

2015

newslab

časopis laboratórnej medicíny

ISSN 1338-9661
Ročník II.

GENETIKA

- Doba laboratórna
- Odysea čítania DNA
- Komparatívna genómová hybridizácia: úvod do metodiky
- Sekvenovanie novej generácie a jeho využitie v klinickej genetike

BIOCHÉMIA

- Stanovenie stopových prvkov v krvnom sére
- Stanovenie α -tokoferolu (vitamín E) v sére kvapalinovou chromatografiou s trojitým kvadрупólom (LCMSMS)
- Analýza močových konkrementov a jej cesta do Európy

IMUNOLÓGIA

- Nové autoprotilátky v diagnostike autoimunitných myopatií
- Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení prognostických markerov CD38 a ZAP-70 u pacientov s B-CLL

CYTOLÓGIA A PATOLÓGIA

- Mucinózne karcinómy ovária – novinky v diagnostike z pohľadu patológa

U KONTO ZADARMO NA 10 ROKOV

Najväčšie hity v novom štýle

☎ *1111

www.unicreditshop.sk



00:00 €

Výbery z akýchkoľvek bankomatov
doma i po celom svete

00:00 €

Štandardné SEPA platby
cez elektronické bankovníctvo

00:00 €

Mesačné spravovanie konta

00:00 €

Medzinárodná platobná karta

00:00 €

Online Banking a Smart kľúč

**NAVYŠE
SMARTFÓN
ZADARMO**



Stačí si mesačne posielat' príjem aspoň 400 €*.

Život je plný úspechov aj pádov.
S nami zvládnete oboje.

Vitajte v
UniCredit Bank

Garancia podmienok – Banka týmto Klientovi zaručuje poplatkové zvýhodnenie po dobu 10 rokov od uzatvorenia zmluvy, pokiaľ bude Majiteľ konta spĺňať stanovenú podmienku pre tento typ produktu. *Pri nedodržaní mesačného limitu došlej platby najmenej vo výške 400 € je konto spoplatnené. Výška poplatku sa môže zmeniť v závislosti od vývoja miery inflácie v SR; požadovaná výška minimálneho mesačného príjmu posielaného na účet sa môže zmeniť v závislosti od vývoja priemernej mzdy v SR. Smartfón môže získať fyzická osoba, nepodnikateľ, ktorá poskytne UniCredit Bank Marketingový súhlas, uzavrie s Bankou Zmluvu o KTK, dovŕšila 27 rokov, nie je zamestnancom skupiny UniCredit a nedostala smartfón od UniCredit Bank v rámci ponuky iného alebo rovnakého produktu a v období odo dňa 28. 11. 2014 po Doby trvania Akcie nemala s Bankou platne uzatvorenú žiadnu inú zmluvu o účte.



Genetika sa nerodila ľahko, veď pozorovanie o prenose vlastností rodičiek na potomstvo sa označilo slovom *babičnosť* najprv obrazne. Vlastnosti rodičiek sa prejavujú u dieťaťa „ako keby ich zbabilo“, podobne ako sa zbabí šperk alebo byt. Babičné znaky sú u rodičiek uložené vo forme génov, ktoré sa po jednom od oboch rodičiek spoja v dieťati. Génové faktory súperia, ktorý z nich sa u dieťaťa prejaví ako vlastnosť.

Výsadou vedkyne je žasnúť. Vývin v oblasti genetiky je však neuveriteľne rýchly a množstvo aj kvalita poznatkov narastá tak, že aj vedkyňa sotva stíha žasnúť. Sú chvíle, kedy sa vedkyne na to všetko pozerajú spolu s laickou verejnosťou s neskrývaným prekvapením. Ale vedkyne spája s ostatnými predovšetkým úzkosť z nepoznanej budúcnosti ľudstva a obava, že by sa to všetko nové, krásne a nádejné mohlo vymknúť z rúk, zneužiť a spraviť pre nasledujúce generácie sci-fi peklo na Zemi.

Naše pravnúčatá zbabia po nás v mnohom nejasnú ľudskú perspektívu a musíme na to pripravovať seba aj ich. Nielen technicky, to ide akosi samo od seba. Sú v tom peniaze, túžba po poznaní, moc, prestíž, sláva, sebarealizácia – nič to nezastaví. Musíme sa pripraviť aj ľudsky, mali by sme sa pokúsiť dozrieť skôr, než bude neskoro. Musíme sa naučiť milovať bezpodmienečnou láskou svoje prečudesné potomstvo, ktoré bude od nás odlišnejšie ako sa my líšime od neandrtáliek. Treba však splniť predpoklad, že nezničíme sami seba skôr, než toto všetko dokážeme uskutočniť. Nepoznám legislatívnu iniciatívu, ktorá by chcela trend objavov v genetike zastaviť, krajiny, ktoré najviac investujú, ho podporujú na úrovni štátneho rozpočtu a považujú to za národný záujem. Je tu skôr neustály pokus fúkať na studené, aby sa nestalo, že to niekto zneužije, stále nástoľčivo znie otázka, či sa dá a priori zabrániť tomu, aby niekto výskum nezneužil.

O budúcnosti sa najľahšie hovorí retrospektívne, ktorá čo kedy mala mohla, alebo nemohla inak. Historičky ako prorokyne minulosti, to majú oproti genetikám ľahšie. Nech sa mi historičky raz smejú, ale tipujem, že deti narodené v tomto storočí sú posledné, ktoré sa budú na nás podobáť. Ľudské gény sa už nebudú meniť spontánnou evolúciou pod tlakom prirodzeného výberu, ale cieľenými inžinierskymi postupmi. Vydržíme viac chladu aj hladu, budeme starnúť pomalšie, mnohé choroby budeme liečiť preprogramovaním génov. A, predovšetkým, zmení sa naša mentálna výkonnosť. Budeme si pamätať viac ako univerzitné knižnice a budeme myslieť rýchlejšie ako dnešné počítače. Možno napokon úplne opustíme telá a vesmír osídlime ako rozmnožujúci sa a mysliaci kozmický prach.

Kým neporozumieme vzťahu medzi génmi a vedomím, slobodnou voľbou a zodpovednosťou, osobným šťastím a spoločným blahom, celá *babičnosť* je nám nanič. Vedkyne, ktorých životnou náplňou je etika, právo alebo náboženstvo sa vo väčšine prípadov domnievajú, že ich profesionálny prístup je sám osebe zárukou morálnejšieho náhľadu bez toho, že by rozumeli profesionálnemu prístupu tvrdých vied. Vo väčšine prípadov si genetičky naopak myslia, že ich odborný a profesionálny prístup s určitým doplnkovým vzdelaním či diskusiami o etike ich privádza k tomu, aby svoje vedomosti aplikovali rozumne, spravodlivo, správne a morálne. A tu vznikajú mnohé nedorozumenia. Bez genetických, chemických a bioinformatických genetickú informáciu neprečítame. Prikladáme písmenku ku písmenku a vetu k vete. Hoci sa dnes zdá, že s génmi a *babičnosťou* si vystačíme aj pre biologický základ aj pre kultúrnu nadstavbu, predsa sú nahromadené slovíčka iba povrch, abeceda a prvoplánová časť poznania. Bez historičiek, kultúrologičiek, antropologičiek, sociologičiek, jazykovedkýň, filozofiek a duchovedkýň nebudeme vedieť, čo chcela tým textom básnička povedať.

MUDr. Peter Križan, CSc.
odborný garant pre genetiku
Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**

EDITORIÁL

Úvodné slovo	3
--------------	---

GENETIKA

Doba laboratórna	5
Odysea čítania DNA	7
Komparatívna genómová hybridizácia: úvod do metodiky	11
Sekvenovanie novej generácie a jeho využitie v klinickej genetike	15
Štúdium spoluúčasti genetických faktorov na diabetickej retinopatii	21

BIOCHÉMIA

Stanovenie stopových prvkov v krvnom sére	24
Stanovenie α - tokoferolu (vitamín E) v sére kvapalinovou chromatografiou s trojitým kvadrupólom (LCMSMS)	28
Analýza močových konkrementov a jej cesta do Európy	31

IMUNOLÓGIA

Nové autoprotilátky v diagnostike autoimunitných myopatií	34
Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení prognostických markerov CD38 a ZAP-70 u pacientov s B-CLL	39

MIKROBIOLÓGIA

Možnosti laboratórnej diagnostiky <i>Neisseria gonorrhoeae</i> a jej aktuálna rezistencia na antibiotiká	42
--	----

CYTOLÓGIA A PATOLÓGIA

CINtec PLUS – naše skúsenosti	45
Mucinózne karcinómy ovária – novinky v diagnostike z pohľadu patológa	47
Malígný steroid cell tumor vaječníka	51

PREHĽADOVÉ ČLÁNKY

Prístup slovenských žien k problematike rakoviny krčka maternice	55
--	----

**Ročník 2, 2015, číslo 1,
vychádza 2 x ročne
Dátum vydania: apríl 2015**

Redakčná rada:
Predseda:
MUDr. Anna Stecová, CSc.

Výkonné redaktorky:
Ing. Zuzana Kovalová
Mgr. Petra Austová
PhDr. Mária Žeglenová
MUDr. Katarína Vlniešková

Členovia:
MUDr. Peter Bohuš
MUDr. Eva Ďurovcová PhD.
RNDr. Ivana Hojsíková
MUDr. Ján Lazúr
MUDr. Peter Križan CSc.
RNDr. Marcela Popovňáková
MUDr. Katarína Schenková
RNDr. Elena Tíbenská, PhD.
MUDr. Peter Vereš

Vydavateľ:
SOLEN, s. r. o.,
IČO 35865211

**Sídlo vydavateľa a adresa
redakcie:**
SOLEN, s. r. o.,
Ambrova 5,
831 01 Bratislava,
tel.: 02/5465 1386,
fax.: 02/5465 1384,
redakcia@solen.sk

Redakcia:
Mgr. Miroslava Doubková

Grafická úprava:
Ján Kopčok

**Väčšina článkov prechádza
recenziou.**
**Registrácia MK SR
pod číslom EV 5164/15
ISSN 1338-9661
Čitačná skratka: Newslab**

Doba laboratórna

Vývoj laboratórnych techník na extrakciu nukleových kyselín

Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.¹, RNDr. Radka Tomášová¹, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.¹, RNDr. Ivana Hojsíková²

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP

²Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP

Úspešná izolácia nukleových kyselín a proteínov je základ mnohých laboratórnych genetických, biochemických, imunologických alebo mikrobiologických vyšetrení. V súčasnosti je k dispozícii široká škála extrakčných metód a výber tej správnej závisí od druhu a následného použitia cieľovej molekuly. V článku ponúkame historický prehľad vývoja jednotlivých metód a ich využitie v súčasnosti.

Kľúčové slová: nukleové kyseliny, izolácia DNA, história DNA.

Laboratory age

Basic assumption of many genetic, biochemical, immunological and microscopis methods is succesfull nucleic acid or protein purification. Wide range of different extraction methods is currently available and selection of the right one depends on the type and subsequent use of the target molecule. Here, we describe a historical overview of the development of various methods and their usage in present days.

Key words: nucleic acids, DNA isolation, DNA history.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 5–6

Úvod

Žijeme v modernej dobe laboratórnej, v dobe, ktorá nám otvára možnosti vstupovať čoraz hlbšie do sveta molekúl, produkovať v krátkom čase a na malom priestore obrovské množstvo údajov. V laboratórnej diagnostike v posledných desaťročiach zaznamenávame výrazný posun k automatizácii vyšetrovacích procesov, minimalizácii zariadení a počítačom asistovanej analýze. Tento stav je výsledkom snaženia mnohých známych výskumníkov aj bezmenných členov vývojových tímov.

Švajčiarsky lekár Friedrich Miescher (obrázok 1) v roku 1869 prvýkrát izoloval DNA. Nádej sa, že objaví fundamentálne princípy života a chemickú podstatu buniek. Spočiatku experimentoval s analýzou chemických látok (prevažne proteínov ako hlavnej zložky cytoplazmy) z leukocytov získaných z hnisavých obväzov. Zdokonaľovaním pokusov sa mu podarilo zistiť, že dokáže z roztoku pridaním kyseliny precipitovať dovtedy nepoznanú substanciu, opäť rozpustnú po pridaní alkalického látky. Zaznamenal, že táto substancia je bohatá na fosfor a vzhľadom na jej lokalizáciu v bunke ju nazval nukleín. V roku 1889 ju jeho žiak Richard Altman na podklade jej chemických vlastností premenoval na nukleovú kyselinu (NK) (1, 2).

Napriek nerozpoznanému významu nukleových kyselín sa v nasledujúcich rokoch o ne zvýšil záujem, zdokonaľovali sa izolačné a purifikačné techniky, ale až v roku 1935 sa ruskému vedcovi Andrejovi Nikolajevičovi Belozerskému podarilo izolovať čistú DNA, čím sa definitívne otvorila brána k poznaniu jej štruktúry a funkcie v organizme. Poznanie chemickej a fyzikálnej povahy nukleových kyselín znamenalo ďalší rozvoj izolačných techník (3).

Obrázok 1. Laboratórium Friedricha Mieschera na zámku Tübingen



Prebraté z http://www.tuepedia.de/index.php/Friedrich_Miescher

Môžeme konštatovať, že všetky historické metódy pretrvávajú, aj keď v upravenej podobe do súčasnosti. V roku 1958, v čase experimentov Meselsona a Stahla (dokázali semikonzervatívnu DNA) sa na extrahovanie DNA využívala hustotná gradientová centrifugácia, ktorá je v špeciálnych prípadoch a rôznych úpravách využívaná dodnes. Na izoláciu nukleových kyselín sa najčastejšie zaužívali dva prístupy – prvý (aj historicky), založený na roztokoch a druhý, založený na kolónkach (nosičoch). Výber vhodného protokolu podlieha predovšetkým potrebe množstva, kvality a druhu finálnej nukleovej kyseliny, ale aj kvantitatívnym, priestorovým, časovým a finančným pomerom (4).

Prvým krokom úspešnej izolácie NK je lýza buniek. Jej cieľom je uvoľniť obsah bunky (respektíve organel) pomocou jemných detergentov, prípadne ultrazvukom. Aby sa zabránilo degradácii cieľových molekúl, rozpad bunky prebieha v tlmivom roztoku a vhodných teplotných podmienkach. Na oddelenie cieľovej NK z roztoku bunkového obsahu sa využíva dočasná denaturácia – teplotná, vysolovacia metóda alebo zrážanie organickými rozpúšťadlami.

Kontamináciu DNA zvyškami RNA je možné jednoducho odstrániť pridaním enzýmu ribonukleázy.

Medzi jednoduchšie a historicky pôvodnejšie extrakčné prístupy patrí vysolovacia metóda založená na princípe zmeny rozpustnosti molekúl DNA v závislosti od zmeny koncentrácie iónov v roztoku (najčastejšie síranu amónneho). Ďalšou jednoduchou možnosťou je zrážanie organickými rozpúšťadlami (etanol, polyetylenglykol), ktoré sa uskutočňuje na základe ich schopnosti znížiť rozpustnosť NK (zvýšením intramolekulovej elektrostatickej interakcie). Rôzna rozpustnosť DNA sa využíva aj pri fenol-chloroformovej extrakcii. Jej podstatou je oddelenie vodnej fázy (s DNA) od roztoku

Obrázok 2. Moderné laboratórium v priestoroch MGA

obsahujúceho fenol a chloroform pomocou vysokootáčkovej centrifugácie, s následnou etanolovou precipitáciou DNA. Aj keď je táto metóda časovo náročná a závislá od kvality realizácie, je stále pomerne často využívaná pre jej finančnú nenáročnosť a vyššie výťažky DNA (4).

Metóda chromatografie na živicových kolónkach (RESIN, z angl. živica) využíva viazanie a následné uvoľnenie požadovanej substancie pomocou výmeny iónov medzi pevnou fázou a kvapalinou obklopujúcou pevnú fázu. Je to pomerne stará metóda (Thomas a Way, 1906), spočiatku využívaná v anorganickej chémii. Pôvodné prírodné materiály – sulfónované uhlie a zeolit, boli v polovici minulého storočia nahradené organickými iónomeničmi, ktoré sa používajú až do súčasnosti (aj v podobe komerčne dostupných kitov). Je to pomerne rýchla metóda s vysokým výťažkom a čistotou DNA (4, 5).

Metóda chromatografie na kremičitanových kolónkach (SILIKA matrice) je takisto pomerne stará, aj pri nej nahradil prírodný materiál – diatomit (rozsielková zemina), synteticky pripravený silikagél. Silika materiál (SiO_2) v prítomnosti chaotropných solí (jodid sodný, guanidín thiokyanát) adsorbuje DNA na svoj povrch, z ktorého je po opakovanom prečistení uvoľnená pomocou elučného činidla. Je to časovo nenáročná metóda s vysokou čistotou DNA a je takisto dostupná vo forme kitov (4).

Najmladšie metódy izolácie využívajú magnetické mikročastice alebo nanočastice. Majú jadro, tvorené magnetickými oxidmi železa, obalené látkou (organické polyméry, živice) umožňujúcou naviazanie cieľových objektov, napríklad NK. Princípom je separácia takýchto magnetických partikul pôsobením silného magnetu, ich následné premývanie a uvoľnenie NK z komplexu (obrázok 3). Aj v tomto prípade je dostupných niekoľko kitov, ktoré umožňujú pomerne v krátkom čase získať DNA nekontaminovanú proteínmi alebo RNA. Keďže táto metóda nevyžaduje manipuláciu so škodlivými organickými rozpúšťadlami, opakovanú centrifugáciu, filtráciu vo vákuu alebo kolónkovú separáciu, je ideálna na automatizovanú separáciu. Izolačné automaty zabezpečia v krátkom čase a štandardných podmienkach spravidla väčšie množstvo vzoriek, preto sú ideálne v rutinných aj výskumných laboratóriách. Ich nevýhodou je finančná náročnosť (inštrument, špeciálne plasty, kity) (4, 6).

Medzi moderné prístupy patrí aj rýchla extrakcia DNA prostredníctvom FINA diskov. Pre jej jednoduchosť a vysoký stupeň analytickej senzibility je ľahko uskutočniteľná i v odľahlejších lokálnych zdravotných centrách

Obrázok 3. Princíp separácie pomocou magnetických partikul. Bunky zo vzorky v reakčnej nádobe sú rozrušené pomocou lyzačného pufru. Účinkom proteínázy K dochádza k degradácii proteínov. Po pridaní sklenených magnetických častíc dôjde na ich povrchu k naviazaniu NK. Nasleduje premývanie sekvencia a záverečné oddelenie magnetických guľôčok. Izolovaná NK je v elučnom roztoku premiestnená do jednorazovej platničky.



(napríklad v Afrike). Princípom je zvislá filtrácia a spočívajú v oddelení buniek s obsahom DNA separačnou membránou, ktorá je v priamom kontakte s absorpčnou vložkou. Vzniknutý kapilárny tlak tak riadi prietok tekutiny. Následnou lýzou buniek (pomocou NaOH) sa s nadbytkom lyzačného pufru oddelí bunková debris a DNA ostane zachytená na separačnom disku. Ten je možné pridať priamo do PCR reakčnej zmesi (7).

Automatizácia laboratórií je nepochybne prínos; redukuje pracovný čas i personálne zdroje, zvyšuje kvalitu a reproducibilitu výsledkov. V súčasnosti je nevyhnutné pokračovať v tomto trende. Nesmieme však podľahnúť pohodlnému tlaku automatov. Naďalej je dôležité zvoliť si pre daný cieľ najvhodnejší spôsob izolácie. Princípiálne poznanie metód preto ostáva rozhodujúce pre pochopenie zákonitostí a obmedzení jednotlivých prístupov. V tomto duchu nech naše mysle zostanú rovnako otvorené ako mysle bádateľov, ktorí pre nás dobu laboratórnu otvorili.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií. ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Maderspacher F. Rags before the riches: Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Cur. Biol.* 2004;14(15):R608.
2. Wolf G. Friedrich Miescher, the man who discovered DNA. *Chemical Heritage*. 2003;21(10-11):37–41.
3. Converging on DNA. 1900 – 1953. [online]. <http://www.accessexcellence.org/RC/AB/BC/1900-1953.php>.
4. Tan SC, Yip BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009;1-10.
5. McGarvey FX. *Introduction to industrial ion Exchange*. Sybron Chemicals Inc. Birmingham: New Jersey, 1983.
6. Húska D, Baloun J, Trnková L, et al. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHE-Magazin*. 2008;18(3):14–15.
7. Jangam SR, Yamada DH, McFall SM, et al. Rapid, Point-of-Care Extraction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA from Whole Blood for Detection by Real-Time PCR. *J Clin Mikrobiol.* 2009;47(8):2363–2368.



Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
gabriela.pavlikova@medirex.sk

Odysea čítania DNA

**RNDr. Radka Tomášová¹, Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.¹, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.¹,
RNDr. Ivana Hojsíková²**

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP

²Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Sekvenovanie DNA je proces určenia presného poradia nukleotidov v molekule DNA. Zahŕňa rôzne metódy a technológie, ktoré determinujú poradie štyroch báz – adenín (A), guanín (G), cytozín (C) a tymín (T) v reťazci DNA. V 21. storočí vzniká sekvenovanie novej generácie (NGS), ktoré v mnohých ohľadoch prekonáva klasické metódy sekvenovania. Nové technológie vynikajú vysokým výkonom, rýchlosťou a nízkymi nákladmi v prepočte na jednu bázu. V súčasnosti je NGS najrýchlejšie sa rozvíjajúcou metódou molekulovej genetiky, ktorá v blízkej budúcnosti môže priniesť zlom v personalizovanej medicíne. V tomto prehľade stručne popisujeme základné princípy a hlavné typy NGS technológií.

Kľúčové slová: sekvenovanie DNA, sekvenovanie novej generácie, masívne paralelné sekvenovanie, aplikácie NGS.

The DNA reading odyssey

DNA sequencing is the process of determination of the precise order of nucleotides within a DNA molecule. It includes all methods or technologies that are used to determine the order of the four bases - adenine (A), guanine (G), cytosine (C) and thymine (T) in a strand of DNA. In the 21st century, the new technology - a next generation sequencing (NGS) was developed, which in many respects exceeds the conventional sequencing methods. New technologies are specified by high performance, speed and low cost per base. Currently the NGS is one of the most rapidly advancing method in molecular genetics and has the potential to significantly influence the field of personalized medicine in the near future. In this review, we briefly describe basic principles of the mostly used NGS technologies.

Key words: DNA sequencing, next generation sequencing, massively parallel sequencing, NGS applications.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 7–10

Klasické metódy sekvenovania

Prvé pokusy sekvenovania biomakromolekúl sa datujú do 70. rokov minulého storočia, keď boli realizované nepriamo – sekvenovaním molekúl RNA alebo proteínov. Prvú sekvenciu DNA získal v roku 1968 Ray Wu z Cornellovej univerzity. Bol to reťazec z okrajovej oblasti genómu fága λ (Lambda) dlhý 12 nukleotidov. V roku 1977 dva pracovné tímy nezávisle od seba predstavili dva odlišné prístupy sekvenovania, čo znamenalo prelom vtedajších techník. Boli to: chemická Maxam-Gilbertova metóda a enzymatická metóda popísaná Frederickom Sangerom.

Maxam-Gilbertova metóda funguje na princípe kaskády chemických reakcií štiepiacich špecificky nukleotidové bázy v jednovláknových DNA molekulách, ktoré sú na svojich koncoch značené. Naštípené a následne sú rozdelené podľa svojej veľkosti v polyakrylamidovom géli a autorádiograficky vizualizované.

Prvou technikou enzymatického sekvenovania DNA bola v roku 1975 metóda „plus-mínus“, ktorou bol o dva roky kompletne prečítaný celý genóm bakteriofága ϕ X174 s 5386 nukleotidmi. Využívala DNA polymerázu I z *Escherichia coli* a DNA polymerázu bakteriofága T4 s rôznym množstvom limitujúcich deoxynukleotidov (dNTP). Detekcia vzniknutých produktov prebiehala elektroforézou v polyakrylamidovom géli.

Neskôr bola popísaná Sangerova enzymatická metóda. Využívala modifikované nukleotidy – dideoxynukleotidy (ddNTP, 2',3'-dideoxynukleozid-trifosfát), analógy normálnych stavebných jednotiek DNA – deoxynukleotidov (dNTP, 2'-deoxyribonukleozid-trifosfát), pôsobiacich

ako špeciálne inhibítory DNA polymerázy. Sangerovo sekvenovanie bolo postupne modifikované, a tak pôvodné radioaktívne značenie ddNTP vystriedalo fluorescenčné značenie, polyakrylamidová elektroforéza na rozdelenie fragmentov nových molekúl DNA bola nahradená kapilárovou a manuálne odčítavanie poradia báz vystriedali sofistikované automatizované počítačové softvéry. Zdokonaľovaním technológií sa proces sekvenovania plne zautomatizoval. Sangerova metóda sa stala zlatým štandardom a aj napriek svojej prácnosti a časovej náročnosti desaťročia patrila k najpoužívanejším a najspoľahlivejším sekvenačným metódam (1).

Tejto popularite do veľkej miery napomohol Projekt sekvenovania ľudského genómu (HGP, Human Genome Project) (1990 – 2003) s cieľom určiť kompletnú nukleotidovú sekvenciu ľudskej DNA. Projekt trval 13 rokov a stál takmer 3 miliardy dolárov. Bola to zdĺhavá mravčia práca. Výsledkom bolo osekvenovanie 99 % ľudského genómu s veľkosťou 3,3 miliardy báзовých párov (bp). Použité technológie vychádzali metodicky práve zo Sangerovej metódy, avšak boli doplnené prístupmi umožňujúcimi analyzovať dlhšie úseky DNA (1). Jednou z možností bolo tzv. „shotgun“ sekvenovanie, pri ktorom je DNA náhodne štiepená na krátke úseky, klonovaná do vektorov a potom následne osekvenovaná z oboch koncov. Získané úseky sa vzájomne prekrývajú, a tým umožňujú zostavenie celej sekvencie. Ďalší rozvoj sekvenovania individuálnych ľudských genómov bol nutne podmienený vznikom nových lacnejších a výkonnejších technológií (2):

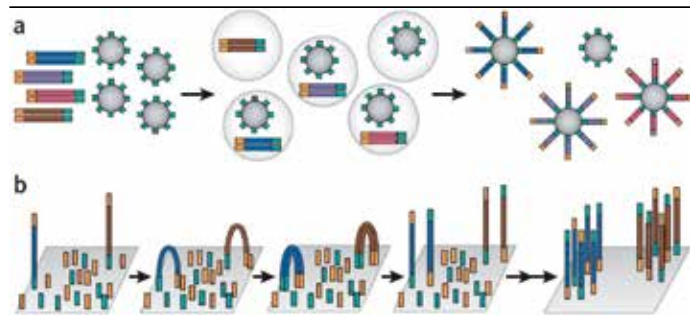
Sekvenovanie novej generácie (NGS; next generation sequencing)

Sekvenátory prvej generácie založené na Sangerovom princípe dosahovali zvýšenie sekvenačnej kapacity v zásade iba pridávaním kapilár, v ktorých prebiehala elektroforéza v prístroji. Najvýkonnejšie sekvenátory založené na kapilárovej elektroforéze umožňovali simultánnu analýzu 384 vzoriek a ich maximálny denný výkon bol na úrovni 2,2 Mb (Megabáz – milión báz) (3). S takýmto výkonom sa rutinné sekvenovanie genómov porovnateľných veľkostí s ľudským nedalo rutinne realizovať. Dopyt po výkonnejšom a nízkonákladovom sekvenovaní mal za následok tlak na vývoj vysokovýkonných tzv. „high-throughput“ technológií. Princíp spočíva v paralelizácii tohto procesu a produkcii tisícov až miliónoch sekvencií súčasne, preto sa NGS označuje aj ako masívne paralelné sekvenovanie.

Výstupom NGS je obrovský objem dát, ktoré je nutné roztriediť a spracovať. Problém teda nie je (možno prvýkrát v histórii) v získaní dostatočného množstva údajov, ale v ich zmysluplnej interpretácii. Štatistické modely a výpočtové algoritmy, ktoré mali doteraz viac-menej akademický význam, tým získali praktický rozmer. Nastal čas na etablovanie bioinformatiky.

V súčasnosti môžu byť NGS technológie rozdelené do dvoch základných kategórií. Prvú skupinu predstavujú platformy založené na PCR amplifikácii templátu (PCR-based technologies), nazývajú sa aj sekvenátory druhej generácie. Druhú skupinu tvoria technológie bez nutnosti amplifikačného kroku pred vlastnou sekvenáciou, ktoré využívajú tzv. Single-molecule sequencing a sú označované za sekvenátory tretej generácie (4, 5).

Obrázok 1. Schematické znázornenie princípu emulznej PCR a PCR v zhlukoch



(A). Emulzná PCR (emPCR, emulsion PCR): Amplifikácia DNA fragmentov na partikulách (beads). K fragmentom DNA sa z oboch strán ligujú adaptéry obsahujúce sekvencie umožňujúce naviazanie primerov využívaných pri amplifikačnej (aj následnej sekvenačnej) reakcii. Amplifikácia prebieha v emulzii vody a oleja s obsahom potrebných PCR reagentov, čo zabezpečuje optimálne prostredie. Podmienky emPCR sú optimalizované tak, aby sa v každej kvapke tejto emulzie nachádzala vždy len jedna partikula a jedna molekula DNA. Na povrchu partikul sú kovalentne naviazané oligonukleotidy so sekvenciou komplementárnou k adaptérovej sekvencii umožňujúcej naviazanie templátového DNA vlákna pre jeho následnú amplifikáciu. Pri tejto metóde dochádza k paralelnej a zároveň klonálnej amplifikácii miliónoch jednotlivých fragmentov na povrchu partikul v miliónoch kvapiek emulzie. Výsledkom je DNA knižnica pripravená na sekvenovanie. Túto techniku používajú sekvenátory 454/Roche a Life Technologies. (B) PCR v zhlukoch (cluster PCR, bridge PCR): K DNA fragmentom sa podobne ako pri emPCR z oboch strán ligujú adaptéry. DNA fragment sa vďaka tomu môže viazať na oligonukleotidy kovalentne viazané na povrchu prietokovej komôrky (flow cell). Dochádza k syntéze jeho komplementárneho vlákna, ktoré už je naviazané na povrchu prietokovej komôrky. Následne je novovzniknuté vlákno ohnuté a komplementárne sa viaže na susediaci oligonukleotid zodpovedajúci sekvenčnému adaptéru na druhej strane tohto vlákna (prípomína most). Proces amplifikácie sa opakuje, až kým nevznikne približne 1 000 kópií daného DNA fragmentu v tesnej blízkosti, čím sa vytvorí zhluk/klaster funkčne ekvivalentný jednej partikule (bead) po emPCR. Túto techniku používajú sekvenátory Illuminy (6)

Sekvenátory druhej generácie

V priebehu posledných rokov sa objavujú na trhu rôzne prístupy NGS technológií ponúkané niekoľkými firmami, ktoré si navzájom konkurujú. V dôsledku patentovej ochrany zvolili navzájom mierne odlišné prístupy avšak so všeobecne podobným princípom. Väčšina vychádza z pomerne krátkych fragmentov DNA, z prípravy templátu a vytvorenia knižníc amplikónov emulznou PCR (emPCR) alebo PCR v zhlukoch (cluster PCR), nazývanou aj tzv. „bridge“ PCR. Stručný popis princípu oboch metód PCR znázorňuje obrázok 1.

Nasleduje samotné sekvenovanie založené na syntéze alebo ligácii s detekciou inkorporovaných nukleotidov a analýza získaných dát (6).

Každý výrobca rieši tieto základné kroky inou kombináciou uvedených možností, z čoho vyplýva rozdielna špecifita, senzitivita a rôzna miera chybovosti. Pri porovnávaní rovnakej sekvencie tak môžu vzniknúť rozdiely v type a množstve produkovaných dát a ich rôznej interpretácii (7). Hlavnými protagonistami NGS revolúcie sú štyri platformy.

454 LifeScience (Roche)

Prvá NGS platforma bola komerčne dostupná v roku 2005. Princípom technológie je kombinácia emPCR a pyrosekvenovania. Pyrosekvenovanie možno zjednodušene definovať ako real-time sekvenovanie, pri ktorom sa sledom enzymatických reakcií deteguje svetelný signál uvoľnený pri zabudovaní dNTP do vznikajúceho reťazca DNA. Množstvo uvoľneného svetla je úmerné počtu začlenených nukleotidov. Výhodou tejto metódy je rýchlosť a dĺžka prečítanej sekvencie. Technológia 454 začínala s dĺžkou sekvencie 400 bp a v roku 2013 sa pohybovala na úrovni 1 000 bp. Optimálna dĺžka čítanej sekvencie je 700 bp, čo je porovnateľné so Sangerovou metódou. V roku 2007 bol touto NGS technológiou prvýkrát prečítaný genóm Jamesa Watsona a trvalo to dva mesiace (8). V súčasnosti je táto technológia na ústupe najmä v dôsledku vysokých prevádzkových nákladov.

Illumina (Solexa)

Druhou NGS platformou uvedenou na trh v roku 2006 bol sekvenátor firmy Solexa, ktorý o rok neskôr odkúpila spoločnosť Illumina. Metóda je založená na sekvenačnej reakcii syntézou s využitím fluorescenčne značených reverzibilných terminátorov a bridge PCR. Pri sekvenovaní možno postupovať dvoma spôsobmi, buď sa sekvencia prečíta v jednom smere (single-read) alebo sa postupuje proti sebe z oboch koncov (pair-end read). Spoločnosť Illumina v súčasnosti dominuje na NGS poli a ponúka niekoľko prístrojov rôznej výkonnosti: MiSeq (2 x 300 bp), MiSeqDx (2 x 125 bp), NextSeq 500 (2 x 150 bp), HiSeq2500 (2 x 250 bp) a HiSeq X Ten. HiSeq X Ten sa skladá z 10 ultravysokokapacitných sekvenátorov a dnes je najvýkonnejšou sekvenačnou platformou, ktorá prekonáva cenovú bariéru 1 000 dolárov za osekvenovanie jedného ľudského genómu. Zameraná je najmä na populačné štúdie. Illumina platformy ovládajú trh najmä vďaka vysokej výkonnosti sekvenátorov, robustnosti realizácie, kapacite a priaznivej cenovej relácii prevádzky (9).

SOLiD System (Life Technologies)

Tretí typ sekvenátora predstavila v roku 2007 vtedy ešte spoločnosť Applied Biosystems (dnes Life Technologies). SOLiD systém (Sequencing

by Oligonucleotide Ligation and Detection) pracuje na princípe emPCR a sekvenovaní DNA ligázou. Využívajú sa fluorescenčne značené oktamérové úseky s dvoma definovanými bázami (10). Tento dvojbázový kódovací systém zaručuje prečítanie každého nukleotidu dvakrát, čím sa zvyšuje presnosť, s akou je určené poradie nukleotidov danej sekvencie. Medzi uvedenými NGS platformami má teda SOLiD systém najnižšiu chybovosť. V súčasnosti sú v ponuke dva varianty sekvenátora: 5500 System a 5500xl System, ktorý výrazne zvýšil dĺžku čítania z pôvodných 35 bp na 75 bp a zlepšil aj presnosť meraní na 99,99 %.

Ion Torrent (Life Technologies)

Technológia Ion Torrent sa objavila na scéne v roku 2010 a ako jediná využíva namiesto optického/svetelného spôsobu zaznamenávania jednotlivých nukleotidov detekciu elektrochemického signálu. Inkorporácia nukleotidu do rastúceho reťazca DNA spôsobí uvoľnenie vodíkového iónu (H⁺), čím dôjde k zmene pH. Proces prebieha na polovodičovom čípe husto pokrytom mikrojamkami, pod ktorými je umiestnený senzor citlivý na zmenu pH. Celkové množstvo produkovaných dát je určené hustotou jamiek na čípe. Samotná príprava knižnice prebieha podobne ako v predchádzajúcich metódach napojením adaptérov s následnou emPCR a sekvenačnou reakciou syntézou. Výhodou by malo byť, že pri sekvenovaní sa využívajú nemodifikované nukleotidy. Ion Torrent aktuálne ponúka Ion PGM Sequencer (314/316/318 chips) a Ion Proton System (I, II, III), pričom model Ion Proton Sequencer s mikročipom Ion PII Chip je schopný prečítať celý genóm človeka v priebehu jedného dňa. Prvý ľudský genóm osekvenovaný technológiou Ion Torrent bol genóm Gordona Moora (10, 11).

Sekvenátory tretej generácie

Výraznú zmenu predstavujú metódy, ktoré nie sú založené na nutnom namnožení sekvenovaných úsekov. Nevyužívajú tak amplifikačný krok, čo znižuje výskyt spontánnych mutácií vzniknutých chybovosťou DNA-polymerázy. Pri klonovaní DNA pomocou PCR môže dôjsť k zámene niektorých báz a tým aj k rôznemu počtu výskytu jednotlivých fragmentov, čo môže ovplyvniť výsledok experimentu.

Prvý prístroj, ktorý stál na prahu tretejgeneračnej technológie sekvenovania, predstavila firma Helicos Bioscience v roku 2007. Metóda využíva jednotlivé individuálne molekuly DNA (tSMS, True Single Molecule Sequencing) pevne fixované k povrchu. Sekvenačná reakcia prebieha syntézou s fluorescenčne značenými nukleotidmi. Zavedeniu tohto analyzátora do praxe bránila vysoká cena prístrojov a dĺžka čítanej sekvencie (30 – 35 bp). V súčasnosti nie je technológia ďalej vyvíjaná (12).

SMRT (Pacific Bioscience)

V roku 2009 prišla na trh nová technológia, ktorá sekvenuje jednotlivé molekuly DNA v reálnom čase (SMRT, single-molecule real-time). Systém využíva čipy pokryté nanoštruktúrovým materiálom, ktorý vytvára jamky (ZMW, Zero Mode Waveguide) na dne s fixovanou DNA polymerázou. Sekvenačný proces prebieha syntézou DNA vlákna podľa templátovej DNA s pomocou fluorescenčne značených nukleotidov. Vzhľadom na to, že tento prístup nevyžaduje premývacie kroky pri začleňovaní jednotlivých

typov nukleotidov (wash-and-scan) nevyhnutných pri analyzátoroch druhej generácie, celý proces sekvenovania sa zrýchľuje. Súčasným lídrom v tejto oblasti je systém PacBio RS a v porovnaní so sekvenátormi druhej generácie dosahuje priemernú dĺžku čítania 5 500 – 8 500 bp. Okrem toho môže aj priamo detegovať epigenetické modifikácie, ako je 4-metylcytozín, 5-metylcytozín a 6-metyladenín (13).

Nanopore sequencing (Oxford Nanopore)

Sekvenovanie pomocou nanopórov je založené na meraní elektrického prúdu prechádzajúceho cez biologický proteín tvoriaci pór v nevodivej membráne. Analytom je jednoreťazová molekula DNA, pri jej prechode nanopórom dôjde k detekcii jednotlivých nukleotidov, pričom pre každý typ nukleotidu je vopred určená modulácia prúdu. Technológia má minimálne požiadavky na reagenty i prípravu vzorky, je lacná, rýchla a ponúka analýzu DNA v reálnom čase. V súčasnosti firma Oxford Nanopore ponúka analyzátory MinION™, PromethION™ a GridION™ (13, 14).

NGS technológie sekvenovania sa neustále modifikujú a prudko napredujú. Dnes vieme s istotou povedať len to, že sú výrazne rýchlejšie ako v minulom roku a pomalšie ako v budúcom roku.

Aplikácia a využitie NGS technológií

Vysoký výkon súčasných sekvenátorov je možné použiť v širokom spektre aplikácií, od pokrytia rozsiahlej oblasti celého genómu (ultraširoké sekvenovanie), po sekvenovanie iba jednej oblasti s vysokým počtom čítaní (ultrahlboké sekvenovanie). Výhoda ultrahlbokého sekvenovania je detekcia variantov, ktoré sa vo vzorke vyskytujú s nízkou frekvenciou a prínos ultraširokého sekvenovania spočíva v analýze vzoriek viacerých pacientov v kratšom čase. Pre špecifické účely môžeme teda využiť celogenómové sekvenovanie zahŕňajúce *de novo* sekvenovanie a resekvenovanie genómov, exomové sekvenovanie kódujúcich častí DNA, sekvenovanie transkriptómu, ktorý predstavuje súbor všetkých molekúl RNA (mRNA, rRNA, tRNA a ďalšie nekódujúca RNA molekuly) a ciele resekvenovanie (targeted resequencing) umožňuje sekvenovať iba vybrané gény alebo vymedzenú oblasť genómu (15).

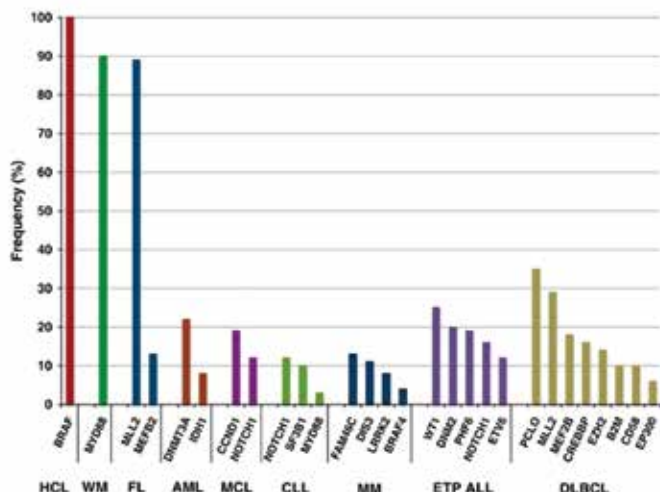
NGS technológie ponúkajú celú plejádu možností ich využitia nielen v medicíne, ale aj v iných vedných odboroch. Významné uplatnenie nachádzajú napríklad v mikrobiomike zaoberajúcej sa genomickými analýzami mikroorganizmov, kde umožňuje definovať napríklad mikrobióm človeka, v metagenomike, kde umožňujú stanoviť druhy baktérií (a nielen baktérií) vyskytujúcich sa vo vzorkách pôdy, vody. Vo forennej genetike rezonuje potenciálny prínos epigenetických štúdií zameraných na odlíšenie monozygotných (jednovaječných) dvojčiat, ktoré majú rovnakú sekvenciu DNA a klasickými genetickými metódami sa nedali dosiaľ rozoznať. Vo fylogenetike NGS umožňuje študovať evolučný vývoj a vzťahy medzi organizmami prostredníctvom celogenómových komparatívnych analýz. (1 – 2, 4 – 6, 15 – 17).

