Luo J, et al. DNase inhibits early biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*- or *Staphylococcus aureus*-induced empyema models. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:917038. doi: 10.3389/fcimb.2022.917038.

13. Villarreal JV, Jungfer C, Obst U, Schwartz T. DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *J Microbiol Methods*. 2013;94(3):161-9. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.009.
14. Willis AL, Calton JB, Carr TF, Chiu AG, Chang EH. Dead or alive: Deoxyribonuclease I sensitive bacteria and implications for the sinus microbiome. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(2):94-8. doi: 10.2500/ajra.2016.30.4278.
15. Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Arawi SA, Almurshedi F, Alhashmi N, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2011;43(12):1186-8. doi: 10.1038/ng.975.
16. Lacey KA, Serpas L, Makita S, Wang Y, Rashidfarrokhi A, Soni C, et al. Secreted mammalian DNases protect against systemic bacterial infection by digesting biofilms. *J Exp Med*. 2023;220(6). doi: 10.1084/jem.20221086.
17. McCord JJ, Engavale M, Masoumzadeh E, Villarreal J, Mapp B, Latham MP, et al. Structural features of Dnase1L3 responsible for serum antigen clearance. *Commun Biol*. 2022;5(1):825. doi: 10.1038/s42003-022-03755-5.
18. Lanigan RS. Final report on the safety assessment of Cocoyl Sarcosine, Lauroyl Sarcosine, Myristoyl Sarcosine, Oleoyl Sarcosine, Stearoyl Sarcosine, Sodium Cocoyl Sarcosinate, Sodium Lauroyl Sarcosinate, Sodium Myristoyl Sarcosinate, Ammonium Cocoyl Sarcosinate, and Ammonium Lauroyl Sarcosinate. *Int J Toxicol*. 2001;20 Suppl 1:1-14.
19. Dini S, Bekhit AEA, Roohinejad S, Vale JM, Agyei D. The Physicochemical and Functional Properties of Biosurfactants: A Review. *Molecules*. 2024;29(11). doi: 10.3390/molecules29112544.
20. Baker Z, Harrison RW, Miller BF. Action of Synthetic Detergents on the Metabolism of Bacteria. *J Exp Med*. 1941;73(2):249-71. doi: 10.1084/jem.73.2.249.
21. Keyhani J, Keyhani E, Attar F, Haddadi A. Sensitivity to detergents and plasmid curing in *Enterococcus faecalis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006;33(3):238-42. doi: 10.1007/s10295-005-0261-y.

18. Urinary biomarker panel for early detection of kidney injury in children with type 1 diabetes mellitus

Iryna Vikhrova

Supervisor: Prof. Andrii Loboda D.Med.Sc.¹

¹ Department of Pediatrics, Sumy State University, Sumy, Ukraine

Introduction

Diabetic nephropathy remains one of the most serious chronic complications of type 1 diabetes mellitus (T1D), yet clinicians still rely heavily on albuminuria and estimated glomerular filtration rate (GFR), which often fail to capture the earliest stages of kidney injury [1]. This limitation creates a major clinical problem in pediatric diabetology, because children may already develop glomerular, tubular, endothelial, and enzymatic renal changes long before classical clinical markers show clear abnormalities. Early diagnosis matters especially in children, since long disease duration, chronic hyperglycemia, oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction gradually reshape renal tissue and increase the lifetime risk of chronic kidney disease [2].

Recent literature points to several promising urinary biomarkers that reflect different components of renal injury in diabetes [3]. Adiponectin reflects mainly glomerular dysfunction and compensatory nephroprotective signaling; VCAM-1 reflects endothelial and inflammatory activity; RBP4 reflects proximal tubular dysfunction; ANPEP reflects early enzymatic and tubular changes; and DPP IV reflects proximal tubular and glomerular involvement. However, pediatric evidence remains fragmented. Existing studies rarely evaluate these markers together in one analytical model, and the literature almost completely ignores urinary VCAM-1 and peptidase patterns in children with T1D in the context of early diabetic nephropathy. The material also highlights an important gap: databases do not offer pediatric studies that combine peptidases, diabetic nephropathy, and children in a focused manner, while evidence on urinary VCAM-1 in children with T1D remains absent or extremely limited [4].

We therefore studied a combined urinary biomarker panel in children with T1D to clarify whether adiponectin, VCAM-1, RBP4, ANPEP, and DPP IV can identify early kidney injury before advanced clinical nephropathy develops. We aimed to compare biomarker expression across three groups of children with different diabetes duration and a healthy comparison group, to quantify the strength of biomarker elevation, and to test the relationship between these markers and GFR [3-5]. We expected that a multi-marker panel would reveal early and duration-dependent renal injury more clearly than any single conventional indicator. In practical terms, we aimed to identify biomarkers that can improve early screening, risk stratification, and long-term monitoring of diabetic nephropathy in children with T1D.

Material and methods

We collected morning fasting urine samples from healthy children and children with T1D between 6:00 and 9:00 a.m. Samples were centrifuged and stored at -20°C until analysis. For the initial exploratory analysis, pooled urine samples were prepared for each study group by combining equal aliquots (100 μL) from individual participants to obtain representative group-level biomarker profiles. This design was used to assess overall group-level expression patterns rather than inter-individual variability.

We organized the pediatric T1D cohort into three duration-based groups: group I included children with T1D duration of less than 1 year, group II included children with T1D duration of 1–5 years, and group III included children with T1D duration of more than 5 years. Group IV served as the comparison group and included healthy children. This structure allowed us to evaluate not only the presence of biomarker elevation, but also the progression of biomarker expression with increasing disease duration, which reflects the clinical course of diabetic nephropathy.

We measured urinary biomarkers using the Proteome Profiler Human Kidney Biomarker Antibody Array (Catalog No. ARY019, R&D Systems, USA). This array detects 38 kidney injury markers simultaneously and provides a rapid, sensitive, and cost-effective method for comparing relative expression between study groups. From these markers, we selected five with the highest relevance for diabetic kidney injury: adiponectin, VCAM-1, RBP4, ANPEP, and DPP IV. The method is based on a sandwich immunoassay principle similar to ELISA but uses a nitrocellulose membrane instead of a microplate. Each membrane contains capture antibodies in duplicate for each analyte, which improves analytical reliability and internal consistency.

Each pooled urine sample was incubated with a biotinylated detection antibody overnight on the membrane. After incubation, streptavidin–horseradish peroxidase and chemiluminescent substrate were added to amplify the signal. Membranes were scanned using the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, USA), and spot intensity was analyzed semi-quantitatively using Bio-Rad Image Lab software. For each biomarker, mean signal intensity was calculated from duplicate spots, and variability was assessed across technical replicates. Results were expressed as both absolute pixel density values and fold-change relative to the control group.

To evaluate statistical differences between groups, we applied chi-square analysis using fourfold contingency tables. Spearman rank correlation coefficients were calculated to assess associations between urinary biomarkers and glomerular filtration rate (GFR). A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The results demonstrated a consistent and statistically significant pattern of elevated urinary expression of all five kidney injury biomarkers in children with T1D compared to the healthy control group ($p < 0.05$), indicating early and multi-level renal involvement even in the initial stages of disease. In children with T1D duration below 1 year, biomarker levels were already significantly increased, including a 1.5-fold rise in adiponectin, 1.3-fold increases in VCAM-1 and RBP4, a 2.6-fold increase in ANPEP, and a 3.5-fold increase in DPP IV. This pattern suggests that enzymatic and proximal tubular alterations may represent some of the earliest detectable renal changes in pediatric T1D, preceding clinically apparent nephropathy. In the 1–5 years

disease duration group, all biomarkers remained elevated and demonstrated further progression. ANPEP showed a 3.2-fold increase and DPP IV a 3.7-fold increase, while adiponectin and VCAM-1 exhibited a gradual but steady rise. These findings indicate sustained activation of tubular and enzymatic injury pathways alongside progressive involvement of glomerular and endothelial components. In children with T1D duration exceeding 5 years, the highest overall biomarker expression was observed. Adiponectin demonstrated a 3.9-fold increase, while DPP IV reached a 4.6-fold increase, confirming progressive glomerular stress and long-term enzymatic activation. VCAM-1 and RBP4 also remained elevated, reflecting persistent endothelial activation and proximal tubular dysfunction.

Chi-square analysis confirmed the statistical robustness of all observed differences across biomarkers and study groups ($p < 0.05$), supporting that the detected changes represent a stable biological pattern rather than random variation. Correlation analysis with GFR demonstrated significant positive associations for adiponectin ($r = 0.734$, $p = 0.007$), ANPEP ($r = 0.589$, $p = 0.044$), and DPP IV ($r = 0.869$, $p = 0.0001$), with DPP IV showing the strongest relationship with renal function. No statistically significant correlations were found for VCAM-1 and RBP4, suggesting that these markers may be less directly associated with changes in renal function in this dataset.

Overall, the biomarker panel revealed a coordinated multi-compartment pattern of renal involvement in pediatric T1D, involving glomerular, tubular, endothelial, inflammatory, and enzymatic pathways. The progressive increase of markers across disease duration further supports a time-dependent escalation of subclinical kidney injury.

Discussion

This study shows that children with T1D already develop measurable kidney injury long before classical diabetic nephropathy reaches an advanced clinical stage. The five-marker urinary panel revealed significant changes in all T1D groups, including children with disease duration below one year. This finding highlights the strong clinical relevance of the study. The data support the idea that diabetic nephropathy in children starts early, evolves through multiple structural and functional pathways, and requires broader biomarker surveillance than albuminuria alone can provide [6].

The results also show that each biomarker contributes a different diagnostic layer. Urinary adiponectin is a promising early, noninvasive marker of glomerular injury and shows the most pronounced increase in children with T1D of more than 5 years' duration. VCAM-1 captures inflammatory and endothelial involvement and may signal early tubulointerstitial injury. RBP4 reflects proximal tubular dysfunction and supports early detection of tubular damage. ANPEP and DPP IV react very early and strongly, especially during the first years of T1D, which makes them valuable markers of early enzymatic and functional renal stress [7-10]. DPP IV is the most dynamic long-term marker in this dataset, while adiponectin is the most convincing glomerular marker.

The combined panel offers more than descriptive biomarker profiling. It offers a practical diagnostic strategy for pediatric nephrodiabetology. Clinicians can use this panel to identify high-risk children earlier, stratify patients more precisely, and strengthen follow-up before irreversible renal decline develops. Researchers can use the panel to study the transition from subclinical injury to overt nephropathy and to test targeted interventions at earlier stages. In

this sense, the study does not only report biomarker elevation; it supports a shift toward earlier, more mechanistic, and more individualized monitoring of diabetic kidney injury in children with T1D [6].

Instead of treating kidney injury as a late albuminuric event, the results frame it as a complex process that involves glomerular stress, tubular dysfunction, endothelial activation, inflammatory signaling, and enzymatic remodeling from the earliest phases of T1D. Future studies should validate these findings in larger pediatric cohorts, analyze longitudinal changes at the individual level, and test whether combined urinary biomarker monitoring can improve clinical outcomes. Even at this stage, the findings support a clear conclusion: children with T1D require earlier and more comprehensive renal surveillance, and a combined urinary biomarker panel represents a promising step toward improving early diagnostics of diabetic nephropathy.

The authors acknowledge the research group of Thomas Boren (Umeå University) for supporting this study within the Erasmus+ (KA1) program. The work was conducted as part of the research project of the Department of Pediatrics, Sumy State University (Registration No. 0120U102150).

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

References

1. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, et al: Diabetic kidney disease. Nat Rev Dis Primers 2015; 1:15018.
2. Forbes JM, Cooper ME: Mechanisms of diabetic complications. Physiol Rev 2013; 93(1):137–188.
3. Champion CG, Sanchez-Ferraz O, Batchu SN: Potential role of serum and urinary biomarkers in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy. Can J Kidney Health Dis 2017; 4:2054358117705371.
4. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J: Inflammatory molecules and pathways in diabetic nephropathy. Nat Rev Nephrol 2011; 7(6):327–340.
5. Piwkowska A, Rogacka D, et al: Role of aminopeptidases in renal physiology and diabetic nephropathy. Int J Mol Sci 2020; 21(4):1219.
6. Drossos K, et al: Early urinary biomarkers of diabetic kidney disease in children and adolescents. Pediatr Nephrol 2021.
7. Papadopoulou-Marketou N, et al: Urinary adiponectin as a biomarker of diabetic nephropathy and early renal dysfunction. Clin Biochem 2015; 48(12):787–793.
8. Zhang H, et al: VCAM-1 and endothelial dysfunction in diabetes mellitus: mechanisms of vascular inflammation and injury. Front Cardiovasc Med 2024.
9. Cao X, et al: Retinol-binding protein 4 (RBP4) as a marker of metabolic and renal dysfunction in diabetes mellitus. Front Endocrinol (Lausanne) 2024.
10. Chika N, et al: Urinary aminopeptidase N (ANPEP) and dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) as early biomarkers of tubular injury in kidney disease. Biomolecules 2024; 14(9):1049.

19. Tear film changes after anterior segment surgery

MUDr. Datseri Rafaella

Supervisor: prof. MUDr. Alena Furdova, PhD, Mph²

¹ University general hospital of Heraklion (PAGNI)

² Comenius University in Bratislava , Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology

Introduction

The ocular surface, which consists of the cornea, conjunctiva, eyelids, and precorneal tear film, works synergistically under the control of the lacrimal functional unit (LFU) to preserve ocular surface homeostasis. Ocular surface health is dependent upon sensory–neural reflex arc regulating production, distribution, and clearance of tears. Damage to any component of the ocular surface anatomy results in tear film instability and dry eye disease (DED). DED is a multifactorial disease of tear film homeostasis loss that typically results in ocular surface inflammation and neurosensory abnormalities.

Although necessary for disease treatment and visual rehabilitation, anterior segment surgical procedures disrupt the LFU. Transection of corneal nerves, microtrauma to the epithelium, intraoperative drying, phototoxicity, and exposure to preserved topical medications work in synergy to decrease tear secretion, alter tear composition and increase tear film evaporation. Extent and duration of tear film disruption depends largely on the underlying surgical procedure. Cataract surgery typically results in transient tear film instability as recovery can take up to 3 months while corneal nerves regenerate. Following keratoplasty, severe and persistent disruption of the ocular surface is present due to a greater degree of denervation and chronic ocular surface inflammation. Glaucoma surgery results in decreased tear film stability related not only to conjunctival incisions, but also chronic topical medication exposure leading to conjunctival remodeling and goblet cell loss. Conversely, excising a pterygium may improve tear film equilibrium over time, since the eyelid will no longer be irritated by the problematic tissue. However, literature evaluating postoperative changes in tear film physiology is limited to single procedural studies with short-term follow-up. As a result, there is a lack of evidence describing the temporal progression and comparative severity of DED following different types of anterior segment procedures. Our study assesses tear film physiology changes following multiple anterior segment surgical procedures from a real-world cohort. We focused on procedure specific recovery patterns along with the impacts of pre-existing ocular surface disease and postoperative compliance.

Methods

This prospective observational study included 100 patients undergoing anterior segment surgery. Patients were categorized into four groups: cataract surgery (n=60), glaucoma

surgery (n=25), penetrating keratoplasty (n=4), and pterygium excision (n=10). One photorefractive keratectomy case was excluded from comparative analysis.

Preoperative evaluation included clinical assessment of ocular surface disease, measurement of tear break-up time (TBUT), and Schirmer testing. Meibomian gland dysfunction was documented based on slit-lamp findings. Systemic and topical risk factors, including diabetes, psychotropic medication use, and glaucoma therapy, were recorded.

Postoperative follow-up was conducted at 1 month, 3 months, and 6 months. TBUT was used as the primary outcome measure due to its strong correlation with tear film instability and symptom severity. Patients were prescribed artificial tear supplementation, and adherence was categorized as good (regular use), moderate (intermittent use), or poor (minimal or discontinued use). Persistence of blepharitis at 6 months was also recorded.

Results

Baseline characteristics

Baseline ocular surface disease was common to all groups. In the cataract group, tear film instability was present at baseline in 60–70% patients with majority having clinically significant meibomian gland dysfunction. About one third of the patients were on topical medications for glaucoma, 25% were receiving psychotropic medications and one third were on antidiabetic medications. There was no preoperative optimization of the ocular surface in any patient.

Patients with glaucoma had moderate ocular surface disease related to chronic topical medication use as well as conjunctival changes secondary to inflammation. Patients undergoing PK had severe ocular surface disease at baseline with TBUT of 5–6 seconds and Schirmer values of 7–10mm. Those with pterygia had a more preserved tear film with TBUT values of 10–13 seconds and normal Schirmer values.

Postoperative tear film evolution

In the cataract group, postoperative dry eye symptoms peaked at 3 months in 60% of patients, corresponding to TBUT values of 6–7 seconds. This reduction was statistically significant compared to preoperative values ($p < 0.01$). Partial recovery was observed at 6 months, though outcomes varied substantially. Patients with good adherence to artificial tear therapy (n≈30) demonstrated progressive improvement toward baseline TBUT values. In contrast, patients with poor adherence (n≈20) exhibited persistent tear film instability. A subgroup of 10 patients with ongoing blepharitis and meibomian gland dysfunction showed minimal recovery, suggesting a refractory phenotype. Glaucoma patients demonstrated marked heterogeneity, with TBUT values ranging from 2 to 10 seconds at 6 months. The most severe reductions were observed in patients continuing topical therapy or discontinuing lubrication. Tear film instability was more pronounced adjacent to filtering blebs, reflecting localized disruption. In penetrating keratoplasty patients, severe early postoperative symptoms improved with intensive lubrication. By 3–6 months, TBUT stabilized between 8–10 seconds. Pterygium patients demonstrated the most favorable outcomes, with stable TBUT values around 10 seconds and minimal long-term symptoms following resolution of early postoperative irritation.

1 **Table 1. Baseline ocular surface characteristics**

Group	n	TBUT (sec)	Schirmer (mm)	OSD prevalence
Cataract	60	8	12	60–70%
Glaucoma	25	6–8	10–12	100%
PKP	4	5–6	7–10	100%
Pterygium	10	10–13	14–15	Low

2

3 **Table 2. Tear break-up time ranges**

Group	Pre-op	1 month	3 months	6 months
Cataract	8	5–6	6–7	7
Glaucoma	7	5	4–6	8–10
PKP	6	5	9	8
Pterygium	11	10	10	10

4

5 Discussion

6 Postoperative dry eye symptoms following anterior segment procedures seem largely
7 determined by pre-existing ocular health and post-surgical care, not just surgical variations. In
8 theory, anterior segment surgeries transect corneal nerves, disrupting the corneal–lacrimal
9 reflex and leading to decreased tear production. Since tear film break-up improves by
10 approximately 3 months when you look at nerve regeneration times, this helps to explain the
11 delayed return to baseline symptoms.

12 The results from cataract surgery patients seemed to mimic previously published research
13 about corneal nerves and shows the typical increased then decrease tear film disruption seen
14 after cataract surgery. However, due to the higher percentage of ocular surface disease
15 preoperatively in our study population compared to previous studies, it may have resulted in
16 higher and more prolonged dysfunction after surgery.

17 It was surprising to see the impact that compliance with treatment made postoperatively.
18 Patients who had increased compliance with artificial tears improved their tear film breakup
19 time postoperatively. While our study is underpowered to draw conclusions about causation,
20 this remained a trend worth noting as it is easily addressed.

21 The glaucoma group had the highest standard deviation in almost every parameter. This may
22 be secondary to the effects of topical medications toxicities, loss of goblet cells, blebs, and
23 mechanical irritation from contact with eyes. Previous studies have noted ocular surface
24 disease increases with longer durations of topical polypharmacy.

25 PK patients showed severe disruption early on likely secondary to epithelial defects and
26 denervation but did show improvement with aggressive lubrication. This could be secondary
27 to structural changes that have been shown in the past even after years of successful PK.
28 Interestingly, pterygium patients improved or maintained their tear film parameters. This

might be secondary to restoring the normal architecture of the ocular surface after removing the pterygium.

Another important takeaway from these results is that they support the idea I introduced in my thesis that there are no universally dry eyes. There are procedure-specific tear films that go through a recovery process after surgery.

As with all investigations, there are limitations to this project. As a pilot study, there were small numbers of patients in each subgroup making it difficult to achieve significance. Thus the results should be viewed as hypothesis generating.

The strengths of this study include its real-world design. This allows us to understand how these surgeries might affect patients you see in your practice on a day-to-day basis. In conclusion, anterior segment surgeries appear to cause distinct patterns of tear film dysfunction that improve with time. These effects seem to be potentiated by the presence of ocular surface disease.

References

1. Pflugfelder SC. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res.* 2020.
2. Craig JP et al. TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf.* 2017.
3. Wolffsohn JS et al. TFOS DEWS III Diagnostic Methodology. *Am J Ophthalmol.* 2025.
4. Zemaitiene A et al. Evaluation of ocular surface after cataract surgery. *J Clin Med.* 2022.
5. Craig JP et al. Tear film alterations after keratoplasty. *Sci Rep.* 2022.
6. Kim KY et al. Meibomian gland changes after keratoplasty. *BMC Ophthalmol.* 2021.
7. Mastropasqua R et al. Tear film changes in glaucoma. *Curr Med Chem.* 2018.
8. Zatarain-Barrón NC et al. Tear film changes after pterygium excision. *Eye Contact Lens.* 2025.
9. Jones L et al. TFOS DEWS III Management. *Am J Ophthalmol.* 2025.

20. Optimálne načasovanie chirurgickej korekcie kongenitálnej ezotropie: retrospektívna kohortová analýza 86 pacientov

MUDr. Daniel Havalda
(oftalmológia)

Spoluautori: Klára Hodálová², Veronika Popova², Beáta Bušányová², Dana Tomčíková², Anton Gerinec²

Školiteľ: prof. MUDr. Anton Gerinec, CSc, FEBO²,

¹ Oftalmologické pracovisko Nemocnice Bory – Penta Hospitals, Ivana Kadlečíka 2, 841 03 Bratislava, ² Klinika detskej oftalmológie LF UK a NÚDCH, 831 01 Bratislava

Úvod

Kongenitálna ezotropia je forma konvergentného strabizmu manifestujúca sa typicky v prvých mesiacoch života a charakterizovaná veľkou, stabilnou uhlovou deviáciou. Incidencia ochorenia sa pohybuje približne medzi 0,2–2 % populácie [1,2].

Etiológia je multifaktoriálna, pričom významnú úlohu zohráva porucha vývoja binokulárnej fúzie v období vysokej neuroplasticity zrakového systému [4]. Klinicky sa ochorenie prejavuje veľkou konvergentnou deviáciou, často sprevádzanou stridavou fixáciou alebo cross-fixáciou [1].

Liečba je primárne chirurgická a jej cieľom je dosiahnuť paralelné postavenie očí a vytvoriť podmienky pre rozvoj binokulárnych funkcií. Načasovanie operácie je kľúčovým faktorom ovplyvňujúcim výsledok, pričom skoršia intervencia zvyšuje pravdepodobnosť priaznivého senzorického vývoja [3,5].

Napriek tomu zostáva optimálne načasovanie operácie predmetom diskusie. Systematická revízia Cochrane poukazuje na nedostatok dostatočne kvalitných dôkazov, zatiaľ čo novšie prehľadové práce podporujú skorší chirurgický prístup [7,8].

Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať klinické výsledky pacientov s kongenitálnou ezotropiou a overiť hypotézu, že operácia vykonaná medzi 12. a 18. mesiacom života vedie k optimálnemu funkčnému a anatomickému výsledku.

Materiál a metódy

Naša retrospektívna kohortová štúdia analyzovala súbor 86 pacientov s kongenitálnou ezotropiou, ktorí boli operovaní v 12-ročnom sledovanom období od 1. januára 2010 do 31. decembra 2021 na Klinike detskej oftalmológie NÚDCH.

Kritériá zaradenia a vylúčenia

Pacienti boli zaradení na základe splnenia nasledovných kritérií: kompletná zdravotná dokumentácia, manifestácia strabizmu pred šiestym mesiacom života, veľkosť úchyľky pred

operáciou ≥ 20 prizmových dioptrií, absencia závažných neurologických ochorení (napr. detská mozgová obrna, hydrocefalus), účasť na kontrolných oftalmologických vyšetreniach po prvej, resp. viacerých operáciách vrátane vyšetrenia so zistením finálnej úrovne binokulárnych funkcií s odstupom 3 a viac rokov od poslednej operácie.

Dokumentácia každého pacienta musela obsahovať anamnestické údaje so zameraním na dobu trvania úchyľky, jej začiatok, pridružené symptómy, záznamy o oftalmologických vyšetreniach oboch očí s dôrazom na nekorigovanú a najlepšiu korigovanú zrakovú ostrosť, motilitu očí, stanovenie úchyľky a vyšetrenie predného segmentu, operačný protokol o vykonanej operácii, resp. operáciách. Sledované a spracované boli nasledujúce parametre pred ako aj po operácii: vek pri prvej operácii, veľkosť úchyľky; pred operáciou, rok po prvej operácii, a s odstupom času (≥ 3 rokov) od poslednej operácie, stupeň binokulárnych funkcií po absolvovaní všetkých operácií, počet operácií u jednotlivých pacientov, výskyt asociovaných stavov, typ vykonanej operácie, zraková ostrosť, veľkosť refrakčnej chyby, stupeň amblyopie

Pacienti, ktorí nespĺňali tieto kritériá alebo mali neúplnú zdravotnú dokumentáciu, boli zo štúdie vylúčení. V sledovanom období 01/01/2010 – 31/12/2021 absolvovalo prvú operáciu 108 pacientov s diagnózou kongenitálnej ezotropie. 11 pacientov nemalo kompletnú dokumentáciu, 5 pacientov sa nedostavilo na kontrolné vyšetrenia a 6 pacientov bolo vyradených pre závažné neurologické komplikácie. Celkovo tak do štúdie bolo zaradených 86 pacientov spĺňajúcich stanovené kritériá.