Odborom, do ktorého NGS sekvenovanie prinieslo doslova revolúciu, je nádorová genomika. Realizovali sa rozsiahle vedecké projekty, ktoré prispeli ku komplexnejšej a k podrobnejšej charakteristike molekulovej podstaty nádorových ochorení. Tieto štúdie dopomohli k objaveniu nových génov asociovaných s daným ochorením a k stanoveniu genetického profilu

nádoru (18). Obrázok 2 znázorňuje prehľad detegovaných somatických mutácií vo vybraných onkohematologických malignitách.

Z klinického hľadiska sú NGS technológie sľubným nástrojom s priamym vplyvom pri nahradení alebo doplnení existujúcich laboratórnych algoritmov: napríklad detekcia chromozómových aneuploidií DNA plodu pri neinvazívnej prenatalnej diagnostike, identifikácia vzácnych genetických variantov ochorení s mendelovskou dedičnosťou, pri identifikácii zárodočných mutácií pri familiárnych syndrómoch. Potenciálne využitie je aj pričasnej diagnostike širokého spektra tumorov, analýzou voľne cirkulujúcej nádorovej DNA v plazme, napríklad detekcia mutácií pri kolorektálnom karcinóme, mutačný status tumor- supresorových génov a chromozómových prestavieb pri lymfómoch alebo leukémiách, detekcia DNA vírusov asociovaných s určitým typom nádoru (EBV – nazofaryngeálny karcinóm, HPV – cervikálne lézie) (17 – 20).

Obrázok 2. Najčastejšie somatické mutácie *de novo* detegované metódami NGS v génoch hematologických malignít



Vysvetlivky: HCL – vlasatobunková leukémia, WM – Waldenströмова makroglobulinémia, FL – folikulový lymfóm, MCL – lymfóm z plášťových buniek, CLL – chronická lymfocytová leukémia, MM – mnohopočetný myelóm, ETP ALL – prekurzorová T-bunková akútna lymfoblastová leukémia, DLBCL – difúzny veľkobunkový B-lymfóm (18)

Záver

Technológie NGS sa od svojho zavedenia významne etablovali v oblasti základného i aplikovaného genetického výskumu a začínajú vstupovať na pôdu klinickej diagnostiky. Pokiaľ skutočne dospejeme k rutinnému používaniu NGS, bude nevyhnutné vyriešiť niekoľko prekážok a otázok. Vygenerované množstvo primárnych dát je nutné správnym spôsobom uchovať a anotovať, efektívne analyzovať, ale predovšetkým správne interpretovať. Určenie kvality sekvenančných výstupov komplikuje aj absencia medzinárodných štandardov a súčasná rýchlosť regulačných orgánov, ktoré sú prekonané tempom vývoja NGS technológií. Musíme aktívne pristúpiť k edukácii nielen lekárskej obce, ale aj širokej verejnosti,

s cieľom správne pochopiť, vysvetliť a použiť získané informácie. Hádame do obdobia, keď sa táto vyhládka stane reálnou, budeme mať aj náležitý progresívny zákon o DNA, pretože ide o dáta nielen citlivé, ale najmä cenné z viacerých aspektov.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií. ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Hutchison CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(18):6227–6237.
- Pospišilová Š, Tichý B, Mayer J. Sekvenovanie ľudského genomu – technológie nové generácie aneb budeme rutinne sekvenovať ľudské genomy? *Čas Lék Čes.* 2009;148:296–302.
- Shibata K, Itoh M, Aizawa K, et al. RIKEN Integrated Sequence Analysis (RISA) System 384-Format Sequencing Pipeline with 384 Multicapillary Sequencer. *Genome Res.* 2000;10(11):1757–1771.
- Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31–46.
- Anderson M, Schrijver I. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine. *Genes.* 2010;1(1):38–69.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology.* 2008;26:1135–1145.
- Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;251364. doi: 10.1155/2012/251364.
- www.roche.com
- www.illumina.com
- www.lifetechnologies.com
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 2011;457:348–352.
- Schadt EE, et al. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet.* 2010;19(R2): R227.
- van Dijk, EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(14):418–426.
- www.nanoprotech.com
- Travis C, Glenn Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources.* 2011;11:759–769.
- Yang Y, Xie B, Yan J. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014;12:190–197.
- Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet.* 2012; 81:503–510.
- Braggio E, Egan JB, Fonseca R, et al. Lessons from next-generation sequencing analysis in hematological malignancies. 2013;3:e127; doi:10.1038/bcj.2013.26.
- Yu J, Gu G, Ju S. Recent Advances in Clinical Applications of Circulating Cell-free DNA Integrity. *Lab Med.* 2014;45(1): 6–12.
- Chan M, Lee CH WH, Wu M. (2013) Integrating Next-Generation Sequencing Into Clinical Cancer Diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 13(7):647–650.



RNDr. Radka Tomášová
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP
Galvaniho 17/C, 820 14 Bratislava
radka.tomasova@medirex.sk

Komparatívna genómová hybridizácia: úvod do metodiky

RNDr. Miroslav Tomka, PhD.¹, RNDr. Ivana Hojsíková²

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o. člen MEDIREX GROUP

²Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Metódy klasickej cytogenetiky, ako sú prúžkovanie alebo fluorescenčná in situ hybridizácia, si našli pevné miesto pri skríningu genetických abnormalít, ako aj pri hodnotení odpovede na liečbu alebo určovaní prognózy. Vývoj však priniesol nové metodiky, ktoré umožňujú hodnotiť genetické alterácie na molekulovej úrovni naraz v celom genóme. K takýmto metodikám patrí aj komparatívna genómová hybridizácia (CGH). Nasledujúci článok prináša stručný opis metodiky, jej podstatu, obmedzenia ako aj jej využitie v laboratórnej diagnostike rôznych druhov ochorení.

Kľúčové slová: aCGH, array CGH, komparatívna genómová hybridizácia, zhubné nádory prsníka, zhubné nádory tela maternice, zhubné nádory krčka maternice, zhubné nádory vaječníkov.

Comparative genomic hybridization: introduction to the method

Traditional cytogenetic methods like banding or fluorescent in situ hybridization found their place in genetic abnormality screening as well as in evaluation of the treatment response or prognosis. Development in the field of molecular biology over the past years brought new methods which allow the assessment of alterations on the molecular level, even on the whole genome at the same time. Comparative genomic hybridization (CGH) belongs to such methods. Following article introduces the method in brief, describes its principle, limitations as well as its use in diagnostics of different kinds of diseases.

Key words: aCGH, array CGH, comparative genomic hybridization, breast cancer, endometrial cancer, cervical cancer, ovary cancer.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 11–14

Úvod

Incidencia zhubných nádorov má celosvetovo stúpajúci trend. Slovensko nie je výnimka. Národný onkologický register SR za rok 2008 evidoval u oboch pohlaví spolu 30 144 osôb s nádorovými ochoreniami, z toho 15 055 mužov a 15 089 žien.

Zo štatistik pre rok 2008 vyplýva, že v Slovenskej republike medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádorové ochorenia u žien patria zhubné nádory prsníka, tela maternice, krčka maternice a vaječníkov. Zhubné nádory prsníkov tvoria po nemelanómových nádoroch kože druhý najčastejšie sa vyskytujúci typ nádorového ochorenia u žien. V roku 2008 bolo hlásených 2639 nových prípadov s 772 úmrtiami. Zhubné nádory tela maternice boli zaznamenané 876-krát, pričom 221 postihnutých následkom tohto ochorenia podľahlo. Zhubné nádory krčka maternice boli hlásené u 634 pacientok, z čoho 209 končilo exitom. Zhubné nádory vaječníkov boli evidované u 509 pacientok s hlásenými 276 úmrtiami (1).

Onkologické ochorenia vo všeobecnosti považujeme za ochorenie génov. Túto skutočnosť najlepšie ilustrujú familiárne viazané ochorenia, pri ktorých sa mutačné poškodenie konkrétneho génu prenáša z generácie na generáciu a u postihnutého jedinca sa tak zvyšuje riziko vypuknutia ochorenia v skorších rokoch života. So zvyšujúcou sa priemernou dĺžkou života je možné predpokladať aj zvyšujúcu sa incidenciu malígnych ochorení. V tomto smere bude stúpať potreba nových skríningových metód umožňujúcich efektívne a včasné odhalenie ochorenia. Medzi také patrí aj metodika nazývaná komparatívna genómová hybridizácia – CGH.

Skríningové metodiky cytogenetiky

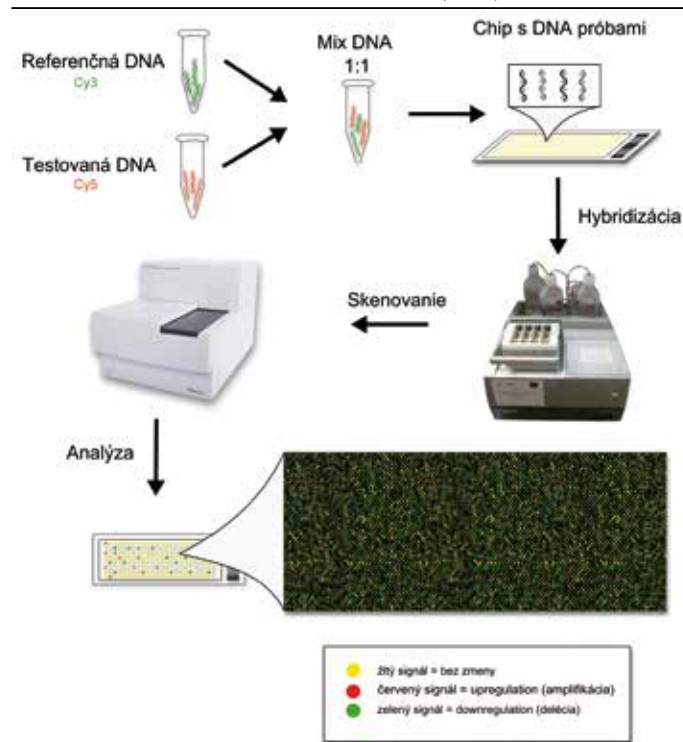
Od sedemdesiatych rokov minulého storočia sa na sledovanie nebalansovaných chromozómových abnormalít, ako sú strata alebo zisk genetického materiálu, využívajú rôzne druhy prúžkovania chromozómov. Výsledkom aplikácie metodiky sú pod mikroskopom viditeľné prúžky na kondenzovaných chromozómoch, čo uľahčuje identifikáciu a lokalizáciu abnormalít. Metodika dosahuje v ideálnych prípadoch rozlíšenie 5Mb (2).

Ku klasickým metodikám cytogenetiky patrí aj fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH). Fluorescenčne značené próby, RNA alebo DNA, sa na základe komplementarity viažu na presne zodpovedajúcu sekvenciu nukleotidov chromozómovej DNA. Použitím fluorescenčného mikroskopu a príslušného softvéru je možné lokalizovať a detegovať prítomnosť alebo neprítomnosť konkrétneho genetického materiálu v danej oblasti chromozómov. Zavedením „super-resolution“ techník sa rozlišovacia schopnosť FISH metodiky zvýšila až na možnosť detekcie niekoľko málo kilobáz (3).

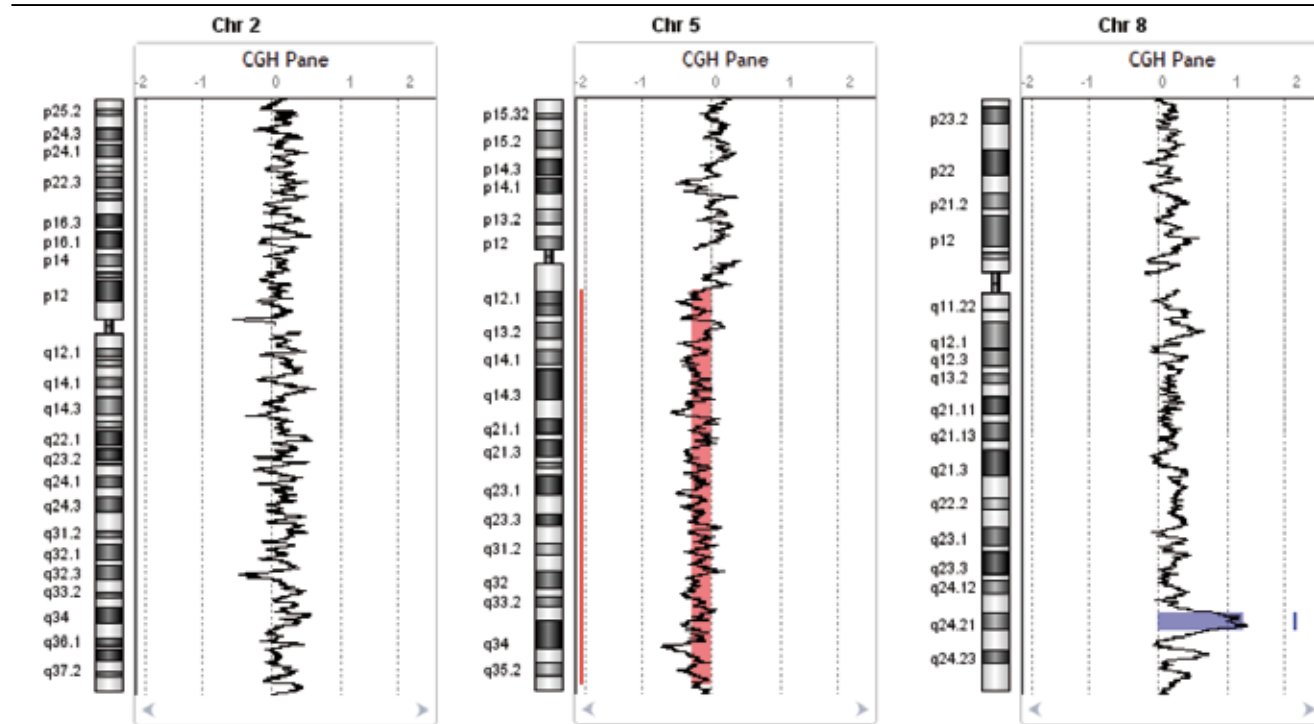
Niekam medzi klasické cytogenetické metodiky, ako je karyotypovanie a FISH, a molekulárno-biologické techniky, ako je kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qRT-PCR) či sekvenovanie, zaraďujeme komparatívnu genómovú hybridizáciu (CGH) a jej modernejšiu vetvu v podobe array CGH (aCGH).

Krátko z histórie CGH

Komparatívna genómová hybridizácia, CGH, prvýkrát opísala v roku 1992 skupina vedcov z kalifornskej univerzity (4). Metodiku založili na kompetitívnej fluorescenčnej in situ hybridizácii. Metafázové chromozómy na sklíčku hybridizovali s odlišne fluorescenčne značenými referenčnými a testovanými úsekmi

Obrázok 1. Schematické znázornenie metodiky array CGH.

DNA. Hybridizáciu testovanej a referenčnej DNA sondy hodnotili podľa intenzity výsledného farebného signálu. Oblasti chromozómov, ktoré stratili, alebo, naopak, získali genetický materiál, mali v porovnaní s normálnou referenčnou vzorkou zmenený pomer intenzít oboch signálov, čo sa prejavilo vo výslednej farbe signálu (4).

Obrázok 2. Obrázok ilustruje genetické aberácie u testovaného pacienta. Červeným pruhom označená oblasť chromozómu č. 5 zodpovedá strate genetického materiálu v tejto oblasti chromozómu. Chromozóm č. 8 vykazuje získanie genetického materiálu, ktorý je označený modrým pruhom. Chromozóm č. 2 nevykazuje žiadnu abnormalitu genetického materiálu. Získané výsledky boli potvrdené sekvenovaním.

V roku 1997 autorský kolektív z Heidelbergu publikoval upravený variant CGH. Namiesto hybridizácie DNA sond s chromozómami použili na matrix naviazané krátke úseky DNA a tie hybridizovali s testovanou a referenčnou DNA. Metodikou tak zjednodušili a značne zvýšili jej rozlišovaciu schopnosť (5). Dnes technológia array CGH (alebo matrix CGH) dosahuje rozlišovaciu schopnosť na úrovni 100 kb (6). Publikovaná metodika položila základ automatizácii procesu CGH a otvorila tým dvere do rutinných diagnostických laboratórií.

Princíp aCGH

Oba typy metodiky CGH, konvenčná na chromozómoch, aj array CGH na báze DNA, sú založené na rovnakom princípe (obrázok 1). Testovaná a referenčná DNA je špecificky fluorescenčne značená. Testovaná DNA sa obvyčajne značí červeným farbivom (Cyanín-5) a referenčná DNA zeleným fluorofórom (Cyanín-3). Obe DNA sú spoločne a v rovnakom pomere nanesené na sklíčko (DNA microarray), ktoré obsahuje presne špecifikované jednovláknové úseky DNA, tzv. sondy, alebo kloný. Ich dĺžka sa u jednotlivých výrobcov líši (napr. Agilent ponúka 60 básových sondy).

Hybridizácia prebieha pri presne regulovaných podmienkach niekoľko hodín (24 – 56 hodín), najčastejšie v poloautomatických hybridizačných peciach. Po hybridizácii je sklíčko prenesené do počítačom riadeného skenera, kde je obraz nasnímaný a softvérovo vyhodnotený. Pre každý gén je vypočítaný normalizovaný pomer intenzít červeného a zeleného signálu, ktorý indikuje zmenu v množstve genetického materiálu na jednotlivých úsekoch DNA (tzv. CNV – Copy Number Variation). Ak je normalizovaný pomer < 1 , hovoríme o strate genetického materiálu (t. j. delécia), ak je, naopak, pomer > 1 , ide o získanie genetického materiálu (t. j. amplifikácia) (obrázok 2).

Silné a slabé stránky aCGH

Každá metodika má svoje výhody aj nevýhody. Slabá stránka metodiky je neschopnosť odhaliť balansované alterácie, ako sú recipročné translokácie alebo inverzie. Tieto anomálie nemenia počet kópií v genóme, a tak ostávajú pre CGH nedetegovateľné.

Nedetegovateľné ostávajú aj mutácie, ktoré sú mimo detekčný rozsah metodiky. Zavedením aCGH sa rozlíšenie metodiky zvýšilo na teoretickú hodnotu 100 kb. Rozlíšenie aCGH je primárne určené dvoma faktormi: dĺžkou cieľovej DNA a hustotou pokrytia genómu sondami. Z toho vyplýva, že čím sú cieľové sondy DNA na matrici kratšie a čím hustejšie je nimi pokrytá daná oblasť, tým je rozlíšenie vyššie (7).

Medzi najväčšie prednosti aCGH patrí schopnosť simultánnej detekcie aneuploidií, delécií, inzercii a duplikácií v rámci celého genómu. Vhodným navrhnutím prekrývajúcich sa DNA sond môže byť určitá oblasť v rámci genómu pokrytá na 100 %. To môže byť výhodné pri skríningu špecifických oblastí chromozómov, ktoré sú priamo dotknuté pri konkrétnych druhoch ochorenia. Technika aCGH tak spája výhody lokusovo špecifickej FISH analýzy s možnosťou skríningsu celého genómu.

aCGH v diagnostike

Metodika aCGH našla svoje uplatnenie v prenatalnej a postnatalnej diagnostike, v preimplantačnom skríningu, ale aj v diagnostike nádorových ochorení.

Prenatálna a postnatálna diagnostika sa zameriava na vývinové a mentálne poruchy zapríčinené aberáciami genetického materiálu. Samotná analýza sa vykonáva na vzorkách plodovej vody, choriových klkov, ale aj periférnej krvi embrya a neskôr novorodenca. Kan et al. (8) uvádzajú, že pomocou aCGH bolo identifikovaných 20 % (44/220) klinicky významných CNV pri abnormálnych, ultrazvukom detegovaných nálezoch. Z tohto množstva 21 patrilo aneuploidiám a 23 iným chromozómovým imbalance. Zaujímavosťou je, že 3,2 % vzoriek (7/220) s CNV bolo detegovaných iba prostredníctvom aCGH, a nie použitím konvenčných cytogenetických techník ako G-banding a kvantitatívna fluorescenčná PCR. Z toho dôvodu navrhujú nahradiť karyotyping za metodiku aCGH a využiť ju ako voľbu prvostupňového skríningsu. Konvenčná cytogenetika by sa mala použiť následne pri vizualizácii klinicky významných CNV (8). Napriek tomu, že pomocou metodiky aCGH nie je možné zistiť všetky druhy poškodenia genetického materiálu, je schopná odhaliť približne dvakrát viac chromozómových abnormalít ako G-prúžkovanie (7).

Citlivosť metodiky aCGH dokumentuje jej využitie v preimplantačnom skríningu, kde je k dispozícii len minimálne množstvo materiálu. Pomocou aCGH je možné odhaliť chromozómové imbalance v rozsahu cca 1Mb z jediného lymfoblastu, fibroblastu alebo blastoméry (9).

Hoci aCGH hrá nezastupiteľnú úlohu najmä pri skríningu aberácií spôsobujúcich vývinové a mentálne poruchy, svoje miesto si našla aj pri skríningu nádorových ochorení. V tejto oblasti však skríning nie je vždy jednoduchý. Heterogenita buniek spôsobená ich klonálnou povahou, nedostatok materiálu (biopsia), jeho znížená kvalita (FFPE bločky), spolu so samotným typom aberácie (nízky počet kópií, aberácie na krátkom úseku), môžu metodike aCGH spôsobiť problémy. Napriek tomu sa aCGH s úspechom používa pri detekcii genomických abnormalít v hematolo-

gických ochoreniach, ako sú CLL (chronická lymfocytová leukémia), MDS (myelodysplastický syndróm), MM (mnohobodový myelóm), ALL (akútna lymfoblastová leukémia), AML (akútna myeloidná leukémia) a CMML (chronická myelomonocytová leukémia) (10).

Technológia aCGH sa osvedčila pri charakterizovaní genetických abnormalít zodpovedných napríklad za zhubný nádor močového mechúra (11), kolorektálnych nádorov (12), nádorov pľúc (13), pri identifikácii nových génov zodpovedných za vznik nádorov prostaty (15) a mnohých ďalších.

Metodika aCGH hrá svoju úlohu aj pri štúdiu najčastejšie sa vyskytujúcich nádorových ochorení žien. Ako je známe, nádory prsníka sú heterogénnou skupinou, v ktorej etiológii nachádzame mutácie génov ako *BRCA1*, *BRCA2*, ale aj zmeny v počte génov *LSM1*, *BAG4* a *C8ORF4* pozorované pomocou aCGH (15). Francúzska štúdia v 18 medicínskych centrách sledovala 423 pacientov s metastatickými nádormi, pričom používali Sangerovo sekvenovanie a aCGH. Genomické alterácie odhalili u 195 (46 %) pacientov. Najčastejšie išlo o aberácie génov *PIK3CA*, *CCND1* a *FGFR1*, ale aj zriedkavé mutácie v géne *AKT1* a zriedkavé amplifikácie v génoch *EGFR*, *MDM2*, *FGFR2*, *AKT2*, *IGF1R* a *MET*. Vybraní pacienti (55 zo 423) boli podrobení personalizovanej liečbe s rôznym výsledkom (16).

Nádory vaječníkov sú taktiež spojené s mutačným vyradením tumor supresorových génov *BRCA1/2*, ale vyskytujú sa aj ako súčasť Li-Fraumeniho syndrómu, v ktorom dôležitú úlohu hrá gén *TP53*. Špecifické genetické alterácie boli pomocou aCGH odhalené aj v prípade ovariálnych nádorov, ktoré vykazovali rezistenciu na chemoterapiu (17). Metodikou aCGH bol realizovaný skríning vybraných onkogénov z endometriálnych nádorov, pričom bola pozorovaná amplifikácia onkogénov *AR*, *PIK3CA*, *MET*, *HRAS*, *NRAS*, *D17S1670*, *FGFR1*, *CTSB*, *RPS6KB1*, *LAMC2*, *MYC*, *PDGFRA*, *FGF4/FGF3*, *PAK1* a *FGR* (18). Metodika aCGH zachytila CNV v 73 % (19/26) vzoriek aj v prípade cervikálnych nádorov. Amplifikácia bola zistená najmä v oblastiach 3q (50,0 %), 1q (42,4 %), 19q (23,1 %), kým strata v oblastiach 11q (30,8 %), 4q (23,1 %) a 13q (19,2 %). Zvýšený výskyt amplifikácie 3q bol pozorovaný v pozitívnych vzorkách na HPV 16 a HPV 18, čo len potvrdzuje závažnosť infekcie HPV pri tomto nádorovom ochorení (19).

Záver

Onkologické ochorenia aj napriek dokázateľným úspechom v diagnostike a liečbe predstavujú vážny problém nielen z medicínskeho hľadiska. So zvyšujúcim sa priemerným vekom populácie môžeme predpokladať, že incidencia týchto ochorení bude aj naďalej stúpať. Z toho dôvodu je žiaduce, aby klinické laboratória mali k dispozícii moderné metodiky, ktoré umožňujú odhaliť ochorenie na základnej, molekulovej úrovni. Komparatívna genómová hybridizácia tieto podmienky spĺňa.

Hoci použitie aCGH v skríningu onkologických ochorení je v niektorých prípadoch komplikované, výsledky získané touto metodikou majú vysokú výpovednú hodnotu a pravdepodobne budú postupne nahrádzať metodiky klasickej cytogenetiky. Odporúčania medzinárodného konzorcia pre štandardizáciu cytogenomických arraí – ISCA (International Standard Cytogenomic Array) použiť CGH ako prvú skríningovú metódu a G-banding používať iba v prípadoch, ako sú Downov syndróm a v prípadoch rodinného výskytu chromozómových aberácií (20), je len krokom k tomuto prechodu. Výsledkom zavedenia nových technológií do

diagnostiky a skríningu nádorových ochorení by mal byť genetický profil pacienta, ktorý v konečnom dôsledku vyústi do personalizovanej terapie.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra:

1. Safaei D, Plesko I. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2008. Národný onkologický register SR. NCZI; 2014.
2. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* 2008;1:45.
3. Han R, Li Z, Fan Y, Jiang Y. Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J Genet Genomics*. 2013;40(12):583-595.
4. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821.
5. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20(4):399-407.
6. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):500-513.
7. Bejjani BA, Shaffer LG. Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn*. 2006;8(5):528-533.
8. Kan AS, Lau ET, Tang WF et al. Whole-genome array CGH evaluation for replacing prenatal karyotyping in Hong Kong. *PLoS One*. 2014;9(2):e87988. doi: 10.1371/journal.pone.0087988. eCollection 2014.
9. Greco E, Bono S, Ruberti A, et al. Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:457913. doi: 10.1155/2014/457913. Epub 2014 Mar 23.
10. Simons A, Sikkema-Raddatz B, de Leeuw N, et al. Genome-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Hum Mutat*. 2012;33(6):941-948.
11. Conconi D, Panzeri E, Redaelli S, et al. Chromosomal imbalances in human bladder urothelial carcinoma: similarities and differences between biopsy samples and cancer stem-like cells. *BMC Cancer*. 2014;14:646. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/646>
12. Brim H, Lee E, Abu-Asab MS, et al. Genomic aberrations in an African American colorectal cancer cohort reveals a MSI-specific profile and chromosome X amplification in male patients. *PLoS One*. 2012;7(8):e40392. doi:10.1371/journal.pone.0040392
13. Lo FY, Chang JW, Chang IS, et al. The database of chromosome imbalance regions and genes resided in lung cancer from Asian and Caucasian identified by array-comparative genomic hybridization. *BMCCancer*. 2012;12:235. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/235>
14. Kamradt J, Jung V, Wahrheit K, et al. Detection of novel amplicons in prostate cancer by comprehensive genomic profiling of prostate cancer cell lines using oligonucleotide-based arrayCGH. *PLoS One*. 2007;2(8):e769. doi: 10.1371/journal.pone.0000769
15. Yang ZQ, Streicher KL, Ray ME, et al. Multiple interacting oncogenes on the 8p11-p12 amplicon in human breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(24):11632-11643.
16. André F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014;15(3):267-274.
17. Osterberg L, Levan K, Parheen K, et al. Specific copy number alterations associated with docetaxel/carboplatin response in ovarian carcinomas. *Anticancer Res*. 2010;30(11):4451-4458.
18. O'Toole SA, Dunn E, Sheppard BL, et al. Genome-wide analysis of deoxyribonucleic acid in endometrial cancer using comparative genomic hybridization microarrays. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(2):834-842.
19. Kuglik P, Smetana J, Vallova V, et al. Genome-wide screening of DNA copy number alterations in cervical carcinoma patients with CGH+SNP microarrays and HPV-FISH. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):5071-5082.
20. Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, et al. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(12):1156-1166.



RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o. člen MEDIREX GROUP
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
miroslav.tomka@medirex.sk

Sekvenovanie novej generácie a jeho využitie v klinickej genetike

**MUDr. Mária Geryková Bujalková, PhD.^{1,2}, RNDr. Regina Lohajová Behulová, PhD.³,
RNDr. Renáta Lukačková¹, RNDr. Gabriel Minárik, PhD.^{4,5,6}, RNDr. Tomáš Szemes, PhD.^{4,5}**

¹Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

²Ambulancia lekárskej genetiky, Nemocničná, a. s., člen MEDIREX GROUP, Malacky

³Klinika lekárskej genetiky LF SZU a UNB, Bratislava

⁴Katedra molekulárnej biológie PriF UK, Bratislava

⁵Geneton, s. r. o., Bratislava

⁶Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

Revolučná metóda sekvenovania novej generácie (NGS) je založená na možnosti realizácie paralelnej sekvenačnej analýzy veľkého množstva DNA fragmentov. Chemický princíp v súčasnosti najpoužívanejších NGS technológií zahŕňa takzvané sekvenovanie počas syntézy alebo ligáciou s následnou detekciou fluorescence, chemiluminiscencie alebo zmeny pH. Obrovské množstvo dát získaných pomocou NGS analýz je nevyhnutné efektívne spracovať a korektne vyhodnotiť pomocou rôznych bioinformatických algoritmov, čo kladie vysoké nároky na informatickú infraštruktúru laboratória a odborný personál špecializovaný na bioinformatiku. Rutinná klinicko-diagnostická implementácia NGS metód vyžaduje precíznu validáciu jednotlivých testov a štandardizáciu celého analytického procesu. Vzhľadom na rozsah získaných dát prináša genetické testovanie pomocou NGS veľké množstvo výsledkov s rôznou informatívnou hodnotou. V prípade identifikácie patologického variantu (mutácie) v známom géne alebo v géne veľmi pravdepodobne asociovanom s daným ochorením je možné diagnosticky stanoviť príčinu pacientovho fenotypu. Naopak, takzvané náhodné nálezy, ktoré sa identifikujú pri testovaní pomocou exómového alebo celogenómového sekvenovania, so sebou prinášajú interpretačné a etické výzvy a na ich reportovanie musia byť stanovené prísne kritériá. Rôzne aplikácie NGS sa už využívajú nielen v rámci výskumu, ale aj v laboratórnej diagnostike mnohých geneticky podmienených ochorení. Doterajšie niekoľkoročné skúsenosti preukázali jednoznačnú efektivitu panelového a exómového sekvenovania najmä v prípade zriedkavých syndrémov a geneticky heterogénnych ochorení. Je však zrejmé, že postupná integrácia NGS do klinicko-diagnostickej praxe môže perspektívne priniesť „na mieru šitú“ lekársku starostlivosť aj pri častejšie sa vyskytujúcich, multifaktoriálnych chorobách.

Kľúčové slová: sekvenovanie novej generácie (NGS), génové panely, exómové sekvenovanie (ES), celogenómové sekvenovanie (WGS), geneticky heterogénne ochorenia, zriedkavé syndrómy.

Next Generation Sequencing and its Application in Clinical Genetics

Revolutionary method of next generation sequencing (NGS) is based on the parallel sequencing analysis of a large number of DNA fragments. Chemical principle of current most widely used NGS technologies includes sequencing by synthesis or ligation followed by the detection of fluorescence, chemiluminiscence or changes in pH. Huge amount of data arising from NGS analyses have to be effectively processed and correctly evaluated by various bioinformatic algorithms that put high requirements on laboratory's hardware and software equipment as well as staff trained in bioinformatics. Routine diagnostic implementation of NGS methods requires thorough validation of individual tests and standardization of the entire analytical procedure. Considering the amount of acquired data, genetic testing by NGS yields a lot of results with varying informativeness. If a pathological variant (mutation) in a known or novel gene associated with the disease is found, the cause of patient's phenotype can be ascertained. On the contrary, incidental findings identified by exome or whole genome sequencing give rise to interpretative and ethical challenges and their reporting must fulfil strict criteria. Various NGS applications are already used in research and clinical diagnosis of many genetically determined diseases. Long-term experience proved apparent efficacy of gene panel and exome sequencing particularly in the diagnosis of rare syndromes and genetically heterogeneous diseases. However, in perspective, progressive integration of NGS into the clinical practice could lead to the individually tailored patient management even in more common, multifactorial diseases.

Key words: next generation sequencing (NGS), gene panels, exome sequencing (ES), whole genome sequencing (WGS), genetically heterogeneous diseases, rare syndromes.

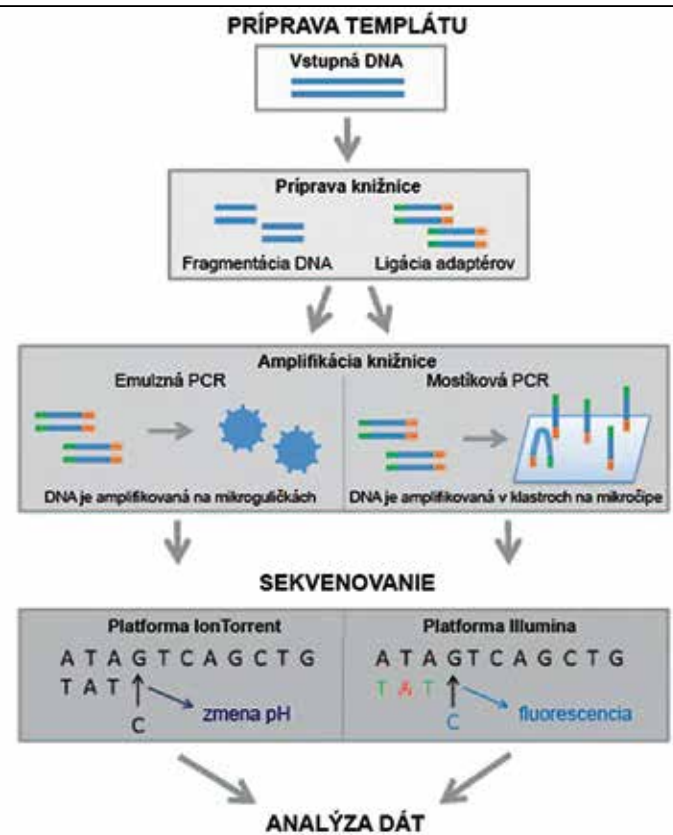
Sekvenačné technológie prvej a druhej generácie

Metóda DNA sekvenovania publikovaná F. Sangerom koncom 70. rokov minulého storočia (1) označovaná aj ako dideoxynukleotidové sekvenovanie priniesla nové a v čase svojho vzniku ešte netušené možnosti analýzy jednotlivých génov a neskôr celých genómov. Prvogeneračná Sangerova metóda sa postupne vyvinula na výkonnú automatizovanú technológiu využívajúcu polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), fluorescenčné značenie dideoxynukleotidov, kapilárnu elektroforézu a komplexné počítačové spracovanie dát a metodicky stále predstavuje zlatý štandard. Napriek určitým obmedzeniam automatizácia Sangerovho postupu umožnila úspešnú realizáciu projektu sekvenovania ľudského genómu a etablovanie sekvenačnej analýzy v rutinej molekulovo-genetickej diagnostike. Program sekvenovania celého ľudského genómu však dramaticky zvýšil nároky na kapacitu sekvenačných technológií. Projekt sa realizoval v „továrskych“ organizovaných sekvenačných centrách so špecifickou infraštruktúrou, ktorá zahŕňala stovky veľkokapacitných sekvenátorov, ďalších automatizovaných prístrojov a počítačov, ako aj veľké množstvo personálu. Takýto typ zvýšenia výkonnosti sekvenovania však nebol perspektívne postačujúci pre nové výskumné a diagnostické výzvy v humánnej genetike a genomike a postupne dochádzalo k vývoju nových, čoraz komplexnejších sekvenačných postupov.

Technológie sekvenovania novej generácie (NGS) sa od automatizovanej Sangerovej metódy odlišujú najmä svojou vysokou výkonnosťou. Základný princíp NGS je prehľadne znázornený na obrázkoch 1 – 3. Podstata zvýšenej efektivity spočíva v masívnej paralelizácii biochemických a meracích krokov, ako aj výraznom zvýšení rýchlosti sekvenovania. Nové metódy umožňujú simultánnu analýzu miliónov sekvenačných „čítaní“ v jednej vzorke. Ďalšie rozdiely zahŕňajú odlišnú formu východiskového templátu (tzv. fragmentové knižnice, viď nižšie) a o niečo kratšiu dĺžku sekvenovania analyzovaných fragmentov v porovnaní so Sangerovou metódou. Obmedzenia spôsobené kratšími čítaniami však kompenzuje masívna hĺbka pokrytia a paralelizácia, t. j. mnohonásobné opakovanie analýzy tej istej cieľovej oblasti genómu v zmesi obrovského množstva súbežne zoradených DNA fragmentov rôzneho typu (obrázok 2).

V súčasnosti používané NGS technológie druhej generácie (popis metód tretej generácie, ktoré sa stále ešte len profilujú, je nad rámec tohto prehľadového článku) z chemického hľadiska využívajú DNA syntézu alebo ligáciu. Detekcia signálu z miliónov chemických reakcií, ktorý je následne transformovaný do sekvenačných dát, je zabezpečená snímaním emitovanej fluorescence (z fluorescenčne značených nukleotidov), enzymaticky vyvolanej chemiluminiscencie (pri degradácii pyrofosfátu) a pH zmien (pri uvoľňovaní protónov počas inkorporácie nukleotidov do DNA reťazca). Bez ohľadu na chemickú podstatu sekvenovania, všetky NGS metódy vyžadujú komplexnú predsekvenačnú prípravu DNA templátu a následnú bioinformatickú analýzu sekvenačných dát (obrázky 1 a 3). Predsekvenačné kroky zahŕňajú prípravu sekvenačnej (fragmentovej) knižnice, podľa potreby aj vrátane cieľového obohatenia (target enrichment) a následne klonálnu amplifikáciu pripravenej sekvenačnej knižnice. Príprava knižnice sa zvyčajne skladá z dvoch krokov, fragmentácie východiskovej DNA na veľkosť 150-500 bp fyzikálnym (napríklad sonikáciou) alebo enzymatickým spôsobom (nukleázou, transpozónami) a ligácie adaptorových primerov na fragmenty. Cieľové obohatenie, t. j. špecifická

Obrázok 1. Princíp sekvenovania novej (druhej) generácie (upravené podľa (2))

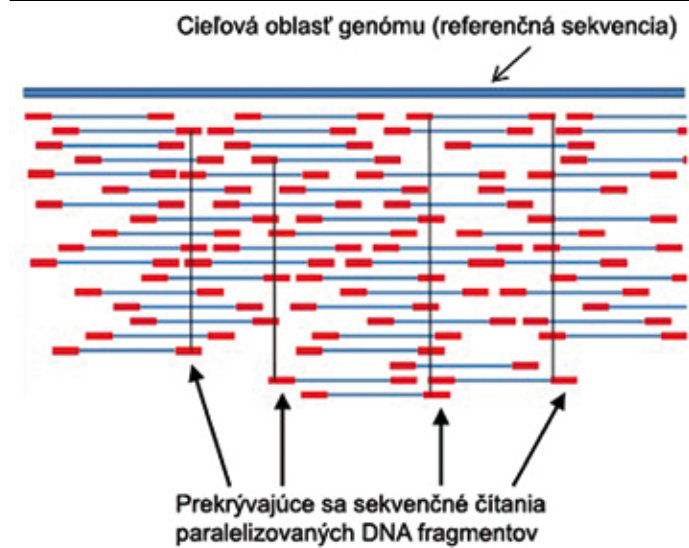


selekcia želaných DNA fragmentov, sa vykonáva v prípade potreby sekvenovať len určité oblasti genómu v sumárne menšom rozsahu (napríklad len niektoré exóny alebo súbory génov) a najčastejšie sa realizuje pomocou PCR alebo hybridizácie so špecifickými oligonukleotidovými probami. Klonálna amplifikácia knižnice prebieha pomocou špecifických typov PCR – najčastejšie tzv. emulznej alebo mostikovej (bridge) PCR. Posekvenačná bioinformatická analýza zahŕňa spracovanie nasnímaného signálu, jeho transformáciu do čiastkových nukleotidových sekvencií a porovnanie výslednej „poskladanej“ DNA sekvencie s referenčnou za účelom záverečnej identifikácie a anotácie variantných nukleotidov (5).

Počas sekvenačnej reakcie sa vygenerujú milióny až miliardy tzv. čítaní. Čítanie (read) je nukleotidová sekvencia určitej dĺžky (read length) získaná z DNA fragmentu nachádzajúceho sa v sekvenačnej knižnici. Na presnosť NGS analýzy a správnu interpretáciu dát je nevyhnutné dosiahnuť dostatočnú hĺbku pokrytia (depth of coverage). Hĺbka pokrytia je počet čítaní, ktorý pokrýva konkrétny cieľový nukleotid a bežne sa vyjadruje vo forme Nx (napríklad 40x, 100x, t. j. štyridsať, sto čítaní cieľového nukleotidu). Ďalším dôležitým parametrom je hĺbka sekvenovania (sequencing depth), t. j. celkové množstvo sekvenačných dát (prečítaných nukleotidov), ktoré vyžaduje daná vzorka, aby sa dosiahla požadovaná priemerná hĺbka pokrytia. Najčastejšie sa udáva ako počet potrebných čítaní na vzorku (napríklad 40 miliónov, 1 miliarda) alebo počet nukleotidov (báz), ktoré je nutné sekvenovať (napríklad 100 Mb, 4 Gb).

Proces analýzy NGS dát môžeme všeobecne rozdeliť na tri stupne (obrázok 4). Primárna analýza, stanovenie báz (base-calling), zahŕňa konvertovanie

Obrázok 2. Masívna paralelizácia na úrovni spracovania sekvenačných NGS dát. Červené úseky predstavujú identifikované sekvencie, modré úseky medzi nimi neurčenú sekvenciu (upravené podľa (3))



Obrázok 3. Všeobecný postup sekvenovania druhej generácie a analýzy získaných sekvenačných dát (upravené podľa (4))

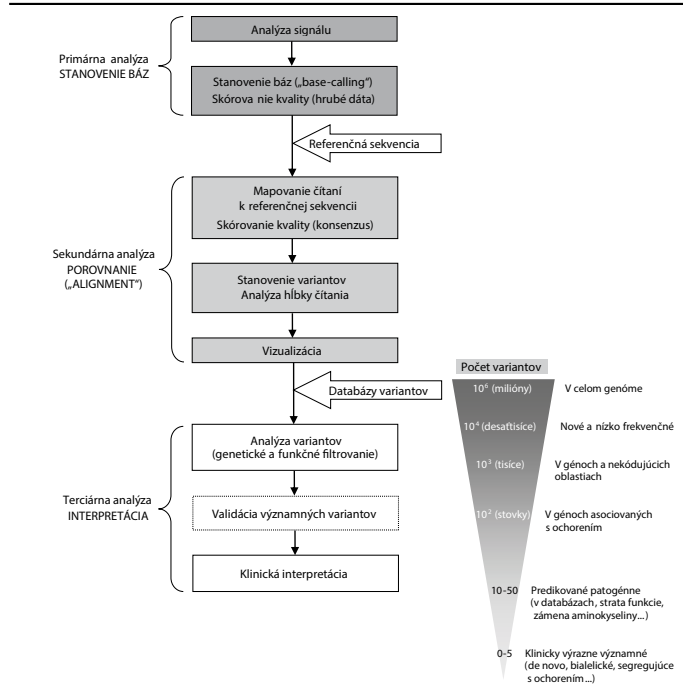


biochemických signálov, čiže hrubých dát, ktoré boli získané snímaním zmien svetelnej intenzity (fluoresencia, chemiluminiscencia) alebo zmien pH, do krátkych nukleotidových sekvencií – čítaní. Sekundárna analýza zabezpečuje porovnanie (alignment) sekvencií s referenciou a stanovenie variantných nukleotidov a ich anotáciu. Terciárna analýza znamená interpretáciu, t. j. analýzu zistených variantov z hľadiska pôvodu, jedinečnosti a funkčného dosahu. Každý z týchto krokov vyžaduje špeciálne vytvorené databázy, algoritmy, softvér a skúsenosti. Procesy primárnej analýzy sú už v súčasnosti úspešne zvládnuté a postupne sa automatizujú. Aj v rámci sekundárnej analýzy sa štandardizujú metódy mapovania čítaní k najnovšej referenčnej sekvencii ľudského genómu. Limitáciu širšej klinickej aplikácie NGS predstavuje práve biomedicínska interpretácia identifikovaných variantov, ktorá sa zatiaľ ešte len vyvíja, čo sa týka algoritmov, analytických postupov a identifikácie či predikcie kauzálnych genotypovo-fenotypových korelácií (6).

Aplikácie NGS

Sekvenovanie génových panelov (panelové sekvenovanie, PS) je zamerané na konkrétne ochorenia, pretože sa analyzuje stanovený súbor známych, klinicky významných génov. Dosahuje sa tým väčšia hĺbka pokrytia (t. j. viac čítaní v želaných oblastiach) a následne aj vyššia analytická senzitivita a špecifita. Keďže PS analyzuje len gény so známou

Obrázok 4. Obrázok 4. Algoritmus bioinformatického spracovania NGS dát a stupne filtrovania pri terciárnej analýze (upravené podľa (6) a (7))



asociáciou s konkrétnymi ochoreniami, umožňuje lepšiu interpretáciu nálezov v klinickom kontexte. V porovnaní s exómovým a genómovým sekvenovaním (viď nižšie) je PS kompatibilné s ekonomicky a časovo výhodnejším využitím menších stolových sekvenátorov (nižšia cena prístroja, možnosť analýzy viacerých vzoriek v jednom behu) a jednoduchším manažovaním objemu dát. V tabuľke 1 sú uvedené príklady génových panelov, ktoré v súčasnosti komerčne ponúkajú výrobcovia dvoch NGS platforiem (Illumina, Life Technologies) na priame použitie v diagnostike.

Exómové sekvenovanie (ES) znamená stanovenie DNA sekvencie exómu, teda väčšiny približne zo 160 000 proteín-kódujúcich exónov, ktoré síce predstavujú len 1 – 2 % ľudského genómu (~30 – 60 Mb), ale zahŕňajú ~85 % známych kauzálnych mutácií (8). ES sa používa na detekciu variantov (mutácií) už v známych, s ochoreniami asociovaných génoch, ako aj na zisťovanie nových etiopatogenetických asociácií. Objavovanie a charakterizácia „nových“ génov boli ešte donedávna doménou výskumných laboratórií, ale postupne dochádza k presunu identifikácie kandidátnych kauzálnych génov aj do klinicko-diagnostických laboratórií, hoci na jednoznačné potvrdenie asociácie sú zvyčajne potrebné ďalšie štúdie, často v spolupráci s výskumnými pracoviskami.

Celogenómové sekvenovanie (whole genome sequencing, WGS) stanovuje DNA sekvenciu prakticky celého genómu a pokrýva teda kódujúce aj nekódujúce oblasti. Výhodou tohto prístupu je relatívne nekomplikovaná predsekvenačná príprava vzoriek, ktorá nevyžaduje PCR amplifikáciu alebo obohacovanie cieľových oblastí. Pre obmedzenia pri interpretácii variantov v nekódujúcich oblastiach sa často volí stratégia, pri ktorej sa najprv analyzujú kódujúce regióny (t. j. exóm). V prípade, že sa nenájdu kauzálné mutácie, dáta sa znovu analyzujú a hľadajú sa va-

rianty v regulačných nekódujúcich oblastiach, ktoré by mohli ovplyvňovať expresiu klinicky významných génov. WGS pri porovnaní s cieľným PS vyžaduje rádovo desaťnásobky hĺbky sekvenovania (sequencing depth), t. j. množstva sekvenovania, ktoré vyžaduje daná vzorka, a to pri podstatne nižšej hĺbke pokrytia (depth of coverage), čo prináša veľké nároky na kvalitu a kapacitu technológie (konkrétneho prístroja) aj dátovej analýzy. Keďže sekvenačná hĺbka analyzovanej vzorky je násobkom objemu sekvenovanej DNA a želanej hĺbky pokrytia, pri veľkosti génového panela napríklad 3 Mb (3×10^6 bp) a hĺbke pokrytia 100x je sekvenačná hĺbka 0,3 Gb ($3 \text{ Mb} \times 100$), zatiaľ čo pri sekvenovaní celého genómu s veľkosťou 3 Gb (3×10^9 bp) a hĺbke pokrytia 30x je požadovaná sekvenačná hĺbka až 90 Gb ($3 \text{ Gb} \times 30$). Celogenómové sekvenovanie tak v súčasnosti predstavuje finančne najviac náročnú NGS aplikáciu s najnižšou priemernou hĺbkou pokrytia, hoci v budúcnosti sa tieto nevýhody budú postupne redukovat.

Klinické aspekty implementácie NGS

Vzhľadom na pomerne nedávne etablovanie NGS technológií a rôznorodosť klinických aplikácií sa NGS testovanie (najmä panelové) vykonáva prevažne pomocou vlastných testov vyvinutých v jednotlivých laboratóriách. Využívajú sa najrozličnejšie kombinácie prístrojov, chemikálií a postupov dátovej analýzy. Niekedy sú jednotlivé časti analýzy (napríklad zostava predsekvenačného postupu od jedného výrobcu alebo softvéry pre terciárnu analýzu dát) komerčne, verejne dostupné, ale následne musia byť validované na diagnostické použitie (9).

Pri tradičnom diagnostickom testovaní je úlohou klinického genetika stanoviť diagnózu založenú na klinickom obraze, objektívnom vyšetrovaní a rodinnej anamnéze. Genetický test býva indikovaný na potvrdenie, respektíve vylúčenie diagnózy. Vyšetrojúce laboratórium vo výsledkovej správe uvedie všetky potenciálne patologické varianty (mutácie) v analyzovanom gène, ako aj základný popis použitých metód vrátane analytických parametrov (senzitivita, špecifita, detekčný limit). Panelové sekvenovanie predstavuje z pohľadu klinického genetika logické rozšírenie súčasných sekvenačných testov v prípade tzv. geneticky heterogénnych ochorení. Indikáciou PS je teda klinická diagnóza ochorenia, ktorého genetická etiológia je veľmi heterogénna, konkrétny kauzálny gén sa nedá nijakým spôsobom vyselektovať a súbežná analýza veľkého počtu asociovaných génov preto predstavuje najefektívnejší diagnostický postup. Korektná indikácia PS tak môže prispieť k podstatnému zrýchleniu identifikácie kauzálnej mutácie u novodiagnostikovaných pacientov, respektíve úspešnému zavŕšeniu diagnostického procesu pri dlhodobo nedoriešených prípadoch. Testovanie pomocou PS najlepšie vyhovuje aj súčasným modelom finančnej úhrady (zdravotnými poisťovňami i samoplacovsky) za molekulárne diagnostické testy. Z týchto dôvodov je pre laboratória aj indikujúcich klinických genetikov najvýhodnejšie začať zo získavaním skúseností najprv prostredníctvom PS pred postupným prechodom k ES a WGS aplikáciám.

Použitie ES alebo WGS umožňuje voľnejší prístup k testovaniu pacientov, bez nutnosti presnej iniciálnej diagnózy, ale na korektnú interpretáciu dát vyžadujú obe aplikácie úzku spoluprácu klinického genetika s laboratóriom, najmä pri voľbe vhodnej stratégie filtrovania variantov a následnej interpretácii výsledkov. Indikáciou ES, respektíve WGS sú prípady, pri ktorých je klinicky veľmi pravdepodobné genetické ochorenie,

Tabuľka 1. Príklady génových panelov ponúkaných výrobcami NGS platforiem

Zameranie panelu	Názov	Počet génov	Spektrum analýzy
Dedičné ochorenia	TruSight One Sequencing	4.813	Exónové oblasti génov uvedených v OMIM*, ktorých mutácie boli asociované s konkrétnymi ochoreniami
	Ion AmpliSeq Inherited Disease	325	>700 vrodených chorôb vrátane neuromuskulárnych (245 ochorení /87 génov), kardiovaskulárnych (159/62), metabolických (46/28), vývinových porúch (193/75) a iných ochorení (napr. dedičné nádorové, slepota: 210/73)
	TruSight Inherited Disease	552	OMIM* gény asociované prevažne so závažnými autozómovo-recesívnymi ochoreniami s nástupom v detstve
Heterogénne ochorenia	TruSight Cardiomyopathy	46	Kardiomyopatie (KMP: hypertrofická, dilatčná, nonkompaktná ľavokomorová, arytmogénna pravokomorová/ katecholaminergná polymorfna komorová tachykardia) a syndrómy s KMP, napr. Danonov, Fabryho
	TruSight Autism	101	Gény asociované s poruchami autistického spektra a mentálnou retardáciou (resp. zaostávaním vývinu)
Analýza tumorového tkaniva a dedičné nádorové predispozície	Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer	22	Vybrané oblasti najčastejšie mutovaných génov v karcinómoch hrubého čreva a pľúc
	Ion AmpliSeq Cancer Hotspot	50	Najčastejšie mutácie („hotspots“) vo vybraných onkogénoch a tumor-supresorových génoch; široké pokrytie onkogénov <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> a <i>EGFR</i>
	Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer	>400	Exónové oblasti onkogénov a tumor-supresorových génov často mutovaných v rôznych typoch solídnych nádorov (vrátane génov pre signálnu transdukciiu, apoptózu, opravu DNA, reguláciu transkripcie, zápalovú reakciu a rastové faktory)
	TruSight Tumor	26	Vybrané exóny onkogénov a všetky exóny tumor-supresorových génov, ktoré sú najčastejšie mutované v karcinómoch pľúc, hrubého čreva, žalúdka, ovárií a v melanómoch; vysoká senzitivita (detekčný limit < 5 % zastúpenia mutovaných alií vo vzorke nádorového tkaniva)
	TruSight Cancer	94	Gény asociované s predispozíciou k častým (prsník/ováriá, hrubé črevo) aj zriedkavým dedičným nádorovým ochoreniam

* databáza Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.omim.org/>

Tabuľka 2. Geneticky podmienené ochorenia vhodné na panelové testovanie

Syndrómy Noonanovej spektra (RASopatie), Cornelia de Lange syndróm
Marfanov syndróm a príbuzné ochorenia spojiva
Sticklerov, Ehlers-Danlos, Alportov syndróm a iné kolagénopatie
Osteogenesis imperfecta a iné skeletálne dysplázie
Bardet-Biedlov, Joubertov syndróm a iné cíliopatie
Polycystická choroba obličiek, Bartterov syndróm
X – viazaná mentálna retardácia
Syndrómy asociované s autizmom
Glykogenózy
Lyzozomálne teaurizmózy
Poruchy peroxizómovej biogenézy
Mitochondriálne ochorenia
Epilepsia a s ňou asociované syndrómy
Spinocerebelárne a iné vybrané ataxie
Hereditárna spastická paraplégia
Primárne dystónie a príbuzné syndrómy
Charcot-Marie-Toothova a ďalšie dedičné neuropatie
Spinálna svalová atrofia a vrodené svalové dystrofie
Pletencové svalové dystrofie
Kardiomyopatie a arytmie
Retinálne dystrofie
Vrodená hluchota

ale dostupné cielené testy pre konkrétny gén alebo gény asociované s daným fenotypom (aj pomocou PS) neidentifikovali kauzálnu mutáciu, alebo ak klinický obraz, údaje z rodinnej anamnézy, silne suponujú genetickú etiológiu, ale fenotyp nekorešponduje so špecifickým ochorením, pre ktoré je dostupný cielený genetický test. Pred indikáciou ES/WGS testovania musí klinický genetik dôkladne zvážiť aj potenciálny vplyv náhodných nálezov (viď nižšie).

Predtestová konzultácia klinickým genetikom má zahŕňať formálny informovaný súhlas a pacienti majú byť podrobne informovaní o očakávanom výsledku testovania, pravdepodobnosti a type potenciálnych náhodných nálezov a kategóriách výsledkov, ktoré budú, respektíve nebudú uvedené vo výsledkovej správe. Takisto je potrebné pacientom jasne vysvetliť rozdiel medzi výlučne klinicko-diagnostickým a (potenciálne) výskumne orientovaným testovaním, hoci oba typy sa často prekrývajú, resp. dopĺňajú. Nevyhnutným dôsledkom testovania pomocou ES/WGS je identifikácia sekvenčných variantov, ktoré sa nevzťahujú priamo k pôvodnému zámeru testu. Za primárny nález sa považuje patogénny variant (mutácia) v géne, ktorý je relevantný k diagnostickej indikácii NGS testu. Naopak, náhodný alebo sekundárny nález znamená nečakané zistenie patogénnej zmeny v géne zjavne nesúvisiacom s pôvodnou indikáciou. Určité typy náhodných nálezov je možné považovať za dostatočne závažné a ich uvedenie vo výsledkovej správe sa jednoznačne odporúča (10). Medzi významné náhodné nálezy patrí najmä identifikácia variantu asociovaného s predispozíciou k určitému ochoreniu (t. j. vysokým rizikom rozvoja ochorenia v budúcnosti), respektíve zistenie mutácie pre doteraz

klinicky sa neprejavujúce ochorenie a nález nosičstva heterozygotnej mutácie pre recesívne ochorenie. Diagnostické laboratórium poskytuje ES/WGS analýzy by preto malo mať vypracovaný podrobný postup ohľadom posudzovania a uvádzania (reportovania) náhodných nálezov vo výsledkovej správe.

Diagnostické využitie NGS v klinicko-genetickej praxi

Jednotlivé NGS aplikácie sa v súčasnosti efektívne využívajú v genetickej laboratórnej diagnostike zriedkavých syndrómov, heterogénnych ochorení a pri neinvazívnom prenatálnom testovaní plodu. Za zriedkavé (raritné) ochorenia sa na základe konsenzu považujú choroby s individuálnou populačnou incidenciou menej ako 1 : 2 000, čiže vyskytujúce sa menej ako u 500 jedincov z milióna. Extrémne zriedkavé (ultrararitné) ochorenia majú incidenciu menšiu ako 1 : 50 000, zisťujú sa teda u menej ako 20 jedincov z milióna. Predpokladá sa, že kauzálne mutácie pre raritné ochorenia sa vyskytujú so zodpovedajúcou nízkou frekvenciou, respektíve výlučne u postihnutých jedincov. Tento predpoklad platí najmä pre vysokopenetrantné mutácie, t. j. varianty veľkého účinku asociované s typickým fenotypom, ktoré sa nevyskytujú bežne v populácii, a preto ani v databázach celogenómových analýz alebo polymorfizmov (dbSNP, HapMap, 1000 Genomes, ap.). Neprítomnosť v týchto databázach predstavuje dôležité kritérium pri hľadaní zriedkavého alebo *de novo* variantu pri ES/WGS analýzach. Od uverejnenia pilotnej práce, ktorá pomocou ES identifikovala mutáciu v géne *SLC26A3* a potvrdila pôvodne klinicky nesuponovanú diagnózu vrodenej chloridovej diarrhey (hnačky) (11) bolo publikovaných viac ako 150 ďalších štúdií, ktoré úspešne využili ES/WGS na detekciu recesívnych, dominantných aj *de novo* mutácií.

Geneticky heterogénne ochorenia, ktoré predstavujú jednoznačných kandidátov na využitie PS, môžeme rozdeliť do niekoľkých základných skupín: špecifické genetické syndrómy s historicky známou heterogenitou, syndrómy s mentálnou retardáciou a/alebo autizmom, dedičné metabolické poruchy a ochorenia primárne diagnostikované inými medicínskymi odborníkmi (neuroológia, kardiológia, oftalmológia, ORL). Konkrétne príklady sú uvedené v tabuľke 2.

Zavedenie NGS metód prinieslo potrebnú technológiu aj na vyriešenie technických problémov neinvazívnej detekcie trizómie 21 a ďalších častých aneuploidií plodu z voľnej fetálnej DNA cirkulujúcej v periférnej krvi matky. Po pilotných menších prácach principiálne testujúcich NGS analýzu ďalšie štúdie potvrdili vysokú špecifitu a senzitivitu takéhoto neinvazívneho prenatálneho testovania (NIPT) na rozsiahlych súboroch tehotných žien (12,13). Pri skríningu najčastejších fetálnych aneuploidií NIPT predstavuje alternatívu a perspektívne náhradu multimarkerových biochemických testov a invazívneho odberu fetálnej vzorky. V súčasnosti je už v ponuke viacero komerčne dostupných NIPT testov a ich široké použitie je zatiaľ limitované finančnou náročnosťou pre tehotné probandy. Len ďalší vývoj ukáže, či tento typ testov úspešne nahradí doterajšie postupy prenatálnej genetickej diagnostiky.

Záver

Postupné rozšírenie NGS analýz v klinicko-diagnostickej praxi bude predstavovať zmenu paradigmy v medicíne a veľmi pravdepodobne

prinesie skutočne „na mieru šitú“ lekársku starostlivosť založenú na poznaní individuálneho rizika. Už dnes je zrejmé, že aplikácie NGS budú mať veľký význam nielen pri genetických ochoreniach s mendelským typom dedičnosti, ale aj pri polygénových a multifaktoriálnych chorobách (14). Preto je potrebné, aby klinickí genetici postupne pomohli integrácii „genomického“ myslenia aj v iných medicínskych špecializáciách.

Literatúra

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-7.
2. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol*. 2013;133(8):e11.
3. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapping_Reads.png
4. Hui P. Next Generation Sequencing: Chemistry, Technology and Applications. *Top Curr Chem*. 2014;336:1-18.
5. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46.
6. Moorthie S, Hall A, Wright CF. Informatics and clinical genome sequencing: opening the black box. *Genet Med*. 2013;15(3):165-71.
7. Krier JB, Green RC. Management of incidental findings in clinical genomic sequencing. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 9:Unit9.23.
8. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, et al. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. 2011;48(9):580-9.
9. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15(9):733-47.
10. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15(7):565-74.
11. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(45):19096-101.
12. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*. 2012;119(5):890-901.
13. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011;13(11):913-20.
14. Thakuria JV, Zaraneek AW, Church GM, et al. Back to the future: from genome to metabolome. *Hum Mutat*. 2012;33(5):809-12.



MUDr. Mária Geryková Bujalková, PhD.
 Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**
 Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
 maria.bujalkova@medirex.sk

Štúdium spoluúčasti genetických faktorov na diabetickej retinopatii

(Vedecký zámer projektu ŠF ITMS 26240120038 „Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií“)

Prof. RNDr. Ľudevít Kádaši, DrSc.

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského Bratislava

Jednou z najzávažnejších komplikácií cukrovky (diabetes mellitus, DM) je retinopatia (DR), ktorá po 20 rokoch trvania cukrovky takmer u 100 % pacientov vedie k úplnej strate zraku. Napriek významným vedeckým pokrokom toto ochorenie je stále hlavnou príčinou slepoty a zhoršenia zrakovkej ostrosti v populácii produktívneho veku. Aj keď presná etiopatogenéza DR zatiaľ nie je objasnená, v ostatných rokoch sa nahromadilo veľké množstvo dôkazov o významnej spoluúčasti genetických faktorov na vývine a závažnosti DR. Výsledky doterajších štúdií však ukazujú, že objasnenie a pochopenie ich úlohy ešte vyžaduje mnohé ďalšie extenzívne štúdie. Cieľom nášho projektu je vytvoriť materiálnu, vedomostnú a metodickú infraštruktúru, a tak prispieť k riešeniu tejto problematiky, či už identifikáciou niektorých genetických faktorov, ktoré sa podieľajú na patogenéze DR, alebo identifikáciou genetických markerov, ktoré by umožnili vytypovať jedincov so zvýšenou náchylnosťou na DR ešte v predklinickom štádiu, aby sa u nich mohli aplikovať efektívne preventívne zákroky.

Kľúčové slová: diabetes mellitus, diabetická retinopatia, genetické faktory, kandidátne gény, celogenómová analýza.

Studying the contribution of genetic factors to the development of diabetic retinopathy

One of the most serious complications of diabetes (diabetes mellitus, DM) is retinopathy (DR), which after 20 years duration of diabetes in nearly 100% of patients leads to complete loss of vision. Despite significant scientific progress, the disease is still the leading cause of blindness and worsening the visual acuity in the population of working age. Although the exact etiology of DR is not yet clarified, in recent years large amount of evidence has accumulated on a significant involvement of genetic factors in development and severity of DR. Results of previous studies show that clarification and understanding of their role still needs many more extensive studies. The aim of our project is to create materials, knowledge and methodological infrastructure and thus contribute to solving this problem, including identification of certain genetic factors involved in the pathogenesis of DR or identification of genetic markers that would allow to identify DM patients with increased susceptibility to DR, still in preclinical stage, which would allow to apply effective preventive interventions.

Key words: diabetes mellitus, diabetic retinopathy, candidates genes, whole genome analysis.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 21–23

Úvod

Jednou z najzávažnejších komplikácií cukrovky (diabetes mellitus, DM) je retinopatia (DR), ktorá po 20 rokoch trvania cukrovky takmer u 100 % pacientov vedie k úplnej strate zraku. Napriek významným vedeckým pokrokom v etiopatogenéze DR, toto ochorenie je stále hlavnou príčinou slepoty a zhoršenia zrakovkej ostrosti v populácii produktívneho veku.

Presná patogenéza DR nie je zatiaľ objasnená, ale sa uvažuje o niekoľkých rizikových faktoroch. Na prvom mieste sa spomína dĺžka trvania cukrovky a jej zlá kompenzácia. Z ďalších vonkajších faktorov, ktoré môžu ovplyvniť vznik a ďalší priebeh diabetickej retinopatie, sú fajčenie, konzumácia alkoholu, vysoký krvný tlak, poruchy v hladinách krvných tukov, hormonálna antikoncepcia.

V ostatných rokoch nazhromaždené výsledky a pozorovania však poukazujú na to, že na vývine DR sa významne podieľajú aj genetické faktory. Tie dôkazy pochádzajú z rôznych zdrojov. Na prvom mieste treba spomenúť, že napriek rovnakému priebehu DM a jeho kompenzácie u časti pacientov sa vyvinie DR a u inej nie. Dokonca aj v prípade jedného z najzaujímavejších

rizikových faktorov DR, čím je dĺžka trvania DM, sa pozorovali významné rozdiely. Niektorí postihnutí ani po mnohých rokoch nekompenzovaného DM nemajú DR, kým u iných už po krátkom čase kompenzovaného DM sa príznaky objavujú (1, 2). Jediným vysvetlením tohto pozorovania je odlišné genetické pozadie u DM pacientov (3). Okrem tohto nepriameho dôkazu existuje aj celý rad priamych dôkazov. Na prvom mieste treba spomenúť etnickú príslušnosť, respektíve populačné rozdiely vo výskyte DR u DM pacientov. Napríklad *výrazné rozdiely sa našli u Afroameričanov a Američanov európskeho pôvodu* (rozdielne genetické pozadie). V prospech genetických faktorov hovorí aj rodinná agregácia DR v diabetickejších rodinách, keď riziko u príbuzných DM pacientov s DR sa našla 3-násobne vyššia incidencia DR v porovnaní s rodinami DM pacientov bez DR (The diabetes control and complications trial research group 1997) (30). Aj konkordancia výskytu DR vykazuje zvýšenú hodnotu u monozygotných dvojčiat v porovnaní s dizygotnými. Najpresvedčivejšie dôkazy však pochádzajú priamo z genetických analýz. Napríklad *väzbová analýza odhalila v ľudskom genóme niekoľko lokusov, ktoré vykazovali väzbu s DR, aj keď samotné gény zatiaľ*

neboli identifikované. Ide o nasledovné chromozómy: 1q36, 3, 5, 6, 9, 15, 19 a 20 (3, 4, 5, 6). Tretím zdrojom dôkazov o spoluúčasti genetických faktorov na vývine DR sú asociačné štúdiá, či už celogenómové (7) alebo s variantmi kandidátnych génov (8, 9). Celogenómových asociačných štúdií bolo doteraz uskutočnených len niekoľko. Jedna štúdia na mexických Američanov odhalila asociáciu s variantom génu *CAMK4* na 5. chromozóme a s variantom génu *FMN1* v lokuse *15q13* (10). Početnejšie sú štúdie, ktoré sledovali asociáciu s variantmi kandidátnych génov. Ako kandidátne gény sa analyzovali predovšetkým gény biochemických dráh, ako je polyolová dráha, „increased advanced glycation end products formation“ (AGE) dráha, „glucose-induced“ dráhy, angiogenéza, renín-angitensínová dráha, „tissue matrix remodeling“, aktivácia proteínkinázy C (PKC), tvorba reaktívnych kyslíkov, vaskulárna endoteliálna dysfunkcia a „increased hexosamine flux“ dráha (1, 11, 12, 13). Pacienti s diabetes mellitus 2. typu majú vysokú variabilitu terapeutických odpovedí na liečbu orálnymi antidiabetikami, preto medzi kandidátne gény možno zaradiť aj gény, ktoré majú vzťah k farmakokinetike aj k farmakodynamike týchto orálnych antidiabetík (*CYP2C9, KCNJ11, ABCC8, TCF7L2, OCT1, OCT2 a MATE1, ATM a pod.*)

Prehľad niekoľkých doteraz najviac analyzovaných génov:

ALR2: Našli sa asociácie CA opakovanie v tomto géne s DR v niekoľkých populáciách, ako je Čína (14), Japonsko (15), India (16), Čile (17) a Brazília (18). Na druhej strane takáto asociácia sa nenašla v kórejskej populácii (19) a v jednej populácii Brazílie (20).

RAGE: Polymorfizmus 374T/A vykázal asociáciu DR vo Švédsku a v Indii. Dokonca polymorfizmus Gly82Ser sa ukázal ako protektívne vo vzťahu k DR v Indii (3, 9, 21). Tieto výsledky však neboli replikované v populácii Číny. Takisto polymorfizmus 429T/C nevykázal asociáciu s DR v Číne ani v Slovinsku.

ATRI: Tento gén sa nachádza v oblasti na 3. chromozóme, ktorá vykazovala väzbu s DR. Napriek tomu v súbore 827 pacientov z Číny polymorfizmy tohto génu nevykazovali asociáciu s DR.

ACE: Inzerčno/delečný polymorfizmus tohto génu bol asociovaný s DR u japonských pacientov, pacientov z Iránu a polymorfizmu rs4343 u pacientov z Číny (22). Na druhej strane takáto asociácia sa nenašla u 283 pacientov zo Španielska.

VEGF: Polymorfizmy promótorovej oblasti tohto génu vykazovali silnú asociáciu s DR v japonskej populácii (23)), v kaukazoidných populáciách (24, 25)), ale aj v indickej populácii (11). Výsledky asociačných štúdií polymorfizmov tohto génu s DB zosumarizovali v metaanalýze (26).

GSTT1: U 604 pacientov kaukazoidného pôvodu delécia tohto génu u DM pacientov s DR bola dvakrát častejšia ako u pacientov bez DR.

SOD2: V jednej štúdii sa ukázalo, že polymorfizmus tohto génu má protektívny účinok voči DR (27).

HFE: Našla sa asociácia mutácie C282Y tohto génu s DR u kaukazoidných DM2 pacientov.

PON1: Variant L/L tohto génu je silne asociovaný s vývinom DR v japonskej populácii (22).

PAI-1: Delécia 4G v promótorovej oblasti tohto génu bola asociovaná s vyšším rizikom DR u Indiánov kmeňa Pima (28).

α3-AR: Takisto u Indiánov Pima genotypy Arg/Arg a Arg/Trp boli signifikantnejšie asociované s DR ako genotypy Trp/Trp (28).

Z uvedeného vyplýva, že na vývin DR má vplyv široká škála génov, pričom sa dá očakávať, že vplyv jednotlivých génov bude pomerne malý. Preto sú výsledky analýz jednotlivých génov separátne málo signifikantné, ba v niektorých prípadoch aj protichodné.

Je všeobecne známe, že oxidatívny stres je významným rizikovým faktorom makro-, ale aj mikrovaskulárnych patológií. Nadprodukcia reaktívnych kyslíkových radikálov v mitochondriách môže byť v pozadí týchto patológií. DR je vlastne mikrovaskulárnou komplikáciou DM. Preto mtDNA sa považuje za kandidáta geneticky podmienenej susceptibility DR. Bolo uskutočnených niekoľko štúdií, ktoré sledovali asociáciu mitochondriálnych haplotypov s priebehom a závažnosťou DR. V jednej štúdii zo strednej Európy sa našla významná asociácia haplotypu T s DR u pacientov s DM2 (29). V inej štúdii, uskutočnenej v Taliansku, zase haplotyp H bol signifikantne asociovaný s DR. O populačne špecifickej asociácii mtDNA haploskupín s komplikáciami DM (teda aj DR) referujú iní autori v troch populáciách židovského pôvodu.

Z uvedeného vyplýva, že spoluúčasť genetických faktorov na vývine a závažnosti DR u DM pacientov je nesporná. Výsledky doterajších štúdií však ukazujú, že objasnenie a pochopenie ich úlohy ešte vyžaduje mnohé ďalšie extenzívne štúdie. Cieľom nášho projektu je vytvoriť materiálnu, vedomostnú a metodickú infraštruktúru, a tak prispieť k riešeniu tejto problematiky, či už identifikáciou niektorých genetických faktorov, ktoré sa podieľajú na patogenéze DR, alebo identifikáciou genetických markerov, ktoré by umožnili vytypovať jedincov so zvýšenou náchylnosťou na DR ešte v predklinickom štádiu, aby sa u nich mohli aplikovať efektívne preventívne zákroky. Je totiž jednoznačne potvrdené, že čím v skorších štádiách vývinu sa zachytí DR, tým sú preventívne zákroky efektívnejšie a v konečnom dôsledku môžu zachrániť zrak DM pacienta.

Podakovanie: Táto publikácia je výsledkom implementácie projektu „Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií“, ITMS 26240120038, podporovaného programom „Research & Developmental Operational Programme, ERDF“.

„Tento článok vznikol na základe výskumných aktivít v projekte, ktorý bol podporený v rámci OP Výskum a vývoj, s názvom: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“.

Literatúra

1. Uthra S, Raman R, Mukesh BN, et al. Genetics of diabetic retinopathy. *Int. J. Hum. Genet.* 2008;8(1-2):155–159.
2. Sun JK, Keenan HA, Cavallerano JD, et al. Protection from retinopathy and other complications in patients with type 1 diabetes of extrema duration. *Diabetes Care.* 2011;34(4):968–974.
3. Schwartz SG, Brantley MA, Flynn HW. Genetics an diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews.* 2012;9:86–92.
4. Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, et al. Sib-pair linkage analysis for susceptibility gene for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes.* 1998;47(5):821–830.

5. Hallman DM, Boerwinkle E, Gonzalez VH, et al. A genome-wide linkage scan for diabetic retinopathy susceptibility genes in Mexican Americans with type 2 diabetes from Starr County, Texas. *Diabetes*. 2007;56(4):1167–1173.
6. Looker HC, Nelson RG, Chew E, et al. Genome-wide linkage analysis to identify loci for diabetes retinopathy. *Diabetes*. 2007;56(4):1160–1166.
7. Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, et al. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Hum. Molec. Genet.* 2011;20(12):272–2481.
8. Roy MS, Hallman M, Fu YP, et al. Assessment of 193 candidate genes for retinopathy in African Americans with type 1 diabetes. *Arch. Ophthalmol.* 2009;127(5):605–612.
9. Balasubbu S, Sundaresan P, Rajendran A, et al. Association analysis of nine candidate gene polymorphisms in Indian patients with type 2 diabetic retinopathy. *BMC Medical Genetics*. 2010;11:158.
10. Fu Y-P, Hallman DM, Gonzalez VH, et al. Identification of diabetic retinopathy genes through a genome-wide association study among Mexican-Americans from Starr County Texas. *J. Ophthalmol.* 2010. doi:10.1155/2010/861291,
11. Balasubbu S, Rajendran A, Ramasamy K, et al. Emerging patterns of possible potential candidate gene polymorphisms associated with diabetic retinopathy – a review. *Assian J. Exp. Sci.* 2006;20:15–28.
12. Ng PK. Human genetics of diabetic retinopathy: Current perspectives. *J. Ophthalmol.* 2010. doi:10.1155/2010/172593.
13. Kuo JZ, Wong TY, Rotter JI. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmology*. 2014;132(1):96–107.
14. Li Q, Xie P, Huang J, et al. Polymorphisms and functions of the aldose reductase gene 5'regulatory region in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Chin. Med. J.* 2002;115(2):209–213.
15. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al. Length rather than a specific allele of dinucleotide repeat in the 5'upstream region of the aldose reductase gene is associated with diabetic retinopathy. *Diabet. Med.* 1999;16:1044–1047.
16. Kumaramannickavel G, Sripriya S, Ramprasad VL, et al. Z-2 aldose reductase allele and diabetic retinopathy in India. *Ophthalmic Genet.* 2003;24:41–48.
17. Olmos P, Futers S, Acosta AM, et al. (AC)23 (Z-2) polymorphism of the aldose reductase gene and fast progression of retinopathy in Chilean type 2 diabetics. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2000;47:169–176.
18. Richeti F, Noronha RM, Waetge RT, et al. Evaluation of AC(n) and C(-106) T polymorphisms of the aldose reductase gene in Brazilian patients with DM1 and susceptibility to diabetic retinopathy. *Mol. Vis.* 2007;13:740–7415.
19. Park HK, Ahn CW, Lee GT, et al. (AC)(n) polymorphism of aldose reductase gene and diabetic microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002;55:151–157.
20. Santos KG, Tschiedel B, Schneider J, et al. Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylen-tetrahydrofolate reductase gene. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003;61:133–136.
21. Ramprasad S, Radha V, Mathias RA, et al. Rage gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in clinic-based population from South India. *Eye*. 2007;21(3):395–401.
22. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, et al. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2009;58(9):2137–2147.
23. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, et al. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2009;247:21–26.
24. Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5-prime-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:1635–1639.
25. Ray D, Mishra M, Read Davies R, et al. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes*. 2004;53:861–864.
26. Lu Y, Shi Y, Ge Y, et al. Two polymorphisms (rs699947, Rs2010963) in the VEGF gene and diabetic retinopathy: An updated meta-analysis. *Diabetes and Metabolism*. 2012;S:3.
27. Demiryurek AT, Erbagci I, Oztuczu S, et al. Lack of association between the Thr431Asn and Arg83Lys polymorphisms of the ROCK2 gene and diabetic retinopathy. *Curr. Eye. Res.* 2010;35(12):1128–1134.
28. Nagi DK, McCormack LJ, Mohamed-Ali V, et al. Diabetic retinopathy, promoter (4G/5G) polymorphism of KAI-1 gene, and PAI-1 activity in Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1997;20(8):1304–1309.
29. Kofler B, Mueller EE, Eder W, et al. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Medical Genetics*. 2009;10(35):1–7.
30. The diabetes control and complications trial research group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1997;31(1):1829–1839.

Prof. RNDr. Ľudovít Kádaši, DrSc.

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity
Komenského, Bratislava
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava
kadasl@fns.uniba.sk

Stanovenie stopových prvkov v krvnom sére

RNDr. Štefan Hauks

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Košice

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť a zvalidovať pracovné postupy pre metódy na stanovenie stopových prvkov meď a zinok v krvnom sére pre rutinnú diagnostiku v laboratóriu klinickej biochémie. Validované analytické metódy sú prevádzkovo realizovateľné s presnosťou (opakovateľnosť, reprodukovateľnosť) do 5 % a správnosťou (výťažnosť) v intervale 85 – 115 % v celom kalibračnom rozsahu.

Kľúčové slová: elektrotermická atomizácia, teplotný a časový program, kalibračná krivka, presnosť, správnosť.

Determination of trace elements in serum

The aim of this work was to develop and validate a method of operating procedures for the determination of trace elements copper and zinc in serum for routine diagnostic in laboratory of clinical biochemistry. Validated analytical methods are operationally feasible with precision (repeatability, reproducibility) up to 5% and an accuracy (recovery) in the interval of 85-115% at the all calibration screen.

Key words: electrothermal atomization, temperature and timing, calibration curve, precision, accuracy.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 24–27

Úvod

Väčšina stopových kovov sú esenciálne výživové prvky pre človeka, ale aj pre zvieratá, patria sem selén, zinok, meď, kobalt, mangán, molybdén, chróm, nikel a železo. Medzi významné funkcie stopových prvkov patrí determinácia, mobilizácia a konštantná väzba na biologické ligandy. Niektoré sú využívané pri elektrických impulzoch pozdĺž nervových vlákien, iné sú stabilnou súčasťou komplexov s enzýmami alebo nukleovými kyselinami, prípadne ligandmi. V biologických procesoch sa uplatňujú ako spúšťače, aktivátory, ako aj kontrolory celej škály reakcií. Iná skupina stopových prvkov vytvára pevný statický komplex a stávajú sa integrálnou časťou proteínov a enzýmov. Množstvo biologických systémov je závislé od denného príjmu stopových prvkov (meď, zinok, mangán). Oxidatívny stres je významným faktorom v infekčnom procese, ak sú v deficite mikroprvky (1). Stopové prvky a niektoré ich zlúčeniny majú antivírusovú aktivitu prostredníctvom inaktivácie celulárnych proteínov. Teda stopové prvky zohrávajú významnú úlohu pri chorobách vyvolaných vírusmi (2 – 5). Imunitný systém predstavuje významnú zložku organizmu integrujúceho fyziologické funkcie, ktoré eliminujú cudzorodé zložky, infekčné mikróby, ako aj odumreté vlastné bunky. Tieto mechanizmy sú zabezpečené prostredníctvom nešpecifickej (vrodenej) alebo špecifickej (získanej) imunity so zložitými procesmi, ktoré sú koordinované celým radom buniek (lymfocyty, makrofágy, antigén prezentujúce bunky) a molekulárnych látok (cytokínov, imunoglobulínov, imunohormónov). Makrofágy predstavujú bunky prvej línie pri obranných procesoch vyznačujúce sa fagocytárnou, cytotoxickou a sekrečnou aktivitou. Mikroelementy ako zinok, selén, železo, meď a iné významne ovplyvňujú jednotlivé zložky nešpecifickej imunity. Vybrané mikroelementy zohrávajú dôležitú úlohu v ochrane buniek pred poškodením vyvolaným oxidantmi. Fagocyty produkujúce reaktívne oxidanty sa zúčastňujú na ochrane proti infekčným agens. Nedostatok zinku znižuje funkciu NK buniek, pričom prídavok tohto prvku výrazne zlepšuje aktivitu NK buniek. Poznatky o špecifickom účinku mikroelementov na funkciu neutrofilov sú nejasné (6).

Stopové prvky sa v tkanivách nachádzajú v koncentrácii **nižšej ako 50 ppm ($< 50 \times 10^{-6}$ g/g)**. Ich potrebný denný príjem je menší než 50 mg denne. Hlavné prvky – Fe, I, Cu, Zn, Co, Cr, Mo, Se, F, Mn, Ni, As, Sn, Si, V:

- sú esenciálne – telo si ich nedokáže samo vytvoriť a sú závislé od ich príjmu potravou;
- ich nedostatok alebo nadbytok spôsobuje zdravotné problémy.

Hlavnou biochemickou úlohou stopových prvkov je katalytické pôsobenie v enzýmoch a moduláciách enzýmových aktivít. Taktiež majú veľký význam v ochrane pred oxidačným stresom (SOD potrebuje Mn, Cu a Zn).

Pri reakcii akútnej fázy IL-1 a IL-6 spôsobí redistribúciu stopových prvkov (pokles Zn a Fe v sére).

Toxicita – u zdravých jedincov je veľká tolerancia v koncentračnom rozmedzí. Pri renálnych poruchách sa môže horšie vylučovať Se a Cr, Cu a Mn zasa pri chorobách pečene. Stanovujú sa metódou atómovej absorpčnej spektrometrie.

Meď (Cu)

Meď je súčasť aktívneho centra mnohých (predovšetkým oxidoredukčných) enzýmov. Súvisí to so schopnosťou medi prijať alebo odovzdať elektrón ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$). Príkladom je cytochróm – c oxidáza, posledný článok prenosu elektrónov v terminálnej oxidácii. Ďalší enzým, lyzoxidáza, má význam v syntéze elastínu a kolagénu.

V ľudskom tele je 100 – 150 mg medi. Z gastrointestinálneho traktu sa meď dostane do krvi, kde sa viaže na albumín, aminokyseliny a transcupreín. Tieto transportné formy sa dostanú do pečene, kde sa meď zabuduje do ceruloplazmínu, ktorý je hlavným transportným proteínom medi.

Odporúčaná denná dávka je 2 – 3 mg. Nutričný nedostatok medi sa v praxi nevyskytuje, v experimente vedie k anémii.

Zinok (Zn)

Zinok je súčasťou aktívneho centra viac ako 300 enzýmov a pre iné bielkoviny je potrebný ako aktivátor alebo stabilizátor štruktúry. Zinok je esenciálny prvok pri syntéze nukleových kyselín a pre funkciu génov.