Rozdelenie pacientov

Podľa veku pri prvej operácii boli pacienti rozdelení do štyroch vekových skupín:

do 12 mesiacov ($n = 9$),

12–18 mesiacov ($n = 30$),

19–24 mesiacov ($n = 28$),

nad 24 mesiacov ($n = 19$).

Vyšetrovacie metódy

Vyšetrovacie metódy boli prispôbené vývojovému štádiu každého dieťaťa, keďže realizovateľnosť vyšetrenia sa výrazne líši v závislosti od veku a miery spolupráce. V predoperačnom období, najmä u pacientov mladších ako 12–18 mesiacov, nebolo vo všeobecnosti možné spoľahlivo realizovať subjektívne senzorické testy. U týchto mladších pacientov bola preto očná deviácia kvantifikovaná predovšetkým pomocou alternujúceho prizmatického cover testu, pokiaľ to spolupráca umožňovala, pričom u veľmi malých alebo nefixujúcich detí bola doplnená o odhady podľa Hirschberga a Krimskeho metódy, v súlade so štandardnou praxou detskej oftalmológie.

Všetci pacienti absolvovali skiaskopiu v cykloplégii a rutinné vyšetrenie predného segmentu oka. Komplexné senzorické vyšetrenie pomocou synoptofora, zahŕňajúce simultánnu makulárnu perцепciu, fúziu a stereopsiu, bolo realizované až v období, keď to vek a spolupráca pacientov umožňovali, čo zvyčajne zodpovedalo dlhodobým pooperačným kontrolám. V tomto období už väčšina detí dokázala udržať stabilnú fixáciu, čo umožnilo presné meranie reziduálnej horizontálnej deviácie a binokulárnych funkcií na synoptofore.

Dodatočné hodnotenie stereopsie bolo u spolupracujúcich pacientov realizované pomocou Titmusovho a Langovho testu. Tento vekovo adaptovaný, pragmatický prístup k vyšetreniu zabezpečil, že každý pacient bol hodnotený najspoľahlivejšími dostupnými metódami vzhľadom na jeho vývojové a kooperatívne možnosti.

Okrem retrospektívnej analýzy zdravotnej dokumentácie všetci pacienti absolvovali štandardizované dlhodobé oftalmologické vyšetrenie, ktoré zahŕňalo hodnotenie simultánnej makulárnej percepcie, fúzie a stereopsie pomocou synoptofora, vyšetrenie stereopsie pomocou Titmusovho a Langovho testu a meranie reziduálnej horizontálnej deviácie na synoptofore.

Primárnym cieľom štúdie bol stupeň binokulárnych funkcií hodnotený na 6-bodovej škále:

0 = žiadne binokulárne funkcie,

1 = simultánna makulárna percepcia,

2 = fúzia 1. stupňa,

3 = fúzia 2. stupňa,

4 = fúzia 3. stupňa,

5 = stereopsia.

Sekundárnym cieľom bola veľkosť reziduálnej horizontálnej deviácie po operácii.

Analyzované boli aj vedľajšie faktory ako vek pri prvej operácii, pohlavie, predčasné narodenie a počet operácií.

Štatistická analýza

Na štatistickú analýzu boli použité Kruskal–Wallisov test na porovnanie rozdielov medzi skupinami, Mann–Whitneyho U test s Bonferroniho korekciou na párové porovnania, Spearmanova korelácia na hodnotenie vzťahu medzi počtom operácií a výsledným stupňom binokulárnych funkcií, Ordinal logistic regression na multivariačnú analýzu faktorov ovplyvňujúcich výsledok. Hodnota $p < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky

Do retrospektívnej analýzy bolo zaradených 86 pacientov s kongenitálnou ezotropiou, ktorí podstúpili chirurgickú liečbu v období od 1. januára 2010 do 31. decembra 2021. Pacienti boli rozdelení do štyroch vekových skupín podľa veku pri prvej operácii: do 12 mesiacov ($n = 9$), 12–18 mesiacov ($n = 30$), 19–24 mesiacov ($n = 28$) a nad 24 mesiacov ($n = 19$).

Binokulárne funkcie

Priemerný stupeň binokulárnych funkcií bol najvyšší v skupine operovanej vo veku 12–18 mesiacov (priemer: 3.07), čo korešpondovalo prevažne s pokročilými binokulárnymi funkciami až stereopsiou. Naopak, najnižší priemerný stupeň bol zaznamenaný v skupine pacientov operovaných po 24. mesiaci (priemer: 1.67).

Kruskal–Wallisov test preukázal štatisticky významný rozdiel medzi skupinami ($H = 13.235$, $p = 0.0042$). Párové porovnania pomocou Mann–Whitneyho U testu s Bonferroniho korekciou ukázali významne lepší funkčný výsledok v skupine 12–18 mesiacov v porovnaní so skupinou 19–24 mesiacov ($p = 0.0019$), a v porovnaní so skupinou nad 24 mesiacov ($p = 0.0017$).

Rozdiely medzi skupinou do 12 mesiacov a ostatnými skupinami neboli štatisticky významné ($p > 0.05$), čo možno pripísať nižšiemu počtu pacientov v skupine a najmä vyššiemu podielu pacientov s tzv. cross-eye formou kongenitálnej ezotropie (6 z 9 pacientov), kde literatúra odporúča intervenciu už okolo 6. mesiaca veku [2,5,9,10]. U týchto pacientov sa vek operácie pohyboval medzi 7–13 mesiacmi. Výsledky v tejto skupine tak z týchto dôvodov zaostali za očakávaniami vzhľadom na doterajšie zistenia.

Obnova stereopsie

Za osobitnú pozornosť stojí výskyt stereopsie (stupeň 5), ktorý bol dosiahnutý iba u 7 pacientov (8.1 % z celkového súboru). Z týchto pacientov až 5 (71.4 %) patrilo do skupiny operovanej vo veku 12–18 mesiacov, čo predstavuje 16.7 % všetkých pacientov v tejto vekovej skupine:

V skupine do 12 mesiacov dosiahli stereopsiu 1 pacient (11.1 %), 12–18 mesiacov 5 pacientov (16.7 %), v skupine 19–24 mesiacov 1 pacient (3.6 %), v skupine nad 24 mesiacov nebol zaznamenaný žiadny prípad stereopsie (0%).

Reziduálna horizontálna deviácia

Priemerná veľkosť reziduálnej horizontálnej deviácie bola najnižšia v skupine operovanej vo veku 12–18 mesiacov 1 rok po 1. operácii (priemer: 5.38° , $SD\ 2.97^\circ$, $CI = 4.27–6.49^\circ$), ako aj pri finálnom vyšetrení (≥ 3 roky od poslednej operácie; priemer: 3.89° , $SD = 2.21^\circ$, $95\% CI = 3.06–4.72^\circ$).

1 rok po 1. operácii:

< 12 mesiacov: priemer 7.22° ($SD = 3.41^\circ$, $n = 9$, $95\% CI = 4.60–9.84^\circ$)

12–18 mesiacov: priemer 5.38° ($SD = 2.97^\circ$, $n = 30$, $95\% CI = 4.27–6.49^\circ$),

19–24 mesiacov: priemer 7.71° ($SD = 3.86^\circ$, $n = 28$, $95\% CI = 6.21–9.21^\circ$),

nad 24 mesiacov: priemer 8.15° ($SD = 4.09^\circ$, $n = 19$, $95\% CI = 6.18–10.12^\circ$).

3 a viac rokov po poslednej operácii:

< 12 mesiacov: priemer 5.56° ($SD = 2.68^\circ$, $n = 9$, $95\% CI = 3.50–7.62^\circ$),

12–18 mesiacov: priemer 3.89° ($SD = 2.21^\circ$, $n = 30$, $95\% CI = 3.06–4.72^\circ$),

19–24 mesiacov: priemer 6.14° ($SD = 2.97^\circ$, $n = 28$, $95\% CI = 4.99–7.29^\circ$),

nad 24 mesiacov: priemer 7.12° ($SD = 3.05^\circ$, $n = 19$, $95\% CI = 5.65–8.59^\circ$).

Kruskal–Wallisov test (3+ roky po poslednej operácii) ukázal štatisticky významný rozdiel medzi skupinami ($H = 11.04$, $p = 0.0115$).

Párové porovnania (Mann–Whitneyho U testy s Bonferroniho korekciou) preukázali: skupina operovaná vo veku 12–18 mesiacov mala významne nižšiu reziduálnu deviáciu oproti skupine

19–24 mesiacov ($p = 0.034$), a oproti skupine nad 24 mesiacov ($p = 0.008$), významný rozdiel aj oproti skupine do 12 mesiacov ($p = 0.048$).

Zhrnutie

Najnižšia priemerná deviácia bola dosiahnutá u pacientov operovaných medzi 12–18 mesiacmi. Výsledky naznačujú, že operácia v tomto vekovom období je spojená s najvyššou pravdepodobnosťou paralelného postavenia bulbov a stabilným funkčným výsledkom.

Vplyv ďalších faktorov

Pohlavie nemalo štatisticky významný vplyv na výsledný stupeň binokulárnych funkcií ($p = 0.96$) ani na reziduálnu horizontálnu deviáciu ($p = 0.89$).

Pozitívna anamnéza na predčasné narodenie nemala štatisticky významný vplyv na binokulárne funkcie ($p = 0.14$) ani na reziduálnu deviáciu ($p = 0.21$).

Počet operácií:

Spearmanova korelácia odhalila slabú, ale štatisticky významnú negatívnu závislosť medzi počtom operácií a výsledným stupňom binokulárnych funkcií ($p = -0.237$, $p = 0.029$).

Počet operácií bol pozitívne korelovaný s vyššou výslednou reziduálnou deviáciou ($p = 0.264$, $p = 0.018$).

Multivariačná analýza (Ordinal logistic regression)

Ordinal logistic regresná analýza potvrdila: Operácia vo veku 19–24 mesiacov ($\beta = -1.34$, $p = 0.007$) a nad 24 mesiacov ($\beta = -1.36$, $p = 0.011$) bola významne spojená s horším funkčným výsledkom oproti referenčnej skupine 12–18 mesiacov. Počet operácií bol nezávislým negatívnym prediktorom funkčného výsledku ($\beta = -0.65$, $p = 0.012$). Pohlavie a prematurita nemali štatisticky významný vplyv.

Diskusia

Výsledky našej štúdie potvrdzujú, že chirurgická liečba kongenitálnej ezotropie realizovaná medzi 12. a 18. mesiacom života vedie k najlepším funkčným aj anatomickým výsledkom. Pacienti operovaní v tomto veku dosiahli najvyšší stupeň binokulárnych funkcií a najnižšiu reziduálnu deviáciu, pričom rozdiely boli štatisticky významné v porovnaní so skupinami operovanými po 18. mesiaci života.

Tieto výsledky podporujú koncept kritického obdobia vývoja binokulárneho videnia, počas ktorého má včasná chirurgická intervencia zásadný význam pre senzorický vývoj [4,5].

Dostupná literatúra poukazuje na benefit skorého chirurgického riešenia, avšak optimálny čas operácie nie je jednoznačne definovaný. Cochrane systematická revízia poukazuje na nedostatok kvalitných dôkazov, zatiaľ čo prehľadové práce a metaanalýzy podporujú skorší chirurgický prístup [7,8,5].

Naše výsledky sú v súlade s viacerými klinickými štúdiami, ktoré preukázali lepšie motorické aj senzorické výsledky u pacientov operovaných v skoršom veku [3,6,11].

Horšie výsledky v skupine pacientov operovaných pred 12. mesiacom je potrebné interpretovať opatrne vzhľadom na malý počet pacientov a vyšší podiel prípadov s cross-fixáciou, ktoré predstavujú špecifickú podskupinu s odlišnou prognózou [14,15].

Naša štúdia zároveň potvrdila, že vyšší počet operácií je spojený s horšími funkčnými aj anatomickými výsledkami, čo bolo popísané aj v predchádzajúcich prácach [9,10].

Z klinického hľadiska naše výsledky podporujú preferenciu operácie v intervale 12–18 mesiacov, pokiaľ to stav pacienta a organizačné možnosti umožňujú.

Limitáciou štúdie je jej retrospektívny dizajn a monocentrický charakter. Napriek tomu poskytuje konzistentné klinické dáta podporujúce optimalizáciu načasovania chirurgickej liečby.

Do budúcnosti sú potrebné prospektívne multicentrické štúdie na presnejšie určenie optimálneho času chirurgickej intervencie.