Tabuľka 1. Pracovné podmienky na stanovenie Cu a Zn

Parameter	Cu	Zn
Vlnová dĺžka (nm)	324,8	213,9
Štrbina (nm)	0,5	1,0
Korektor pozadia	bez korekcie	bez korekcie
Zdroj žiarenia	katódová výbojka	katódová výbojka
Prúd lampy (mA)	4,0	5,0

Zvláštnosť zinku v porovnaní s inými stopovými prvkami spočíva v tom, že nie je veľmi aktívny v oxidačno-redukčných reakciách (nekatalyzuje vznik a premenu bioreaktívnych foriem kyseliny). Je schopný vytvoriť 4 koordinačné väzby s atómami síry v cysteínoch alebo s dusíkmi histidínov.

Zinok je prvok, ktorý má vzťah k vnímavosti k niektorým druhom zhubných nádorov. Hrá totiž významnú rolu v tvorbe T-lymfocytov, ktoré majú schopnosť likvidovať nádorové bunky a k zhoršenej funkcii imunitného systému.

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť a zvalidovať pracovný postup pre metódu na stanovenie stopových prvkov meď a zinok v krvnom sére pre rutinnú diagnostiku v laboratóriu klinickej biochémie.

Experimentálna časť

Použité prístroje a zariadenia

Na stanovenie stopových prvkov bol použitý atómový absorpčný spektrometer firmy Agilent Technologies 240Z AA (Austrália) s elektrotermickou atomizáciou GTA 120 (Graphite Tube Atomizer) v spojení s automatickým podávačom vzoriek PSD 120 (Programmable Sample Dispenser). Ako ochranný plyn bol použitý argón (0,3 l/min). Merania boli analyzované na pyrolytických grafitových kyvetách bez platformy firmy Agilent Technologies (Nemecko). Dávkovaný objem vzoriek bol 20 µl pre meď a 10 µl pre zinok. Pracovné podmienky na stanovenie oboch stopových prvkov sú uvedené v tabuľke 1 a teplotné programy sú uvedené v tabuľke 2.

Chemikálie a roztoky

Kyselina dusičná TraceSELECT® (Sigma-Aldrich Co., USA); Triton® X-100 p. a. (Merck, Nemecko), voda TraceSELECT® (Sigma-Aldrich Co., USA), lyofilizovaný sérový kalibrátor ClinCal® – Serum Calibrator šarža 243 Recipe® Chemical + Instruments, Nemecko), štandardný referenčný materiál Seronorm™ Trace Elements Serum šarža 0903106 (SERO AS, Nórsko), kontrolné lyofilizované krvné sérum ClinChek® s dvoma hladinami kontrol (Level I, II) šarža 347 (Recipe® Chemical + Instruments, Nemecko).

Pracovné postupy

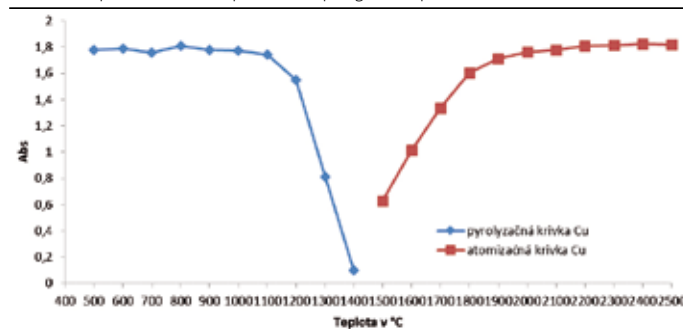
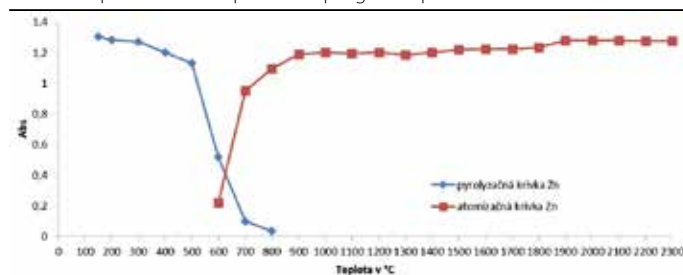
Príprava sérového kalibrátora, kontrolného krvného séra a štandardného referenčného materiálu

K lyofilizovanému sérovému kalibrátoru, kontrolnému krvnému séru a štandardnému referenčnému materiálu sme pridali 3 ml deionizovanej vody, ktoré sme miešali krúživým pohybom, nechali sme stáť 30 minút pri laboratórnej teplote. Po 30 minútach bolo možné sérový kalibrátor, kontrolné sérum a štandardný referenčný materiál použiť na stanovenie.

Tabuľka 2. Teplotný a časový program na stanovenie Cu a Zn

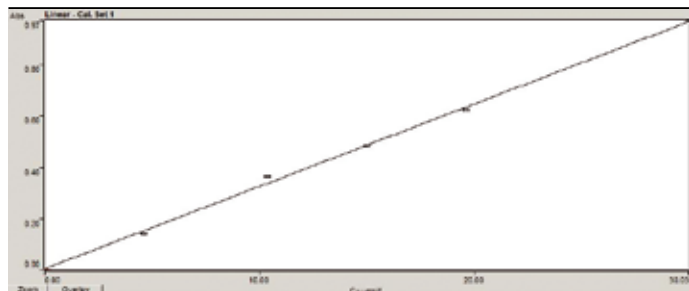
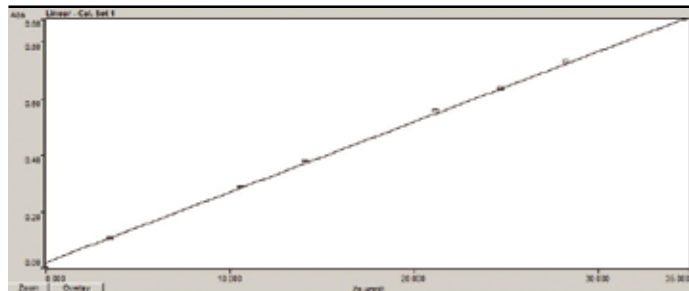
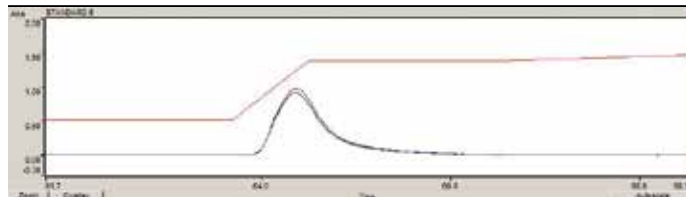
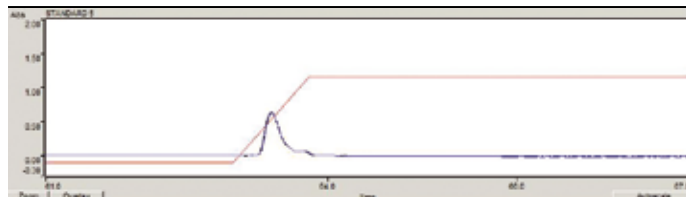
Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Prietok argónu (l/min)
Sušenie	1 85	5	0,3
	2 95	40	0,3
	3 120	10	0,3
Pyrolýza	4 300 (Zn) 1 100 (Cu)	5	0,3
	5 300 (Zn) 1 100 (Cu)	2	0,3
	6 300 (Zn) 1 100 (Cu)	2	0
Atomizácia	7 1 900 (Zn) 2 200 (Cu)	1	0*
	8 1 900 (Zn) 2 200 (Cu)	2	0*
Čistenie	9 2 000 (Zn) 2 300 (Cu)	2	0,3

* – zaznamenávanie signálu

Graf 1. Optimalizácia teplotného programu pre Cu**Graf 2.** Optimalizácia teplotného programu pre Zn

Priame stanovenie

Štandardný referenčný materiál a kontrolné krvné sérum na priame stanovenie boli riedené 20 x 0,2 % (v/v) Tritonom X-100 a 1 % HNO₃ a sérový kalibrátor bol riedený 20 x 0,2 % HNO₃ v prípade medi a v prípade zinku bol štandardný referenčný materiál a kontrolné krvné sérum riedené 100 x 0,2 % (v/v) Tritonom X-100 a 1 % HNO₃ a sérový kalibrátor 100 x 0,2 % HNO₃ priamo v 2 ml autosamplerových nádobkách, z ktorých boli následne dávkované do grafitovej kyvety (20 µl nastavenie medi a 10 µl na stanovenie zinku). Na stanovenie obsahu Cu a Zn v sére sa použila metóda kalibračnej krivky, na vyhodnotenie sa použila výška signálu.

Obrázok 1. Kalibračná krivka Cu**Obrázok 3.** Kalibračná krivka Zn**Obrázok 2.** Grafický záznam signálu Cu v čase (2 replikáty)**Obrázok 4.** Grafický záznam signálu Zn v čase (2 replikáty)

Cu bol 0,9992 a kalibračnej krivky Zn bol 0,9995. Citlivosť definovaná ako koncentrácia, ktorá je potrebná na dosiahnutie signálu 0,0044 AU s. (tzv. charakteristická hmotnosť), bola 12,7 pg pre Cu a 16,3 pg pre Zn.

Výsledky a diskusia

Optimalizácia teplotného programu

Dôležitým krokom pri stanovení stopových prvkov technikou ETAAS je optimalizácia teploty a času v teplotnom programe. K tejto optimalizácii nám poslúžili krivky termického rozkladu (pyrolýzy) a krivky atomizácie pre meď a zinok (graf 1 a 2). Z tejto optimalizácie sme stanovili pre meď teplotu pyrolýzy na 1 100 °C a teplotu atomizácie na 2 200 °C a v prípade zinku bola stanovená teplota pyrolýzy 300 °C a teplota atomizácie 1 900 °C.

Ďalším dôležitým krokom bolo použitie Tritonu X-100 na riedenie, aby sme dosiahli reprodukovateľné sušenie všetkých analyzovaných vzoriek. V tabuľke 2 sú uvedené teplotné a časové programy na stanovenie medi a zinku.

Na obrázku 1 a 3 sú namerané kalibračné krivky pre Cu a Zn. Na obrázku 2 a 4 sú znázornené grafické záznamy signálu Cu a Zn pre dva replikáty.

Linearita a citlivosť

Kalibračné grafy boli lineárne pre celý koncentračný rozsah 5 – 30 μmol/l pre Cu a 4 – 35 μmol/l pre Zn, korelačný koeficient kalibračnej krivky

Správnosť

Správnosť navrhnutého postupu bola overená analýzou štandardného referenčného materiálu krvného séra (Serionorm™ Trace Elements Serum šarža 0903106) a ďalším kontrolným materiálom krvné sérum ClinChek® s dvoma hladinami kontrol (Level I, II) šarža 347 (Recipe® Chemical + Instruments, Nemecko). Počet meraní nasledujúcich za sebou bol rovný 10. Kompletne vyhodnotenie výsledkov kontrol je uvedené v tabuľke 3.

Presnosť

Presnosť bola vypočítaná z nameraných hodnôt pre štandardný referenčný materiál krvného séra Serionorm™ a kontrolný materiál krvné sérum ClinChek®. Presnosť sme vyjadrili opakovateľnosťou v počte 10 za sebou nasledujúcich meraní a reprodukovateľnosťou v počte 15 meraní získaných za niekoľko dní (tabuľka 3).

Medza detekcie (LOD) a stanovenia (LOQ)

Na určenie medzí bolo použité 3σ kritérium, ktorým je určená medza detekcie analytu ako trojnásobok smerodajnej odchýlky šumového signálu (LOD). Medza stanovenia bola vypočítaná ako desaťnásobok smerodajnej odchýlky šumového signálu (LOQ). V prípade Cu bola medza detekcie 0,18 μmol/l a medza stanovenia 0,61 μmol/l, v prípade Zn bola medza detekcie 0,16 μmol/l a medza stanovenia 0,53 μmol/l.

Tabuľka 3.

	Presnosť – opakovateľnosťou RSD (%)	Presnosť – reprodukovateľnosťou RSD (%)	Správnosť – priem. hodnota ± SD		Správnosť – výťažnosťou (%)
			certifikovaná	nameraná	
Serionorm™ (šarža 0903106)	0,99 (Cu)	1,61	29,6 ± 1,4	29,5 ± 0,3	99,7
	1,97 (Zn)	1,22	26,6 ± 1,3	25,9 ± 0,5	97,5
ClinChek® – Level I (šarža 347)	1,41 (Cu)	2,51	12,6 ± 1,9	12,7 ± 0,2	101
	1,86 (Zn)	2,37	20,2 ± 3,0	20,3 ± 0,4	100,5
ClinChek® – Level II (šarža 347)	1,23 (Cu)	2,46	21,1 ± 3,1	21,3 ± 0,3	100,9
	2,35 (Zn)	2,91	31,2 ± 4,7	30,8 ± 0,7	98,7

Záver

V tejto práci bola vypracovaná analytická metóda na kvantitatívne stanovenie stopových prvkov meď a zinok v krvnom sére na rutinnú diagnostiku v laboratóriu klinickej biochémie. Validovaná analytická metóda je prevádzkovo realizovateľná s presnosťou (opakovateľnosť, reprodukovateľnosť) do 5 % a správnosťou (výťažnosť) v intervale 85 – 115 % v celom kalibračnom rozsahu.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr. (Suppl.)*. 2001;85:67–74.
2. van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001;52:225–239.
3. Sherrington CA, Olynyk JK. Iron as a cofactor in chronic hepatitis C infection. *Liver*. 2002;22:187–189.
4. Semba RD. Iron-deficiency anemia and the cycle of poverty among human immunodeficiency virus-infected women in the inner city. *Clin. Infect. Dis. (Suppl.)*. 2003;37:105–111.
5. Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection and immunity: An overview. *Nutr. Rev.* 2002;60:40–45.
6. Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE. Micronutrients and innate immunity. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*. 2000;182:5–10.
7. Rácz O, Šipulová A. Metabolizmus stopových prvkov. 19–24.



RNDr. Štefan Hauks

Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
stefan.hauks@medirex.sk

Stanovenie α -tokoferolu (vitamín E) v sére kvapalinovou chromatografiou s trojitým kvadrupólom (LCMSMS)

RNDr. Jana Varhačová, RNDr. Renáta Šmilňáková

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Košice

Cieľom práce bolo vyvinúť metódu stanovenia α -tokoferolu (vitamín E) na kvapalinovom chromatografe s trojitým kvadrupólom. Východiskový objem vzorky použitý na analýzu bol 50 μ l séra. Ióny boli detegované v pozitívnom móde vysoko špecifickou a citlivou technikou – multiple reaction monitoring (MRM). Limit detekcie pre α -tokoferol bol 0,01 μ mol.l⁻¹.

Kľúčové slová: α -tokoferol (vitamín E), sérum, LC-MS-MS, LOD, LQD.

Determination of α -tocopherol (vitamin E) in serum of chromatography method with triple quadrupole

The aim of this work was to develop a liquid chromatography method with triple quadrupole detection for the determination of α -tocopherol (vitamin E). Initial volume of sample used for analysis was 50 μ l serum. Ions were detected in a positive mode by using multiple reaction monitoring (MRM). The detection limit of α -tocopherol was 0,01 μ mol.l⁻¹.

Key words: α -tokoferol (vitamin E), serum, LC-MS-MS, LOD, LQD.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 28–30

Úvod

Vitamíny rozpustné v tukoch sú látky potrebné na správne fungovanie organizmu. Spolu s proteínmi, tukmi a sacharidmi patria k základným zložkám našej potravy. Vitamíny z tejto skupiny pôsobia pri metabolických procesoch (katabolizmus, anabolizmus) ako katalyzátory. Vďaka ich rozpustnosti v tukoch majú spoločný absorpčný mechanizmus z GIT-u ako tuky. Ich nedostatok môže byť spôsobený zníženým príjmom potravy s obsahom tukov alebo poruchou vstrebávania (malabsorpcia) tukov.

Vitamín E tvoria analógy tokoferolu (α -, β -, γ -, δ -) a ich príslušné nenasýtené tokotrienoly. Vitamín E je silný antioxidant významne účinný v kombinácii s inými rastlinnými antioxidantmi. Je známe, že spomaľuje proces starnutia buniek, chráni tkanivo kože, očí, pečene. Monitorovanie statusu vitamínu E významne pomáha pri odhaľovaní nedostatočného príjmu vitamínov z potravy. Taktiež pri nedostatku α -tokoferol transportného proteínu, ktorý pomáha zabudovať α -tokoferol do lipoproteínových častíc (VLDL) v pečeni.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

Všetky chemikálie potrebné na prípravu mobilnej fázy a prípravu vzorky boli HPLC analytickej čistoty. Metanol, etanol a voda boli zakúpené z firmy Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko). Štandardný roztok α -tokoferolu (vitamín E), butylovaný hydroxytoluén (BHT) boli zakúpené z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), certifikovaný referenčný materiál pre vitamín α -tokoferol – CRM ClinChek® Control bol zakúpený z firmy Recipe (Nemecko).

Odber a príprava vzoriek

Vzorky pacientov boli po odbere centrifugované a sérum uskladnené pri teplote -20 °C až do ďalšieho spracovania. Vzorky boli spracované v polypropylénových skúmavkách (eppendorf), 50 μ l séra bolo precipitované pridaním 100 μ l etanolu (vychladený na 4 °C) obsahujúceho stabilizátor BHT (1 %). Takto pripravená vzorka bola 5 minút premiešavaná na trepačke a následne centrifugovaná (8 000 x g, 5 minút). Do HPLC bolo injektovaných 20 μ l supernatantu.

Chromatografická technika a doplnkový materiál

Merania boli realizované na kvapalinovom chromatografe HPLC Agilent 1260 série (Agilent Technologies, Singapur). Na detekciu bol použitý 6410 Agilent trojitý kvadrupól s elektrosprejom (ESI). Ióny boli detegované v pozitívnom móde vysoko špecifickou a citlivou technikou – multiple reaction monitoring (MRM). Retenčný čas, prekurzorový a produktový ión, rovnako ako iné parametre analytu, sú uvedené v tabuľke 1. Údaje na kvantitatívne stanovenie vitamínu boli vyhodnocované cez MassHunter Workstation Software (Agilent). Na chromatografickú analýzu bola použitá analytická kolóna Kinetex C18 100A 4,6 x 50 mm, 2,6 μ m (Phenomenex, CA, USA) a predkolóna Security Guard Cartridge C18 4,0 x 3,0 mm.

Tabuľka 1. Optimalizácia MS/MS krokov na kvantitatívne stanovenie vitamínu E

Analyt	t_r (min)	Prekurzorový ión MS1	Produktový ión MS2	CE (V)	Polarita
α -tokoferol	3,2	431	165	20	pozitívna

Vysvetlivky: t_r – retenčný čas, CE – kolízna energia

Tabuľka 2. Optimalizácia chromatografickej metódy stanovenia vitamínu E

Parametre	Rozsah testovania	Optimum
prietok	0,5 – 1,0 ml/min-1	0,8 ml/min-1
teplota kolóny	40 – 55 °C	48 °C
mobilná fáza	metanol, acetonitril, voda, etanol	metanol : voda (97 : 3,v/v)

Tabuľka 3. Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť stanovenia vitamínu E metódou LC-MS-MS

analyt	v sérii (n = 15) priemer ± SD μmol/l ⁻¹	CV %	medzi sériami (n = 6) priemer ± SD μmol/l ⁻¹	CV %
α-tokoferol	25,3 ± 0,21 57,1 ± 0,04	3,6 4,0	26,7 ± 0,61 50,2 ± 1,11	5,4 5,1

Výsledky a diskusia

Príprava a stabilita vzoriek

Štandardné roztoky boli stabilizované BHT (1g.l⁻¹) a skladované pri -20 °C. Vzorky pacientov po odbere boli centrifugované v chladenej centrifúge a po centrifugovaní zmrazené pri -20 °C. Stabilita vzoriek za takýchto podmienok bola 3 mesiace.

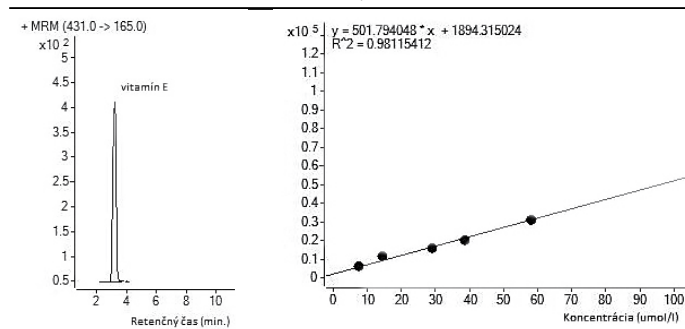
Chromatografická analýza

Pri separácii vitamínu E bola použitá analytická kolóna s reverznou fázou. Pri výbere kolóny, mobilnej fázy a iných parametrov sa postupovalo tak, aby sme v krátkom čase dosiahli čo najlepšiu separáciu analytu. V tabuľke 2 sú uvedené testované parametre a optimálne podmienky separácie vitamínu E. Koncentrácia vitamínu v sére bola vypočítaná z externej kalibračnej krivky. Zo zásobného roztoku 2,32 mmol.l⁻¹ α-tokoferolu v metanole bol pripravený pracovný roztok 232 μmol.l⁻¹. Z pracovného roztoku boli riedením s BHT (1g.l⁻¹) pripravené štandardné kalibračné roztoky α-tokoferolu v rozsahu (7,25; 14,5; 29,0; 38,6 a 58,0 μmol.l⁻¹) (obrázok 1). V tomto rozsahu kalibračných štandardných roztokov bola testovaná linearita metódy. Medza detekcie (LOD) bola stanovená ako koncentrácia analytu vo vzorke, ktorá v použitom detekčnom systéme vykazovala zvolenú hodnotu pomer signál/šum > 5. Hodnota medze detekcie pre α-tokoferol bola 0,01 μmol.l⁻¹. Medza stanovenia (LOQ) bola vypočítaná ako dvojnásobok LOD.

Pri validácii parametrov metódy (opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, výťažnosť) bol použitý referenčný materiál CRM ClinChek® Control od Recipe (Nemecko). Opakovateľnosť bola stanovená päťnásobným opakovaným stanovením kontrolného séra pri dvoch hladinách v jeden deň. Z tabuľky 3 vyplýva, že opakovateľnosť pre α-tokoferol vyjadrená variačným koeficientom (CV) neprekročila 5,0 %. Reprodukovateľnosť bola stanovená opakovaným stanovením kontrolného séra pri dvoch hladinách počas šiestich dní. Získané hodnoty variačného koeficientu boli 5,4 % a 5,1 %.

Výťažnosť (správnosť) metódy bola overená tak, že k referenčnému materiálu (CRM ClinChek® Control 1 a 3) boli pridávané štandardy so známou koncentráciou α-tokoferolu (0,68; 1,29 μmol.l⁻¹). Výťažnosť bola následne vypočítaná podľa vzťahu:

$$\text{Výťažnosť} = \frac{[c] \text{ nameraná} - [c] \text{ CRM ClinChek® Control}}{[c] \text{ pridaného štandardu}} \times 100 \%$$

Obrázok 1. Externá kalibračná krivka pre α-tokoferol

Výťažnosť α-tokoferolu pri nízkej koncentračnej hladine bola 95 %, pri vyššej koncentračnej hladine 99 %. Metóda bola otestovaná na skupine pacientov (n = 30) náhodne vybraných z denného súboru analyzovaných vzoriek. Vekové rozpätie vybraných pacientov bolo 43 – 69 rokov, z toho 40 % žien. Stanovené koncentrácie vitamínu E boli v rozsahu deklarovaných referenčných hodnôt 11,6 – 34,8 μmol.l⁻¹.

Záver

Vyvinutá metóda stanovenia vitamínu E v sére je založená na princípe LCMSMS. Metóda spĺňa požadované validačné charakteristiky, je spoľahlivá, citlivá a špecifická. Vzhľadom na uvedené skutočnosti je možné metódu zaviesť v klinických laboratóriách ako alternatívu stanovenia vitamínu E v rutinej diagnostike.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta carotene and other carotenoids as antioxidant. *Am J Clin Nutr.* 1995;(62):1315S–21S.
2. Rino Y, Suzuki Y, Kuroiwa Y, et al. Vitamin E malabsorption and neurological consequences after gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(78):1858–61.
3. Pekmezci D. Vitamin E and immunity. *Vitam Horm.* 2011;(86):179–215.
4. Chatzimichalakis PF, Damanidou VF, Papadoyannis IN. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid –phase extraction. *Journal of Chromatography B.* 2004;(805): 289–296.
5. Andreoli R, Manini P, Poli D, et al. Development of simplified method for the simultaneous determination of retinol, α-tocopherol, and β-carotene in serum by liquid chromatography-Tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal Bioanal Chem.* 2004;(378):98–994.
6. Ding JS, Schoenmakers I, Jones K, et al. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010;(398):779–789.
7. Moreno P, Salvadó V. Determination of eight water – and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2000;(870):207–215.
8. Abahusain MA, Wright J, Dickerson JWT, et al. Determination of Retinol, α-Tocopherol, and β-Carotene by direct Extraction of Human Serum Using High Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography.* 1998;(12):89–93.
9. Capote FP, Jimnez JR, Granados JM, Castro ML. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007;(21):1745–1754.

10. Midttun Ø, Ueland PM. Determination of vitamins A, D, E in a small volume of human plasma by high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011;(25):1942–1948.
11. Grimmelt DH, Zheng Q, et al. *Comprehensive MRM Analysis of Fat Soluble Vitamins including 25 (OH) – Vitamin D3: Sensitivity and Selectivity by ESI LC/MS/MS.* Ionics mass Spectrometry Group Inc.
12. David A, Armbruster TP. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008;(29):S49–52.
13. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology.* Geneva: ICH-Q2B; 1996.
14. Siong TE, Choo KS. Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol by high pressure liquid chromatography in micro-volumes of serum. *Mal J Nutr.* 1999;(5):21–30.
15. Talwar D, Ha TKK, Cooney J, et al. Routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol, and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clinica Chimica Acta.* 1998;(270):85–100.
16. Li J, Wang Y. *Fat-Soluble Vitamins Analysis on an Agilent ZORBAX Eclipse PAH Polymeric C18 Bonded Column.* Application Note from Agilent Technologies (Shanghai) Co. Ltd.
17. Szczesniowski A. *Rapid Analysis of Vitamin D in Serum Using Triple Quadrupole LC/MS.* Application Note from Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara), CA USA.
18. Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Shah Y, Ahmad L, Watson DG. An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-retinol (vitamin A) and alpha-tocopherol (vitamin E) in human serum, Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. *J. Chromatogr. B.* 2010;878:2339–2347.



RNDr. Jana Varhačová

Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
jana.varhacova@medirex.sk

Analýza močových konkrementov a jej cesta do Európy

RNDr. Iveta Gáboríková

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Autor v článku opisuje problematiku urolitiázy, rozoberá jednotlivé postupy chemickej analýzy močových konkrementov (MK) z pohľadu vhodnosti a možnosti diagnostikovať ojedinelé alebo neznáme MK.

Kľúčové slová: urolitiáza, mokrá cesta analýzy, polarizačná mikroskopia (PM), infračervená spektroskopia (IČ).

Analyse of urinary calculi and course to Europe

In the article the author describes the issue of urolithiasis, deals with chemical analysis of urinary calculi from the point of suitability and ability to diagnostic rare or unknown kidney stones

Key words: urolithiasis, wet chemistry, polarisation microscopy, infrared spectroscopy.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 31–33

Úvod

Urolitiázou nazývame ochorenie, pri ktorom sa tvoria konkrementy v obličkách (nefrokalcinóza) alebo močových cestách (nefrolitiáza, ureterolitiáza, cystolitiáza, uretrolitiáza). Urolitiáza bola známa choroba už v staroveku, kamene močového mechúra boli časté najmä u mladých chlapcov a starých mužov, boli zaznamenané pokusy o konzervatívnu liečbu a dokonca o rozpúšťanie kameňov. Ránhojiči zvládali operácie bez narkózy a technické podrobnosti sa udržiavali ako rodinné tajomstvo.

Konkrement je zložený z 98 % z kryštalického materiálu a približne 2 % tvorí organická hmota zložená z proteínov, glykoproteínov, cukrov, ktoré spájajú kryštály do výsledných tvarov konkrementov. Výnimku tvoria infekčné močové konkrementy (struvit), kde polysacharidy produkované baktériami tvoria nadpolovičnú časť kameňa.

MK sám osebe nie je choroba, ale je následok celkového ochorenia na podklade metabolickej poruchy, infekcie močových ciest alebo morfológických a funkčných zmien uropoetického systému. Incidencia urolitiázy je v celosvetovom meradle vysoká (cca 10 %) (1), narastá počet recidív, pričom prevencia – metafylaxia, môže znížiť výskyt recidív zo 70 % na 10 – 15 % (2, 3). Cennú informáciu v terapii a prevencii recidív poskytuje dôsledné zhodnotenie typu litiázy podľa chemického zloženia konkrementu a podľa fyzikálnej analýzy. Vznik MK je výsledkom vzájomného pôsobenia ochranných a rizikových faktorov. Sú známe kauzálne faktory urolitiázy, ktorých vzájomným pôsobením sa môže MK vytvoriť.

Kauzálne faktory urolitiázy

1. **Presýtenie moču (supersaturácia) litogénnymi látkami** pri metabolickej poruche, nadmernom príjme potravy, poruchách gastrointestinálneho traktu (GIT), užívaní niektorých liekov a podobne.
2. **Zmeny pH moču**, napríklad pri renálnej tubulárnej acidóze (RTA), primárnej dne, infekcii baktériami štiepiacimi močovinu, pri poruchách GIT-u a podobne.
3. **Nedostatok inhibítorov** kryštalizácie a agregácie.
4. **Obštrukčné uropatie a morfológické zmeny obličiek**, napríklad dreňová cystóza, anomálie močových ciest, funkčné poruchy a podobne.
5. **Cudzie teleso** v močových cestách.

U väčšiny chorých zistíme niekoľko rizikových faktorov, čo potvrdzuje multifaktoriálnu etiológiu urolitiázy. Najdôležitejšie rizikové faktory predstavujú metabolické poruchy, ktoré sa vyskytujú až u 90 % chorých s litiázou (4).

Typy močových konkrementov

1. Základná skupina MK

Kalciumoxalátové (weddelit, whewellit) (obrázok 6), **kalciumfosfátové** (apatit, brushit) (obrázok 2), **kyselina močová** (dihydrát kyseliny močovej) (obrázok 5), **struvit** a **cystín** (obrázok 1).

2. Ojedinelé MK

Močan sodný, močan amónny, beta-fosforečnan vápenatý (whitlockit), hydrogénfosforečnan vápenatý (monetit), xantín, DHA – 2,8-dihydroxyadenín.

3. Liekové MK a ich metabolity

– oxytetracyklín, ampicilín, sulfonamidy, chloramfenikol, dezurool, crivixan.

4. Artefakty

– alfa kremeň, kalcit, sadrovec, tehla, parafín, omietka, pieskovec, granit, keramzit, semenka rastlín.

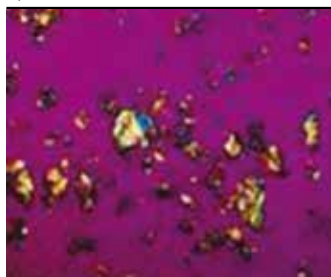
Všetky MK nezaradené do základnej skupiny vyžadujú špeciálne analytické postupy dôkazu jednotlivých komponentov (obrázok 7).

Mokrá cesta analýzy

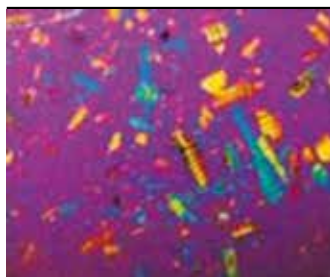
Predstavuje semikvantitatívnu, rutinnú metódu na identifikáciu dôležitých komponentov MK spontánne vymočených, ako aj vyoperovaných. Je ekonomická a rýchla. Použitím setu Urinary calculi (DiaSys) sú dokázateľné oxaláty, fosfáty, horčík, amoniak, kyselina močová, cystín, a to farebnými reakciami, vápnik titračne a karbonáty pridaním HCl. Zloženie MK sa vypočíta pomocou pravítka, ktoré je súčasťou setu.

Spôsob analýzy poskytuje len hrubú orientáciu v zložení MK patriacich do základnej skupiny. Správnosť a spoľahlivosť výsledkov chemickej analýzy mokrou cestou je potrebné potvrdiť použitím inej metódy, v našom laboratóriu polarizačnej mikroskopie.

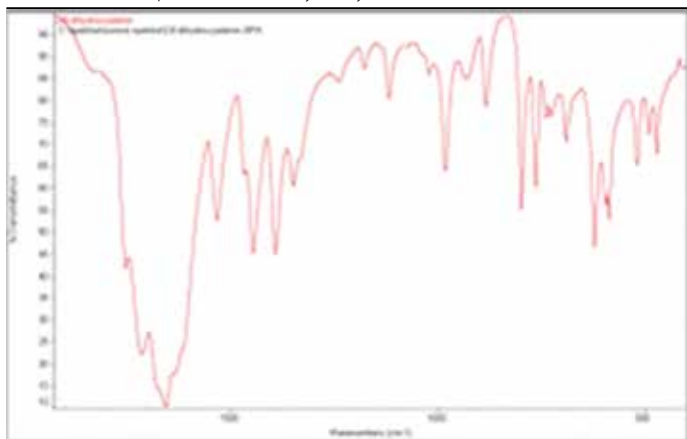
Obrázok 1. Zrnkový preparát
Cystín – zväčšené 160-krát



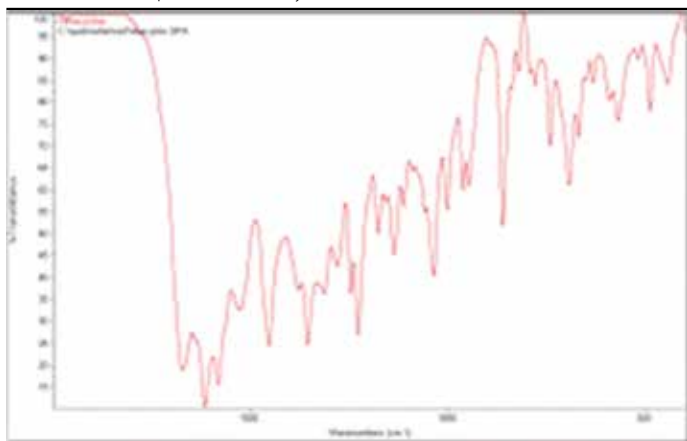
Obrázok 2. Zrnkový preparát
Brushit – zväčšené 320-krát



Obrázok 3. IČ spektrum 2,8-dihydroxyadenín



Obrázok 4. IČ spektrum tetracyklín



Smernice pre urolitiázu Európskej asociácie pre urológiu (EAU) neodporúčajú mokrú cestu analýzy MK, dokonca ju považujú za neakceptovateľnú (5).

V našich podmienkach set pomôže pri identifikácii oxalátov MK neznámeho, zmiešaného zloženia.

Polarizačná mikroskopia

Je to mikroskopická metóda, ktorá využíva optické vlastnosti kryštálov v prechádzajúcom svetle. Polarizátorom prechádza svetlo a mení sa na lineárne polarizované. Po prechode anizotropnou vzorkou (kryštálom) sa rozdelí na dva lúče – riadny a mimoriadny, šíria sa rôznou rýchlosťou a kmitajú v rôznych rovinách. Analyzátor zloží obidva lúče do rovnakej roviny kmitania a ich fázový posun sa prejaví vznikom interferenčných fa-

Tabuľka 1. Identifikované zložky MK – čisté Nicolet FT-IR spektrometer

Urinary Concrement Guide		
File	Analyze	Concrement
Overview Window Help		
Frequent		Rare
Whewellite		2,8 - dihydroxyadenine
Weddellite		Hydroxylapatite
Cystine		Calcite
Xanthine		Aragonite
Protein		Gypsum
Dahllite		alpha - Quartz
Struvite		Tridymite
Brushite		N4 - acetylsulfamethoxazole
Uric acid		Oxolinic acid
Uric acid dihydrate		Cholesterol
Ammonium urate		Whitlockite
Sodium urate monohydrate		Newberyite
Calcium phosphate amorphous		Potassium urate

Obrázok 5. MK zmiešaný, kyselina
močová, kalciumoxalát



Obrázok 6. MK Whewellit – jackstone



Obrázok 7. MK neznámeho zloženia



rieb. Pri amorfných zložkách (apatit, karbonátapatit) nevzniká fázový posun a ani interferenčné farby, obrazy MK predstavujú bezfarebné útvary.

Polarizačná mikroskopia je citlivá metóda, ktorá nám umožňuje stanoviť aj veľmi malé množstvo analytu. Má však obmedzenia, ktoré sa týkajú optických vlastností materiálu. Nedajú sa určiť jemnozrnné až amorfné materiály, neznáme vzorky a semikvantitatívne stanovenie je možné len na základe odhadu objemových percent, čo môže byť rozdielne od hmotnostných percent stanovených infračervenou spektroskopiou. Podlieha vo veľkej miere subjektívnej chybe, je ťažko šandardizovateľná a obdobie zácviaku je pomerne dlhé. Spojenie s IČ všetky tieto nedostatky eliminuje.

Infračervená spektroskopia

Skúma absorpciu infračerveného žiarenia molekulami vzorky. Poskytuje informácie o prítomných

funkčných skupinách a o molekulovej štruktúre látky a slúži k ich kvantitatívnemu stanoveniu. V IČ oblasti je aktívna väčšina molekúl. Absorpčné spektrum je charakteristické pre danú látku, prakticky neexistujú dve rovnaké spektrá pre rôzne látky s výnimkou optických izomérov. Pri interakcii molekuly s IČ žiarením sa zväčší amplitúda vibrácií atómov a dochádza k zmene frekvencie rotačného pohybu molekuly.

IČ spektrum znázorňuje závislosť transmitancie od vlnočtu (obrázok 3, obrázok 4).

MK predstavujú analýzu tuhých látok, kde jedna z techník na prípravu vzoriek je známa ako KBr technika, ktorá pozostáva z lisovania jemne rozdrenej zmesi analyzovanej látky s KBr pri tlaku 500 MPa za vzniku priehľadnej tabletky, ktorá sa vkladá do držiaka v kyvetovom priestore spektrometra.

Knižnica IČ spektier MK Nicolet FT-IR spektrometra má k dispozícii až 800 základných spektier a 18 000 doplnkových.

IČ spektrometria poskytuje informácie aj o matrixe MK, čo je pri PM problematické. Je to spoľahlivá, presná, kvantitatívna metóda, ktorou sa dajú identifikovať ojedinelé, liekové ako aj neznáme konkrémenty (tabuľka 1).

Európska asociácia pre urológiu (EAU) IČ spektrometriu jednoznačne odporúča a považuje za jeden z vhodných analytických spôsobov dôkazu komponentov MK v laboratórnych podmienkach (5).

Záver

Urolitiáza je vlastne interné ochorenie s urologickými následkami. Vysoká incidencia, recidivita, nepríjemné akútne prejavy a možné vážne následky sú nepochybne dôvodom na špecifickú metafylaxiu urolitiázy, predovšetkým medikamentóznou, a to najlepšie už u chorých s prvou príhodou urolitiázy (3). Treba povedať, že spoľahlivá, moderná analýza zloženia MK môže prispieť ku komplexnej diagnostike príčin tohto ochorenia.

Literatúra

1. Shokeir AA. Renal Colic: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Eur. Urol.* 2001;39:241–249.
2. Baumann J, Affolter MB, Caprez U, Henze U. Calcium Oxalate Aggregation in Whole Urine, New Aspects of Calcium Stone Formation and Metaphylaxis. *Eur. Urol.* 2003;43:421–425.
3. Kočvara R, Plasgura P, Petřík A, et al. Metaphylaxis of the First Kidney Stone. *Eur. Urol.* 1996;30(suppl. 2):A66.
4. Kočvara R, Ptaček V, Ťuiková J, et al. Metafylaxie urolitiázy, spôsoby a výsledky. *Čas. lek. čes.* 1989;128:266–269.
5. Türk C, Knoll T, Petrik A, Sarica K, Seitz C, Straub M, Traxer O. *Guidelines on Urolithiasis.* 2010;11–12.
6. Bouška V, Kašpar P. *Speciální optické metody.* Praha, Česká republika: Akademia, 1983.
7. Kalous V, et al. *Metody chemického výzkumu.* Praha, Česká republika: SNTL/Alfa. 1987.



RNDr. Iveta Gáboriková
Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
iveta.gaborikova@medirex.sk

Nové autoprotílátky v diagnostike autoimunitných myopatií

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Medirex, a. s., člen skupiny MEDIREX GROUP, Bratislava

V sérach pacientov s idiopatickou zápalovou myopatiou (IIM) detegujeme autoprotílátky proti rôznym bunkovým štruktúram, ktoré sú úzko spojené s charakteristickými klinickými prejavmi ochorenia. Aj preto nám môžu poskytnúť potrebné informácie o diagnostike, klasifikácii ochorenia, predikcii prognózy, ako aj o voľbe liečby. Počas posledných desiatich rokov boli identifikované nové protílátky špecifické pre myozitídu (MSA), ako je anti-CADM-140, anti-P155, anti-NXP-2, anti-SAE a anti-200/100, z ktorých sú všetky okrem anti-200/100 špecifické pre dermatomyozitídu (DM). Anti-CADM-140 protílátky sú asociované s klinicky amyopatickou dermatomyozitídou (CADM) a akútnou progresívnou intersticiálnou pneumóniou (ILD), anti-P155 sú identifikované pri myozitídach asociovaných s malignitami a anti-200/100 sú asociované s nekrotizujúcou myozitídou. Boli identifikované aj cieľové antigény týchto autoprotílátok a v niektorých prípadoch sa predpokladá aj ich patogénna úloha v rozvoji IIM. Ďalšie pochopenie antigénnych vlastností cieľových proteínov týchto nových autoprotílátok nám môže pomôcť v pochopení patofyziológie IIM a ich komplikácií, čo môže v konečnom dôsledku viesť k lepšej a účinnejšej terapii.

Kľúčové slová: autoprotílátky, autoantigény, myozitída, dermatomyozitída.

New autoantibodies in diagnosis of autoimmune myopathies

Autoantibodies to various cellular constituents are detected in the sera of patients with idiopathic inflammatory myopathy (IIM), which are closely associated with characteristic clinical manifestations of the diseases. Therefore, autoantibodies give us much information in clinical diagnosis, classification, prediction of prognosis and choice of treatment in patients with IIM. During the last decade, novel myositis-specific autoantibodies have been identified, such as anti-CADM-140, anti-p155, anti-NXP-2, anti-SAE and anti-200/100, all of which except anti-200/100 are dermatomyositis-specific autoantibodies. The anti-CADM-140 antibody is associated with clinically amyopathic dermatomyositis and acute progressive interstitial pneumonia, anti-p155 is identified in malignancy-associated myositis and anti-200/100 is associated with necrotizing myositis. Target autoantigens have also been identified and their pathogenic roles in IIM have been suggested. Our increased understanding of the autoantigenic properties of these targeted proteins will help us to reveal the pathophysiology of IIM or its complications, and may lead to therapeutic development.

Key words: autoantibodies, autoantigens, myositis, dermatomyositis.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 34–38

Úvod

Výskyt autoprotílátok v sére je častý prejav autoimunitných ochorení a najmä systémových ochorení spojiva. Napriek tomu, že sa niektoré autoprotílátky zaslúžili o objasnenie imunopatologických pochodov vzniku niektorých autoimunitných ochorení, ich význam je hlavne klinický. Klinické využitie je najmä diagnostické, pretože niektoré sú špecifické pre určité ochorenie a sú aj súčasťou klasifikačných kritérií (napríklad anti-dsDNA a anti-Sm pri systémovej lupus erythematoses). Niektoré autoprotílátky sú zas asociované s klinickými príznakmi, čo môže byť nápomocné pri odhade ďalšieho priebehu, prípadne prognózy ochorenia, a teda prispieva aj k rozhodovaniu ohľadne spôsobu a agresivity liečby.

Mnohé autoprotílátky sú známe už pomerne dlho, je známy ich význam, môže sa však meniť spôsob ich detekcie, čo často prispieva k zvyšovaniu senzitivity. Stále sa však objavujú nové autoprotílátky, viac alebo menej frekventované, často však vysokošpecifické pre dané ochorenie, ktoré môžu veľmi výrazne prispieť k diagnostike autoimunitného ochorenia. Príkladom takýchto ochorení, pri ktorých bola

v posledných rokoch opísaná asociácia s novými autoprotílátkami, sú idiopatické zápalové myopatie (IIM), a to hlavne polymyozitída (PM) a dermatomyozitída (DM). Pri myozitídach rozlišujeme autoprotílátky pre myozitídy špecifické (myositis specific antibodies – MSA), ktoré sa nevyskytujú pri žiadnych iných autoimunitných ochoreniach, ako napríklad protílátky proti aminoacyl-tRNA syntetázam (anti-ARS), najčastejšie anti-Jo-1 (proti histidyl-tRNA syntetáze), anti-SRP (proti „signal recognition particle“) a proti antigénu Mi-2 („nuclear helicase protein, part of NuRD complex“) a protílátky s myozitídou asociované (myositis associated antibodies-MAA), napríklad anti-Ro52, anti-PM/Scl, anti-Ku („DNA-binding, non-histone protein“) či anti-U1RNP, ktoré sa môžu vyskytovať aj pri iných systémových ochoreniach, ako sú IIM, môžu však byť nápomocné pri definovaní podtypov ochorenia (tabuľka 1). Popri týchto známych autoprotílátkach bolo v posledných niekoľkých rokoch opísaných minimálne osem nových autoprotílátok špecifických pre IIM. V našom príspevku sa pokúsime podať stručný prehľad, charakteristiku a klinický význam týchto novoidentifikovaných protílátok.

Tabuľka 1: Autoprotilátky špecifické pre myozitidy a protilátky asociované s myozitidami (spracované podľa Nakashima, Int. J. Clin. Rheumatol. 2010, Rönnelid et al., Autoimmun Rev, 2009, Ghirardello et al., Autoimmun Rev, 2009)

Protilátka	Cieľový antigén	Frekvencia (%)	Špecifita	Klinický význam
Protilátky špecifické pre myozitídu (MSA)				
Anti-ARS				Antisyntetázový syndróm (myozitída, ILD, polyartritída, Raynaudov fenomén)
– anti-Jo-1	histidyl-tRNA-syntetáza	15 – 20	99 – 100	
– anti-PL-7	threonyl-tRNA-syntetáza	5 – 10	100	
– anti-PL-12	alanyl-tRNA-syntetáza	< 5	100	
– anti-EJ	glycyl-tRNA-syntetáza	5 – 10	100	
– anti-OJ	isoleucyl-tRNA-syntetáza	< 5	100	
– anti-KS	asparaginyln-tRNA-syntetáza	< 5		
– anti-Zo	fenylalanyl-tRNA-syntetáza	< 1		
– anti-YRS	tyrosyl-tRNA-syntetáza	< 1		
Anti-SRP	Signal recognition particles	5 – 10	97 – 99	Nekrotizujúca myopatia
Anti-Mi-2		5 – 10	98 – 100	DM
Anti-CADM-140 (MDA5)		20 – 35 u DM 50 – 70 u C-ADM	100	Špecifický pre C-ADM
Anti-p155/140 (TIF-1γ)	Transcriptional intermediary factor 1-γ	15 – 20 u DM		DM, hlavne s malignitami asociovaná DM
Anti-NXP2 (anti-MJ)	Nuclear Matrix Protein 2, 140 kDa	< 5 18 – 23	100	DM, asociácia s ILD Juvenilná DM
Anti-SAE1/SAE2	SUMO activating enzyme subunits 1 (40 kDa) and 2 (90 kDa)	1 – 8	100	DM, asociácia s ILD
Anti-200/100 (HMGCR)	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	< 10 (nekrotizujúce myopatie 42)		Nekrotizujúca myopatia
Protilátky asociované s myozitídou				
Anti-U1RNP	U1 malý jadrový RNP	10		MCTD, overlap syndróm
Anti-Ro/SSA	52 kDa a 60 kDa proteín	13 – 37 (Ro52) 4 (Ro60)		Asociované s ARS
Anti-Ku	70/80 kDa	20 – 30	95 – 97	PM-SSc overlap (hlavne japonská populácia)
Anti-PM-Scl	11 – 16 proteínový jadrový komplex	8 – 10	98 – 100	PM-SSc overlap (hlavne kaukazoidná populácia)

Vysvetlivky: ARS – aminoacyl-tRNA syntetázy; C-ADM – klinicky amyopatická dermatomyozitída; DM – dermatomyozitída; ILD – intersticiálna pľúcna choroba; MCTD – mixed connective tissue disease; PM – polymyozitída; RNP – ribonukleoproteín; SAE – small ubiquitin-like modifier activating enzyme; SSc – systémová skleróza

Nové autoprotilátky

Anti-aminoacyl-tRNA syntetázové (ARS) protilátky

Aminoacyl-tRNA syntetázy (ARS) sú enzýmy katalyzujúce väzbu aminokyselín k tRNA, rozoznávame preto 20 typov ARS. ARS sú aj jedným z hlavných antigénových terčov pri myozitídach a protilátky proti nim namierené sú najčastejšie sa vyskytujúce tak pri PM, ako aj DM. Donedávna bolo identifikovaných 6 autoprotilátok reagujúcich s rôznymi tRNA syntetázami: anti-Jo-1 (histidyl), anti-PL-7 (treonyl), anti-PL-12 (alanyl), anti-OJ (isoleucyl), anti-EJ (glycyl) a anti-KS (asparaginyln-tRNA syntetáza). Až na malé výnimky sa u jedného pacienta vyskytuje vždy len jedna z týchto autoprotilátok, avšak pacienti napriek tomu vykazujú podobné klinické príznaky, ktoré sa spoločne nazývajú tzv. antisyntetázový syndróm (ASS) (1). V posledných rokoch boli opísané autoprotilátky proti ďalším tRNA syntetázam, ktorých výskyt je síce extrémne nízky, špecifita však, podobne ako pri ostatných ARS, veľmi vysoká:

- **anti-fenylalanyl-tRNA-syntetáza (anti-Zo)** bola opísaná Betteridgeom et al. v roku 2007 u pacienta s intersticiálnou pneumó-

niou spojenou s proximálnou myopatiou, Raynaudovým fenoménom a artralgiou. Imunofluorescenčne na Hep2 bunkách pozorovali silnú pozitivitu zrnitej cytoplazmy, následne sa však nepodarilo dokázať prítomnosť žiadneho známeho antigénu. Imunoprecipitáciou autori dokázali prítomnosť dvoch proteínov s molekulovou hmotnosťou približne 60 a 70 kDa a následnou kombináciou imunoprecipitácie a hmotnostnej spektrometrie identifikovali terčový antigén ako phenylalanyl-tRNA syntetázu (2);

- **anti-tyrosyl-tRNA syntetáza (anti-YRS)** protilátky opísal Hashish v roku 2005 u pacienta s ASS, tieto protilátky boli zatiaľ objavené len u jedného pacienta, zaraďujeme ich preto ku skupine vzácných ARS (3);
- **anti-asparaginyln-tRNA syntetáza (anti-AsnRS)** protilátky boli opísané Hirakatom et al. v roku 2007. Autori analyzovali 2 500 sér pacientov s rôznymi ochoreniami spojiva, pozitivitu anti-AsnRS dokázali u 8 pacientov, pričom až 4 z nich mali ILD, avšak len dvaja DM, výskyt anti-AsnRS je preto asociovaný skôr s ILD ako s DM. Imunogenetickou anályzou sa navyše autorom podarilo dokázať asociáciu anti-AsnRS s DRB1*1501/1502 alelou (4).

Anti-CADM-140 (anti-MDA5) protilátky

Amyopatická dermatomyozitída (clinically amyopathic DM-CADM) je charakterizovaná ako ochorenie s typickými kožnými prejavmi DM, avšak bez príznakov svalovej slabosti. Asi u 10 % týchto pacientov dôjde za niekoľko mesiacov až rokov po vzniku kožných príznakov aj ku klinickým prejavom myozitídy. U ďalších 10 % pacientov do 6 mesiacov od vzniku kožných zmien dochádza k manifestácii potenciálne fatálnej pľúcnej fibrózy (interstitial lung disease – ILD) bez akýchkoľvek príznakov myozitického postihnutia (5). Donedávna sa predpokladalo, že pri amyotickéj dermatomyozitíde sa nevyskytujú žiadne MSA protilátky, čo bolo považované za charakteristickú črtu tohto ochorenia. V roku 2005 Sato et al. (6) prvýkrát opísali u pacientov s amyopatickou dermatomyozitídou prítomnosť špecifických protilátok, ktoré precipitovali so 140 kDa proteínom, boli teda nazvané anti-CADM-140. Testovali 298 sér pacientov s rôznymi ochoreniami spojiva, anti-CADM-140 dokázali u 8 zo 42 pacientov s DM, avšak ani u jedného pacienta s iným ochorením, pričom všetci 8 pacienti mali amyopatickú dermatomyozitídu (CADM) a navyše, pacienti anti-CADM-140 pozitívni rozvinuli rýchlejšie progresívnu ILD oproti pacientom anti-CADM-140 negatívnym. Nakashima et al. (7) vo svojej štúdii z roku 2010 testovali 192 sér pacientov s rôznymi ochoreniami spojiva, z nich PM = 47, DM = 37 a CADM = 1. U 13 pacientov bola dokázaná prítomnosť anti-CADM-140 protilátok, všetci pacienti pozitívni na prítomnosť anti-CADM-140 protilátok mali DM (typickú alebo amyopatickú), navyše, ani u jedného z týchto pacientov nebola dokázaná prítomnosť iných MSA alebo MAA protilátok. Z 13 anti-CADM-140 pozitívnych pacientov 92 % malo ILD (54 % rozvinulo fatálnu ILD). Klinická prognóza DM pacientov pozitívnych na anti-CADM-140 bola horšia oproti DM pacientom anti-CADM-140 negatívnym, 46 % anti-CADM-140 pozitívnych pacientov zomrelo na respiračné zlyhanie do 6 mesiacov od prepuknutia ochorenia. Nakashima et al. v tejto štúdii identifikovali aj autoantigén anti-CADM-140 protilátok, ktorým je „the melanoma differentiation-associated Gene 5“ (MDA5), ktorý hrá významnú úlohu vo vrodenej imunitnej odpovedi svojou schopnosťou interakcie s vírusovou RNA. Toto zistenie môže podporovať doterajšie predpoklady vzťahu myozitídy a vírusovej infekcie (hlavne Coxakie infekcie). Na potvrdenie tejto teórie však treba dokázať, či anti-CADM-140 a MDA5 hrajú patogenetickú úlohu v rozvoji DM.

Neskôr bola prítomnosť anti-CADM-140 dokázaná na viacerých súboroch pacientov, pričom najvyššia prevalencia anti-CADM-140 protilátok u DM pacientov bola doteraz zaznamenaná v Japonsku (25 % – 35 %) (8). Retrospektívne štúdie dokázali prítomnosť anti-CADM-140 protilátok aj u európskych pacientov (13 % DM pacientov), pričom bola dokázaná ich korelácia s ťažkými formami rýchlo progredujúcej ILD a zlou klinickou prognózou pacientov (9, 10).

Anti-p155(/p140) (anti-TIF1-γ) protilátky

Asociácia myopatií, hlavne dermazomyozitídy s paraneoplastickými ochoreniami, je dobre známa už niekoľko desaťročí, preto je u týchto pacientov odporúčaný skrining paraneoplastických ochorení. Až donedávna však nebol známy marker, ktorý by bol na takýto skrining vhodný. V roku 2006 Targoff et al. (11) ako prví opísali u pacientov s DM

novú protilátku rozoznávajúcu 155 kDa proteín a 155/140 kD doublet (anti-p155/140), ktorej terčovým antigénom je „transcription intermediary factor 1-gamma“ (TIF1-γ) a ktorá vykazuje silnú koreláciu s DM a malignitami. Prítomnosť anti-p155 (TIF1-γ) protilátok dokázali u 51 z 244 sledovaných pacientov s myozitídou (21 %), u jedného zo 49 pacientov so SLE, avšak u žiadneho bez myozitídy. Vo svojej štúdii súčasne ukázali silnú imunogenetickú asociáciu anti-p155/140 s rizikovou alelou DQA1*0301 v kaukazoidnej populácii. Takmer súčasne s Targoffom dokázali prítomnosť anti-p155/140 protilátok Kaji et al. (12), ktorí dokázali u 13 % pacientov s DM protilátky anti-p155/140 (TIF1-γ), pričom až u 71 % anti-p155/140 pozitívnych pacientov s DM zaznamenali prítomnosť malignít. Vysoká asociácia anti-p155/140 (TIF1-γ) protilátok s malignitami u pacientov s DM a možnosť ich využitia ako skriningového markera na vyhľadávanie malignít u týchto pacientov bola následne potvrdená viacerými štúdiami (13, 14). Horillo et al. na základe svojej štúdie, v ktorej porovnali viaceré metódy detekcie anti-p155/140 protilátok s veľmi dobrou zhodou, odporúčajú zaviesť anti-p155/140 (TIF1-γ) do laboratórnej praxe ako marker výskytu malignít u pacientov s DM (15). Z metaanalýzy, ktorú publikoval Trallero-Araguas, vyplýva, že pozitivita anti-p155 protilátok predstavuje 89 % špecifitu a 78 % senzitivitu pre diagnózu malignity asociovej s DM, s pozitívnou a negatívnou prediktívnou hodnotou 58, respektíve 95 % (16).

Anti-NXP-2 (anti-MJ) protilátky

Anti-MJ protilátky boli prvýkrát opísané u 18 % pacientov s juvenilnou dermatomyozitídou (JDM) (17), neskôr bol opísaný ich antigénový terč, ktorým je „nuclear matrix protein 2“ (NXP-2), a ich výskyt u pacientov s JDM bol dokázaný vo viacerých štúdiách s výskytom 23 – 25 %. Gunawardena et al. dokázali prítomnosť anti-NXP-2 protilátok u 23 % pacientov s JDM, avšak u žiadneho pacienta s JDM overlap syndrómom ani v kontrolnej skupine. Vo svojej práci navyše dokázali prítomnosť alely HLA-DRB1*08 ako možného rizikového faktora pre pozitivitu anti-NXP-2 protilátok (18). V skupine argentínskych pacientov s JDM bol výskyt anti-NXP-2 protilátok (25 %) podobný ako v skupine pacientov z Veľkej Británie, a podobne ako v tejto skupine aj s vysokou incidenciou (19). Na základe týchto štúdií sa predpokladalo, že výskyt anti-NXP-2 je asociovaný len s JDM, avšak Betteridge et al. detegovali anti-NXP-2 aj v skupine dospelých pacientov s DM, napriek tomu, že ich výskyt je oveľa nižší (6 % pacientov s DM) (20). V dvoch ďalších štúdiách bol výskyt anti-NXP-2 u dospelých DM pacientov veľmi rozdielny. V talianskej štúdii 58 pacientov s IIM boli anti-NXP-2 protilátky detegované u 30 % DM a 8 % PM pacientov, výskyt protilátok bol prítom asociovaný s mladým vekom a dobrou odpoveďou na terapiu, zatiaľ čo v japonskej skupine 507 dospelých pacientov boli anti-NXP-2 detegované len u 1,6 % DM, ako aj 1,6 % pacientov s PM. Všetci anti-NXP-2 pozitívni pacienti mali významné bolesti svalov a zvýšené hodnoty kreatinín kinázy, u 38 % sa do 3 rokov od stanovenia diagnózy polymyozitídy objavilo malígne ochorenie. Aby sme mohli povedať, či sú rozdielne výsledky medzi študovanými skupinami výsledkom rôznych detekčných metód stanovenia protilátok, alebo ide o vplyv populačno-genetických aspektov, prípadne vplyv prostredia, bude treba ďalšie štúdie s väčším počtom pacientov (21, 22).

Anti-SAE protilátky

Anti-SAE, „small ubiquitin-like modifier activating enzyme“, protilátky boli prvýkrát identifikované Betteridgeom et al. v roku 2007 a v roku 2009 tou istou skupinou potvrdené na väčšej skupine IIM pacientov. Cieľovým antigénom anti-SAE protilátok je „Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) activating enzyme“, ktorý sa skladá z dvoch podjednotiek SAE1 a SAE2, s molekulovou hmotnosťou 40 a 90 kDa. SUMO je malý proteín štruktúrne podobný ubiquitínu a hrá kľúčovú úlohu v posttranslačnej úprave špecifických proteínov, ako napríklad proteín kináza a transkripčné faktory. Autori vo svojej štúdii zistili prítomnosť anti-SAE protilátok u 8 % dospelých pacientov s DM, avšak ani u jedného s iným ochorením, ani u zdravých jedincov. V práci z roku 2009 Betteridge et al. tiež identifikovali imunogenetickú asociáciu medzi produkciou anti-SAE protilátok a HLA systémom. Všetci anti-SAE pozitívni pacienti exprimovali aspoň jednu kópiu alely HLA-DQB1*03 a HLA-DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03, prítomnosť týchto alel je teda vysoko rizikovým faktorom (23). Talianski autori na skupine 183 pacientov dokázali prítomnosť anti-SAE protilátok u 7 % pacientov s DM, čím potvrdili anti-SAE ako protilátky špecifické pre DM. Pacienti anti-SAE pozitívni trpeli hlavne na kožné a svalové prejavy DM, na druhej strane dysfágie, ILD a artritída sa u nich zväčša nevyskytovali (24). Na druhej strane japonskí autori potvrdili prítomnosť anti-SAE protilátok len u 2 zo 110 (1,8 %) sledovaných pacientov s DM, ani jeden nemal amyotickú alebo juvenilnú DM (25). Na základe uvedených publikácií môžeme anti-SAE protilátky považovať za špecifický marker pre DM.

Anti-200/100 (anti-HMGCR) protilátky

Pomerne nedávno boli u pacientov s nekrotizujúcou myopatiou opísané nové autoprottilátky. Christopher-Stine et al. vo svojej štúdii z roku 2010 (26) testovali u 225 pacientov s myozitídou súčasne vzorky biopsie svalov a autoprottilátky v sére. U 38 pacientov bola histologicky dokázaná nekróza myofybríl, pričom u 26 z týchto pacientov neboli dokázané žiadne známe autoprottilátky. Imunoprecipitáciou boli v 16 sérach týchto pacientov objavené nové autoprottilátky, ktoré reagovali s 200 a 100 kDa proteínmi (anti-200/100 protilátky), zo zvyšných 187 sér pacientov bez nekrózy myofybríl boli tieto protilátky zachytené len u jedného pacienta. Zaujímavým zistením bolo tiež, že až u 63 % z týchto pacientov boli pred prepuknutím svalových bolestí podávané statíny, čo je signifikantne viac oproti ostatným pacientom s DM (15,2 %), prípadne PM (18,4 %). Autori teda charakterizujú anti-200/100 ako protilátky asociované so statínmi indukovanou nekrotizujúcou myopatiou. Neskôr bol tou istou skupinou autorov (27) identifikovaný terčový antigén anti-200/100 protilátok, ktorým je „3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase“ (HMGCR) a bola zistiteľná aj imunogenetická asociácia produkcie anti-HMGCR s HLA systémom, kde sa alela DRB1*11:01 javí ako vysoko asociovaná s anti-HMGCR myopatiou, a to bez vplyvu etnickej skupiny. Tieto výsledky napovedajú o vzťahu medzi expozíciou statínmi, zvýšenou expresiou HMGCR a prezentáciou HMGC-peptidov alelou DRB1*11:01. Napriek tomu, že mechanizmus vzniku a rozvoja anti-HMGCR autoimunity nie je známy, vieme, že expresia HMGCR proteínov je up-regulovaná v bunkových kultúrach vystavených statínom, HMGCR proteíny sú exprimované v nízkych koncentráciách v normálnych svaloch, avšak vo vysokých koncentráciách v biopsických

vzorkách regenerujúcich svalov pacientov s HMGC-asociovanou nekrotizujúcou myopatiou. Tieto poznatky napovedajú, že anti-HMGCR myopatia môže byť u geneticky predisponovaných jedincov iniciovaná nadexpresiou HMGCR v súvislosti s užívaním statínov a pokračuje (počas podávania statínov) v dôsledku zvýšených hodnôt HMGCR v regenerujúcich svalových bunkách, ktoré sa stávajú terčom imunitného systému. Tento koncept HMGCR-myopatie však ešte vyžaduje experimentálne potvrdenie (28).

Klinické využitie a záver

V našom príspevku sme sa snažili urobiť stručný prehľad nových autoprottilátok a ich antigénových terčov, ktoré boli opísané pri autoimunitných myopatiách v posledných rokoch. Ide hlavne o MSA autoprottilátky, ktorých prevalencia síce nemusí byť vysoká, avšak špecifita pre dané ochorenie sa javí veľmi vysoká. Podstatným poznatkom je, že sa vo väčšine prípadov nestretávame s prekryvaním týchto protilátok u jedného pacienta, aj preto je odporúčané testovať ich vždy paralelne. Čo je však najpodstatnejšie, napriek tomu, že za zlatý štandard detekcie autoprottilátok pri autoimunitných myopatiách môže byť považovaná imunoprecipitácia, čoraz rýchlejšie sa do klinickej praxe dostávajú aj iné detekčné systémy (ELISA, Imunoblot), ktorých senzitivita a špecifita je porovnateľná s imunoprecipitáciou, a dôkaz nových autoprottilátok sa preto postupne stáva súčasťou klinickej imunologickej diagnostiky autoimunitných myopatií. V súčasnosti už vieme, okrem protilátok anti-HMGCR, stanoviť všetky z uvedených nových autoprottilátok imunoblotom, pričom sa predpokladá, že aj anti-HMGCR sa čoskoro stanú súčasťou rutínnej imunologickej diagnostiky.

Literatúra

1. Nakashima R, Mimori T. Clinical and pathophysiological significance of myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 2010;5(5):523–536.
2. Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J, McHugh N. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Jun;46(6):1005–8. Epub 2007 Mar 27.
3. Hashish L, Trieu EP, Sadanandan P, Targoff IN. Identification of autoantibodies to tyrosyl-tRNA synthetase in dermatomyositis with features consistent with antisynthetase syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(Suppl 9):S312.
4. Hirakata M, Suwa A, Takada T, Sato S, Nagai S, Genth E, Song YW, Mimori T, Targoff IN. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum.* 2007 Apr;56(4):1295–303.
5. Špalek P. Dermatomyozitída – patogenéza, klinický obraz, diagnostické kritériá a liečba. *Neurológia*. 2007;2(3):161–168.
6. Sato S, Hirakata M, Kuwano M, et al. Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1571–1576.
7. Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, et al. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(3):433–440.
8. Sato S, Hoshino K, Satoh T, et al. RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: Association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):2193–2200.
9. Labirua A, Lundberg 2010, Fiorentino A kol. 2011, Chaisson NF, Paik J, Orbai AM, et al. A Novel Dermato-Pulmonary Syndrome Associated With MDA-5 Antibodies: Report of 2 Cases and Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)*. 2012 Jul;91(4):220–228.
10. Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguas E, Balada E, Vilar-del-Tarres M, Juárez C. Anti-MDA5 Antibodies in a Large Mediterranean Population of Adults with Dermatomyositis. *Journal of Immunology Research*. 2014.
11. Targoff IN, Mamurova G, Trieu EP, et al. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3682–3689.

12. Kaji K, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Identification of a novel autoantibody reactive with 155 and 140 kDa nuclear proteins in patients with dermatomyositis: an association with malignancy. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(1):25–28.
13. Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguás E, Grau-Junyent JM, Labrador-Horrillo M. Malignancy and myositis: novel autoantibodies and new insights. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 Nov;22(6):627–32.
14. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, Matsushita T, Ichimura Y, Kadera M, Ishiguro N, Ueda-Hayakawa I, Asano Y, Ogawa F, Fujikawa K, Miyagi T, Mabuchi E, Hirose K, Akimoto N, Hattata N, Tsutsui K, Higashi A, Igarashi A, Seishima M, Hasegawa M, Takehara K. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins. *Arthritis Rheum*. 2012 Feb;64(2):513–22.
15. Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguás E, Balada E, Vilardeell-Tarrés M, Juárez C. Anti-TIF1γ antibodies (anti-p155) in adult patients with dermatomyositis: comparison of different diagnostic assays. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):993–6.
16. Trallero-Araguás E, Rodrigo-Pendas JA, Selva-O'Callaghan A, et al. Usefulness of anti-p155 autoantibody for diagnosing cancer-associated dermatomyositis: a systematic review and metaanalysis. *Arthritis Rheum*. 2012 Feb;64(2):523–532.
17. Oddis CV, Fertig N, Goel A, et al. Clinical and serological characterisation of the anti-MJ antibody in childhood myositis. *Arthritis and Rheumatism*. 1997;40:S139.
18. Gunawardena H, Wedderburn LR, Chinoy H, et al. Autoantibodies to a 140-kd protein in juvenile dermatomyositis are associated with calcinosis. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1807–1814.
19. Espada G, Maldonado Cocco JA, Fertig N, Oddis CV. Clinical and serologic characterization of an Argentine pediatric myositis cohort: identification of a novel autoantibody (anti-MJ) to a 142-kDa protein. *J Rheumatol*. 2009 Nov;36(11):2547–2551.
20. Betteridge ZE, Gunawardena H, Chinoy H et al. Autoantibodies to the p140 autoantigen NXP-2 in adult dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:S304.
21. Ceribelli A, Fredi M, Taraborelli M, et al. Anti-MJ/NXP-2 autoantibody specificity in a cohort of adult Italian patients with polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. 2012 Apr 30;14(2):R97.
22. Ichimura Y, Matsushita T, Hamaguchi Y, et al. Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):710–713.
23. Betteridge ZE, Gunawardena H, Chinoy H, et al. Clinical and human leucocyte antigen class II haplotype associations of autoantibodies to small ubiquitin-like modifier enzyme, a dermatomyositis-specific autoantigen target, in UK Caucasian adult-onset myositis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(10):1621–1625.
24. Tarricone E, Ghirardello A, Rampudda M, Bassi N, Punzi L, Doria A. Anti-SAE antibodies in autoimmune myositis: Identification by unlabelled protein immunoprecipitation in an Italian patient cohort. *J Immunol Methods*. 2012 Oct 31;384(1–2):128–34.
25. Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Low prevalence of anti-small ubiquitin-like modifier activating enzyme antibodies in dermatomyositis patients. *Autoimmunity*. 2013 Jun;46(4):279–84.
26. Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, et al. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2757–2766.
27. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum*. 2011 Mar;63(3):713–721.
28. Casciola-Rosen L, Mammen AL. Myositis autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2012 November;4(6).



RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Medirex a. s., člen skupiny **MEDIREX GROUP**
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
elena.tibenska@medirex.sk

Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení prognostických markerov CD38 a ZAP-70 u pacientov s B-CLL

MVDr. Alica Elbertová

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Košice

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je definovaná ako lymfoproliferatívne ochorenie zapríčinené klonálnou proliferáciou a akumuláciou maligne transformovaných, malých zreých B lymfocytov v periférnej krvi, lymfatických uzlinách, slezine a kostnej dreni. Klinický priebeh CLL je variabilný. Bol preukázaný významný prognostický dosah rôznych CLL biomarkerov, ako sú IgV_H mutačný status, chromozomálne abnormality ako aj expresia CD38 a ZAP-70. Expresia ZAP-70 alebo CD38 koreluje s nemutovaným stavom IgV_H génov a je spojená s horšou prognózou. Imunofenotypová analýza pomocou prietokovej cytometrie je vhodná nielen na detekciu charakteristického imunofenotypového profilu buniek B CLL, ale aj na stanovenie ich intracelulárnej expresie ZAP-70.

Kľúčové slová: prietoková cytometria, prognostické markery, B CLL, ZAP-70.

The Utility of Flow Cytometry for Evaluation of Prognostic Factors CD38 and ZAP-70 in B-CLL Patients

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a lymphoproliferative disease characterised by the clonal proliferation and progressive accumulation of malignant transformed small mature B cells in the peripheral blood, lymph nodes, spleen and bone marrow. The clinical course of CLL is variable. An important prognostic impact has been shown for different CLL biomarkers such as IgV_H mutation status, chromosomal aberrations, CD38 and ZAP-70 expression. The expression of ZAP-70 or CD38 has been correlated with the expression of unmutated IgV_H genes and could predict poor prognosis. The flow cytometry immunophenotyping is useful not only for the detection of unique B-CLL phenotype of the pathological B cells but also for detection of their intracytoplasmic ZAP-70 expression.

Key words: flow cytometry, prognostic markers, B CLL, ZAP-70.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 39–41

Chronická lymfocytová leukémia z B lymfocytov (B-CLL) je definovaná ako nízkoagresívne lymfoproliferatívne ochorenie zapríčinené klonálnou proliferáciou maligne transformovaných malých zreých B lymfocytov. Tieto bunky so špecifickým imunofenotypom sa akumulujú v periférnej krvi, kostnej dreni, lymfatických uzlinách, prípadne v iných hemopoetických a non-hemopoetických orgánoch. Príčinou nárastu počtu lymfocytov nie je len ich nadmerná klonálna proliferácia, ale aj porucha apoptózy (1). Podľa kritérií medzinárodného konsenzu o B-CLL (tzv. kritériá IWCLL) je ochorenie definované prítomnosťou monoklonovej lymfocytózy v periférnej krvi nad $5 \times 10^9/l$, trvajúcou najmenej 3 mesiace a spoločne so stanovením typického imunofenotypového profilu patologických buniek prietokovou cytometriou sú dostatočnými kritériami na diagnostiku B-CLL (2). WHO klasifikácia sa opiera o laboratórnu diagnostiku B lymfocytov (morfologické, imunofenotypové, genetické, ako aj molekulovo-biologické parametre) a klinické prejavy ochorenia.

B-CLL tvorí cca 25 % – 30 % z leukémií dospelých v Európe a Severnej Amerike, čím sa zaraďuje k najčastejšie sa vyskytujúcim leukémiám (1). Keďže je roky bezpríznaková, často sa diagnostikuje iba náhodne (asi 50 % prípadov) pri vyšetrení parametrov krvného obrazu.

B-CLL sa vyznačuje veľkou heterogenitou a variabilným priebehom ochorenia, ktorý rozdeľuje pacientov na skupinu s indolentným cha-

rakterom a na skupinu s agresívnym, rýchlo progredujúcim ochorením a krátkodobým prežívaním (3). Snaha opierať sa pri manažmente terapie o vybrané parametre s prognostickým významom vyplýva z biologickej nehomogenosti B-CLL rozpoznateľnej na morfolologickej, fenotypovej a genetickej úrovni. Koncom 90. rokov 20. storočia vstúpili pri štúdiu biologickej heterogenity B-CLL do popredia genetické a molekulovo-biologické parametre, ktoré umožnili rozdelenie dovtedy známych prognostických markerov na **klasické** (staré, respektíve klinické) a na **molekulové** (nové, moderné) (4).

K novým prognostickým markerom zaraďujeme mutačný stav IgV_H génov, expresiu CD38, expresiu ZAP-70, chromozómové abnormality (del17p, del11q, del 6q, trizómia 12 a del 13q) a mutáciu génu TP53. Prítomnosť somatických mutácií v hypervariabilných úsekoch (IgV_H) génov pre ťažké reťazce imunoglobulínov umožnila zdefinovať prognózu a dĺžku prežívania pacientov. Nemutovaný stav IgV_H génov (homológia vo > 98,0 % sekvencií) koreluje s nepriaznivou prognózou a kratším mediánom prežívania a naopak, za prognosticky priaznivý stav sa považuje prítomnosť somatických mutácií vo ≥ 2,0 % sekvencií (4).

Stanovenie mutačného stavu IgV_H je všeobecne považované za technologicky, časovo i finančne náročné a v súčasnosti ťažko realizovateľné v bežných laboratórnych podmienkach pre náročnosť spracovania materiálu (5).

Tabuľka 1. Porovnanie niektorých metód na stanovenie ZAP-70 prietokovou cytometriou

Metóda	anti-ZAP-70	Fixácia/permeabilizácia	Analýza	Cut-off	Autor
Priama IF	1E7.2 Alexa-488 Caltag	Fix and Perm, Caltag	Izotypová. vs. T/NK kontrola	20 %	Zucchetto et al., 2006 (20)
Nepriama IF	2F3.2 Upstate	Paraformaldehyd-Tween	Izotypová kontrola	10 %	Orchard et al., 2004 (12)
Priama IF	1E7.2 Alexa-488 BD	Paraformaldehyd-Saponin	Izotypová kontrola	20 %	Rassenti et al., 2004 (11)
Priama IF	1E7.2PE Caltag	Fix and Perm, Caltag	T/NK kontrola	20 %	D'Arena et al., 2007 (13)
Priama IF	136F12 Alexa 647 Cell Signaling	Intraprep, Beckman-Coulter	Izotypová kontrola	25 %	Slack et al., 2007 (24)
Priama IF	SBZAP PE, BC	Formaldehyd/Triton X-100	MFI		Shankey et al., 2006 (17)
Nepriama IF	2F3.2 Upstate	Fix and Perm, Caltag	T/NK kontrola	20 %	Crespo et al., 2003 (9)

Vysvetlivky: IF – imunofluorescenčná metóda, BD – Becton Dickinson, BC – Beckman Coulter, MFI – Mean Fluorescence Intensity

Expresia CD38 bola prvým markerom, pri ktorom sa preukázala korelácia s IgV_H statusom. CD38 je 45kDa transmembránový glykoproteín, ktorý pôsobí súčasne ako enzým a receptor. Vyšetrenie expresie CD38 na povrchu leukemických buniek prietokovou cytometriou je v klinických laboratóriách relatívne dostupné, avšak jeho použitie ako prognostického markera pri B-CLL sa postupom času ukázalo ako nejednoznačné. Predovšetkým sa nepotvrdila absolútna korelácia expresie s IgV_H mutačným statusom a objavili sa aj rôzne názory na stabilitu expresie antigénu CD38 a na určenie cut-off hodnoty pre pozitivitu CD38 na leukemických bunkách z prognostického hľadiska (hodnoty od 7 % až do 20 %, respektíve 30 %) (6). V súčasnosti sa za klinicky relevantnú mieru expresie považuje arbitrárne (štatisticky) určená hodnota v klinických laboratóriách $\geq 30\%$ detegovaná prietokovou cytometriou (4). Časť pacientov vykazuje bimodálny profil expresie, najbežnejšie sa pozoruje zmena CD38 negativity na CD38 pozitivitu, ktorá sa často spája s progresiou ochorenia (7).

Expresia proteínu ZAP-70 patrí medzi ďalšie prognosticky významné parametre, o ktorých sa uvažovalo, že nahradia stanovenie IgV_H, ZAP-70, zeta asociovaný proteín s molekulovou hmotnosťou 70 kDa, je kódovaný génom na dlhom ramienku 2. chromozómu v 2q2 lokuse (8). Táto tyrozín kináza z rodiny tzv. Syk proteínov obsahuje dve terminálne SH2 domény a C-terminálnu kinázovú doménu. Miestom primárnej expresie proteínu ZAP-70 je cytoplazma T a NK lymfocytov (9). ZAP-70 proteín bol identifikovaný ako fosforylačný partner zeta reťazca CD3 komplexu asociovaného s TCR (T bunkový receptor) komplexom na T lymfocytoch. Aktivácia T lymfocytov prostredníctvom signálu odovzdávaného cez TCR receptor je nevyhnutná na vývoj imunitnej odpovede, z čoho vyplýva, že ZAP-70 zohráva kľúčovú úlohu v TCR signalizácii. Deficit ZAP-70 má za následok absenciu maturovaných CD8+ lymfocytov, blokuje aktiváciu CD4+ T lymfocytov sprostredkovanú cez TCR a môže spôsobiť autozomálne dedičnú formu ťažkého kombinovaného deficitu špecifickej imunity (Severe Combined Immunodeficiency – SCID) (10). Proteín ZAP-70 exprimujú v rôznej miere aj B lymfocyty a nádorové bunky viacerých typov B NHL vrátane B-CLL (8). Expresia proteínu ZAP-70 koreluje s nemutovaným stavom IgV_H génov, a teda pozitívna expresia ZAP-70 predstavuje

nepriaznivú prognózu (9). Pri B-CLL ZAP-70 pravdepodobne zosilňuje signálne dráhy sprostredkované receptorom B lymfocytov, čo je proces prispievajúci k horšej prognóze u ZAP-70 pozitívnych pacientov. Podobne ako pri T lymfocytoch, má ZAP-70 význam pre chemokínovú stimuláciu buniek B-CLL. Predpokladá sa, že expresia ZAP-70 by mohla viesť k migrácii leukemických buniek do mikroprostredia výhodného na prežitie či proliferáciu. Avšak korelácia medzi expresiou ZAP-70 a mutačným stavom IgV_H génov nie je absolútna, a teda prítomnosť diskordantných nálezov (v závislosti od použitej metódy detekcie od 8 % do 25 %) potvrdzuje ZAP-70 ako nezávislý prognostický faktor (4). Pri porovnaní vzájomnej korelácie IgV_H a CD38, respektíve ZAP-70, je štatisticky významnejšia korelácia IgV_H a ZAP-70 (11, 12). Keďže ZAP-70 a CD38 vzájomne nekorelujú, ich súčasné stanovenie má väčšiu výpovednú hodnotu pri identifikácii pacientov s rôznou prognózou než analýza len jedného izolovaného parametra. Kombinovaná analýza CD38 a ZAP-70 umožňuje identifikovať jednak skupinu pacientov s dobrou prognózou, ktorí vykazujú fenotyp CD38-/ZAP-70-, skupinu s nepriaznivou prognózou (fenotyp CD38+/ZAP-70+), ako aj pacientov s diskordantným fenotypom CD38-/ZAP-70+, respektíve CD38+/ZAP-70- a stredným rizikom (13).

Na stanovenie ZAP-70 sa v súčasnosti využívajú imunohistochemické (semikvantitatívne hodnotenie) a imunocytochemické metódy, Western-blotting, analýza mRNA a tiež prietoková cytometria (8). Interpretáciu analýzy pomocou Western-blotingu komplikuje prípadná kontaminácia vzorky T lymfocyty, čo môže viesť k falošne pozitívnym výsledkom (14). Preto sa do popredia dostáva snaha o zavedenie spoľahlivej, rutínnej a relatívne jednoduchšej metódy pomocou prietokovej cytometrie.

Bolo vypracovaných niekoľko protokolov na detekciu ZAP-70, ako aj odporúčani na interpretáciu výsledku expresie ZAP-70 (tabuľka 1). Detekciu expresie ZAP-70 prietokovou cytometriou komplikujú viaceré problémy, ku ktorým sa zaraďuje predovšetkým slabá expresia ZAP-70 v cytoplazme patologických B lymfocytov a chýbanie jednotne používanej štandardizovanej metódy (3, 16).

Popri metódach so separovanými mononukleárnymi bunkami sú vypracované protokoly s imunofenotypovou analýzou plnej krvi. Pracovné

postupy sa ďalej odlišujú v používaní rôznych klonov anti-ZAP-70 protilátok priamou, respektíve nepriamou imunofluorescenčnou metódou. Pomerne veľká variabilita je aj vo fixačno-permeabilizačných metódach, používaní rôznopočetných multifarebných protokolov a analytickej stratégie (tvorba logických „gate“, určenie cut-off pozitivity) (tabuľka 1).

Pri interpretácii výsledkov analýzy sa autori opierajú o vyjadrenie pozitivity expresie ZAP-70 v percentách, alebo vyjadrujú pomernú priemernú intenzitu fluorescencie (MFI). Expresiu ZAP-70 sa deteguje v percentách vo vzťahu k externej negatívnej, izotypovej kontrole, internej pozitívnej kontrole (T lymfocyty, NK lymfocyty), internej negatívnej kontrole (CD5-B lymfocyty) alebo negatívnej kontrole zdravých kontrol, kde sa cut-off pozitivity ZAP-70 pohybuje v rozmedzí 10 % až 30 %. Pri pomernom vyjadrení MFI sa pozitívna expresie ZAP-70 stanoví koeficientom MFI CD3+ T lymfocytov k MFI CD5+ B lymfocytov (T/CLL B), podielom MFI CD5+ B lymfocytov voči CD5- B lymfocytom (CLL B/B Ly), respektíve T lymfocytom (CLL B/T) (6, 9, 12, 15, 17 – 23).

V porovnaní s IgV_H je cytometrické stanovenie CD38 a ZAP-70 menej finančne a časovo náročné (9). Prietoková cytometria sa stala metódou voľby aj pre svoju relatívnu jednoduchosť a dostupnosť. Umožňuje špecifické ohraničenie cieľovej populácie buniek a odlišenie expresie ZAP-70 na patologickom klone B lymfocytov od výraznej pozitivity ZAP-70 v cytoplazme T a NK lymfocytov. Expresia ZAP-70 môže byť relevantnejším prognostickým indikátorom definujúcim B-CLL s horšou prognózou pri nemutovanom IgV_H statuse.