Referencie

1. von Noorden GK, Campos EC. Binocular Vision and Ocular Motility. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
2. Mohny BG. Common forms of childhood strabismus in an incidence cohort. Am J Ophthalmol. 2007;144(3):465–467.
3. Ing MR. Outcome study of surgical alignment before and after 24 months of age in congenital esotropia. Ophthalmology. 1995;102(12):2044–2049.
4. Birch EE. Amblyopia and binocular vision. Prog Retin Eye Res. 2013;33:67–84.
5. Simonsz HJ, et al. Early surgery for congenital esotropia improves stereopsis outcomes: a meta-analysis. Strabismus. 2011;19(4):158–163.
6. Castro PD, et al. Congenital esotropia: epidemiology and clinical features. MEDICC Rev. 2011;13(1):18–22.
7. Mehner L, Ng SM, Singh J. Interventions for infantile esotropia. Cochrane Database Syst Rev. 2023;(1):CD004917.
8. Bhate M, et al. Surgical timing in essential infantile esotropia: a review. Indian J Ophthalmol. 2022;70(7):2563–2568.
9. Greenberg AE, Mohny BG. Predictive factors for favorable sensory outcomes following early surgery for congenital esotropia. J AAPOS. 2006;10(1):20–23.
10. Birch EE, Stager DR. Long-term stability of alignment and sensory outcomes after early surgery for infantile esotropia. J AAPOS. 2006;10(5):409–413.
11. Lambert SR, Plager DA, Lynn MJ. Long-term results of early surgery for congenital esotropia. Ophthalmology. 1999;106(11):2096–2101.
12. Kekunnaya R, Mendonca T, Sachdeva V. Timing of surgery in infantile esotropia: a meta-analysis of long-term motor and sensory outcomes. J AAPOS. 2015;19(2):123–127.
13. Fawcett SL, Birch EE. Motion VEPs, stereopsis, and bifoveal fusion in children with strabismus. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(2):411–416.
14. Ing MR. Outcome study of very early surgery for congenital esotropia. J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 1995;32(3):145–148.
15. Wright KW. Essential infantile esotropia: surgical strategies. Ophthalmol Clin North Am. 2001;14(3):389–395.

21. klinický prínos a diagnostická presnosť shear-wave elastografie v porovnaní s tranzientnou elastografiou (štúdia ASTEL)

MUDr. Dana Dudová

(vnútorné choroby)

Spoluautori: P. Vrbová, E. Lazarová, D. Hanzalík, M. Hutera

Školiteľ: Doc. MUDr. Tomáš Koller PhD.

V. interná klinika Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitná nemocnica
v Bratislave

Úvod:

Elastografia pečene patrí v hepatologickej praxi medzi základné diagnostické nástroje. Svetovo najrozšírenejším a najviac preskúmaným nástrojom je tranzientná elastografia (Fibroscan), avšak tento systém je na Slovensku nerovnomerne dostupný. Shear-wave elastografia je dostupnejšou metódou, pretože je zabudovaná v štandardných ultrazvukových systémoch. Problémom shear-wave elastografie však zostáva interpretácia jej výsledkov, keďže prahové hodnoty pre signifikantnú fibrózu (SF) a pokročilú fibrózu (PF) sú pre každý systém unikátne.

Cieľ:

Porovnať výsledky tranzientnej elastografie (TE) a point shear-wave elastografie (pSWE) v kohorte pacientov vyšetrených súčasne oboma systémami a zistiť klinický prínos pSWE v praxi.

Metódy:

Počas 15 mesiacov sme vyšetrili všetkých indikovaných pacientov pomocou TE aj pSWE (Hitachi Arietta V70). Zaznamenali sme hodnoty tuhosti pečene v kPa a základné demografické a laboratórne parametre. TE sme použili ako zlatý štandard, s prahom >10 kPa pre SF a >15 kPa pre PF. (1) Vyhodnotili sme presnosť pSWE v predikcii detekcie SF a PF. Použili sme tri modely: prvý obsahoval len hodnoty pSWE a dva logit modely použitím SWE spolu s bežnými demografickými a laboratórnymi parametrami. Identifikovali sme plochu pod krivkou (AUROC) a prahové hodnoty pre každý model a vyhodnotili sme pravdepodobnosť SF a PF podľa týchto hodnôt.

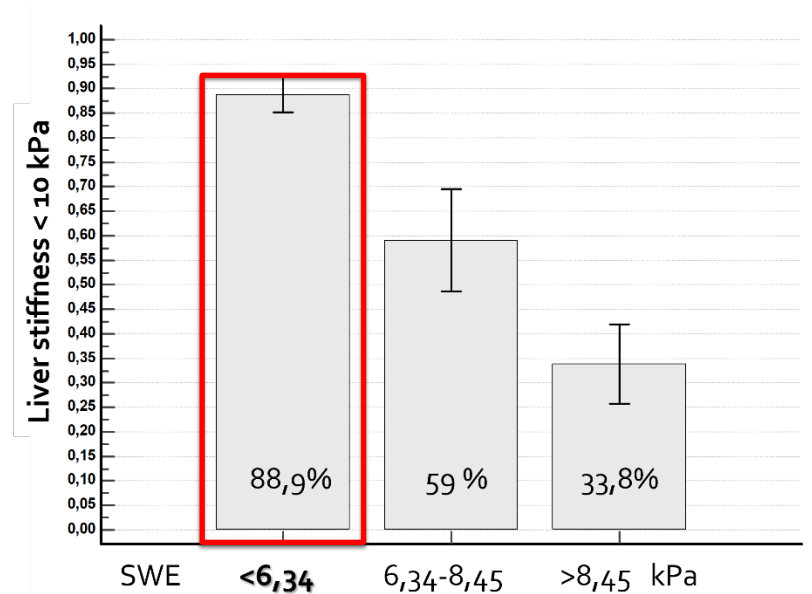
Výsledky:

Vyšetrili sme 500 pacientov s mediánom veku 60 (IQR 48–69), muži/ženy 214/286, s podielom SF 30,8 % a PF 18,4 %. Hodnoty tuhosti podľa TE a SWE vykazovali vysoko signifikantnú koreláciu ($\rho = 0,593$; $p < 0,001$). Zistili sme presnosť samotnej pSWE v predikcii SF (AUROC = 0,812) a PF (AUROC = 0,839) s prahovými hodnotami SF $> 6,34$ a PF $> 8,45$. Pre hodnoty pSWE $< 6,34$; 6,34–8,45 a $> 8,45$ kPa bola pravdepodobnosť SF 11,1, 40,9 a 65,4 % a PF 5,0, 14,77 a 48,9 %. (obrázok 1, 2) Vytvorili sme model ASTEL1 (N = 369) pre pravdepodobnosť (P, rozpätie 0 až 1), ktorý obsahoval pSWE, GGT, trombocyty (AUROC SF = 0,856; AUROC PF = 0,908),

a ASTEL2 (N = 467) použitím pSWE, veku, pohlavia, AST/ALT, GGT (AUROC SF = 0,857; AUROC PF = 0,901). (obrázok 3, 4, 5) Stanovili sme prahové hodnoty $P < 0,33$ na vylúčenie SF a $P > 0,66$ na potvrdenie PF. Pri hodnotách $P < 0,33$, $P = 0,33-0,66$ a $P > 0,66$ bola SF prítomná v 15,6, 62 a 94,2 % (ASTEL1) a 13,92, 50,7 a 86,8 % (ASTEL2). Pri hodnotách $P < 0,33$, $P = 0,33-0,66$ a $P > 0,66$ bola PF prítomná v 5,6, 30 a 79,7 % (ASTEL1) a v 4,4, 28 a 73,68 % (ASTEL2). (obrázok 6, 7)

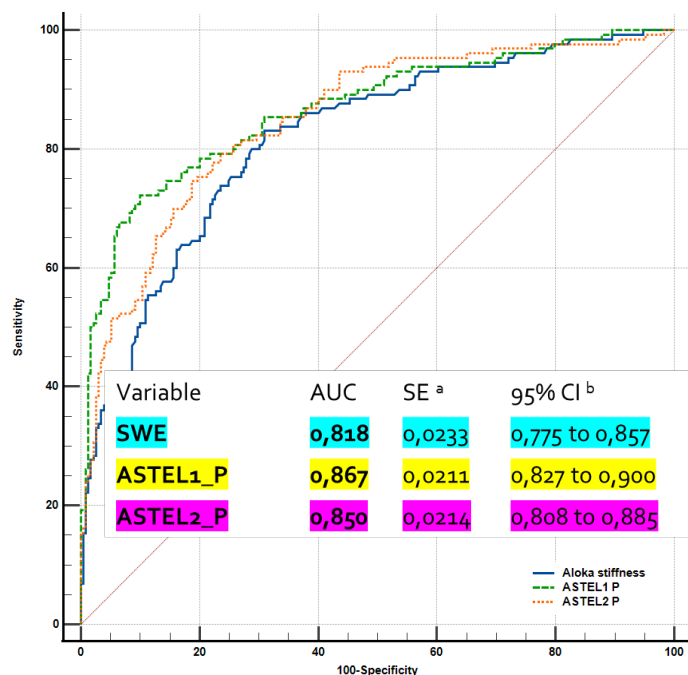
Tab.1. Sumárna štatistika

N=500	men	women	P #
	Median / %		
Age	59,93	55,38	0,0008
Transient elastography	11,06	14,57	0,0102
TE > 10 kPa	27 %	36 %	0,0485
TE > 15 kPa	16 %	22 0%	0,0756
Shear-wave elastography (kPa)	7,37	7,28	0,6371
SWE IQR/median (%)	17,04	17,87	0,2760
AST (N=457)	0,61	0,84	<0,0001
ALT	0,71	1,03	<0,0001
GGT	1,54	2,60	0,0001
ALP	1,76	1,67	<0,0001
LEU	6,50	7,98	0,0137
Platelets (N=360)	225,25	203,69	0,0150

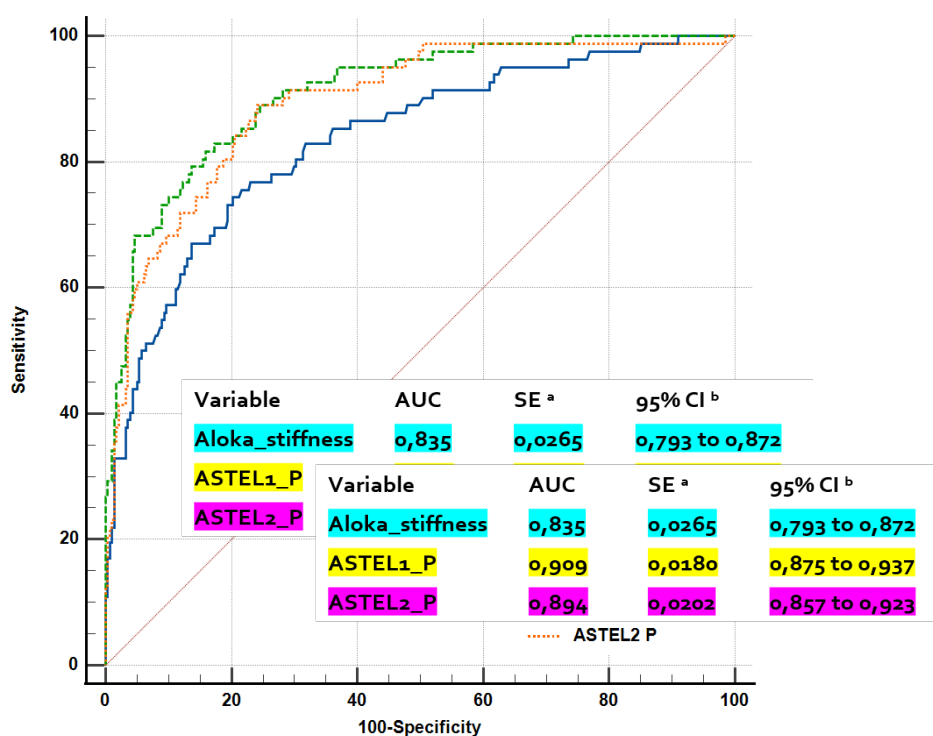


Obrázok 1. SWE rule out TE > 10 kPa (Pri SWE < 6,34 kPa 88,9% rule-out TE>10 kPa)

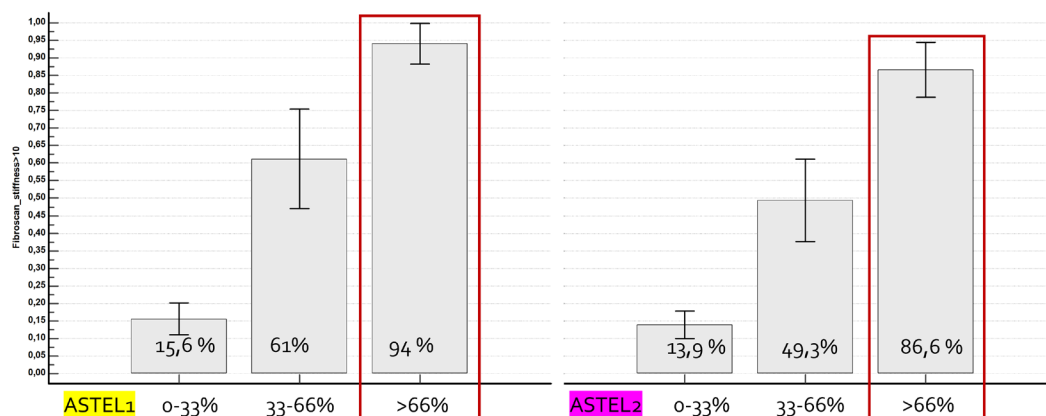




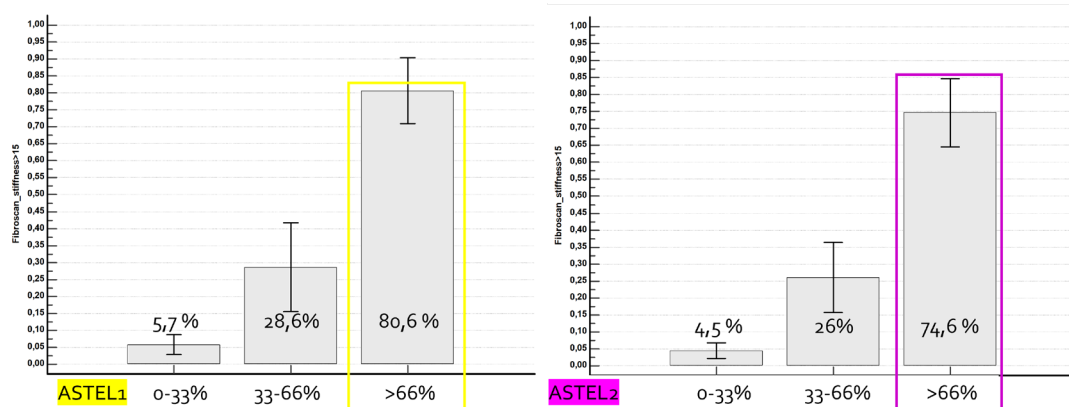
Obrázok 4. Porovnanie prediktívnej hodnoty SWE, ASTEL1 a ASTEL2 v predikcii LSM>10 kPa



Obrázok 5. Porovnanie prediktívnej hodnoty SWE, ASTEL1 a ASTEL2 v predikcii LSM>15 kPa



Obrázok 6. Modely ASTEL na potvrdenie TE > 10 kPa (Pri ASTEL > 66%, 86,6-94% rule in TE>10kPa)



Obrázok 7. Modely ASTEL na potvrdenie TE > 15 kPa (Pri ASTEL<33% 94,3-95,5% rule out TE>15 kPa, Pri ASTEL>66% 74,6-80,6 rule in TE>15 kPa)

Záver

SWE samotná má v diagnostike SF a PF výbornú negatívnu prediktívnu hodnotu (<6,34 kPa, 88,9–95 %). Vyššiu presnosť pozitívnej predikcie SF (86,8–94,2 %) a PF (73,7–79,7 %) dosiahneme použitím jedného z dvoch modelov pravdepodobnosti, ktoré kombinujú hodnoty SWE s bežnými demografickými a laboratórnymi parametrami.

Referencie

de Franchis, RobertoAbralles, Juan G. et al.:Baveno VII – Renewing consensus in portal hypertension, Journal of Hepatology, Volume 76, Issue 4, 959 – 974

22. Pars plana vitrektómia s peelingom vnútornej limitujúcej membrány so vzduchovou tamponádou v liečbe idiopatických makulárnych dier

MUDr. Peter Kadlic
(oftalmológia)

Spoluautori: Dmytro Bondarchuk¹, Vladimír Krásnik¹

Školiteľ: doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD.¹

¹Klinika oftalmológie LFUK a UNB

Úvod

Diera makuly (FTMH – z angl. Full-thickness macular hole) predstavuje okrúhly defekt sietnice siahajúci od vnútornej limitujúcej membrány po retinálny pigmentový epitel. Býva lokalizovaná centrálna v oblasti žltej škvrny a vzniká najčastejšie v dôsledku vitreomakulárnej trakcie. Prvýkrát bola pozorovaná a popísaná profesorom Hermannom Knappom v roku 1869. Prvá úspešná chirurgická liečba cestou pars plana vitrektómie (PPV) bola realizovaná doktormi Kelly a Wendel v roku 1991 s úspešnosťou anatomického uzavretia v 58%. [1] Prevalencia ochorenia sa pohybuje približne medzi 0,2–3,3 prípadov na 1000 obyvateľov. Medzi rizikové faktory možno zaradiť vek nad 65 rokov a ženské pohlavie (2,2:1). [2]

Patomechanicky je zaznamenaný vplyv tangenciálnych a anteroposteriorných trakčných síl na vitreoretinálnom rozhraní, pričom významnú úlohu zohráva stav zadnej sklovcevej membrány. [3]

Diagnostika sa opiera o oftalmoskopiu a optickú koherentnú tomografiu, ktorá umožňuje posúdenie anatomických pomerov, presné meranie parametrov diery, hodnotenie štrukturálnych zmien. V súčasnosti sa na hodnotenie dier makuly používa klasifikácia, ktorú prezentovala The International Vitreomacular Traction Study Group, prípadne klasifikácia predložená v štúdiu CLOSE, ktorá zohľadňuje aj na chirurgické výsledky na základe veľkosti dier a chirurgických postupov. [4,5]

Cieľom liečby je uvoľnenie trakčných síl a dosiahnutie anatomického uzáveru diery pomocou metódy PPV s peelingom vnútornej limitujúcej membrány (MLI) a použitím intraokulárnej tamponády. V minulosti boli prezentované rôzne inovatívne chirurgické postupy, ktoré v niektorých skupinách pacientov zvýšili anatomickú úspešnosť uzáveru FTMH až na 98%. [6] Priaznivý anatomický výsledok operácie je predpokladom priaznivého funkčného výsledku, kedy v pooperačnom období dochádza k zlepšeniu najlepšie korigovanej centrálnej zrakovkej ostrosti (NKCZO) zmenšeniu až vymiznutiu centrálneho skotómu. [7]

Materiál a metódy

Práca predstavuje prospektívne sledovanie súboru pacientov s idiopatickou makulárnou dierou. Do súboru bolo zaradených 9 pacientov (2 muži, 7 žien). Operačný postup zahŕňal 25-

gauge PPV, peeling vnútornej limitujúcej membrány a aplikáciu vzduchovej tamponády s pooperačným polohovaním. V prípade neuzavretia diery bola indikovaná reoperácia cestou PPV s masážou okrajov diery a použitím plynovej tamponády expanzným plynom C3F8 v koncentrácii 16%.

Primárnym cieľom bolo zhodnotiť úspešnosť uzáveru FTMH po PPV s peelingom MLI a vzduchovou tamponádou bez ohľadu na veľkosť diery.

Hodnotené boli anatomické výsledky (uzáver diery) a funkčné výsledky vyjadrené NKCZO 6 mesiacov po operácii. Súčasťou analýzy boli aj morfologické indexy makulárnej diery. Index makulárnej diery (z angl. Macular hole index - MHI) označuje pomer výšky diery makuly k priemeru bázy. Hodnota MHI väčšia ako 0,5 má lepšiu prognózu. [8] Index trakčnej diery (z angl. Tractional hole index – THI) udáva pomer maximálnej výšky diery makuly k minimálnemu priemeru. Poukazuje na vertikálnu trakciu alebo hydratáciu sietnice. Index THI väčší ako 1,41 naznačuje lepšiu prognózu uzáveru. [9]

Vzhľadom na malý počet pacientov nebolo realizované rozsiahlejšie štatistické spracovanie a výsledky boli hodnotené deskriptívne.

Výsledky

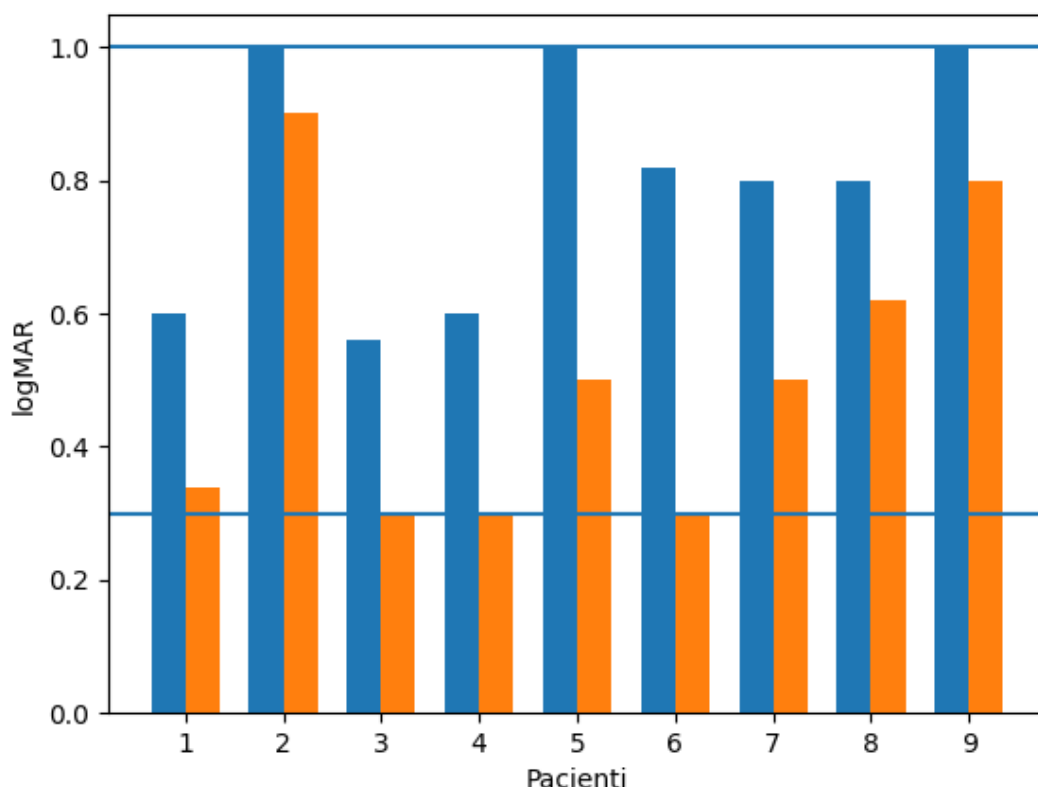
Úspešnosť anatomického uzáveru v celom sledovanom súbore bola 77,78%. U dvoch pacientov bol pozorovaný anatomický neúspech po primárnej operácii. Títo pacienti sa rozmerom minimálneho vnútorného diametra radili medzi najväčšie FTMH v sledovanom súbore. Nálezy oboch pacientov boli riešené sekundárnou operáciou, ktorá u oboch pacientov priniesla želaný anatomický uzáver diery makuly. Títo pacienti mali zároveň nepriaznivé prognostické faktory podľa hodnotených indexov. (Tabuľka č.1)

Tab.1: Anatomické parametre sietnice a jej zmeny po operácii

Pacient	Base diameter (μm)	Min. inner diameter (μm)	Výška (μm)	MHI	THI	MHI po 1.OP	THI po 1.OP
1	1304	400	608	0,47	1,52	-	-
2	786	519	353	0,45	0,68	-	-
3	578	193	390	0,67	2,02	-	-
4	578	281	338	0,58	1,20	-	-
5	1156	489	422	0,37	0,86	-	-
6	851	448	520	0,61	1,16	-	-
7	963	311	419	0,44	1,35	-	-
8	1527	564	474	0,31	0,84	0,30	1,11
9	1333	607	468	0,35	0,77	0,48	2,10
Priemery	1008,44	423,56	443,56	0,47	1,16	0,39	1,60

MHI – macular hole index, THI – tractional hole index, OP – operácia

Pacienti, zo sledovaného súboru, ktorých minimálny vnútorný diameter diery makuly mal veľkosť $\leq 550 \mu\text{m}$ dosiahli 100% úspešnosť uzáveru FTMH primárnou operáciou. Funkčné výsledky boli sledované NKCZO na Snellenových optotypoch. Zlepšenie NKCZO bolo zaznamenané u všetkých 9 pacientov (100 %). Zlepšenie o 5–10 písmen bolo prítomné u 3 očí (33 %) a zlepšenie o viac ako 10 písmen u 6 očí (67 %). (Graf č.1)



Graf.1: Funkčné zmeny NKCZO u pacientov pred a po operácii

LogMAR = logaritmickej škála zrakovéj ostrosti (0.0 = 100% zraková ostrosť; 0.3 = hranica čítacej zrakovéj ostrosti, 1.0 = hranica praktickej slepoty)

Diskusia

Výsledky tejto práce sú v súlade s publikovanými štúdiami, ktoré poukazujú na porovnateľnú účinnosť vzduchovej tamponády s dlhodobou pôsobiacimi plynmi pri dierach makuly menších ako $400 \mu\text{m}$. [10] Veľkosť diery sa ukazuje ako kľúčový prognostický faktor úspešnosti liečby. Kombináciou operačnej techniky PPV s premostením makulárnej diery ILM a pooperačným polohovaním možno dosiahnuť lepšiu úspešnosť anatomického uzáveru u skupín pacientov s veľkosťou diery nad $400 \mu\text{m}$. [5]

K anatomickému uzáveru FTMH dochádza vo väčšine prípadov (58.3-92%) už v 1. deň po PPV s peelingom ILM a pooperačným polohovaním. Na základe výsledkov sa nepredpokladá výraznejší prínos dlhšieho pooperačného polohovania ako 2-3 dni v závislosti od skupín autorov. [10,11] Z tohto dôvodu je otázny benefit dlhšie trvajúcich expanzných plynov,

1 nakoľko prispievajú k rozvoju katarakty, zvýšeného očného tlaku v pooperačnom období
2 a v neposlednom rade sú zdrojom funkčného diskomfortu pacienta a neskoršej zrakovej
3 rehabilitácie. [10]

4 Obmedzením štúdie je malý počet pacientov, ktorý neumožňuje štatistické závery. Napriek
5 tomu možno konštatovať, že PPV s peelingom MLI, vzduchovou tamponádou a pooperačným
6 polohovaním pacienta je efektívna chirurgická technika, ktorá má svoje zastúpenie najmä pri
7 dierach makuly do 400 µm.