Tento článok vznikol na základe výskumných aktivít v projekte, ktorý bol podporený v rámci OP Výskum a vývoj, s názvom: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Adam Z, Vorlíček J, et al. *Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí*. 1. vyd. Praha, Česká republika: Grada Publishing; 2001: 680.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–5456.
- Válek L, Chudej J, Sokol J. Laboratórna diagnostika CLL: cytológia, prietoková cytometria. *Onkológia*. 2014;9(3):166–172.
- Balhárek T, Barthová M, Szépe P, Marcinek J, Burjanivová T, Plank L. Komentár k vývoju konceptu prognostických faktorov chronickej lymfocytovej leukémie: Cesta od prognostických faktorov k prediktorom liečebnej odpovede. *Klin.Onkol*. 2009;22(6):254–263.
- Bosh F, Muntanola A, Giné E, Cario A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E. Clinical Implications of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2006;70B:214–217.
- Rassenti LZ, Kipps TJ. Clinical Utility of Assessing ZAP-70 and CD38 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2006;70B:209–213.
- van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Reviews*. 2009;23:25–47.
- Béné MCh. What is ZAP-70? *Cytometry Part B*. 2006;70B:204–208.
- Crespo M, Bosh F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764–1775.
- Exbio Bulletin. ZAP-70. 2005: 6.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, et al. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:893–901.
- Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiensner A, Rosenwald A, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363:105–111.
- D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology*. 2007;82:787–791.
- Urbanová A, Janega P, Masárová K, Štefániková Z, Babál P. Imunohistochemická detekcia proteínu ZAP-70 a jej význam v diagnostike B-CLL. *Česko-slovenská patológia*. 2009;45(2):40–45.
- Bakke AC, Purtzer Z, Leis J, Huang J. A Robust Ratioetric Method for Analysis of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Cytometry Part B*. 2006;70B:227–234.
- Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2007;20:455–468.
- Shankey TV, Forman M, Scibelli P, Cobb J, Smith CM, et al. An Optimized Whole Blood Method for Flow Cytometric Measurement of ZAP-70 Protein Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2006;70B:259–269.
- Bekkema R, Tadema A, Daenen SMGJ, Kluin Nelemans HC, Mulder AB. An Improved Flow Cytometric Method Using FACS Lysing Solution for Measurement of ZAP-70 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2008;74B:40–44.
- Degheidy HA, Venzon DJ, Farooqui MZH, Abbasi F, Arthur DC. Combined Normal Donor and CLL: Single Tube ZAP-70 Analysis. *Cytometry Part B*. 2012;82B:67–77.
- Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Nanni P, Bulian P, et al. ZAP-70 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Evaluation by External (Isotypic) or Internal (T/NK Cells) Controls and Correlation with IgV_H Mutations. *Cytometry Part B*. 2006;70B:284–292.
- Chen Y, Peterson LC, Dittmann D, Evens A, Rosen S, et al. Comparative Analysis of Flow Cytometric Techniques in Assessment of ZAP-70 Expression in Relation to IgV_H Mutational Status in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:1882–1891.
- Best OG, Ibbotson RE, Parker AE, Davis ZA, Orchard JA, Oscier DG. ZAP-70 by Flow Cytometry: A Comparison of Different Antibodies, Anticoagulants, and Methods of Analysis. *Cytometry Part B*. 2006;70B:235–241.
- Rossi M, Delprincipe MI, Rossi D, Consalvo MI, Luciano F, et al. Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells. *J. of Translational Medicine*. 2010;8:1–11.
- Slack GW, Wizniak J, Dabbagh L, Shi X, Gelebart P, et al. Flow Cytometric Detection of ZAP-70 in Chronic Lymphocytic Leukemia. Correlation With Immunocytochemistry and Western Blot Analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:50–56.



MUDr. Alica Elbertová
Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
alica.elberova@medirex.sk

Možnosti laboratórnej diagnostiky *Neisseria gonorrhoeae* a jej aktuálna rezistencia proti antibiotikám

RNDr. Peter Pavlík

HPL, spol. s r. o., Bratislava

Kvapavka je druhá najčastejšie sexuálne prenosná infekcia. Cefalosporíny tretej generácie ostali ako jedinou možnosťou pre empirickú liečbu gonorey. Dôležitá je dôsledná diagnostika a zároveň správne zvolená terapia, aby sa zabránilo zvyšovaniu rezistencie. V roku 2014 sme zaznamenali 2,7 % rezistentných kmeňov proti cefixímu. Penicilínové, chinolónové a tetracyklínové antibiotiká sa vo veľkej miere na Slovensku používajú v empirickej terapii gonokokových infekcií aj napriek ich vysokej rezistencii.

Kľúčové slová: *Neisseria gonorrhoeae*, gonorea, kvapavka, rezistencia.

The options for laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae and the current situation of antimicrobial resistance.

Gonorrhoea is the second most common bacterial sexually transmitted infection. Third-generation cephalosporins are the last remaining options for first-line treatment of gonorrhoea. Consistent diagnosis and a suitable therapeutic option are necessary to prevent increasing resistance. In 2014, cefixime resistant isolates were detected in 2.7 % cases. In Slovakia, penicillin, tetracycline and quinolone antibiotics are widely used in the first-line therapy of gonococcal infections in spite of their high resistance.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, gonorrhoea, antimicrobial resistance.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 42–44

Kvapavka – gonorea

Gonorea je po chlamýdiových infekciách druhé najčastejšie diagnostikované pohlavne prenosné ochorenie. Vyvoláva ju gram-negatívny diplokok *Neisseria gonorrhoeae*, ktorý adhezuje a preniká do sliznice, kde vyvoláva zápal. Táto infekcia je obvyčajne ľahko liečiteľná a v prípade úspešnej liečby nezanedáva trvalé následky. Liečba sa stala problematickou po objavení sa a následnom zvýšení rezistencie na používané antibiotiká, preto treba venovať pozornosť dôkladnej laboratórnej diagnostike a správne zvolenej liečbe.

Klinické príznaky

K prenosu kvapavky dochádza takmer výlučne prostredníctvom sexuálneho styku, preto najčastejšie postihuje močovo-pohlavné orgány. U mužov sa gonorea prejavuje typickým hnisavým výtokom z močovej rúry, bielej až žltej farby a rezaním alebo pálením pri močení. U žien hlienovitým až hnisavým výtokom z pošvy, bolesťou v podbruší a pri pohlavnom styku. Bezpríznakový priebeh infekcie sa udáva u 10 % mužov a 50 % žien. Neliečené alebo nesprávne liečené ochorenie môže prejsť do chronického štádia. U žien môže postupujúca infekcia zasiahnuť Bartoliniho žľazu a orgány malej panvy (PID). U mužov sa chronická infekcia prejaví najčastejšie zápalom nadsemenníkov (epididimitis). U oboch pohlaví v prípade zanedbanej liečby môže prísť až k systémovej infekcii, ktorá sa prejavuje polyartralgiou, tenosynovitídou a dermatitídou. Zriedkavo sa systémová infekcia môže prejaviť sepsou, endokarditídou alebo meningitídou. K prenosu infekcie z chorej matky do oka novorodenca môže prísť pri pôrode. Očná forma sa vyskytuje i u dospelého človeka pri nedostatočnej osobnej hygiene autoinfekciou z genitálnej oblasti. Zriedkavé

nebývajú ani faryngeálne a rektálne infekcie v závislosti od sexuálnych praktík používaných postihnutou osobou. Majú nešpecifické príznaky, ktorými sú: podráždená sliznica, bolesť hrdla, svrbenie alebo bolesť v konečníku. Vo väčšine prípadov extragenitálnych infekcií sa na ne nemyslí a ostávajú nediagnostikované. Takíto pacienti sú rezervoárom na ďalšie šírenie infekcie (1, 2).

Diagnostika

Mikroskopické a kultivačné vyšetrenie

Kultivačné vyšetrenie zostáva štandardným postupom v diagnostike kvapavky. Vhodné je hlavne v akútnom štádiu infekcie. Dokazuje prítomnosť životaschopných baktérií. Toto vyšetrenie môže byť falošne negatívne v prípade predchádzajúcej antibiotickej terapie. Vzorky sa kultivujú na selektívnej pôde v atmosfére so zvýšenou koncentráciou CO₂. Izolované kmene sú ďalej identifikované diagnostickými testami. Výhodou tejto metódy je možnosť stanovenia citlivosti na antibiotiká, čo má význam pre správnu voľbu liečby, vzhľadom na zvyšujúcu sa rezistenciu. Súčasťou kultivačného vyšetrenia je aj mikroskopické vyšetrenie, ktoré je rýchle a v prípade pozitívneho nálezu už v deň prijatia vzorky umožňuje predbežne diagnostikovať gonokokovú infekciu na základe prítomnosti leukocytov a gramnegatívnych diplokokov v typickom mikroskopickom obraze.

Dôkaz DNA *Neisseria gonorrhoeae* metódou PCR

Najmodernejšie sú molekulárno-biologické diagnostické metódy, ktoré dokazujú prítomnosť DNA gonokokov vo vzorke. Výhodou PCR vyšetrenia je jeho vysoká senzitivita. Deteguje aj mŕtve alebo málo vitálne

baktérie, ktoré by kultivačné vyšetrenie nedokázalo. V prípade pozitívneho nálezu je vhodné doplniť kultivačné vyšetrenie a stanoviť citlivosť na antibiotiká. Výhodou tejto metódy je aj možnosť súčasne vyšetriť prítomnosť DNA *Chlamydia trachomatis* spolu s DNA *Neisseria gonorrhoeae* z jednej vzorky. Limitujúcim faktorom môže byť v prípade vzoriek z faryngu alebo rekta falošná pozitivita, pretože nie je vylúčená skrížená reakcia s DNA komenzálnych neisérií prítomných v hrdle. V tomto prípade je preto potrebné potvrdiť pozitívny nález kultivačným vyšetrením, prípadne inou molekulárno-biologickou metódou.

Odber materiálu

Na kultivačné vyšetrenie je vhodným materiálom u mužov výter z uretry a ejakulát. U žien výter z cervixu alebo pošvy. Pri podozrení na kvapavku je vhodné odobrať aj výter z tonzíl alebo z rekta, podľa sexuálnych praktík pacienta. V prípade očnej infekcie sa odoberá ster z očnej spojovky. Tampóny musia byť vložené do transportnej pôdy a v období transportu uchovávané pri izbovej teplote, pretože gonokoky sú citlivé na vonkajšie prostredie a zmenu teploty. Na žiadanke je potrebné vyznačiť požadované kultivačné vyšetrenie na *Neisseria gonorrhoeae*. V prípade potreby je možné odobrať tekuté materiály ako hnis, punktát, krv na hemokultúru alebo likvor.

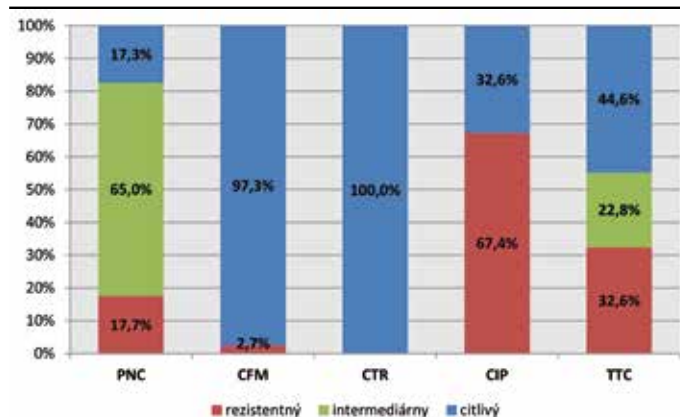
Na vyšetrenie prítomnosti gonokokovej DNA sa na odber používa špeciálna odberová súprava dodávaná laboratóriom, ktorá pozostáva z dvojice tampónov a skúmavky s tekutým transportným médiom. Je možné použiť aj iný vhodný tampón na výter z urogenitálneho traktu, tampón sa však musí vložiť do skúmavky bez transportného média. Vhodným materiálom z hľadiska komfortu pacienta je prvý prúd ranného moču, ktorý obsahuje dostatok epitelových buniek a baktérií zo sliznice močovej rúry. Možno je vyšetriť aj vzorky LBC odobraté na cytologické vyšetrenie v rámci skrínungu karcinómu krčka maternice.

V prípade neúspešnej antibiotickej terapie je vhodné opakovať kultivačnú analýzu o 3 až 7 dní po ukončení liečby. V prípade, že je výsledok negatívny, po týždni od ukončenia terapie je potrebné zopakovať analýzu metódou PCR. U pacientov po úspešnej liečbe je odporúčané zopakovať analýzu metódou PCR 2 týždne po ukončení terapie.

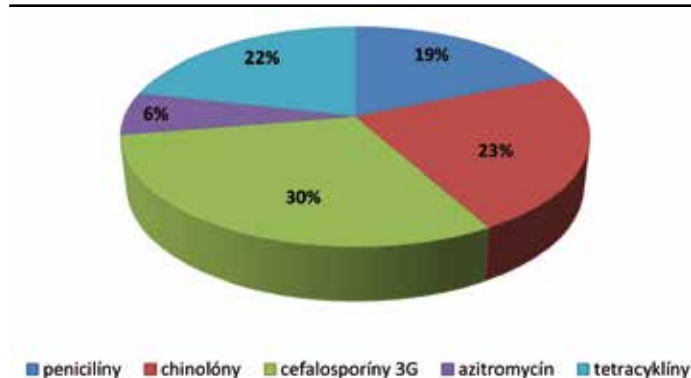
Prehľad rezistencie na antibiotiká

Gonokoky si postupne vytvorili rezistenciu proti antibiotikám, ktoré sa používajú v liečbe. Zo všetkých skupín antibiotík ostali cefalosporíny tretej generácie jedinou voľbou na empirickú terapiu. V Ázii boli dokonca izolované kmene, ktoré boli rezistentné proti všetkým dostupným antibiotikám (3). Dôležitý je neustály monitoring vývoja rezistencie a aktualizácia smerníc pre antibiotickú terapiu. V Európe túto funkciu vykonáva Európske centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb (ECDC) prostredníctvom programu EuroGASP (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme). V rámci tohto programu sa vykonáva testovanie citlivosti na antibiotiká zaslaných izolátov zo všetkých zúčastnených krajín. Prehľady a trendy vývoja rezistencie sú vyhodnocované spolu s epidemiologickými dátami získanými pomocou dotazníkov. Tieto údaje sú veľmi cenné na tvorbu stratégie na spomalenie šírenia rezistencie, najmä prostredníctvom aktualizácie smerníc pre terapiu a diagnostiku ochorenia a šírením osved-

Obrázok 1. Prehľad rezistencie kmeňov *N. gonorrhoeae* proti antibiotikám v roku 2014



Obrázok 2. Používané antibiotiká v empirickej terapii kmeňov *N. gonorrhoeae* izolovaných v roku 2013



medi odbornou verejnosťou. Súčasťou surveillance je aj zavedenie hlásenia a šetrenia prípadov zlyhania terapie cefalosporínmi tretej generácie do epidemiologického informačného systému (EPIS). Slovenskú republiku v tejto surveillance zastupuje laboratórium HPL, spol. s r. o. v spolupráci s niektorými ďalšími mikrobiologickými laboratóriami.

Najväčšia pozornosť sa momentálne venuje rezistencii cefalosporínov 3. generácie, ktoré ostali jedinou skupinou antibiotík vhodných na empirickú terapiu gonokokových infekcií. Sledovanie rezistencie cefalosporínov bolo zaradené do európskej surveillance v roku 2009, keď rezistencia proti cefixímu dosahovala 5,1 %, najvyššia bola v roku 2010 8,7 %, v roku 2011 7,6 % a v roku 2012 bol zaznamenaný pokles rezistencie na 3,9 %. Rezistencia na ceftriaxón bola zaznamenaná veľmi sporadicky. Penicilínázu produkovalo približne 10 % kmeňov. Najvyššiu rezistenciu dosahuje ciprofloxacín, v roku 2009 63 %. V roku 2012 to bolo 50 %. Rezistencia proti azitromycínu bola okrem roku 2009 menej ako 10 % (4).

V roku 2014 sme v laboratóriách HPL, spol. s r. o., kultivačným vyšetrením dokázali 225 prípadov gonokokovej infekcie. Rezistencia proti cefixímu (CFM) dosiahla 2,7 %, čo je pod 5 % hranicu, keď je ešte možné antibiotikum použiť ako liek prvej voľby. Citlivosť na ceftriaxón (CTR) bola testovaná iba pri kmeňoch, ktoré mali hraničnú MIC, alebo boli rezistentné na cefixím. Pri týchto kmeňoch nebola zaznamenaná rezistencia proti ceftriaxónu. Na penicilín (PNC) bolo citlivých len 17,3 % kmeňov. Rezistencia proti ciprofloxacínu (CIP) dosiahla 67,4 % a na tetracyklín (TTC) bolo citlivých 44,6 % kmeňov (obrázok 1).

V rámci získavania epidemiologických údajov pomocou dotazníkov bolo zisťované, aké antibiotiká boli použité v empirickej terapii. Podľa európskej smernice sú voľbou na liečbu v prvej línii cefalosporíny 3. generácie, ktoré boli podané len v 30 % prípadov. V ostatných prípadoch boli podané antibiotiká chinolónové (23 %), tetracyklínové (22 %), penicilínové (19 %) a makrolidové – azitromycín (6 %) (obrázok 2). Používanie antibiotík, proti ktorým je vyššia ako 50 % rezistencia, je v empirickej terapii neefektívne, predlžuje sa tak diskomfort pacienta a zvyšuje sa riziko ďalšieho šírenia infekcie. Azitromycín nie je vhodné použiť v monoterapii gonokokovej infekcie, ale iba v kombinácii s inými antibiotikami.

Terapia gonokokových infekcií

Akútna gonokoková infekcia je v prípade použitia adekvátnej terapie pomerne ľahko liečiteľná. Dôležitý je výber antibiotika na liečbu v prvej línii. Vzhľadom na vysokú rezistenciu zo všetkých skupín antibiotík ostali vhodné na použitie v empirickej terapii len cefalosporíny 3. generácie. V prípade nekomplikovanej akútnej infekcie je možné podať intramuskulárne ceftriaxón 500 mg v jednorazovej dávke alebo perorálne cefixím, 400 mg v jednorazovej dávke spolu s azitromycínom perorálne 2 g.

Podľa európskych odporúčaní sa v empirickej terapii odporúča podávať v prvej línii ceftriaxón intramuskulárne (5). Vzhľadom na preskripčné obmedzenie ceftriaxónu a nižšiu rezistenciu ako 5 % pri cefixíme v Slovenskej republike je alternatívnou možnosťou podanie cefixímu. Cefalosporíny môžu mať znížený účinok na *Neisseria gonorrhoeae* v hrdle v prípade faryngeálnej

infekcie, preto by mal byť súčasne podaný aj azitromycín perorálne 2 g v jednorazovej dávke. Azitromycín má s cefalosporínmi synergický účinok a je účinný aj v prípade súčasnej chlamýdiovej infekcie. Ostatné antibiotiká by mali byť použité len na základe výsledkov testovania citlivosti v prípade, že je kmeň na dané antibiotikum citlivý. Je možné podať ciprofloxacín perorálne 500 mg v jednorazovej dávke. Tetracyklínové antibiotiká sa odporúčajú podávať iba v kombinácii s cefalosporínmi 3. generácie v prípade terapie komplikovaných infekcií alebo pri súčasnej chlamýdiovej infekcii (doxycyklín perorálne 100 mg dva razy denne po obdobie 7 až 10 dní).

Literatúra

1. Beneš J, et al. *Infekční lékařství*. 1. vydanie. Praha: Galen, 2009. 651
2. Buchvald J, Buchvald D. *Dermatovenerológia*. 1. vydanie. Bratislava: SAP, 2002. 497.
3. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. In: *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3538-45.
4. European centre for disease prevention and control. *Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe 2012: surveillance report*. Štokholm: ECDC, 2014. 39.
5. Bignell C, Unemo M. On behalf of the European STI Guidelines Editorial Board. European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. In: *Eurosurveillance*. 2012;17:47.

RNDr. Peter Pavlík

HPL, spol. s r. o.
Istrijská 20, 841 07 Bratislava
pavlik@hpl.sk

SOLEN
MEDICAL EDUCATION

www.solen.sk

recenzované odborné časopisy



knihy, učebnice a skriptá

vzdelávacie kongresy a semináre

podujatia „na kl'úč“

grafika, tlač a distribúcia

technické zabezpečenie

medicínsky marketing

CINtec PLUS – naše skúsenosti

MUDr. Zuzana Ďuricová

Medicyt, s. r. o., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Karcinóm krčka maternice patrí medzi najčastejšie onkologické ochorenie u žien na Slovensku. Cytologická diagnostika má nezastupiteľnú úlohu vo včasnej detekcii predrakovinových štádií. Detekcia ľahkých a ťažkých dysplázií je v LBC efektívnejšia na rozdiel od tzv. konvenčnej cytológie a taktiež ponúka možnosť imunocytochemického vyšetrenia duálnou protilátkou Ki67 a p16. Uskutočnili sme analýzu 81 vyšetrení, kde sme evidovali od jednej pacientky cytologické vyšetrenie a následne bioptické vyšetrenie krčka maternice. Výsledky preukázali, že vyšetrenie LBC pomocou duálnej protilátky nám ponúka lepšie odhadnutie rizika možného vzniku nádorovej proliferácie skvamózneho epitelu krčka maternice.

Kľúčové slová: Liquid-based cytológia (LBC), imunocytochémia, duálna protilátka CINtec PLUS, dysplázia, analýza.

CINtec PLUS – our experiences

Cervical carcinoma belongs among the most frequent oncological diseases in Slovak women. Cytological diagnostics plays an irreplaceable role in early detection of precancerous stages. LBC offers a more effective way of detecting low-grade and high-grade dysplasia apart from the so called conventional cytology while providing also the possibility of immunocytochemical examination with dual Ki67/p16 antibody. We have shown an analysis of 81 examinations including cytological examination of a single patient followed by biopsy examination of the cervix. The findings have proven that dual stain LBC examination offers a better estimate of the risk of possible cancerous proliferation of squamous cervical epithelia.

Key words: Liquid-based cytology (LBC), immunocytochemistry, CINtec PLUS dual antibody, dysplasia, analysis.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 45–46

Úvod

Karcinóm krčka maternice tvorí druhú najčastejšiu rakovinu u žien vo svete i na Slovensku. V etiológii vzniku ochorenia zohráva rozhodujúcu úlohu pretrvávajúca infekcia vysokorizikóvymi typmi ľudského papilomavírusu (HR HPV).

Včasná detekcia predrakovinových štádií ochorenia, tzv. dysplázií (skvamóznych a glandulárnych), môže zásadným spôsobom redukovat' výskyt rozvinutých foriem tohto ochorenia, a znížiť tak mortalitu. Cytologická diagnostika má preto nezastupiteľnú úlohu v diagnostike tohto ochorenia.

Skríning rakoviny krčka maternice ponúka dve možnosti vyšetrenia:

1. Cytologický test, ktorý je založený na mikroskopickom zhodnotení morfológie buniek, čo je pomerne lacná, senzitívna a špecifická metóda, avšak má svoje limity.

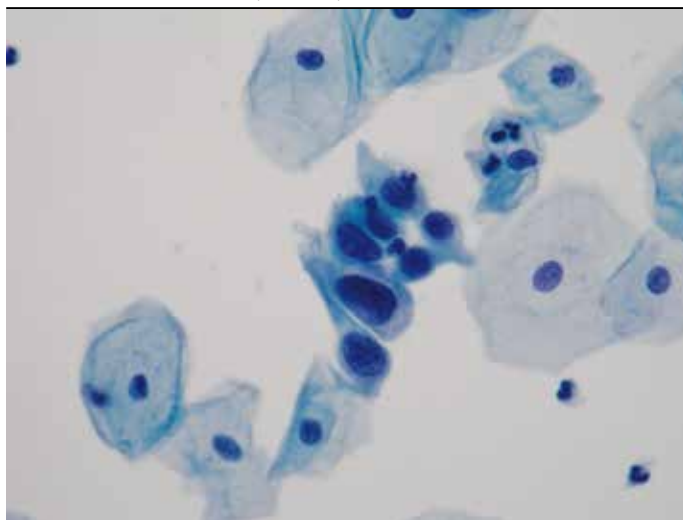
V súčasnosti máme dve možnosti vyšetrenia v cytológii steru z krčka maternice. Prvou je klasická, tzv. konvenčná cytológia, keď sa ster odoberá z krčka maternice natrú na podložné sklíčko, zafarbí sa a následne ho cytológ vyhodnotí vo svetelnom mikroskope. Druhou je Liquid-based cytológiu (LBC), keď sa ster odoberá z krčka maternice odoberie do špeciálneho média vo vialke a následne spracováva v laboratóriu. LBC ponúka na rozdiel od konvenčnej cytológie viac možností ako len morfológické vyhodnotenie, medzi ktoré patria HPV testy, vyšetrenie na chlamýdie a neisseria gonorrhoea, prípadne stanovenie iných molekulárnych markerov. Detekcia ľahkých a ťažkých stupňov skvamóznych intraepiteliálnych lézií je v LBC oveľa efektívnejšia pre vyššiu kvalitu vzoriek a možnosť imunocytochemického vyšetrenia duálnou protilátkou Ki67 a p16.

2. Genetické vyšetrenie steru na HR-HPV, keď sa stretávame s vysokou prevalenciou najmä u mladých žien, z ktorých väčšina infekciu spontánne eliminuje, táto metóda je však finančne náročnejšia.

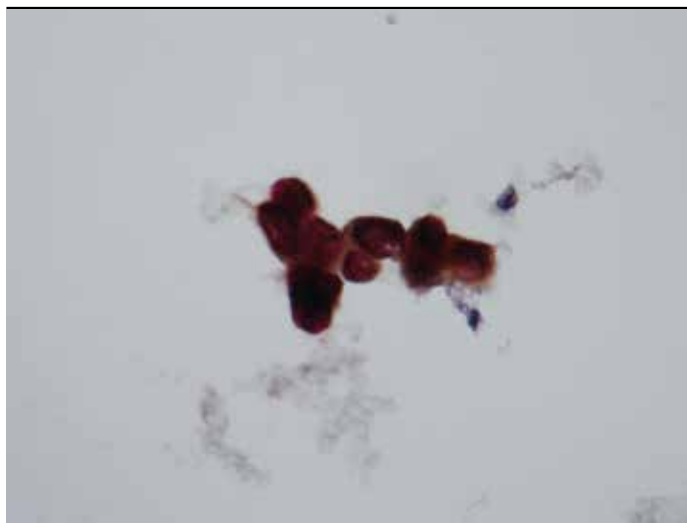
Imunocytochemické vyšetrenie duálnou protilátkou p16 a Ki67

Proteín p16 INK4 hrá kľúčovú úlohu v regulácii G1-S prechodu v bunkovom cykle. Over-expressia tohto proteínu je priamo spojená s onkogénnou transformáciou cervikálnych buniek.

Obrázok 1. HSIL (farbenie podľa Papanicolaou, PAP, zväčšenie: 20-krát)



Obrázok 2. HSIL (imunocytochemické farbenie Ki67/p16, CINtec plus, zväčšenie: 20-krát)



Ki67 je labilný non-histónový nukleárny proteín proliferácie aktívnych buniek. Detekciou p16 a Ki67 imunocytochemickým farbením duálnou protilátkou sa zvyšuje zachyt závažných foriem skvamózných intraepitelových lézií.

V našom laboratóriu sme uskutočnili analýzu spolu 81 vyšetrení, keď sme evidovali od jednej pacientky cytologické vyšetrenie a následne aj bioptické vyšetrenie krčka maternice.

Výsledky analýzy:

- 16 pacientok s cytologickým záverom ASUC (atypické skvamózne bunky neurčitého významu), z nich všetky boli imunocytochemicky p16/Ki67 negatívne a následne v bioptickom vyšetrení boli bez verifikovanej cervikálnej intraepitelovej neoplázie alebo s ľahkým stupňom cervikálnej intraepitelovej neoplázie (CIN I);
- 17 pacientok s cytologickým záverom ASC-H (atypické skvamózne bunky, nemožno vylúčiť dyspláziu ťažkého stupňa), z nich 16 bolo imunocytochemicky p16/Ki67 pozitívnych a následne v bioptickom vyšetrení bolo 14 z nich verifikovaných ako stredne ťažká až ťažká cervikálna intraepitelová neoplázia (CIN II – III), 1 pacientka ako ľahká cervikálna intraepitelová neoplázia (CIN I) a jedna pacientka bola bez dysplázie;

- 39 pacientok s cytologickým záverom LSIL (ľahká skvamózna intraepitelová lézia), z nich bolo 7 imunocytochemicky p16/Ki67 pozitívnych a následne u všetkých siedmich bola biopticky verifikovaná stredne ťažká až ťažká cervikálna intraepitelová neoplázia (CIN II – III);
- 9 pacientok s cytologickým záverom HSIL (ťažká skvamózna intraepitelová lézia), z nich boli všetky imunocytochemicky p16/Ki67 pozitívne a u všetkých bola biopticky verifikovaná stredne ťažká až ťažká cervikálna intraepitelová neoplázia (CIN II – III).

Záver

Imunocytochemické vyšetrenie LBC pomocou duálnej protilátky CINtec PLUS p16/Ki67 nám ponúka lepšie odhadnutie rizika možného vzniku nádorovej proliferácie skvamózneho epitelu krčka maternice. Kombinácia dvoch markerov p16 a Ki67 sa zdá užitočným pomocníkom pri diagnostike high-grade dysplastických lézií s možným potenciálom malígnej transformácie. Pozitívita imunocytochemického vyšetrenia nás nabáda k nevyhnutnému doplneniu genetickým vyšetrením na HR HPV (mRNA E6/E 7), a tým pomáha k zlepšeniu celkového manažmentu pacientky.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. DeMay R. The Pap Test. Singapore: American Society for Clinical Pathology, 2005. 352 s. ISBN 0-89189-420-9.
2. Horáček J, Kobilková J. Gynekologická cytodiagnostika. Praha: Maxdorf Jessenius, 2013. 136 s. ISBN 978-80-7345-327-5.
3. Solomon D, Nayar R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Second Edition. China: Springer, 2004. 191 s. ISBN 0-387-40358-2.



MUDr. Zuzana Ďuricová
Medicyt, s. r. o., člen MEDIREX GROUP
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
zuzana.duricova@medicyt.sk

Mucinózne karcinómy ovária – novinky v diagnostike z pohľadu patológa

MUDr. Tomáš Torday

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP

Primárne mucinózne karcinómy ovária sú pomerne vzácne novotvary patriace do kategórie tzv. nádorov z povrchového epitelu ovária. Histologicky ide prevažne o karcinómy intestinálneho typu. Z klinického hľadiska toto ochorenie postihuje najmä ženy po 5. dekáde života a prezentuje sa väčšinou v I. až II. štádiu ochorenia, pričom pacientky v prvom štádiu (ochorenie viazané na ovárium) majú veľmi dobrú prognózu (90 % 5-ročné prežívanie). Novotvar je však pomerne málo chemosenzitívny. Väčšina primárnych mucinózných karcinómov je unilaterálna, veľkosti viac ako 10 – 13 cm, povrch ovária býva spravidla hladký, bez nádorovej infiltrácie. Histologicky rozlišujeme dve formy invázie v teréne mucinózneho karcinómu, a to expanzívny typ a deštruktívny (infiltratívny) typ. Imunohistochemický profil týchto karcinómov je pomerne variabilný (cytokeratín 7+, cytokeratín 20+/-, CDX2+/-, ER-, PR-, PAX8 -/+, WT1-, DPC4+) a nešpecifický. Význam týchto novotvarov spočíva najmä v nutnosti odlíšenia primárneho mucinózneho karcinómu ovária od metastázy mucinózneho karcinómu z iného origa (častejšia alternatíva). Najčastejším origom metastatických nádorov je najmä hrubé črevo (vrátane apendixu), žalúdok, pankreatikobiliárny trakt či endocervix. Na odlíšenie primárneho od sekundárneho novotvaru je nevyhnutné zhodnotenie komplexu klinických údajov, makroskopického a mikroskopického nálezu a nápomocné je aj imunohistochemické vyšetrenie. Ovariálne postihnutie mucinóznym tumorom asociovaným s tzv. pseudomyxoma peritonei sa v súčasnosti považuje takmer vždy za sekundárne (prevažne asociované s low-grade apendikálnym mucinóznym tumorom).

Kľúčové slová: ovárium, mucinózný karcinóm, metastáza.

Mucinous ovarian carcinomas – what's new in the pathological diagnostics

Primary ovarian mucinous carcinomas are relatively rare neoplasms in the category of surface epithelial ovarian tumors. Histologically, these tumors are in the majority of cases of intestinal type. From clinical point of view, this disease affects women after 5th decade of life and presents in oncological stage I or II, and patients in the first stage (disease confined to the ovary) have very good prognosis (5-year survival in 90% of cases). On the other hand, the chemosensitivity of these neoplasms is relatively low. In general, the vast majority of primary mucinous carcinomas is unilateral, measuring more than 10-13 cm in diameter, the ovarian surface is smooth, without neoplastic infiltration. Histologically, there are two different patterns of invasion recognised within mucinous carcinomas – expansile and infiltrative type. Immunohistochemical profile of these tumors is variable (cytokeratin 7+, cytokeratin 20+/-, CDX2+/-, ER-, PR-, PAX8 -/+, WT1-, DPC4+) and non-specific. It is of great importance to distinguish primary ovarian mucinous carcinoma from metastasis of mucinous carcinoma of other origin (more frequent alternative). The most frequent origins of metastatic tumors are mainly colon (including vermiform appendix), stomach, pancreaticobiliary tract and endocervix. To arrive at the correct diagnosis (primary vs metastatic disease), it's crucial to evaluate all the available clinical, macroscopical and microscopical findings (including immunohistochemical analysis). Ovarian involvement by mucinous tumor associated with the so-called pseudomyxoma peritonei is nowadays considered secondary in most of the cases (mainly associated with low-grade appendiceal mucinous neoplasm).

Key words: ovary, mucinous carcinoma, metastasis.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 47–50

Úvod

Primárne mucinózne karcinómy ovária sú pomerne vzácne a tvoria približne 2 – 3 % všetkých ovariálnych karcinómov. Malígnych je 10 % všetkých mucinózných nádorov. Histologicky ide zväčša o karcinómy intestinálneho typu (1). V posledných rokoch došlo k významnému progresu v porozumení týchto novotvarov. Hoci mucinózne tumory ovária sa zaraďujú klasicky do kategórie nádorov z povrchového epitelu ovária, tento pôvod nie je dokázateľný pri všetkých prípadoch. Možný je aj pôvod zo zárodočných buniek (napríklad asociácia s teratómom), prípadne pomerne časté je spojenie s Brennerovým tumorom (2, 3).

Klinický nález

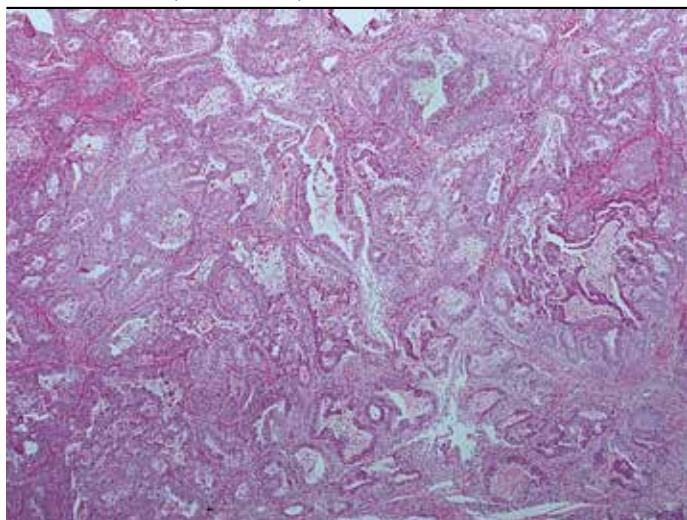
Ovariálne mucinózne karcinómy postihujú zväčša ženy po piatej dekáde života, výnimočne sme však zaznamenali výskyt aj u mladších žien (dokonca

aj v detskom veku). Rizikové faktory pre túto skupinu nádorov nie sú jednoznačne definované. Prekurzorom mucinózneho karcinómu je pravdepodobne mucinózný cystadenóm/borderline tumor. Mucinózný karcinóm je väčšinou viazaný na jedno ovárium (prezentujúci sa v 70 – 80 % prípadov v prvom štádiu ochorenia), zriedka sa šíri mimo ovária do peritoneálnej dutiny (4).

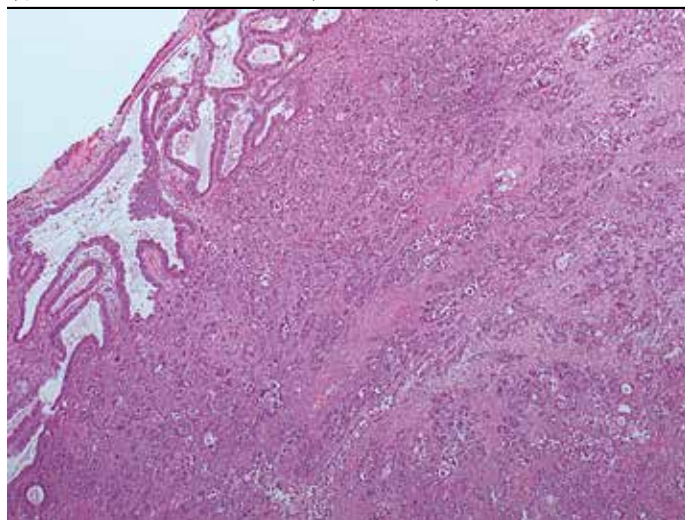
Prognóza

Mucinózne karcinómy v štádiu I majú výbornú prognózu s 90 % 5-ročným prežívaním. Primárne karcinómy, ktoré sa prezentujú v pokročilom štádiu, sú zriedkavé, vo väčšine prípadov pokročilého ochorenia v skutočnosti ide skôr o metastázu mucinózneho karcinómu do ovária z iného origa. Primárne mucinózne karcinómy s peritoneálnym šírením však majú pravdepodobne horšiu prognózu ako serózne karcinómy s podobným rozsahom ochorenia (5). Histologicky expanzívny typ invázie

Obrázok 1. Mucinózný karcinóm ovária s expanzívnyim typom invázie (farbenie hematoxylín-eozín, objektív 4-krát)



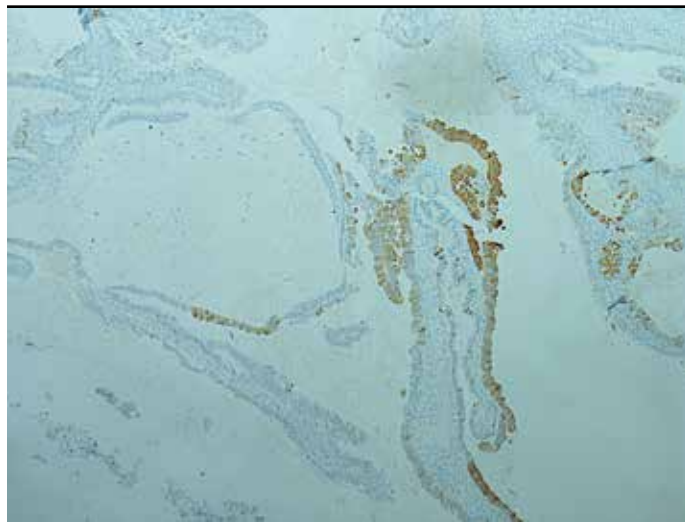
Obrázok 2. Mucinózný karcinóm ovária s deštruktívnym (infiltratívnym) typom invázie (farbenie hematoxylín-eozín, objektív 4-krát)



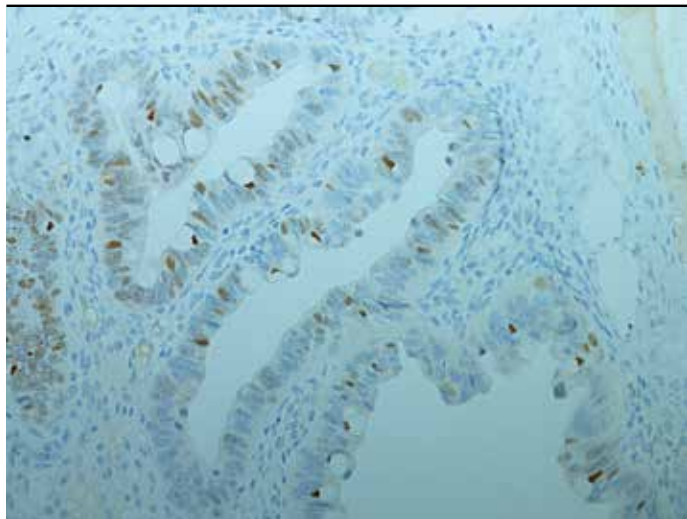
Obrázok 3. Imunohistochemická pozitivita cytokeratínu 7 v mucinóznom karcinóme ovária (cytoplazmatická pozitivita vizualizovaná vo forme hnedej farby, objektív 10-krát)



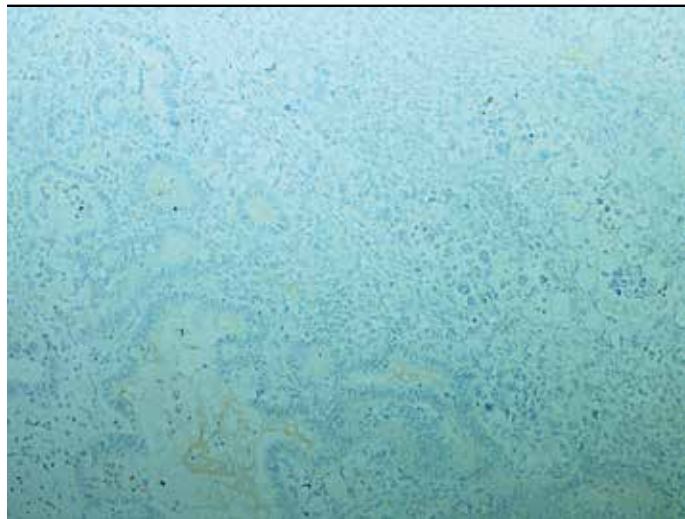
Obrázok 4. Fokálna imunohistochemická pozitivita cytokeratínu 20 (cytoplazmatická) v časti mucinózneho tumoru ovária (objektív 4-krát)



Obrázok 5. Imunohistochemická jadrová pozitivita CDX2 v mucinóznom karcinóme ovária (jadrá hnedej farby, objektív 20-krát)



Obrázok 6. Imunohistochemické vyšetrenie estrogénového receptoru, bez expresie v mucinóznom karcinóme ovária (objektív 10-krát)



Tabuľka 1. Možnosti odlíšenia primárneho a metastatického mucinózneho karcinómu v ovárii

	Primárny mucinózný karcinóm ovária	Metastatický mucinózný karcinóm do ovária
Lateralita	Unilaterálne (> 95 %)	Bilaterálne (75 %)
Veľkosť novotvaru	Väčšinou viac ako 10 – 13 cm	Väčšinou menej ako 10 cm
Makroskopické črty	Multicystický, možné solídne oblasti, povrch hladký	Nodulárny charakter, s postihnúťm povrchu, niekedy však možný hladký povrch
Lokalizácia tumoru	Intracystická, v stróme ovária	Povrchové noduly, postihnutie kortikálnej strómy
Mikroskopické črty	Prevažne expanzívny typ invázie, dobre diferencovaný mucinózný epitel	Infiltratívny/deštruktívny charakter rastu v dezmozplastickéj stróme
Extraovariálne postihnutie	Väčšinou neprítomné	Často prítomné

sa považuje za prognosticky lepší ako deštruktívny (infiltratívny) typ invázie. Na rozdiel od iných typov ovariálnych karcinómov (napríklad high grade serózneho karcinómu), mucinózný karcinóm vykazuje pomerne nízku citlivosť na chemoterapiu (1).