8 Na základe výsledkov práce možno odporučiť individuálny prístup k voľbe tamponády a
9 chirurgickej techniky v závislosti od veľkosti diery a prítomnosti prognostických faktorov.

11 Referencie

- 12 1. Kelly NE, Wendel RT. Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study. Arch
13 Ophthalmol. Chicago, Ill. : 1960; 1991;109:654–9.
14 <https://doi.org/10.1001/archopht.1991.01080050068031>
- 15 2. McCannel CA, Ensminger JL, Diehl NN, Hodge DN. Population-based incidence of macular
16 holes. Ophthalmology. 2009;116:1366–9. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.01.052>
- 17 3. Ito Y, Terasaki H, Suzuki T, Kojima T, Mori M, Ishikawa K, et al. Mapping posterior vitreous
18 detachment by optical coherence tomography in eyes with idiopathic macular hole. American
19 Journal of Ophthalmology. Elsevier; 2003;135:351–5. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01944-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01944-X)
- 20 4. Duker JS, Kaiser PK, Binder S, de Smet MD, Gaudric A, Reichel E, et al. The International
21 Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction, and
22 macular hole. Ophthalmology. 2013;120:2611–9.
23 <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.07.042>
- 24 5. Rezende FA, Ferreira BG, Rampakakis E, Steel DH, Koss MJ, Nawrocka ZA, et al. Surgical
25 classification for large macular hole: based on different surgical techniques results: the
26 CLOSE study group. Int J Retina Vitreous. 2023;9:4. <https://doi.org/10.1186/s40942-022-00439-4>
- 27 6. Michalewska Z, Michalewski J, Adelman RA, Nawrocki J. Inverted internal limiting membrane
28 flap technique for large macular holes. Ophthalmology. 2010;117:2018–25.
29 <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.02.011>
- 30 7. Krásnik V., Strmeň P., Javorská L. Dlhodobé sledovanie zrákových funkcií po anatomicky
31 úspešnej chirurgickej liečbe idiopatickej diery makuly. [Long-term Follow up of Visual Functions
32 after Anatomical Successful Idiopathic Macular Hole Surgery]. Cesk Slov Oftalmol. 57:80–7.
- 33 8. Kusuhara S, Teraoka Escaño MF, Fujii S, Nakanishi Y, Tamura Y, Nagai A, et al. Prediction of
34 postoperative visual outcome based on hole configuration by optical coherence tomography
35 in eyes with idiopathic macular holes. Am J Ophthalmol. 2004;138:709–16.
36 <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2004.04.063>
- 37 9. Dai Y, Shen J, Li J, Jin X, Li Y. Optical coherence tomography predictive factors for idiopathic
38 macular hole surgery outcome. Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2013;49:807–11.
- 39 10. Veith M, Vránová J, Němčanský J, Studnička J, Penčák M, Straňák Z, et al. Surgical Treatment of
40 Idiopathic Macular Hole Using Different Types of Tamponades and Different Postoperative
41 Positioning Regimens. J Ophthalmol. 2020;2020:8858317.
42 <https://doi.org/10.1155/2020/8858317>
- 43 11. Eckardt C, Eckert T, Eckardt U, Porkert U, Gesser C. Macular hole surgery with air tamponade
44 and optical coherence tomography-based duration of face-down positioning. RETINA.
45 2008;28:1087. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318185fb5f>
- 46
- 47

23. Znížená funkcia obličiek je spojená s nižšou denzitou stavca L1 podľa oportunistickej počítačovej tomografie: porovnanie rôznych klinicky dostupných nástrojov

MUDr. Alexander Jančuška

(vnútorné choroby)

Spoluautori: Roman Králik¹, Juraj Payer¹, Martin Kužma¹

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Kužma, PhD

¹V. interná klinika, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Bratislava, Ružinov, Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Chronické ochorenie obličiek (CKD) predstavuje závažný celosvetový zdravotný problém so stúpajúcou prevalenciou. Jedným z najdôležitejších dôsledkov CKD je porucha minerálového a kostného metabolizmu, známa ako CKD-MBD (angl. „chronic kidney disease–mineral and bone disorder“ - CKD-MBD). Tento stav sa manifestuje prítomnosťou jedného alebo kombinácia nasledujúcich: abnormality metabolizmu vápnika, fosforu, vitamínu D alebo paratyroidného hormónu (PTH), poruchy kostného obratu, mineralizácie, objemu, pevnosti, vaskulárnej alebo inej kalcifikácie mäkkých tkanív [1]. Patofyziologicky je spôsobený retenciou fosfátu a zníženou renálnou hydroxyláciou vitamínu D, s následnou maladaptívnou dysreguláciou kalciumfosfátového metabolizmu prostredníctvom zvýšenej sekrécie parathormónu a fibroblastového rastového faktora 23 [2–4]. Tiež je prítomný priamy efekt uremických toxínov na kosť [5,6]. Hlavnými klinickými následkami sú výrazné zhoršenie kardiovaskulárneho zdravia následkom asociovaných vaskulárnych kalcifikácií a narušená kvalita kostí, čím významne zvyšuje riziko fraktúr [2,3,7,8]. Fraktúry, predovšetkým proximálneho konca stehnovkej kosti, často asociované s osteoporózou, sú významným celosvetovým problémom u starších ľudí, s významnou mortalitou, a dopadmi na celkové zdravie, mobilitu a kvalitu života [9,10]. U pacientov s CKD sú významne častejšie oproti zvyšku populácie, pričom tento rozdiel je výraznejší v strednom veku oproti starobnému [8,11–13], a vzhľadom na asociované komorbidity sú spojené s horšou prognózou [14–16].

Diagnostika zhoršenej kvality kostí u pacientov s CKD je dlhodobou problematická. Štandardná a najčastejšie používaná metóda na meranie hustoty kostí je denzitometria (duálna energetická röntgenová absorpciometria – DXA), ktorá v súčasnosti predstavuje základ pre diagnostiku osteoporózy ako aj monitorovanie liečby [17]. Existujú však neistota ohľadom jej spoľahlivosti u pacientov s CKD z viacerých dôvodov: napríklad nerozlišuje medzi kortikálnou a trabekulárnou kosťou, poskytuje iba informácie o množstve (hustote), nie o kvalite kostí, zmenách mikroarchitektúry a mechanických vlastnostiach kostného tkaniva. Tieto zmeny sú obzvlášť významné pri sekundárnych typoch osteoporózy, kam patrí aj CKD-MBD [18,19]. Jej výsledky môžu byť ovplyvnené aj artefaktmi – existujú náznaky, že prekrytie cievnych

1 kalcifikácií a kostí môže viesť k nadhodnoteniu nameranej hustoty kostí v oblasti lumbálnej
2 chrčtice [20], a preto sa u týchto pacientov navrhuje využívanie laterálnej lumbálnej DXA
3 namiesto klasickej anteroposteriórnej [21]. Napriek týmto obmedzeniam zatiaľ denzitometria
4 a zostáva zlatým štandardom aj pri pacientoch CKD najpoužívanejším nástrojom na
5 hodnotenie zdravia kostí [2,22,23].

6 Trabekulárne kostné skóre (TBS) je metrika založená na analýze textúry, ktorá zachytáva
7 priemernú mieru variácií odtieňov sivej na denzitometrických snímkach driekovej chrčtice.
8 Jeho nízka hodnota poukazuje na zhoršenú kvalitu kostí a mikroštruktúru, čo môže byť
9 užitočné najmä pri sekundárnych typoch osteoporózy vrátane CKD-MBD. Výsledky týkajúce sa
10 predikcie zlomenín u pacientov s CKD sú nejednoznačné — podľa viacerých štúdií je u nich TBS
11 nezávislým prediktorom zlomenín, zatiaľ čo podľa iných prináša len nevýznamné zlepšenie
12 predikcie pri pridaní k algoritmu FRAX [24–27]. Podľa nedávnej metaanalýzy u pacientov s
13 CKD, ktorí nepodstupujú dialýzu, pokles TBS predikoval výskyt zlomenín v univariačnej
14 analýze, avšak pri zlúčení údajov z multivariačných analýz zohľadňujúcich FRAX s meraniami
15 hustoty kostí sa zachoval len hranične významný trend (čo môže byť aj dôsledkom
16 heterogenity medzi štúdiami). Dôkazy u dialyzovaných pacientov ako aj u pacientov po
17 transplantácii obličky sú nejednoznačné, najmä pre nedostatok dostupných údajov [28].

18 Novšou a v súčasnosti málo známou metódou na detekciu zhoršenej kvality kosti je meranie
19 denzity stavca L1 pomocou tzv. oportunistických CT vyšetrení — teda CT vyšetrení indikovaných
20 z iných dôvodov. Ukázalo sa, že meranie hustoty z takýchto CT vyšetrení nevykazuje významné
21 rozdiely v porovnaní s meraniami z CT vyšetrení určených na tento účel [29]. Výhodou tohto
22 postupu je možnosť detekcie vysokého rizika zlomenín a zhoršeného zdravia kostí aj u
23 pacientov, u ktorých nebolo vôbec podozrenie na ochorenie kostí, a to bez dodatočnej
24 radiačnej a celkovej logistickej záťaže. Oportúnne CT vyšetrenia dokážu identifikovať
25 pacientov s krehkosťou kostí a vyšším rizikom zlomenín [30]. Existuje niekoľko metodík na
26 hodnotenie kvality kostí (hodnotenie plošnej/objemovej hustoty kostí, útlm obrazu, metóda
27 konečných prvkov) s rôznou predikčnou silou pre budúce zlomeniny [31]. V čase písania tejto
28 práce sa v databáze MEDLINE nenašli žiadne publikácie týkajúce sa oportunistickej CT a
29 zlomenín u pacientov s CKD, čo naznačuje potenciál pre budúci výskum.

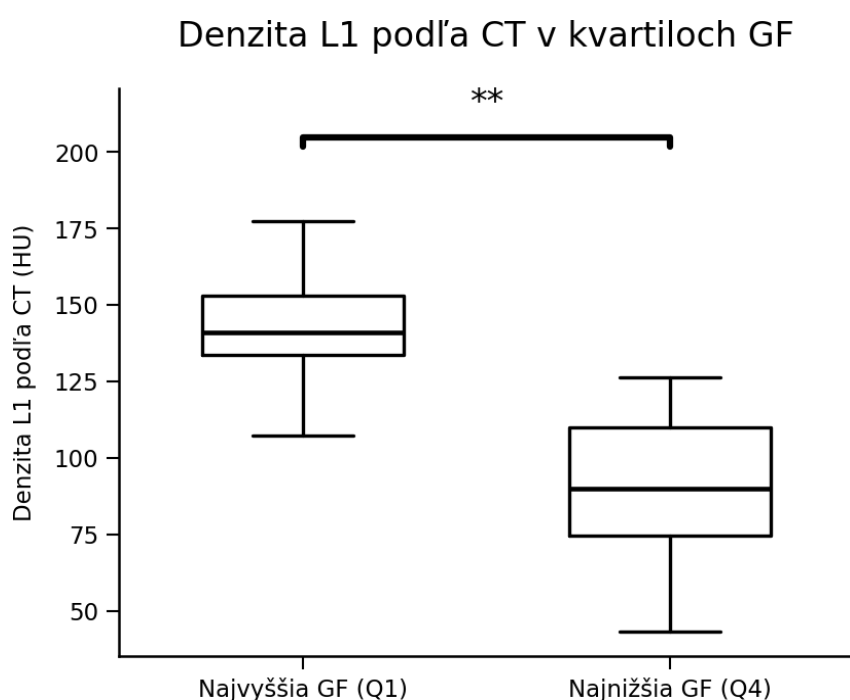
31 Metódy

32 Realizovali sme prierezovú štúdiu všetkých pacientov, ktorí absolvovali CT vyšetrenie so
33 zobrazením celého tela stavca L1, a tiež denzitometrické vyšetrenie a vyšetrenie odhadovanej
34 glomerulárnej filtrácie - eGFR (angl. “estimated glomerular filtration rate”) podľa vzorca CKD-
35 EPI v intervale do 6 mesiacov od CT vyšetrenia v priebehu 5 rokov v Univerzitnej Nemocnici
36 Ružinov. Hodnotili sa vzťahy medzi eGFR a kostnými parametrami: CT denzita stavca L1
37 vyjadrená v HU, BMD v oblasti lumbálnej chrčtice, krčku stehennej kosti a celého femuru,
38 trabekulárne kostné skóre (angl. „trabecular bone score“ - TBS) a parametre 3D DXA, kde boli
39 hodnotené trabekulárna a kortikálna volumetrická BMD, povrchová BMD a hrúbka kortikálnej
40 kosti. Pacienti boli analyzovaní podľa štádií CKD (podľa KDIGO) a zároveň boli podľa
41 príslušnosti do kvartilov podľa eGFR. V rámci štatistických metód sme použili Mann-
42 Whitneyho U test s Holmovou korekciou (neprispôsobené porovnanie) a multivariabilnú
43 lineárnu regresiu (bez aj s úpravou vzhľadom na vek a BMI).