Makroskopický patologický nález

Makroskopicky primárne mucinózne karcinómy dosahujú pomerne veľké rozmery (medián 20 cm), majú hladký povrch, solídne-cystický charakter, pričom cystické priestory sú vyplnené hlienistým obsahom. Môžu obsahovať aj oblasti nekrózy a krvácania. Postihnutie ovária je typicky jednostranné (vo veľkej väčšine prípadov) (1, 2, 3).

Mikroskopický patologický nález

Mucinózne karcinómy intestinálneho typu sú spravidla architektonicky dobre diferencované, bývajú asociované s komponentom mucinózneho cystadenómu, prípadne mucinózneho borderline tumoru.

Rozlišujeme dve základné formy invázie v mucinóznom karcinóme.

Expanzívny typ invázie (častejší) pozostáva z výrazne agregovaných žľazových štruktúr s minimálnym množstvom strómy medzi žľazkami (obrázok 1). Takéto invazívne fokusy by mali dosahovať minimálny rozmer aspoň 5 mm (priemer) alebo plochu aspoň 10 mm² (1, 3).

Druhým typom invázie je deštruktívna invázia (v primárnych novotvaroch menej častá), s chaotickou infiltráciou ovariálnej strómy nádorovými žľazkami (obrázok 2), prípadne izolovanými bunkami (niekedy charakteru buniek typu pečatného prsteňa). Pomerne častá je dezmozplastická reakcia strómy (2, 3).

Z cytologického hľadiska nádorové bunky sú väčšinou cylindrického tvaru, vykazujú variabilnú intracytoplazmatickú produkciu mucínu (zväčša detegovateľná už pri hematoxylinom-eozínom farbených preparátoch), s variabilným stupňom atypie. Súčasťou novotvaru môžu byť aj pohárkovité bunky, Panethove bunky či neuroendokrinné bunky (4).

Imunofenotyp

Väčšina mucinóznych karcinómov je cytokeratín 7 pozitívnych, s variabilnou pozitivitou cytokeratínu 20 (väčšinou fokálnou). Možná je jadrová imunohistochemická expresia CDX2 (marker intestinálnej diferenciácie). Ďalšie markery ako p16, estrogénový receptor, progesterónový receptor či WT1 sú typicky negatívne (obrázok 3 – 6) (6). Využitie imunohistochemických markerov v diferenciálnej diagnóze mucinóznych tumorov ovária uvádzame v tabuľke 2.

Molekulárna patológia

Primárne mucinózne karcinómy obsahujú pomerne často mutáciu KRAS (75 % prípadov). Identické mutácie sú detegované aj v teréne okolitého mu-

cinózneho borderline tumoru alebo cystadenómu (ak je prítomný v okolí karcinómu), čo podporuje názory, ktoré tvrdia, že prekursori mucinózneho karcinómu sú mucinózný cystadenóm a mucinózný borderline tumor (3, 7). Taktiež v 20 % prípadov sa v niektorých štúdiách (taktiež aj naša osobná skúsenosť) preukázala amplifikácia a overexpresia génu *HER2* (čo môže mať v budúcnosti terapeutický význam, podobne ako v prípade karcinómu prsníka alebo žalúdka) (1, 8, 9).

Diferenciálna diagnóza

Odlíšenie mucinózneho karcinómu od iných primárnych nádorov ovária je vo väčšine prípadov jednoduché a je možné na základe posúdenia rutinných hematoxylin-eozínom farbených preparátov. Omnoho závažnejším problémom v diferenciálnej diagnóze je však odlíšenie od metastatického mucinózneho karcinómu, najmä vtedy, ak je nádorové postihnutie ovária prvým klinickým prejavom ochorenia. Najčastejším origom metastatického mucinózneho karcinómu do ovária je gastrointestinálny trakt (appendix vermiformis, hrubé črevo, žalúdok), pankreatikobiliárny trakt, cervix uteru, menej často respiračný trakt a iné lokality. Morfologické charakteristiky, ktoré umožňujú odlíšenie primárneho od sekundárneho novotvaru, uvádzame v tabuľke 1.

Je však potrebné si uvedomiť, že morfologické črty uvedené v tabuľke 1 síce umožňujú odlíšenie primárnych od metastatických mucinóznych karcinómov vo veľkej časti prípadov, možné sú však aj výnimky, ktoré sa neriadia týmito pravidlami. Napríklad sú známe metastázy mucinózneho karcinómu z gastrointestinálneho traktu, ktoré dokážu morfologicky dokonale imitovať primárny novotvar ovária (s jednostranným postihnutím, hladkým povrchom ovária, dokonca s výskytom oblastí, ktoré morfologicky napodobňujú mucinózný borderline tumor, prípadne mucinózný cystadenóm ovária) (1, 2, 3, 4).

Určitú pomoc v týchto problematických prípadoch môže poskytnúť imunohistochemické vyšetrenie (tabuľka 2), avšak v časti prípadov ani to nemusí viesť k úspechu (vzhľadom na nešpecifický imunofenotyp mucinózneho karcinómu ovária) (6). V dnešnom období neexistuje žiaden jednoznačne spoľahlivý pozitívny imunohistochemický marker primárneho mucinózneho karcinómu ovária. Imunohistochemické vyšetrenie pri odlíšení primárneho a metastatického mucinózneho karcinómu uvádzame v tabuľke 2.

Mucinózne tumory ovária a pseudomyxoma peritonei

V posledných rokoch sa preukázalo, že takmer všetky prípady tzv. pseudomyxoma peritonei (PMP) sú asociované s primárnym mucinóznym tumorom apendixu (low grade appendiceal mucinous neoplasm (LAMN)), pričom postihnutie ovária je sekundárne. Pri ovariálnych mucinóznych tumoroch asociovaných s PMP sa odporúča používať nasledovné pojmy: diseminovaná peritoneálna adenomucinóza (DPAM), prípadne deskriptívny

Tabuľka 2. Imunohistochemická diferenciálna diagnóza primárnych a sekundárnych mucinózných karcinómov ovária

	Hrubé črevo	Pankreas	Žalúdok	Endocervix (AdenoCa)	Pľúca (AdenoCa)	Primárny MK ovária
CK7	–	+	variabilne	+	+	+
CK20	+	–/+	variabilne	–	– / +	+/-
CDX2	+	variabilne	variabilne	–/+		+/-
DPC4 / SMAD4	Strata expresie v 10 %	Strata expresie v 50 %	+	+	+	+
TTF1	–	–	–	–	+	–
p16	–	–	–	+	–	–

Vysvetlivky: MK – mucinózný karcinóm, AdenoCa – adenokarcinóm, CK – cytokeratín

popis „sekundárne nádorové postihnutie štruktúrami low grade apendikálneho mucinózneho novotvaru. Pojem PMP je iba klinický a nie patologický. Peritoneálne mucinózne tumory s low grade morfológiou sú prognosticky odlišné od mucinózných karcinómov, ktoré majú horšiu prognózu. V prípade postihnutia peritoneálnej dutiny mucinóznym karcinómom je možné použiť pojem peritoneálna mucinózna karcinomatóza (1, 3).

Peroperačná biopsia pri mucinózných karcinómoch ovária

Úlohou peroperačnej biopsie ovária je predbežné stanovenie dignity novotvaru (benígny, borderline, malígny) a histologického typu novotvaru (ak je to možné) za účelom posúdenia rozsahu ďalšieho chirurgického výkonu u pacientky. Nádory ovária (obzvlášť veľkých rozmerov) sú morfológicky pomerne heterogénne, kde je možné striedanie areálov s benígnou, borderline a malígnou morfológiou. Stanovenie dignity novotvaru preto môže byť počas peroperačnej biopsie problematické, keďže vyšetrenie len jednej alebo dvoch excízií (z časového dôvodu nie je možné rozsiahlejšie vyšetrenie) môže viesť k falošnému podhodnoteniu biologických vlastností lézie. Na jednoznačné posúdenie dignity je často možná až definitívna biopsia s rozsiahlym samplingom (1 až 2 excízie na 1 cm priemeru novotvaru). Jednoznačné peroperačné odlíšenie primárneho od sekundárneho mucinózneho novotvaru väčšinou nie je možné (s výnimkou prípadov, ak je klinicky známe origo novotvaru), avšak je možné použiť vyššie opísané morfologické a klinické znaky, ktoré môžu pomôcť v diferenciálnej diagnóze (unilateralita verzus bilateralita, veľkosť novotvaru, postihnutie povrchu, expanzívny verzus infiltratívny charakter rastu novotvaru, klinické údaje o karcinóme z inej lokality). V prípade benígneho nálezu (mucinózný cystadenóm, prípadne cystadenóm s fokálnou atypiou) nie je potrebný ďalší chirurgický výkon. V prípade mucinózneho borderline tumoru a mucinózneho karcinómu je spravidla potrebné chirurgické určenie rozsahu ochorenia (napríklad odstránenie kontralaterálneho ovária, uteru, lymfadenektómia, odobratie vzoriek z peritonea, omenta, odstránenie apendixu). Metastatické karcinómy si už ďalší chirurgický zákrok za účelom určenia rozsahu ochorenia (v prípade dokázanej ovariálnej metastázy a známeho origa) nevyžadujú (1).

Záver

Primárne mucinózne karcinómy ovária sú zriedkavé. Naopak, častejšie sú metastatické mucinózne karcinómy z iného origa (najmä gastrointestinálny trakt). Úskalím v patologickej diagnostike je fakt, že metastatické mucinózne tumory v ovárii dokážu verne morfológicky imitovať primárne mucinózne ovariálne novotvary (vrátane mucinózneho borderline tumoru či dokonca

cystadenómu/cystadenofibrómu), pričom odlíšenie primárneho od sekundárneho novotvaru má, samozrejme, veľký praktický význam z hľadiska terapie a prognózy. Makroskopické a mikroskopické vyšetrenie s rozsiahlym samplingom novotvaru síce môže vo veľkej časti prípadov umožniť odlíšenie primárneho od sekundárneho pôvodu mucinózneho karcinómu, avšak pôvod novotvaru v časti prípadov môže zostať nejasný. Imunohistochemická analýza je taktiež nápomocná, v súčasnosti však neexistuje žiaden špecifický pozitívny marker, ktorý by dokázal jednoznačne identifikovať primárny mucinózný adenokarcinóm ovária. Veľmi dôležitá je pre patológa znalosť podrobných anamnestických a klinických údajov o pacientke, ktoré môžu značne spresniť a urýchliť samotný diagnostický proces. Na jednoznačnú a definitívnu diagnózu je preto nevyhnutná spolupráca medzi patológom, chirurgom, gynekológom a onkológom.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Soslow RA, Tornos C. *Diagnostic pathology of ovarian tumors*. Chapter 9. Pathology of mucinous tumors. New York: Springer, 2011. 112–118.
2. Crum CP, Nucci MR, et al. *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology*. 2nd ed. Chapter 27. The pathology of pelvic-ovarian epithelial (epithelial-stromal) tumors. Philadelphia: Saunders, 2011: 854–862.
3. Kurman RJ, Ellenson LH, et al. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 6th ed. Chapter 14. Surface epithelial tumors of the ovary. New York: Springer, 2011: 735–748.
4. Hart WR. Mucinous tumors of the ovary: a review. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2005;24(1):4–25.
5. Zaino RJ, Brady MF, et al. Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a gynecologic oncology group study. *Cancer*. 2011;117(3):554–562.
6. Tabrizi AD, Kalloger SE, et al. Primary ovarian mucinous carcinomas of intestinal type: significance of pattern of invasion and immunohistochemical expression profile in a series of 31 cases. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2010;29(2):99–107.
7. Cuatrecasas M, Villaneuva A, et al. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer*. 1997;79(8):1581–1586.
8. McAlpine JN, Wiegand KC, et al. HER2 overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy. In: *BMC Cancer*, 2009;9:433.
9. Kurman RJ, Carcangiu ML, et al. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth edition. Lyon: IARC, 2014. ISBN 978-92-832-2435-8. Chapter 1, *Tumours of the ovary*, p. 25–29.



MUDr. Tomáš Torday
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen **MEDIREX GROUP**
 Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
 tomas.torday@medicyt.sk

Malígny steroid cell tumor vaječníka

MUDr. Peter Vereš¹, MUDr. Pavol Janega, PhD.²

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

²Ústav patologickej anatómie LF UK a UN Bratislava

Steroid cell tumory vaječníka patria do skupiny sex-cord stromal tumorov, ktoré vznikajú z ovariálnej strómy. Špecializovaná stróma je vytvorená zo sex povrazcov embryonálnych gonád (predchodca Sertoliho, Leydigových, granulózových a thekálnych buniek), ktorú charakterizuje hormonálna produkcia; estrogény sú produkované thekálnymi bunkami a androgény Leydigovými bunkami. Steroid cell tumory pozostávajú výlučne z buniek podobných bunkám, ktoré produkujú steroidné hormóny: luteínnym, Leydigovým a adrenokortikálnym bunkám. Hormonálna sekrécia vedie k vzniku typických klinických symptómov, s androgénnymi zmenami, ako je virilizácia a hirsutismus približne u polovice pacientov (56 – 77 %), s estrogénnymi prejavmi a postmenopauzálnym krvácaním približne u 6 – 23 %. Sekrécia kortizolu u 6 – 10 % tumorov môže zapríčiniť vznik Cushingovho syndrómu. Steroid cell tumory sú zriedkavé, predstavujú menej ako 0,1 % ovariálnych tumorov. Vyskytujú sa v každom veku, od 2 do 80 rokov, priemerne v 42. roku života. Malígne steroid cell tumory sú zvyčajne charakterizované zvýšenou mitotickou aktivitou (2 a viac mitóz/HPF), prítomnosťou nekróz, krvácaním a jadrovými atypiami, priemer tumoru je zvyčajne väčší ako 7 cm. Tumory sú typicky inhibín a kalretinín pozitívne. Diagnóza by mala byť stanovená na základe korelácie klinických symptómov a detailného mikroskopického a imunohistochemického vyšetrenia.

Kľúčové slová: vaječník, sex-cord stromal tumor, steroid cell tumor.

Malignant steroid cell ovarian tumors

Steroid cell tumors are a group of sex cord-stromal tumors, which arise from ovarian stroma. Specialized stroma of the genital ridge is derived from sex cords of the embryonal gonad (precursors of Sertoli cells, Leydig cells, granulosa and thecal cells) characterized by hormonal production; oestrogens by thecal cells and androgenes by Leydig cells. Steroid cell tumors are composed entirely of cells resembling steroids secreting cells: lutein, Leydig and adrenocortical cells. The hormonal production causes typical clinical symptoms, about half of patients (56-77%) present with androgenic symptoms, virilisation and hirsutism, about 6-23% with oestrogenic symptoms and postmenopausal bleeding. The cortisol secretion in 6-10% of tumors may cause Cushing syndrome. Steroid cell tumors are rare, account for <0.1% of all ovarian neoplasms. They occur at any age, from 2 to 80 years, with the mean in 42 years. Malignant steroid cell tumors are usually accompanied by increased mitotic activity (2 and more mitoses/ HPF), presence of the necrosis, hemorrhages and nuclear atypias, the tumor mean diameter is usually over 7 cm. Tumors are typically positive for inhibin and calretinin. The appropriate diagnosis should be made on the correlation of clinical symptoms and detailed microscopical and immunohistochemical assessment.

Key words: ovary, sex cord-stromal tumor, steroid cell tumor.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 51–54

Úvod

Steroid cell tumory ovárií patria do skupiny sex-cord stromálnych tumorov. Sú tvorené bunkami produkujúcimi steroidné hormóny, podobné luteínnym, Leydigovým bunkám alebo bunkám kôry nadobličky. Názov steroid cell tumory sa používa od roku 1979, keď ich zo skupiny pôvodných lipoid cell tumorov vyčlenil Scully (1). Nádory z týchto buniek sú relatívne zriedkavé a tvoria asi 0,1 % všetkých nádorov ovária. Rozdeľujeme ich na základe ich pôvodu do dvoch podtypov patriacich do skupiny luteínných alebo Leydigových buniek. Tretiu, najväčšiu skupinu, tvoria nádory, kde pôvod nie je možné jednoznačne identifikovať (tabuľka 1) a predstavujú asi 60 % všetkých steroid cell tumorov ovária (2).

Tabuľka 1. Klasifikácia steroid cell tumorov

A. Skupina nádorov z luteínných buniek
(1) Stromálny luteóm
B. Skupina nádorov z Leydigových buniek
(1) Leydig cell tumor, ne-hilózný typ
(2) Leydig cell tumor, hilózný typ (hilus cell tumor)
C. Steroid cell tumor, NOS

Sekrécia rôznych steroidných hormónov vedie k charakteristickým klinickým prejavom. Najčastejšie pozorovaná produkcia androgénov spôsobuje virilizáciu a hirsutizmus (3, 4). Produkcia estrogénov sa podieľa na vzniku postmenopauzálného krvácania, ktoré môže byť jediným prejavom nádoru u starších žien (5), môže však viesť aj k vzniku predčasného vaginálneho krvácania a galaktorey u detí (6). Zriedkavejšia je hyperkortizolémia, ktorá spôsobuje vznik Cushingovho syndrómu (7). Nádory môžu imitovať alebo sa vyskytnúť súčasne s kongenitálnou adrenálnou hyperpláziou v mladších vekových skupinách, čo môže viesť k nesprávnemu diagnostikovaniu pacientky (8). K častým klinickým príznakom patrí aj zväčšenie a bolesti brucha. Časť nádorov však môže byť aj klinicky nemá, bez vzniku jednoznačných príznakov. Asi 25 % nádorov nevykazuje zvýšenú hormonálnu produkciu (2, 4, 9, 10).

Vekový výskyt steroid cell tumorov je veľmi široký, boli pozorované u pacientok vo veku od 2 do 80 rokov (priemerný vek výskytu je 43 rokov). Spravidla sú unilaterálne (v 6 % môžu byť bilaterálne). Liečba je prevažne chirurgická (2, 9).

Kazuistika

Materiál a metódy

Opisujeme v biopтической praxi pomerne vzácny typ nádoru u 59-ročnej ženy vyplňujúci oblasť malej panvy. U pacientky bola pred piatimi rokmi vykonaná hysterektómia s obojstrannou adnexektómiou. Indikácia operácie ako i zistené histopatologické nálezy sa nepodarilo zistiť. V súčasnosti sme dostali na vyšetrenie vzorky nádoru, ktorý následne generalizoval a pacientka zomrela.

Na histologické vyšetrenie sme dostali v šiestich nádobách uložené časti nádoru (najväčšia mala rozmery 24 x 15 x 15 cm, ostatné fragmenty mali najväčší rozmer 2 až 3 cm). Vzorky boli fixované v 4 % formaldehyde. Nádorové tkanivo malo solídnu makroštruktúru, sivožltú, miestami hnedú farbu s ložiskami zakrvácania.

Tkanivo bolo spracované štandardným spôsobom, po zafixovaní boli vzorky zaliate do parafrínových bločkov, narezané na 3 cm hrubé rezy a ofarbené hematoxylinom-eozínom a farbením retikulínových vlákien podľa Gomoriho. Časť preparátov bola rutinne spracovaná pre imunohistochémiu; 3 cm hrubé rezy boli deparafrinizované, rehydratované vo fosfátni pufovanom fyziologickom roztoku a inkubované s protilátkami na dôkaz cytokeratínov CKA E1/3, CK8/18, CK7 a CK20, vimentínu, alfa-inhibínu, EMA, kalretinínu, melan A, HMB45, CD99, S-100 proteínu, CD10, WT-1, chromogranínu A, NSE, AFP, PLAP a CD117. Rezy boli následne inkubované so sekundárnou protilátkou Envision, polymérom anti-mouse anti-rabbit konjugovaným s HRP a vizualizované prostredníctvom DAB. Všetky chemikálie pochádzali od výrobcu DAKO (Glostrup, Denmark). Farbenia boli zrealizované na imunoanalýzátore BenchMark ULTRA VENTANA podľa výrobcom predpísaného protokolu.

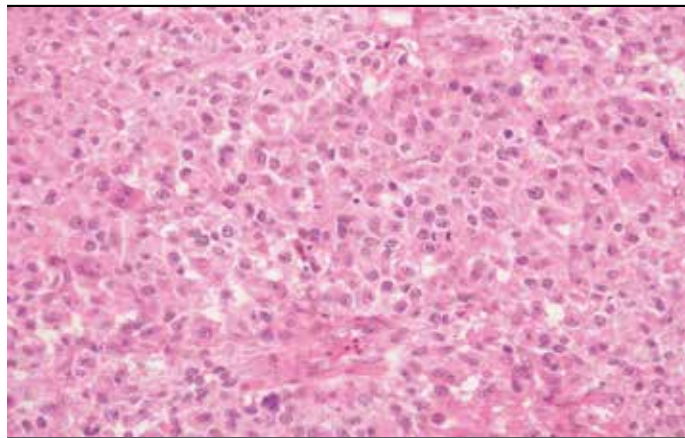
Výsledky

V štandardnom farbení hematoxylinom-eozínom nachádzame stredne veľké a veľké okrúhle alebo polygonálne nádorové bunky s eozinofilnou jemne granulovanou cytoplazmou, fokálne so svetlými intracytoplazmatickými vakuolami a so zreteľnou kontúrou cytoplazmovej membrány. Jadrá sú uložené centrálne, vykazujú stredný až ťažký stupeň pleomorfie, majú nápadne zväčšené jadierko, miestami sú zachytené jadrové pseudoinklúzie. Prítomné sú početné mitózy. Reinkeho kryštály nie sú zachytené v žiadnej hodnotenej vzorke. Bunky sú usporiadané do difúzne rastúcich štruktúr, hniezd a povrazcov. Retikulínové vlákna obklopujú každú bunku. Stróma nádoru je pomerne chudobná, fibrózna, miestami edematózne presiaknutá. Ku kompletnosti exstirpácie nádoru sa z daného materiálu vzhľadom na fragmenty nedalo jednoznačne vyjadriť (obrázky 1, 2, 3).

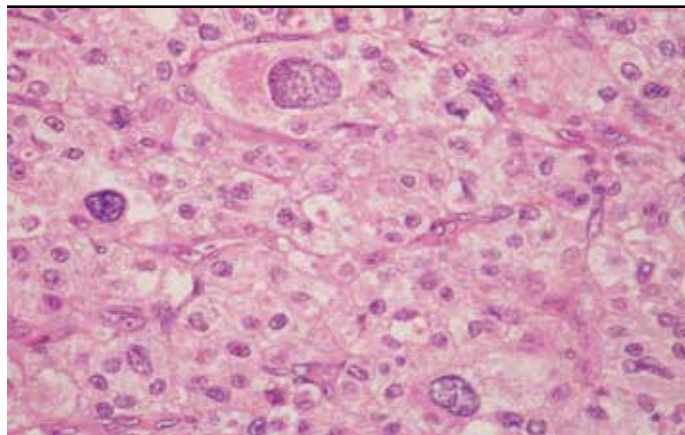
Nádorové bunky vykazujú imunohistochemickú pozitivitu na alfa-inhibín, kalretinín, CKA E1/3, vimentín, CD99 a melan A. Imunohistochemicky sú negatívne na CEA, EMA, CK8/18, CK7, CK20, CD10, chromogranin A, NSE, WT-1, S-100, AFP, hepatocyte, HMB45, CD117 a PLAP.

Makro- a mikroskopický obraz a imunohistochemický profil zodpovedá malígnemu steroid cell tumoru vyrastajúceho z vaječníka, pravdepodobne ponechaného v tele pacientky pri predchádzajúcej operácii (obrázky 4, 5).

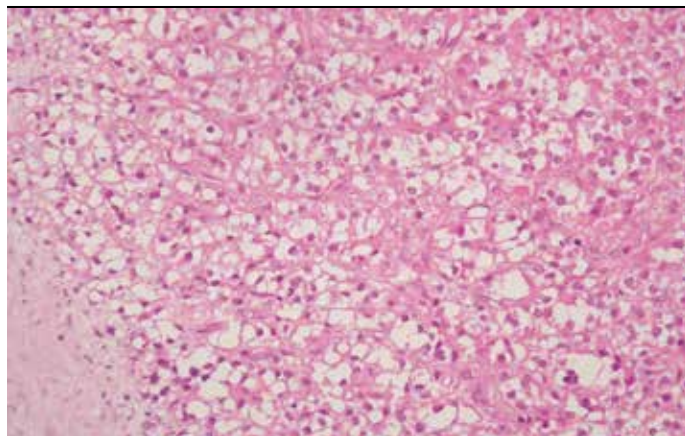
Obrázok 1. Malígný steroid cell tumor, farbenie hematoxylin-eozin, zväčšenie 200-krát



Obrázok 2. Malígný steroid cell tumor, farbenie hematoxylin-eozin, zväčšenie 400-krát

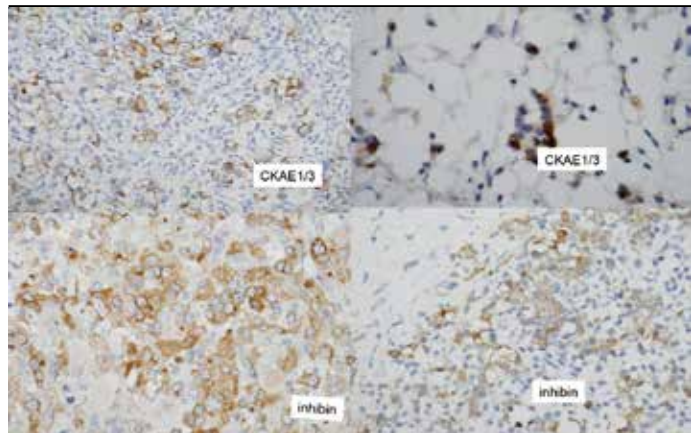
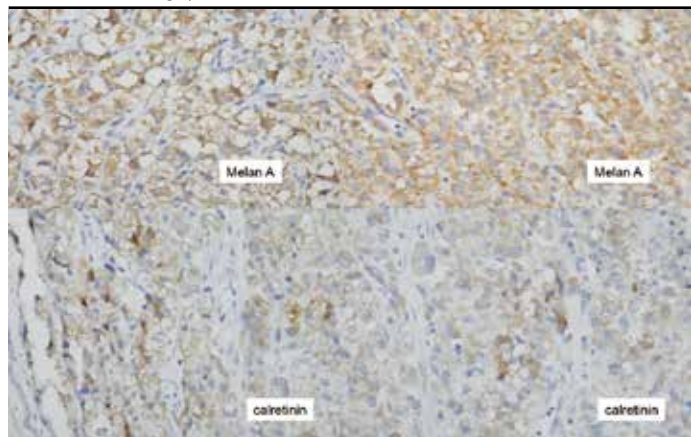


Obrázok 3. Malígný steroid cell tumor, farbenie hematoxylin-eozin, zväčšenie 100-krát



Diskusia

Ovariálne steroid cell tumory sú relatívne zriedkavé tumory patriace do skupiny sex-cord stromálnych tumorov. Nádory sú typické prevažne pomalým rastom a benígnym správaním. Do popredia problémov pacienta vystupujú najmä klinické prejavy súvisiace s dlhodobou hormonálnou dysbalanciou. Vzhľadom na nízku špecifickosť týchto prejavov však môžu často zostať nepozorované (11). Na rozdiel od prevažne benígneho sprá-

Obrázok 4. Malígny streoid cell tumor imunohistochemického farbenia**Obrázok 5.** malígny streoid cell tumor imunohistochemického farbenia**Tabuľka 2.** Znaký malignity steroid cell tumorov ovárií podľa Hayes a Scully (9)

2 a viac mitotických figúr na 10 HRF	92 % malígnych nádorov
nekrózy	86 % malígnych nádorov
rozmer nádoru väčší ako 7 cm	78 % malígnych nádorov
fokálne krvácanie	77 % malígnych nádorov
jadrové atypie grade II a III	64 % malígnych nádorov

vania stromálneho luteómu a Leydig cell tumorov vykazujú steroid cell tumory ovárií NOS horšiu prognózu (3).

Hayes et al. (9) analyzovali v prospektívnej štúdii celkový malígny potenciál týchto nádorov. Ako pravdepodobne benígne opisujú tie tumory, ktoré nevykazujú známky šírenia sa do okolia v priebehu minimálne 3 rokov od operácie. Autori pozorovali malígne správanie nádorov u 18 z 50 pacientov. Z histopatologických nálezov korelovala s malígnym správaním nádoru najlepšie prítomnosť dvoch a viac mitotických figúr na 10 HRF, prítomnosť nekróz v hodnotenom preparáte, rozmery nádoru väčšie ako 7 cm, krvácanie a výrazné jadrové atypie (tabuľka 2). Okrem zachytenia nekróz boli všetky tieto kritériá splnené aj v nami opisovanom prípade.

Nádory sú mikroskopicky tvorené dvomi typmi buniek s prekrývajúcimi sa črtami. Nachádzame bunky s bohatou eozinofilnou cytoplazmou, respektíve bunky s jemne vakuolárnou cytoplazmou (9). Steroid cell tumory je potrebné odlíšiť o iných oxyfílnych a svetlobunkových nádorov ovária. Diferenciálne diagnosticky treba vylúčiť najmä luteinizovaný thekóm,

jasnobunkový karcinóm (clear cell carcinoma), hepatoidný karcinóm, adrenokortikálny karcinóm, hepatoidný yolk sack tumor, nádor z Leydigových buniek, lipid-rich Sertoli cell tumor, extenzívne luteinizovaný granulosa cell tumor, stromálny luteóm, metastatický karcinóm z renálnych buniek a oxyfílny endometrioidný karcinóm (2, 11).

Výrazná pozitivita kalretinínu a alfa inhibínu, zistená aj v našom prípade, je typickým nálezom pozorovaným vo viacerých štúdiách (11, 12). Nami zistená expresia CD99 je v súlade s pozorovaním Jones et al. (12), aj keď iné štúdie preukázali, že expresia nemusí byť konštantná a nie všetky hodnotené nádory sú pozitívne pri farbení touto protilátkou (11). Nádory často exprimujú melan A (86 %), vimentín (75 %) a androgénový receptor (64 %). Expresia cytokeratínov je zriedkavejšia; Cam 5.2 je opisovaný v 46 %, AE1/3 v 36 – 37 %, EMA je prevažne negatívna, aj keď v niektorých prípadoch bola opísaná fokálna EMA pozitivita (5, 11 – 14). Výsledky sú v súlade s našim pozorovaním.

Aj keď v súčasnosti používaná klasifikácia rozdeľuje nádory na základe ich pôvodu k luteínnym, respektíve Leydigovým bunkám, samotný pôvod nádorových buniek nie je úplne jasný. Molekulárno-genetické analýzy preukázali v nádoroch prítomnosť mRNA pre steroidogénne p450c11 a p450c2, čo naznačuje možnosť ich pôvodu z adrenálnych zvyškov (15). Aj keď táto hypotéza nie je všeobecne prijímaná, zodpovedala by existencii testikulárnych nádorov z adrenálnych zvyškov (TART, testicular adrenal rest tumor) u mužov (16 – 18). Disproporčný výskyt nádorov z adrenálnych zvyškov v závislosti od pohlavia môže podporovať túto hypotézu a vyžiada si ďalší výskum a objasnenie týchto nálezov v budúcnosti.

Záver

Steroid cell tumory patria medzi zriedkavé sex-cord stromálne tumory ovária. Práve ich hormonálna produkcia vedúca u pacientov k prejavom hormonálnej dysbalancie môže byť rozhodujúca na stanovenie správnej diagnózy. Detailné histologické spracovanie a imunohistochemické hodnotenie súčasne s posúdením klinických prejavov tumoru je kľúčové na stanovenie stupňa malignity a odlíšenie nádoru od iných histopatologických jednotiek a má význam pri stanovení správneho terapeutického postupu.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Scully RE. *Tumors of the ovary and maldeveloped gonads*. In: Atlas of Tumor Pathology. Hartmann WH. and Cowan WR., Editors. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC: USA, 1979. p. 215–220.
2. Young RH. *Steroid cell tumors*. In: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Sixth Edition. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM. Editors. New York: Springer, 2011. p. 826–832.
3. Tai YJ, Chang WC, Kuo KT, et al. Ovarian steroid cell tumor, not otherwise specified, with virilization symptoms. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014;53(2):260–262.
4. Mizoguchi M, Minami S, Yamamoto M, et al. Ovarian steroid cell tumor, not otherwise specified, producing testosterone. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40(9): 2081–2085.

5. Wan J, Chen X, Li X. Ovarian steroid cell tumor, not otherwise specified: A rare case of postmenopausal vaginal bleeding. *Oncol Lett.* 2014;8(3):1187–1189.
6. Ashraf A, Abdul-Latif H, Hardin W, et al. Vaginal bleeding and galactorrhea in a child with ovarian steroid cell tumor. *Endocr Pract.* 2005;11(5):346–349.
7. Sworczak K, Blaut K, Malecha M, et al. Ectopic ACTH syndrome associated with ovarian steroid-cell tumor. *J Endocrinol Invest.* 2002;25(4):369–372.
8. Yilmaz-Agladioglu S, Savas-Erdeve S, Boduroglu E, et al. A girl with steroid cell ovarian tumor misdiagnosed as non-classical congenital adrenal hyperplasia. *Turk J Pediatr.* 2013;55(4):443–446.
9. Hayes MC, Scully RE. Ovarian steroid cell tumors (not otherwise specified). A clinicopathological analysis of 63 cases. *Am J Surg Pathol.* 1987;11(11):835–845.
10. Reedy MB, Richards WE, Ueland F. Ovarian steroid cell tumors, not otherwise specified: a case report and literature review. *Gynecol Oncol.* 1999;75(2):293–297.
11. Haroon S, Idrees R, Fatima S. Ovarian steroid cell tumor, not otherwise specified: A clinicopathological and immunohistochemical experience of 12 cases. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015;41(3):424–431.
12. Jones MW, Harri R, Dabbs DJ. Immunohistochemical profile of steroid cell tumor of the ovary: a study of 14 cases and a review of the literature. *Int J Gynecol Pathol.* 2010;29(4):315–320.
13. Seidman JD, Abbondanzo SL, Bratthauer GL. Lipid cell (steroid cell) tumor of the ovary: immunophenotype with analysis of potential pitfall due to endogenous biotin-like activity. *Int J Gynecol Pathol.* 1995;14(4):331–338.
14. Deavers MT, Malpica A, Ordonez NG. Ovarian steroid cell tumors: an immunohistochemical study including a comparison of calretinin with inhibin. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22(2):162–167.
15. Lin CJ, Jorge AA, Latronico AC. Origin of an ovarian steroid cell tumor causing isosexual pseudoprecocious puberty demonstrated by the expression of adrenal steroidogenic enzymes and adrenocorticotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):1211–1214.
16. Zaarour MG, Atallah DM, Trak-Smayra VE. Bilateral ovary adrenal rest tumor in a congenital adrenal hyperplasia following adrenalectomy. *Endocr Pract.* 2014;20(4): e69–e74.
17. Thomas TT, Ruscher KR, Mandavilli S. Ovarian steroid cell tumor, not otherwise specified, associated with congenital adrenal hyperplasia: rare tumors of an endocrine disease. *J Pediatr Surg.* 2013;48(6):e23–e27.
18. Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Takahashi S. Testicular adrenal rest tumors in adult males with congenital adrenal hyperplasia: evaluation of pituitary-gonadal function before and after successful testis-sparing surgery in eight patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):612–615.



MUDr. Peter Vereš
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., člen **MEDIREX GROUP**
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
peter.veres@medirex.sk

Prístup slovenských žien k problematike rakoviny krčka maternice

(podľa záverečnej správy z prieskumu spoločnosti GfK Slovakia, s. r. o.)

Prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.

I. gynekologicko-pôrodná klinika LF UK a UNB, Bratislava

Zhodnotený prístup slovenských žien k problematike rakoviny krčka maternice z hľadiska ich informovanosti a spokojnosti s gynekologickou odbornou starostlivosťou ukázal spokojnosť s lekármi, dostatočné znalosti o potrebe preventívnych gynekologických prehliadok, o ich význame a cieľoch. Ukázal významné rezervy v potrebe edukácie žien v zmene ich motivácie absolvovať preventívne vyšetrenie.

Kľúčové slová: preventívna gynekologická prehliadka, cytológia, HPV.

Attitudes of Slovak women on the issue of cervical cancer (according to the final report of the survey by GfK Slovakia)

A survey on a representative sample evaluates attitudes of Slovak women on the issue of cervical cancer in terms of their awareness and satisfaction with gynecological care. It has shown patients satisfaction with physicians, appropriate level of knowledge about the need for preventive gynecological examinations, their significance and objectives. It has shown significant reserves in the need for education of women towards the change in motivation to undergo preventive testing.

Key words: preventive gynecological examination, cytology, HPV.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 55–60

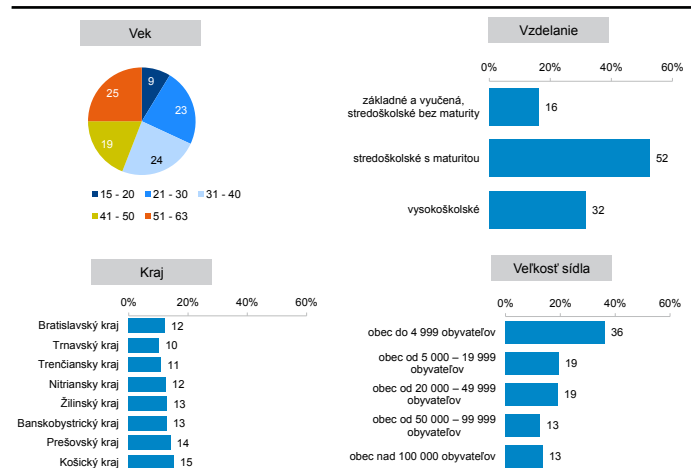
Úvod

Rakovina krčka maternice je ochorenie s významnou možnosťou prevencie, ktorá je možná iba dobrou organizáciou preventívnych gynekologických prehliadok, na ktorých sa ženy pravidelne zúčastňujú. Percento žien, ktoré na Slovensku absolvuje tieto prehliadky, je veľmi nízke.

Metodika a súbor

Kvantitatívny prieskum systémom online a telefonického kontaktu 1 000 žien vo veku 15 – 63 rokov v auguste 2014 hodnotil prístup slovenských žien k preventívnym gynekologickým prehliadkam a k problematike rakoviny krčka maternice (obrázok 1).

Obrázok 1. Charakteristika vzorky



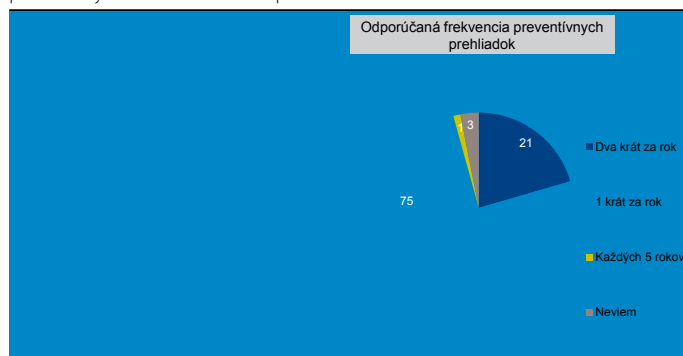
Ciele prieskumu

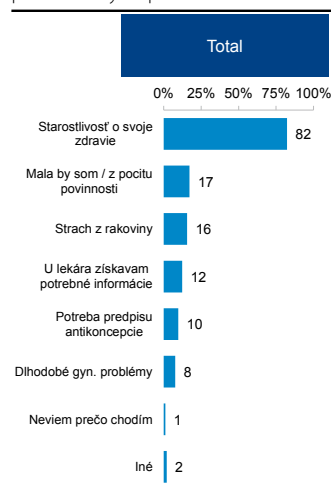
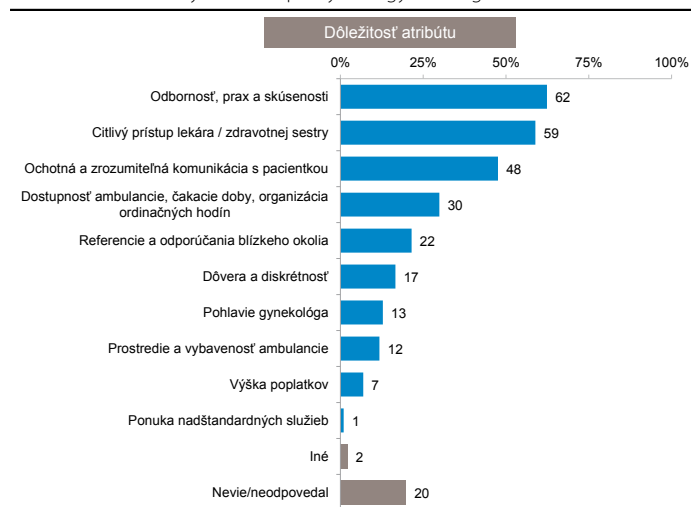
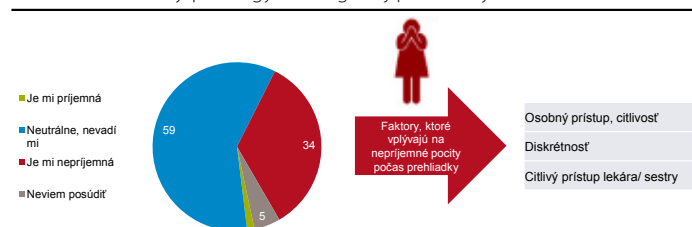
1. Zistiť postoje a správanie slovenských žien v oblasti gynekologických prehliadok – bežných aj preventívnych.
2. Zhodnotiť kritériá žien pri výbere gynekológa, ich očakávania a dôležitosť odbornej erudície.
3. Stanoviť úroveň informovanosti v oblasti možnosti prevencie a spôsobov diagnostiky rakoviny krčka maternice.
4. Analyzovať údaje o záchytech a vyhľadávaní informácií o rakovine krčka maternice.