1 Výsledky

2 Z celkového počtu abdominálnych a hrudníkových CT vyšetrení ($n = 29\,473$), z ktorých 280
 3 pacientov absolvovalo aj DXA vyšetrenie, bolo analyzovaných 134 pacientov, ktorí mali
 4 dostupné všetky DXA parametre pre femur aj lumbálnu chrbticu, hodnotu eGFR a plne
 5 zobraziteľné telo stavca L1 na CT. Z nich bolo 98 žien (73,1 %) a 36 mužov (26,9 %) s mediánom
 6 veku 66 rokov. Spomedzi všetkých kostných parametrov vykazovala densita L1 podľa CT
 7 signifikantný rozdiel medzi Q1 (priemer 145,6 HU) a Q4 (medián 92,2 HU, $p = 0,004$).
 8 Pozorované boli asociácie medzi eGFR a nasledujúcimi parametrami: CT densita L1 (Spearman
 9 $\rho = 0,308$, $p = 0,0009$), BMI (Spearman $\rho = -0,26$, $p = 0,0048$), vek (Spearman $\rho = -0,509$, $p <$
 10 $0,0001$). Po úprave vzhľadom na vek a BMI nebol zistený rozdiel v diskriminačnej schopnosti
 11 CT denzity L1 medzi štádiami CKD ani kvartilmi.

12



13

14

15 **Obrázok 1.** Vzťah medzi densitou tela stavca L1 podľa CT a umiestnením do kvartilov podľa eGFR
 16 (bez úpravy vzhľadom na BMI a vek). Boxplot zobrazuje medián a interkvartilové rozpätie. **
 17 značí stupeň štatistickej významnosti ($0,001 < p < 0,01$).

18

19 Diskusia

20 Výsledky tejto štúdie naznačujú, že densita stavca L1 meraná pomocou oportunistického CT
 21 odráža zmeny kostnej kvality naprieč kvartilmi lepšie než tradičné DXA parametre.

22 Tieto výsledky podčiarkujú významný potenciál vo využívaní oportunistického CT všeobecne,
 23 a tiež špecificky v populácii pacientov s CKD. Kostná densita meraná podľa CT vykazovala
 24 lepšiu diskriminačnú funkciu medzi prvým a posledným kvartilom CKD v porovnaní
 25 s tradičnejšími denzitometrickými parametrami, ktoré sú v súčasnosti považované za zlatý
 26 štandard, hoci po štatistickej úprave vzhľadom na veku a BMI nebol prítomný signifikantný
 27 rozdiel. Hlavnou limitáciou štúdie je predovšetkým obmedzený súbor pacientov, čo vedie

k nízkej reprezentácii jednotlivých subpopulácií CKD podľa štádií KDIGO. Oportunistické CT predstavuje bohatý a zatiaľ nedostatočne využívaný zdroj diagnostických údajov a vyžaduje ďalší výskum.

Referencie

1. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International*. Elsevier; 2006;69:1945–53. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000414>
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work Group. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease–mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney International Supplements*. 2017;7:1–59. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2017.04.001>
3. Cannata-Andía JB, Martín-Carro B, Martín-Vírgala J, Rodríguez-Carrio J, Bande-Fernández JJ, Alonso-Montes C, et al. Chronic kidney disease—mineral and bone disorders: pathogenesis and management. *Calcif Tissue Int*. 2021;108:410–22. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00777-1>
4. Fusaro M, Pereira L, Bover J. Current and emerging markers and tools used in the diagnosis and management of chronic kidney disease–mineral and bone disorder in non-dialysis adult patients. *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023;12:6306. <https://doi.org/10.3390/jcm12196306>
5. Fang Y, Ginsberg C, Seifert M, Agapova O, Sugatani T, Register TC, et al. CKD-induced Wingless/Integration1 inhibitors and phosphorus cause the CKD–mineral and bone disorder. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25:1760. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080818>
6. Nii-Kono T, Iwasaki Y, Uchida M, Fujieda A, Hosokawa A, Motojima M, et al. Indoxyl sulfate induces skeletal resistance to parathyroid hormone in cultured osteoblastic cells. *Kidney International*. 2007;71:738–43. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002097>
7. Górriz JL, Molina P, Cerverón MJ, Vila R, Bover J, Nieto J, et al. Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;10:654. <https://doi.org/10.2215/CJN.07450714>
8. Izzo C, Secondulfo C, Bilancio G, Visco V, Virtuoso N, Miglierino S, et al. Chronic kidney disease with mineral bone disorder and vascular calcification: an overview. *Life*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2024;14:418. <https://doi.org/10.3390/life14030418>
9. LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL, Lewiecki EM, Saag KG, Singer AJ, et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2022;33:2049–102. <https://doi.org/10.1007/s00198-021-05900-y>
10. Shen Y, Huang X, Wu J, Lin X, Zhou X, Zhu Z, et al. The Global Burden of Osteoporosis, Low Bone Mass, and Its Related Fracture in 204 Countries and Territories, 1990-2019. *Front Endocrinol [Internet]*. Frontiers; 2022 [cited 2026 Apr 7];13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.882241>
11. Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney International*. 2000;58:396–9. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00178.x>
12. Moe SM, Nickolas TL. Fractures in patients with CKD: time for action. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2016;11:1929. <https://doi.org/10.2215/CJN.09500916>
13. Goto NA, Weststrate ACG, Oosterlaan FM, Verhaar MC, Willems HC, Emmelot-Vonk MH, et al. The association between chronic kidney disease, falls, and fractures: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2020;31:13–29. <https://doi.org/10.1007/s00198-019-05190-5>

14. Kim TW, Lee S-M, Moon NH, Shin WC. Chronic kidney disease patients with intertrochanteric fracture have a high mortality rate. *Injury*. 2021;52:2350–5. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.05.045>
15. Fusaro M, Gallieni M, Jamal SA. Fractures in chronic kidney disease: neglected, common, and associated with sickness and death. *Kidney International*. 2014;85:20–2. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.302>
16. Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD, Bradbury BD, Robinson BM, Kerr PG, et al. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney International*. 2014;85:166–73. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.279>
17. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20:1185–94. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050304>
18. Lloret MJ, Fusaro M, Jørgensen HS, Haarhaus M, Gifre L, Alfieri CM, et al. Evaluating osteoporosis in chronic kidney disease: both bone quantity and quality matter. *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2024;13:1010. <https://doi.org/10.3390/jcm13041010>
19. Zheng C-M, Zheng J-Q, Wu C-C, Lu C-L, Shyu J, Yung-Ho H, et al. Bone loss in chronic kidney disease: Quantity or quality? *Bone*. 2016;87:57–70. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.017>
20. Campagnaro LS, Carvalho AB, Pina PM, Watanabe R, Canziani MEF. Bone mass measurement by DXA should be interpreted with caution in the CKD population with vascular calcification. *Bone Reports*. 2022;16:101169. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2022.101169>
21. Toussaint ND, Lau KK, Strauss BJ, Polkinghorne KR, Kerr PG. Determination and Validation of Aortic Calcification Measurement from Lateral Bone Densitometry in Dialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:119–27. <https://doi.org/10.2215/CJN.03410708>
22. Bucur RC, Panjwani DD, Turner L, Rader T, West SL, Jamal SA. Low bone mineral density and fractures in stages 3–5 CKD: an updated systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2015;26:449–58. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2813-3>
23. Gómez-Islas VE, García-Fong KR, Aguilar-Fuentes RE, Hernández-Castellanos S, Pherez-Farah A, Méndez-Bribiesca SA, et al. Evaluation of bone densitometry by dual-energy x-ray absorptiometry as a fracture prediction tool in women with chronic kidney disease. *Bone Reports*. 2020;13:100298. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100298>
24. Naylor KL, Prior J, Garg AX, Berger C, Langsetmo L, Adachi JD, et al. Trabecular bone score and incident fragility fracture risk in adults with reduced kidney function. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2016;11:2032. <https://doi.org/10.2215/CJN.00720116>
25. Brunerová L, Lažanská R, Kasalický P, Verešová J, Potočková J, Fialová A, et al. Predictors of bone fractures in a single-centre cohort of hemodialysis patients: a 2-year follow-up study. *Int Urol Nephrol*. 2018;50:1721–8. <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1958-y>
26. Poiana C, Dusceac R, Niculescu DA. Utility of trabecular bone score (TBS) in bone quality and fracture risk assessment in patients on maintenance dialysis. *Front Med*. 2022;8:782837. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.782837>
27. Kužmová Z, Kužma M, Gažová A, Kovářová M, Jackuliak P, Killinger Z, et al. Fibroblast growth factor 23 and klotho are associated with trabecular bone score but not bone mineral density in the early stages of chronic kidney disease: results of the cross-sectional study. *Physiol Res*. 2021;S43–51. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934773>
28. Bioletto F, Barale M, Maiorino F, Pusterla A, Fraire F, Arvat E, et al. Trabecular bone score as a marker of skeletal fragility across the spectrum of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2024;109:e1534–43. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad724>

29. Hopper KD, Wang MP, Kunselman AR. The use of clinical CT for baseline bone density assessment. *Journal of Computer Assisted Tomography*. 2000;24:896–9. <https://doi.org/10.1097/00004728-200011000-00015>
30. Aggarwal V, Maslen C, Abel RL, Bhattacharya P, Bromiley PA, Clark EM, et al. Opportunistic diagnosis of osteoporosis, fragile bone strength and vertebral fractures from routine CT scans; a review of approved technology systems and pathways to implementation. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal*. SAGE Publications; 2021;13:1759720X211024029. <https://doi.org/10.1177/1759720X211024029>
31. Acevedo JBH, Lenchik L, Weaver AA, Boutin RD, Wuertzer S. Opportunistic screening of bone fragility using computed tomography. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2024;28:620–7. <https://doi.org/10.1055/s-0044-1788816>

24. The Role of the Pineal Gland in Cardiovascular Health

Francesca Sulas

(PhD student at the University of Brescia, graduated from pharmacy)

Co-authors: Ivan Varga ², Simona Polakovičová ², Paulína Gálfiová ², Maria Lorencová ²,
Michal Palkovič ³, Zuzana Sirkovská ², Gaia Favero ^{1,4}, and Rita Rezzani ^{1,4}

Supervisor: Prof. Rita Rezzani, PhD ^{1,3}

¹ Department of Clinical and Experimental Sciences, Università degli Studi di Brescia, Italy ²
Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University in
Bratislava, Slovakia ³ Institute of Pathological Anatomy, Comenius University in Bratislava,
Slovakia ⁴ Interdepartmental University Center of Research Adaptation and Regeneration of
Tissues and Organs-(ARTO), Università degli Studi di Brescia, Italy

Introduction

The pineal gland is a small neuroendocrine organ located in the posterior part of the third ventricle [1,2]. It consists primarily of pinealocytes (95%), which are responsible for melatonin (MLT, N-acetyl-5-methoxytryptamine) production, along with scattered glial cells, including astrocytic and phagocytic subtypes [3,4]. It is also well documented that calcified hydroxyapatite concretions characterize the human pineal gland. They are called pineal calcifications, pineal sands, or *Acervuli cerebri*, and increase in size and number with age.

Recent findings have indicated the potential role of the pineal gland in cardiovascular mortality, as evidenced by the synthesis and secretion of melatonin (MLT) in many vertebrate species [5]. MLT is a neuroendocrine hormone essential for maintaining phase relationships among central and peripheral oscillators, thereby regulating circadian rhythms and the sleep–wake cycle in humans [1]. In addition, MLT is implicated in cardiovascular protection through its antioxidant and anti-inflammatory properties [6]. Patients with cardiovascular disease (CVD) frequently show disruptions of the sleep-wake cycle and reduced MLT levels [7]. Beyond its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties, MLT also plays a crucial physiological role in preserving endothelial cell integrity, thereby contributing to the prevention of atherosclerosis, the primary cause of mortality in CVDs [8].

However, whether structural and molecular differences exist in the pineal gland in relation to cardiovascular causes of death remains poorly understood.

Functional impairment of core clock gene family (PER1, PER2, and PER3) has been associated with dysregulation of blood pressure, sodium metabolism, and renal function [11,12]. Conversely, upregulation of PER1 mRNA expression appears to enhance antioxidant and anti-inflammatory mechanisms by activating rhythmic genes, such as sirtuin 1 (SIRT1) [13].

In the nervous system, PER1 also plays an important role in sleep homeostasis. Neuropeptide Y (NPY), which is co-localized with noradrenaline in most sympathetic nerve fibers, may indirectly influence MLT secretion in the human pineal gland [15]. NPY has been shown to

modulate circadian responses to light and increase PER1 mRNA expression [16], further supporting the interaction between sympathetic signalling and molecular clock regulation. Ziegler et al. [7] reported decreases in some neuro-factors, including NPY, in humans and in an animal model of CVD.

Reduced PER1 expression has also been linked to overexpression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) [17]. MMP-9 is a key mediator of extracellular matrix remodelling, inflammation, and cardiovascular pathology. It cleaves denatured collagens, activates cytokines and growth factors, modulates chemokines, and functions in the processing of cell receptors. While MMP-9 plays physiological roles in bone remodelling, angiogenesis, and remyelination, it also participates in inflammation, neurodegeneration, cardiovascular disease, and autoimmune disorders.

Despite these findings, data on the human pineal gland in the context of cardiovascular pathology remain limited. Therefore, further investigation into the expression patterns and interactions of PER1, NPY, and MMP-9 in the pineal gland may provide new insights into the pathogenesis of cardiovascular diseases.

The present study aims to compare the morphology and the expression of selected molecular markers in pineal glands, right atrium, left ventricle, and aortic arch obtained from donors who died of cardiovascular causes versus those from donors who died of non-cardiovascular causes, to identify potential structural and molecular differences associated with cardiovascular pathology, thereby contributing to a better understanding of the involvement of the pineal gland in cardiovascular disease.

Methods

This study was conducted on human pineal glands, aortic arches, left ventricles, and right atria collected from donors aged between 55 and 95 years, provided by the Faculty of Medicine of Comenius University in Bratislava (Slovakia). It was approved by the ethical committee No 1/2026 Medical Faculty Comenius University and Old Town University Hospital in Bratislava.

Cadaveric donors were divided into two experimental groups based on the cause of death: (1) individuals who died from cardiovascular diseases and (2) individuals who died from causes unrelated to cardiovascular conditions.

For light microscopy, samples were formalin fixed – paraffin embedded by using routine protocols. Pineal glands were cut in the sagittal plane into 7 µm serial sections, while the walls of the left ventricles, the aortic arch, and the right atrium were cut transversally into 5 µm serial sections.

Samples for Scanning Electron Microscopy (SEM) were cut by an extra-sharp razor blade or placed on dry ice (solid carbon dioxide) for further freeze-fracturing aimed to expose the internal structure in a mixture of dry ice and acetone. After fracturing or cutting, samples were fixed in 3 % glutaraldehyde solution in phosphate buffer (pH 7.2–7.4) for 4 hours. After rinsing in a buffer solution, a post-fixation was performed in a 1 % buffered solution of osmium tetroxide for a duration of 2 hours. Then, samples were carefully dehydrated using a graded ethanol series up to absolute ethyl alcohol. The displacement of alcohol and drying of the sample without changing the surface tension were achieved by the critical point drying (CPD) method, using Leica CPD 300 machine. After the sample was dried, it was mounted on a conductive stub using adhesive carbon tape, and a conductive gold–palladium layer with a

thickness of 15 nm was applied, using the Leica EM ACE 200 sputter coater. Surfaces of the samples were then examined with a ZEISS EVO LS 15 scanning electron microscope at the Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava. Morphological and immunohistochemical analyses were performed on paraffin-embedded sections. For morphological evaluation, sections were stained with hematoxylin–eosin, trichrome (aniline blue), reticular fiber impregnation according to Lillie, neurofibrils impregnation according to Holmes, and luxol blue with nuclear red staining. For immunohistochemistry, sections will be incubated with primary antibodies against NPY5R, MMP9, and PER1. Double immunostaining will be performed using PGP9.5 in combination with a neuroendocrine cell marker (chromogranin A, NSE, CD56, or synaptophysin, selected based on optimal performance), following standard protocols.

Results

The pineal gland was observed by SEM, revealing the presence of calcifications (Figure 1A-C), pinealocytes, and the surrounding nerve fibers (Figure 1D).

Figure 1. Scanning electron micrographs of the pineal gland at different magnifications. (A), (B) and (C) illustrate pineal sands (Acervuli cerebri). (D) Higher magnification of a pinealocyte and the nerve fibers surrounding it.

Preliminary morphological analyses were performed on paraffin-embedded sections using hematoxylin–eosin, nerve fiber impregnation (Holmes; Figure 2A), luxol blue with nuclear red staining (Figure 2B), reticular fiber impregnation (Lillie, Figure 2C), and trichrome with aniline blue (Figure 2D) staining. These stainings allowed the identification of the general architecture of the pineal gland, highlighting cellular organization, connective components, reticular framework, and nerve fiber distribution.

At this stage, the findings are descriptive and qualitative, as quantitative and immunohistochemical analyses are still ongoing. Despite appropriate negative (Figure 3A-C) and positive (Figure 3D-F) controls, which confirmed the reliability of the assay, immunohistochemical analysis for chromogranin A was negative (Figure 3G-I); however, further analyses with additional neuroendocrine cell markers will be performed to achieve a more comprehensive evaluation.

Further results will clarify the expression patterns of the investigated markers and their potential relationships with the observed morphological features.

Figure 2. Photomicrographs of the pineal gland stained with special staining. (A) neurofibrils impregnation according to Holmes, (B) luxol blue with nuclear red staining, (C) reticular fiber impregnation according to Lillie, and (D) trichrome with aniline blue staining.

Figure 3. Photomicrographs of immunohistochemical analysis with chromogranin A. (A-C) Human colon (negative control). (D-F) Human colon (positive control). (G-I) Pineal gland. Red stars indicate immunopositivity. BS, brain sand.

Discussion

The present preliminary findings provide descriptive evidence of overall pineal gland architecture, while highlighting the need for more in-depth molecular characterization to elucidate its potential involvement in CVD.

A key aspect emerging from previous studies is the functional link between pineal activity, MLT secretion, and cardiovascular regulation. In this context, the disruption of pineal signalling observed in CVD patients may contribute to disease progression through impaired circadian regulation, oxidative stress, and endothelial dysfunction. In particular, the study by Ziegler et al. [7] demonstrated that CVD is associated with immune-mediated denervation of the pineal gland, leading to reduced neuropeptide signalling and altered MLT levels. This mechanism may explain, at least in part, the sleep disturbances and circadian misalignment frequently observed in patients with CVD.

Our investigation extends this concept by focusing not only on functional aspects but also on potential structural and molecular alterations within the pineal gland. Although no definitive morphological differences have yet been quantified, the integration of immunohistochemical analyses will be crucial to determine whether alterations in markers such as PER1, NPY, and MMP-9 reflect early or late events in cardiovascular pathology.

The circadian clock gene PER1 represents a particularly relevant molecular link between pineal function and cardiovascular health. Its role in regulating blood pressure, renal function, and inflammatory responses suggests that altered PER1 expression within the pineal gland could

contribute to systemic dysregulation. Moreover, given that PER1 expression can be modulated by neuropeptides such as NPY, changes in sympathetic innervation—as described by Ziegler et al. [7]—may have downstream effects on molecular clock integrity.

In parallel, the evaluation of MMP-9 expression may provide insight into extracellular matrix remodelling and inflammatory processes. Increased MMP-9 activity has been widely associated with cardiovascular remodelling and plaque instability, and its potential upregulation in the pineal gland could indicate an involvement of this organ in systemic inflammatory signalling.

The present study is limited by its preliminary nature and the lack of quantitative data. Future investigations should focus on correlating morphological findings with molecular marker expression and functional outcomes to determine whether pineal alterations represent causative factors, secondary effects, or adaptive responses in CVD.

Acknowledgement: The author would like to thank Prof. Rita Rezzani for her supervision, Prof. Ivan Varga and his research group for providing the samples and for their invaluable support, and Dr. Michal Palkovič.

Funding: Funded by the European Union-NextGeneration EU, Mission 4 Component 1 CUP D82B24001750008.

References

- 1.
2. 1. Kitkhuandee A, Sawanyawisuth K, Johns NP, Kanpittaya J, Johns J. Pineal Calcification Is Associated with Symptomatic Cerebral Infarction. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2014;23:249–53.
3. 2. Dahrán N, Ghonimi W. Cyto differentiation of pinealocytes (I and II) and astrocyte types of mature male sheep epiphysis cerebri with special emphasis on the presence of neuronal and pigmented like cells. *Open Vet J*. 2023;13:206.
4. 3. Arendt J, Aulinas A. Physiology of the Pineal Gland and Melatonin. In: Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2025 Sept 10].
5. 4. Wang SG, Tsao DD, Vanderpool KG, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI. Connexin36 localization to pinealocytes in the pineal gland of mouse and rat. Bolam P, editor. *Eur J of Neuroscience*. 2017;45:1594–605.
6. 5. Reiter RJ, Sharma R, Chuffa LG de A, Simko F, Dominguez-Rodriguez A. Mitochondrial Melatonin: Beneficial Effects in Protecting against Heart Failure. *Life (Basel)*. Basel, Switzerland; 2024;14:88.
7. 6. Cosentino C, Amaral FGD, Campos LA, Gentil F, Neto OP, Cappellano AM, et al. Human Pinealectomy Syndrome and the Impact of Melatonin Replacement Therapy: 1-Cardiovascular Function. *Journal of Pineal Research*. 2025;77:e70045.
8. 7. Ziegler KA, Ahles A, Dueck A, Esfandyari D, Pichler P, Weber K, et al. Immune-mediated denervation of the pineal gland underlies sleep disturbance in cardiac disease. *Science*. 2023;381:285–90.
9. 8. Luo R, Yang Z, Liang W, Chen Y, Jie Y, Zhang Y, et al. Diurnal Variation in Melatonin-Mediated Cardiac Protection via Per2 Expression in Heart. *Journal of Pineal Research*. 2025;77:e70036.
10. 9. Crnko S, Du Pré BC, Sluijter JPG, Van Laake LW. Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:437–47.

11. 10. Zhao Y, Li Y, Lu T, Huang X, Chen K, Tan L, et al. Research progress on the role and mechanism of circadian clock gene PER1 in the occurrence and development of multiple diseases. *Front Immunol.* 2025;16:1715457.
12. 11. Costello HM, Juffre A, Cheng K-Y, Bratanatawira P, Crislip GR, Zietara A, et al. The circadian clock protein PER1 is important in maintaining endothelin axis regulation in Dahl salt-sensitive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2023;101:136–46.
13. 12. Zietara A, Spires DR, Juffre A, Costello HM, Crislip GR, Douma LG, et al. Knockout of the Circadian Clock Protein PER1 (Period1) Exacerbates Hypertension and Increases Kidney Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertension.* Dallas, Tex. : 1979; 2022;79:2519–29.
14. 13. Zhang B, Wang C, Guo M, Zhu F, Yu Z, Zhang W, et al. Circadian Rhythm-Dependent Therapy by Composite Targeted Polyphenol Nanoparticles for Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *ACS Nano.* 2024;18:28154–69.
15. 14. Emekli R, İsmailoğullari S, Bayram A, Akalin H, Tuncel G, DüNDAR M. Comparing expression levels of PERIOD genes PER1, PER2 and PER3 in chronic insomnia patients and medical staff working in the night shift. *Sleep Med.* 2020;73:101–5.
16. 15. Møller M, Phansuwan-Pujito P, Badiu C. Neuropeptide Y in the Adult and Fetal Human Pineal Gland. *BioMed Research International.* 2014;2014:1–7.
17. 16. Gamble KL, Paul KN, Karom MC, Tosini G, Albers HE. Paradoxical effects of NPY in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J of Neuroscience.* 2006;23:2488–94.
18. 17. Li H-X, Fu X-J, Yang K, Chen D, Tang H, Zhao Q. The clock gene PER1 suppresses expression of tumor-related genes in human oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:20574–83.

Obsah

Adam Lukáč	9
Viktória Palkechová, Clara Anna Irmgard Schrey	16
Patrik Krhút, Samuel Palkovič	23
Karol Babčan.....	26
Timotej Filip Janáč	34
Benjamin Mimler	41
Lukáš Duroška.....	48
Natália Zorgovská	53
Matúš Lehoťák.....	61
Barbora Blštáková	66
Robert Kovács.....	75
Peter Bakič, Martina Šimková	82
Viktoriia Tiahur	90
Mgr. Letícia Hudecová.....	94
Mgr. Emil Bečka	101
MUDr. Klára Hodálová.....	107
Mgr. Filip Baran	113
Iryna Vikhrova	121
MUDr. Datseri Rafaella.....	125
MUDr. Daniel Havalda.....	129
MUDr. Dana Dudová	135
MUDr. Peter Kadlic.....	140
MUDr. Alexander Jančuška	144
Francesca Sulas.....	150

Zborník študentských vedeckých prác 2026
64. fakultná konferencia študentskej vedeckej odbornej činnosti
21. vedecká konferencia doktorandov LF UK

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2026
Za jazykovú korektúru (jazykovú a gramatickú stránku príspevku) zodpovedajú autori
Práce boli posúdené v nezávislom recenznom konaní.

Technická redakcia, návrh obálky:

Rozsah 158 strán, 9,6 AH, prvé vydanie
Vyšlo ako elektronická publikácia

ISBN