Kľúčové zistenia

Ženy navštevujú ambulanciu gynekológa najčastejšie za účelom preventívnej prehliadky (74 %), alebo keď majú zdravotný problém (42 %) (obrázok 3). Gynekologickú prehliadku vníma ako nepríjemnú 34 % (obrázok 3), 59 % ju

Obrázok 2. Frekvencia návštevy gynekológa za účelom preventívnej prehliadky – skutočnosť a odporúčanie



Obrázok 3. Dôvody absolvovania preventívnych prehliadok**Obrázok 4.** Bariéry absolvovania preventívnej prehliadky u žien, ktoré nenavštevujú gynekológa**Obrázok 7.** Atribúty dôležité pri výbere gynekológa**Obrázok 5.** Pocity počas gynekologickej prehliadky

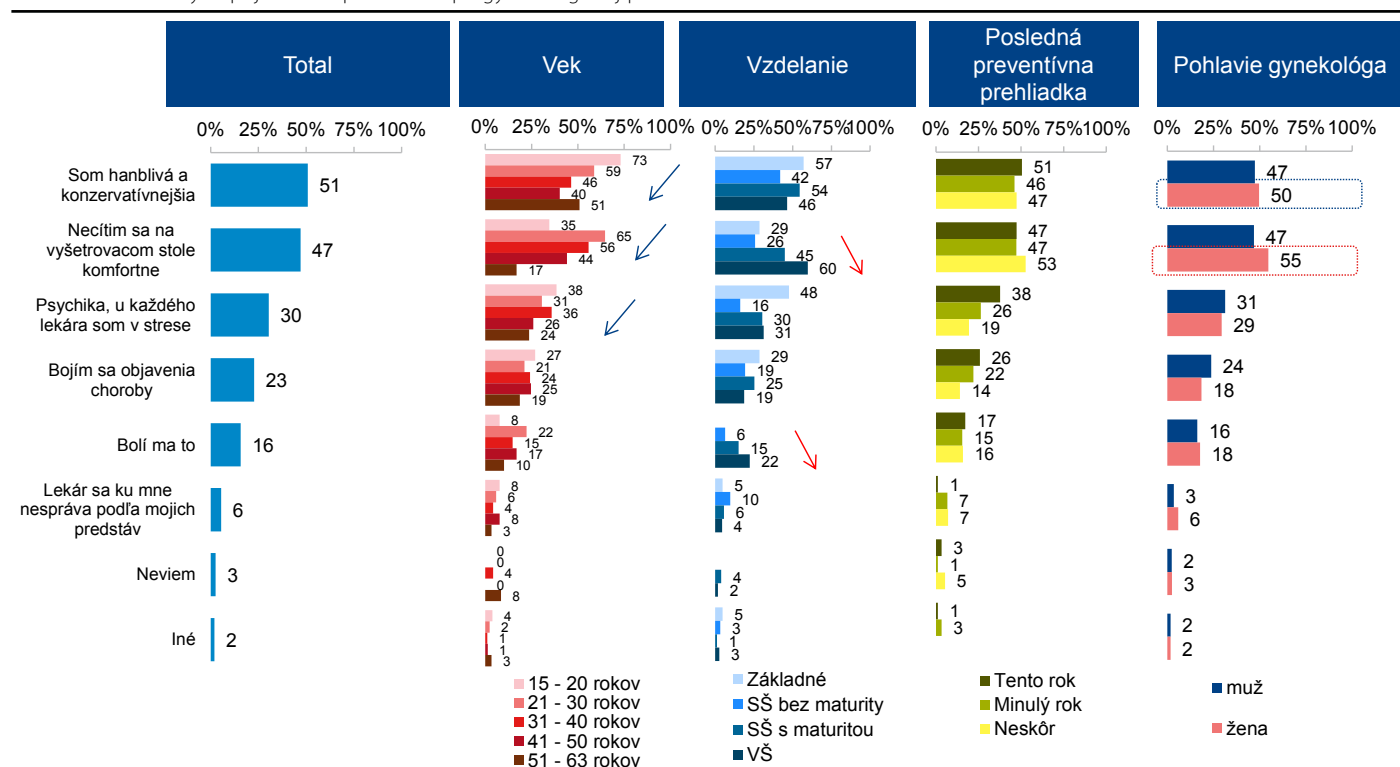
hodnotí neutrálne (obrázok 4). 75 % respondentiek deklaruje, že na preventívnu gynekologickú prehliadku chodí aspoň jedenkrát ročne. Ďalších 13 % opýtaných tvrdí, že preventívnu gynekologickú prehliadku absolvuje raz za dva roky. 75 % opýtaných si myslí, že odporúčaná frekvencia absolvo-

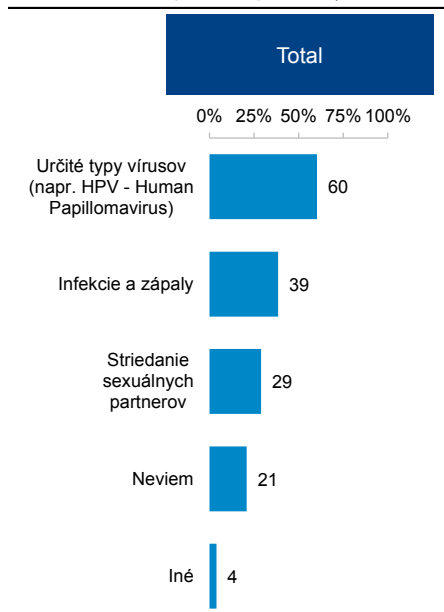
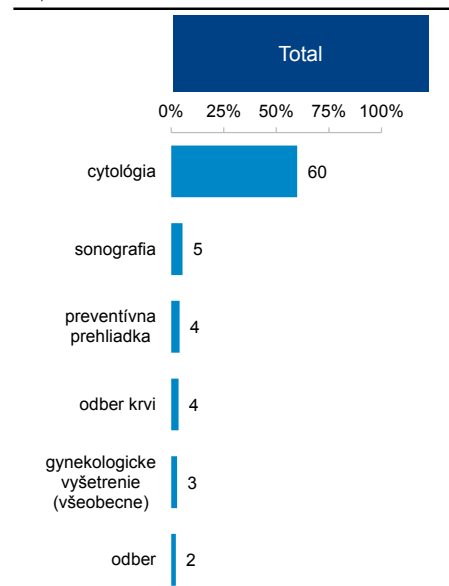
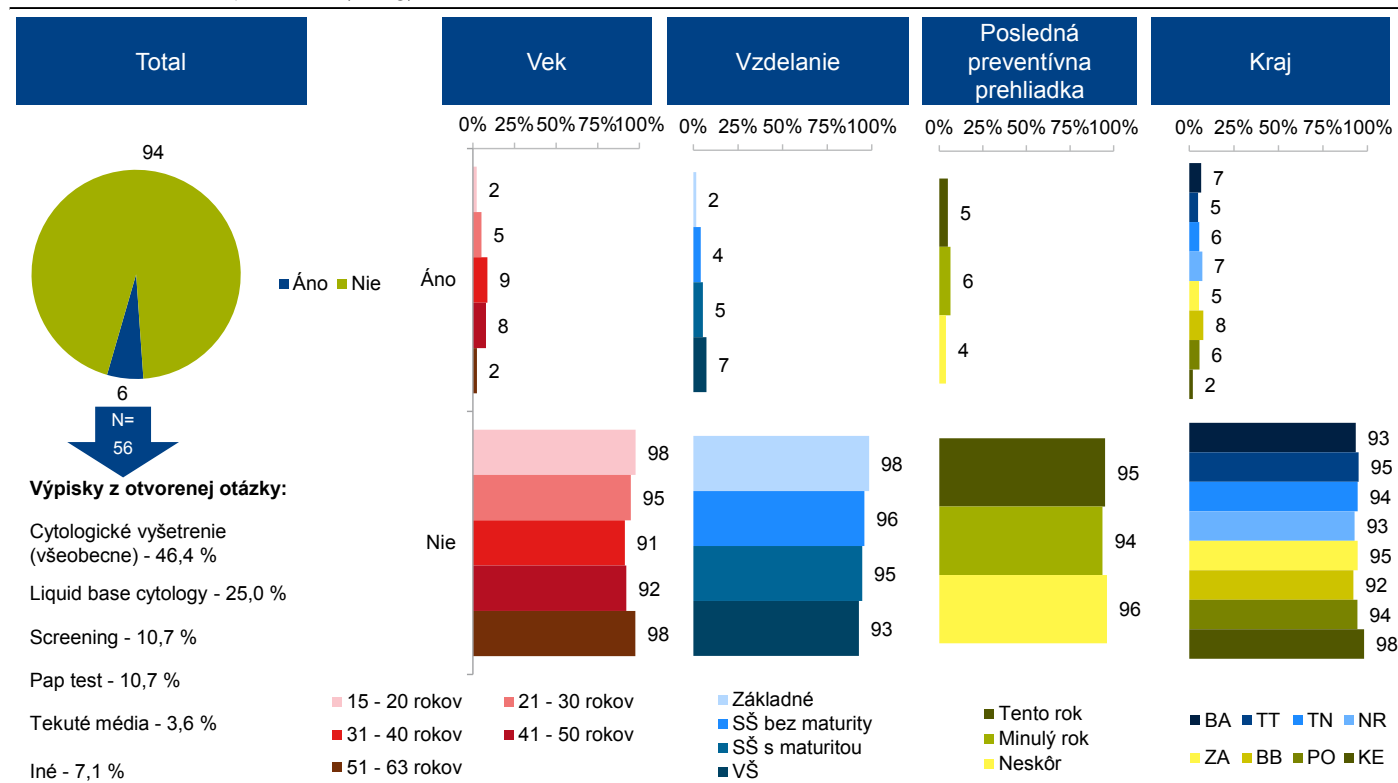
vania preventívnych prehliadok je raz ročne, až 21 %, že je to 2-krát ročne (obrázok 2). Najčastejším dôvodom vedúcim k absolvovaniu preventívnej gynekologickej prehliadky je starostlivosť o svoje zdravie (82 %) (obrázok 5). Najčastejšou bariérou tých žien, ktoré gynekológa nenavštevujú, je absencia potreby tam chodiť, pokiaľ nemajú zdravotné problémy (obrázok 4).

Respondentky navštevujú v 59 % gynekológa mužského pohlavia, 39 % opýtaných chodí k ženám. So stúpajúcim vzdelaním mierne stúpa preferencia lekárky oproti lekárovi.

Najdôležitejšie atribúty pri výbere gynekológa sú (obrázok 7):

- odbornosť, prax a skúsenosti
- citlivý prístup
- ochotná a zrozumiteľná komunikácia

Obrázok 6. Dôvody nepríjemného pocitu žien pri gynekologickej prehliadke

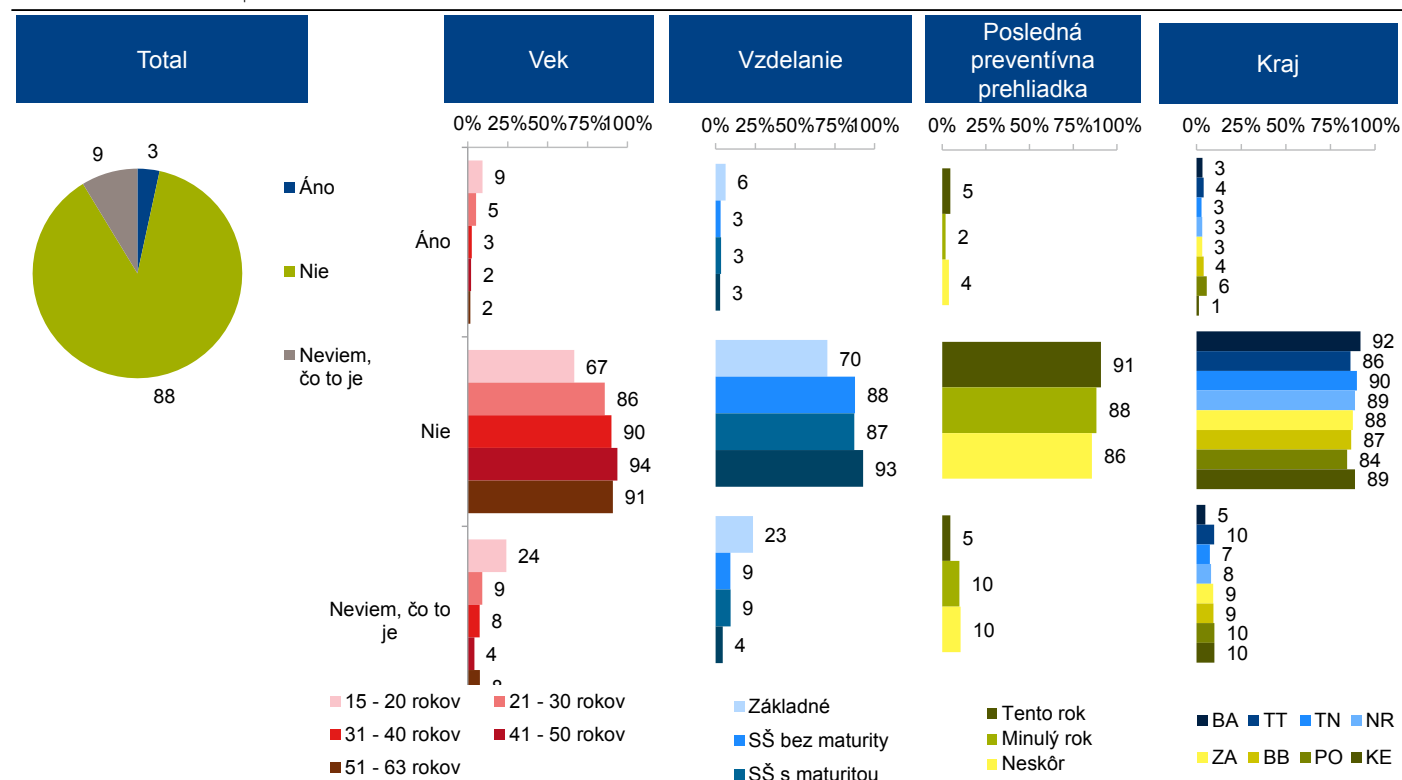
Obrázok 8. Zložky preventívnej gynekologickej prehliadky podľa názoru respondentiek**Obrázok 9.** Rizikové faktory pre vznik rakoviny krčka maternice z pohľadu pacientky**Obrázok 10.** Vyšetrenie určené na včasný záchyt možnej rakoviny krčka maternice – podľa respondentiek**Obrázok 11.** Znalosť Liquid-Based Cytology

U svojho súčasného lekára sú respondentky v spomínaných atribútoch spokojné na 90 %. Celkovo sú najspokojnejšie pacientky z najvyššej vekovej skupiny. Pri hodnotení prístupu počas poslednej preventívnej prehliadky sa vekové skupiny od seba líšia len v hodnotení ústretovosti lekára. Čím nedávnejšie sa preventívna prehliadka uskutočnila, tým pozitívnejšie bola hodnotená.

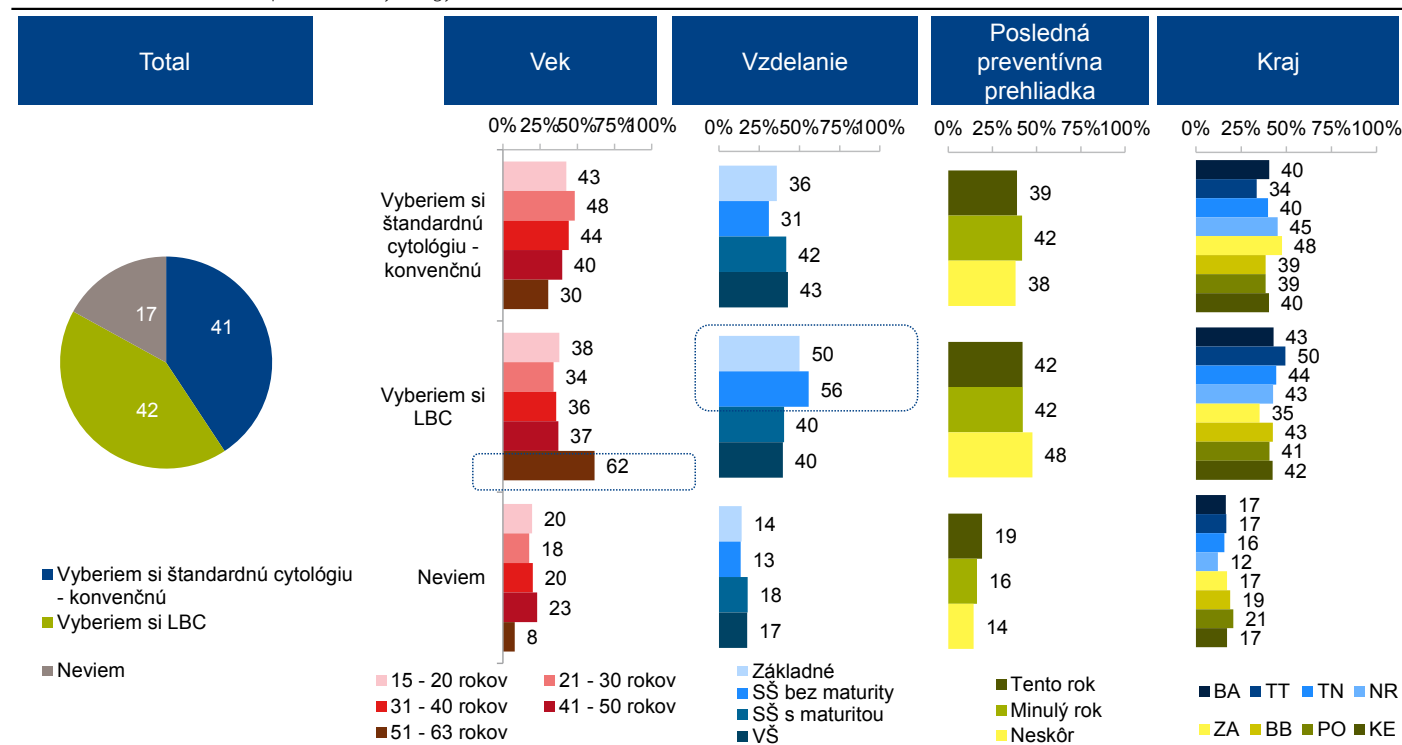
Pri hodnotení úrovne informovanosti v oblasti možností prevencie a spôsobov diagnostiky rakoviny krčka maternice oslovené ženy v 95 % menovali

ako dôvod absolvovania preventívnych gynekologických prehliadok včasné záchytenie skrytých gynekologických ochorení (obrázok 3). Za súčasť preventívnej gynekologickej prehliadky označili respondentky odber buniek z krčka maternice na cytologické vyšetrenie v 79 % (obrázok 8). Znalosť odberu na cytologické vyšetrenie ako súčasť preventívnej gynekologickej prehliadky je výrazne vyššia vo vekovej skupine 31- až 50-ročných. Táto znalosť stúpa so zvyšujúcim sa vzdelaním. 60 % opýtaných spontánne menovalo cytológiu ako

Obrázok 12. Očkovanie proti HPV – stav



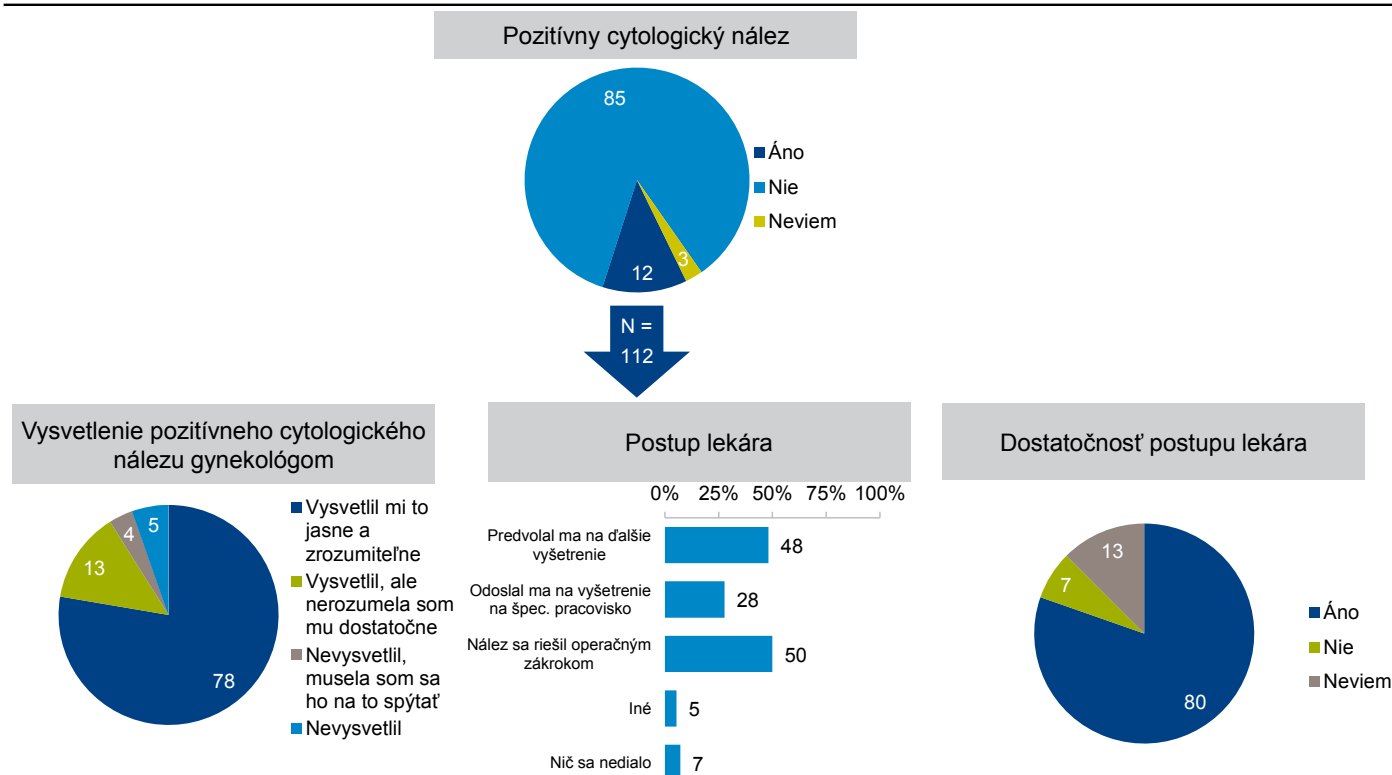
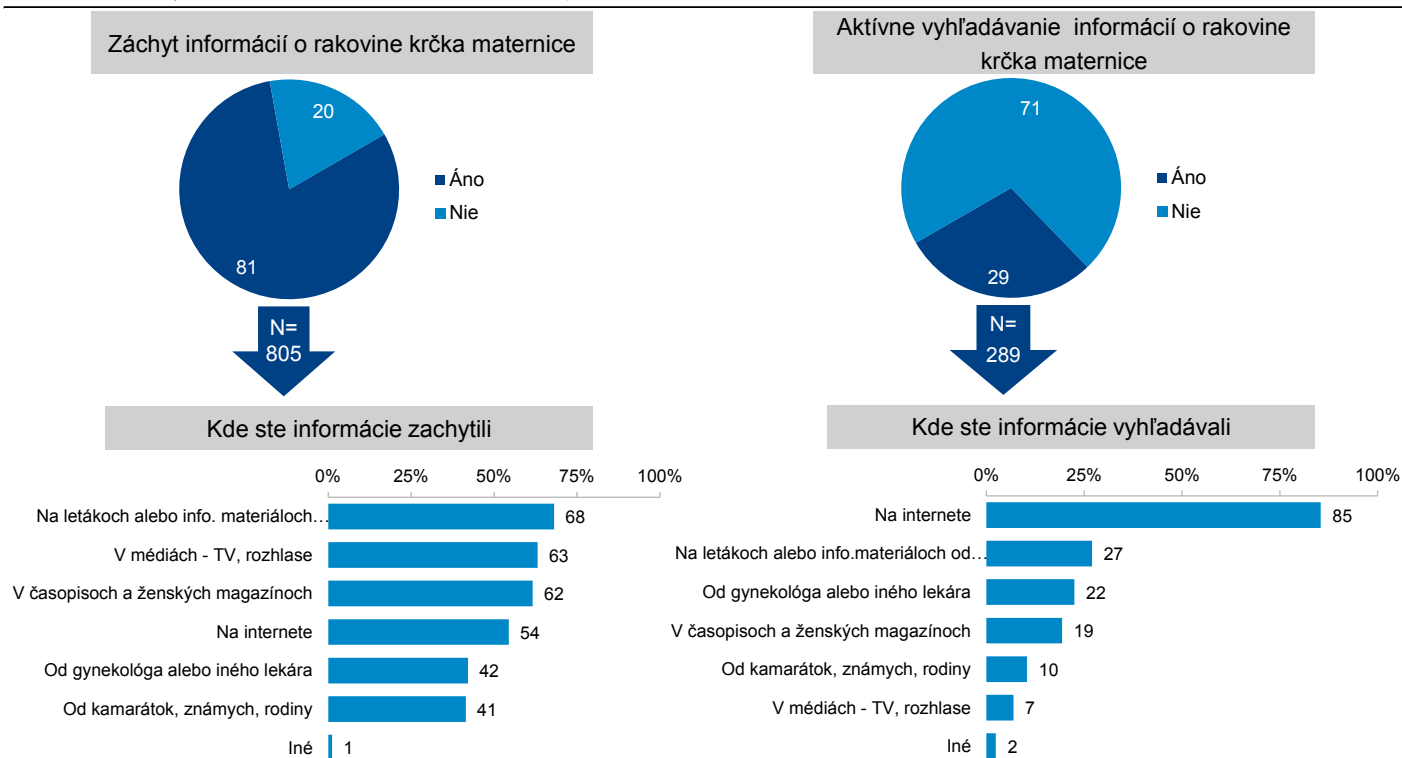
Obrázok 13. Preferencia Liquid-Based Cytology



vyšetrenie určené na včasný záchyt možnej rakoviny krčka maternice. Podoporenú ju menovalo 89 % (obrázok 10), 1,5 % opýtaných spontánne pozná LBC (liquid based cytology), 42 % by ju preferovalo (obrázok 11, 13). Určité typy vírusov, ako napríklad HPV, menovalo 60 % žien ako rizikový faktor vzniku rakoviny krčka ma-

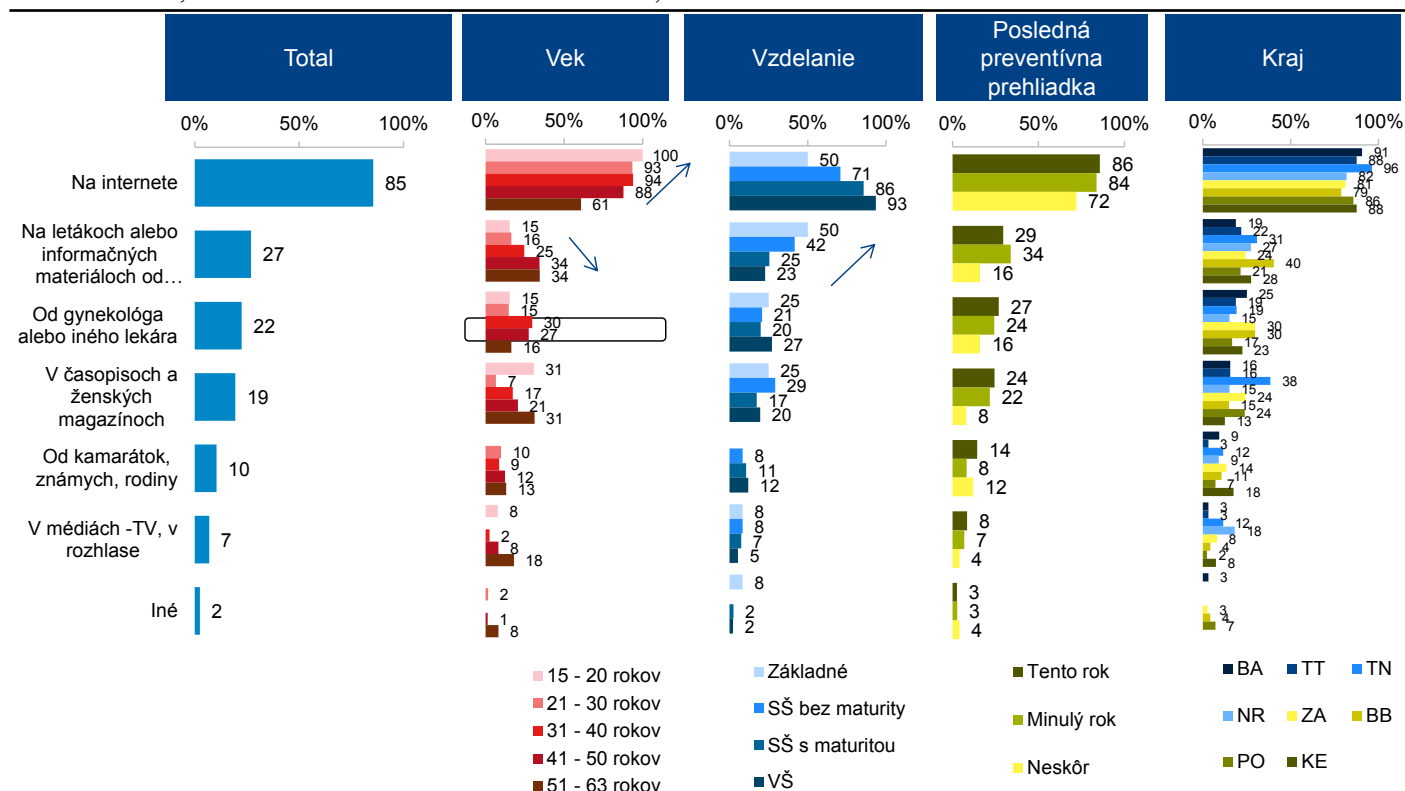
ternice (obrázok 9). Skúsenosti s očkovaním proti HPV dokumentuje obrázok 12. Skúsenosti s pozitívnym nálezom na krčku maternice má 12 % žien (obrázok 14).

Pri hodnotení spôsobu záchytu a vyhľadávania informácií o rakovine krčka maternice 81 % oslovených žien zachytilo informáciu o rakovine krčka

Obrázok 14. Vlastná skúsenosť s pozitívnym cytologickým nálezom**Obrázok 15.** Zdroje informácií o rakovine krčka maternice – pasívne

maternice. Najčastejšie to bolo na letákoch, v médiách a v časopisoch. Záchyt informácií stúpa vekom, vzdelaním a príjmom respondentiek (obrázok 15). Aktívne si tieto informácie vyhľadalo 71 % respondentiek. Vyhľadávali ich na internete, letákoch od svojho gynekológa alebo iného

lekára. Výrazne viac žien si aktívne vyhľadávalo informácie, pokiaľ už mali skúsenosť s pozitívnym cytologickým nálezom. Za najdôveryhodnejšie respondentky pokladajú informácie od svojho gynekológa (88 %) a letáky alebo informačné materiály od lekára alebo z lekárne (obrázok 16).

Obrázok 16. Zdroje informácií o rakovine krčka maternice – aktívne vyhľadávané**Záver pre prax**

Povedomie žien na Slovensku o odporúčanej frekvencii absolvovania preventívnej gynekologickej prehliadky je na úrovni 75 % a rovnaké percento udáva, že aspoň raz ročne tento typ prehliadky absolvuje, čo je v príkrom rozpore so skutočným počtom žien, ktoré naozaj preventívnu gynekologickú prehliadku absolvujú (20 – 30 %). Potenciál na zvýšenie počtu žien, ktoré absolvujú preventívne gynekologické prehliadky, je vzhľadom na ich informovanosť naozaj vysoká. Ako zmysluplné sa javí apelovať na vôľu žien starať sa o svoje zdravie aj v období, keď práve nemajú žiadne zdravotné problémy. Pozitívna emócia („za niečo“) sa zdá silnejším motivátorom na absolvovanie preventívnych prehliadok ako negatívne pocity, ako je strach z rakoviny, či iného ochorenia, alebo pocit povinnosti.

Keďže znalosť odberu na cytologické vyšetrenie ako súčasti gynekologickej prehliadky je výrazne vyššia vo vekovej skupine 31- až 50-ročných (a rastie so zvyšujúcim sa vzdelaním), bolo by potrebné posilniť úroveň informovanosti zvyšných vekových skupín žien.

Na zvýšenie informovanosti sa javia letáky od lekára alebo z lekárne ako najvhodnejšie, pretože sa umiestnili ako prvý spontánne menovaný zdroj a po rozhovore s lekárom aj ako najdôveryhodnejší. Vhodnou komunikačnou cestou je aj internet, keďže je pri aktívnom vyhľadávaní

informácií pre respondentky najvýznamnejší a svojou intimitou umožňuje informovať o detailnom priebehu gynekologickej prehliadky, čo je dôležité najmä pre najnižšie vekové skupiny. Internet je aj dôležitým zdrojom informácií o význame preventívnych gynekologických prehliadok a zmysle záchytu rakoviny krčka maternice a možnostiach klasickej a LBC. Vhodnou platformou na najjednoduchšie komunikačné kampane sa ukazujú časopisy a ženské magazíny.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.

I. gynekologicko-pôrodná klinika LF UK a UNB
Antolská 11, 851 07 Bratislava



SIEMENS

Testujte lepšie. Pracujte rýchlejšie

Zlepšite klinické testy a pracovné procesy pomocou systémov Siemens.

www.siemens.sk/diagnostics

Klinická diagnostika nie je iba veda. Inými slovami úspešnosť laboratória závisí nielen od výsledkov testov, ale aj od pracovných postupov a ich organizácie. Siemens Healthcare Diagnostics vám vie pomôcť s oboma. Naše efektívne riešenia kombinujú široké portfólio testov, ktoré chcete, a špičkovú technológiu, ktorú pri testovaní potrebujete. Dodávame nielen testy pre klinickú diagnostiku, ale tiež know-how pre rozvoj a inovatívne

riešenia. Navyše ponúkame vzdelávanie, servis a podporu, aby ste svoje možnosti využili na maximum. Môžete tak svojim pacientom poskytnúť starostlivosť najvyššej kvality.

Viac informácií, ako vám spolupráca so spoločnosťou Siemens môže pomôcť, nájdete na stránke www.siemens.com/test-smarter.

Answers for life.

Všetko pre Vaše laboratórium....

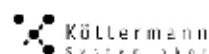
ponúkame:

- laboratórne sklo,
- nábytok,
- prístroje a zariadenia,
- chemikálie, štandardy a špeciálne reagenty,
- osobné ochranné prostriedky,
- spotrebný materiál (plasty),
- služby a riešenia pre Vaše nové laboratórium,
- riešenia pre optimalizáciu obnovy Vášho pôvodného laboratória,

**VWR International, spoľahlivý partner
pre Vaše laboratórium...**



eppendorf
In touch with life



kvalitný odberový systém = kvalitná vzorka = spoľahlivý výsledok

1949



2015



Distribútor na Slovensku: PULImedical, spol. s r.o., Nádražná 34, 900 28 Ivanka pri Dunaji

PULImedical

tel. 02/4594 4920-22

www.pulimedical.sk

BiOG
MEDICÍNSKA TECHNIKA

Spoločnosť Bio G, spol. s r.o., poskytuje od roku 1995 vysokokvalifikované obchodné a servisné služby najmä v oblasti laboratórnej medicíny, podporené kompletným odborným poradenstvom. Svoje obchodné aktivity spoločnosť Bio G, spol. s r.o., doplnila o ponuku diagnostických testov a prístrojov pre ambulantných detských lekárov rôznych špecializácií, všeobecných a odborných lekárov. Z našej ponuky Vám radi dodáme:

- Glukomer
testovanie kapilárnej glykémie (odber z prsta)



- Močové prúžky a prístroj na ich vyhodnotenie.
Chemické stanovenie glukózy, bilirubínu, urobilinogénu, ketónov, proteínov, erytrocytov, leukocyto, pH, dusitanov, špecifickej hmotnosti a kyseliny askorbovej v moči.



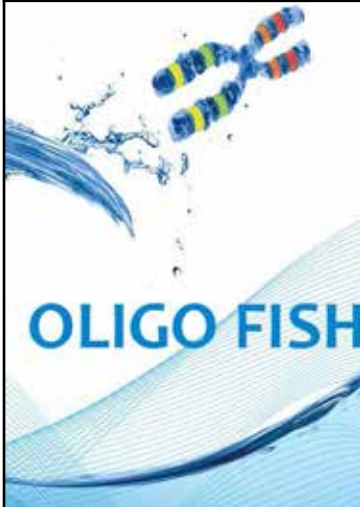
- Multifunkčný prístroj na vyšetrenie CRP a INR z kapilárnej krvi a na kvantitatívne stanovenie hemoglobínu v stolici



- Prístroj na vyšetrenie hemoglobínu a hematokritu z kapilárnej krvi



FISH technológie novej generácie

VYSOKÁ ŠPECIFICITA - SureFISH próby	PRISPÔSOBENIE VLASTNÝM POŽIADAVKÁM - SureDesign aplikácia	RÝCHLY A KVALITNÝ PROTOKOL - 4 hod. hybridizácia	PLNÁ AUTOMATIZÁCIA IHC + ISH
			



Hermes LabSystems Ltd., Púchovská 12, 83106 Bratislava, Slovakia
mail@hermeslab.sk tel.: +421 2 4920 6938 www.hermeslab.sk



Nábytkové stolárstvo TOMKO

Račianska 190, Bratislava

„Spomienka na zlú kvalitu trvá dlhšie, ako krátka radosť z nízkej ceny.“

Tel.: 02/44 88 40 36



www.nabytkovestolarstvo.sk

Naša spoločnosť sa od roku 1989 venuje výrobe interiérového nábytku na mieru z laminovaných alebo dýhovaných dosiek. Sme spoľahlivým partnerom pri výrobe nábytku pre kancelárie, obchody, reštaurácie, business centrá, súkromných klientov alebo špecializované zariadenia. Krédom nášho fungovania je vysoká kvalita prevedenia a seriózny prístup, vďaka ktorým sa nám darí budovať dlhodobé partnerstvá. Postaráme sa o Vás od architektonického návrhu, cez výrobu, dodávku a montáž až po servis a poradenstvo.

ECOLAB HEALTHCARE

Profesionálny prístup k prevencii infekcií

- Najvýznamnejšia svetová spoločnosť v oblasti profesionálnej hygieny s viac ako 45 000 zamestnancami
- Odborné poradenstvo ako bonus pre klienta
- Široké spektrum účinných látok k prevencii či riešeniu každej nozokomiálnej situácie

Nástroje

Riešenia čistenia a dezinfekcie všetkých typov nástrojov pre manuálne a strojové použitie



Plochy

Riešenia pre čistenie a dezinfekciu kritických plôch a povrchov



Ruky a pokožka

Riešenia umývania a dezinfekcie rúk a pokožky



Známa produktová rada: ♦ **Sekusept** ♦ **Skinman** ♦ **Incidin** ♦ **Incidur**

Tovar priamo od výrobcu alebo prostredníctvom distribútorov:

► **Betrix** ► **Unipharma** ► **Medart**

prípadne odporučíme najbližšieho lokálneho distribútora



ECOLAB s.r.o., Čajakova 18, 811 05 Bratislava
tel.: 00421 2 5720 49 16, fax: 00421 2 5720 49 28
e-mail: info.sk@ecolab.com, www.sk.ecolab.eu

EUROLAB LAMBDA

Váš spoľahlivý partner v ambulantnej diagnostike

NycoCard READER II

celosvetovo najpoužívanejší CRP prístroj

- záruka 10 rokov
- bezkonkurenčná cena



NycoCard::: **READER II**



NOVINKA



HemoCue® WBC Diff

ambulantný prístroj na stanovenie 5-populačného diferenciálu leukocytov z kapilárnej krvi

- malé rozmery
- nevyžaduje údržbu ani kalibráciu
- jednoduchý postup → odber vzorky → vloženie do prístroja → odčítanie výsledku
- celkový počet leukocytov (WBC) + diferenciálny počet
 - neutrofily • lymfocyty • monocyty
 - eozinofily • bazofily

SureScreen FOB



najpoužívanejší imunologický test

na stanovenie okultného krvácania na Slovensku

s optimálnou citlivosťou 50 ng/ml

0,85 EUR s DPH za kompletný test

(testovacia platnička + predplnená odberová nádoba + návod pre pacienta)

1,39 EUR s DPH za kompletný test

(testovacia platnička + predplnená odberová nádoba + návod pre pacienta + pomôcka na zachytenie stolice)

SureScreen FOB extra



+



MEDSERVIS

dodávateľ laboratórnej techniky



ISO 9001

LL-C (Certification)

VÁŠ PARTNER V RIEŠENÍ

- **Prípravy vzoriek – eppendorf**
- **Analytiky krvných obrazov – SYSMEX, MINDRAY, DIAGON**
- **Analytiky koagulačných testov – SYSMEX, DIAGON, ROCHE**
- **Digitálnej morfológie – Cella Vision, Vision Hema**
- **Testov osmolality – ADVANCED**
- **Agregometrie trombocytov – ROCHE**



HEMATOLOGY

MOVING FORWARD
IT'S IN OUR BLOOD



UniCel DxH 800
Cellular Analysis
System



UniCel DxH Slidemaker
Stainer Coulter Cellular
Analysis System



AutoMate 1200 Sample
Processing System



UniCel DxH 2401

WWW.BECKMANCOULTER.COM/HEMATOLOGY

LAB FORWARD

Kompletní nabídka laboratorní diagnostiky



• MOČOVÁ ANALÝZA

močové readery
testovací proužky PHAN®
kontrolní materiál



• KLINICKÁ BIOCHEMIE

biochemické analyzátory ERBA
diagnostické soupravy BIO-LA-TEST®
kontrolní a kalibrační materiály



• IMUNOLOGIE

EIA / IFA analyzátor MAGO 4
zpracování ELISA i IFA v jedné sérii
validace výsledků



• HEMATOLOGIE

analyzátory řady ELITE
5-populační diferenciál
ekonomický provoz



Výsledky, ktorým môžete veriť

Ako zaneprázdnený lekár sa spoliehate na presné a časovo dostupné výsledky, ktoré sú nutné k správnym rozhodnutiam pri diagnostike pacienta. Ako si môžete byť istý správnosťou výsledku? Randox je globálnym lídrom v poskytovaní riešenia Kontroly Laboratórnej Kvality. Všetky produkty a služby sú navrhnuté nielen pre vylepšenie laboratórnej správnosti, tiež pre úsporu času a nákladov.

Nezávislé kontroly **Acusera**, externá kontrola kvality **RIQAS** alebo **Acusera 24·7** medzilaboratórny manažment dát, kvalita a istota v správnosti sú ich podstatou.



ACUSERA 



ACUSERA 



RIQAS 

Randox s.r.o., Vilová 2, 851 01 Bratislava

☎ + 421 2 6381 3324

☎ + 421 2 6381 2482

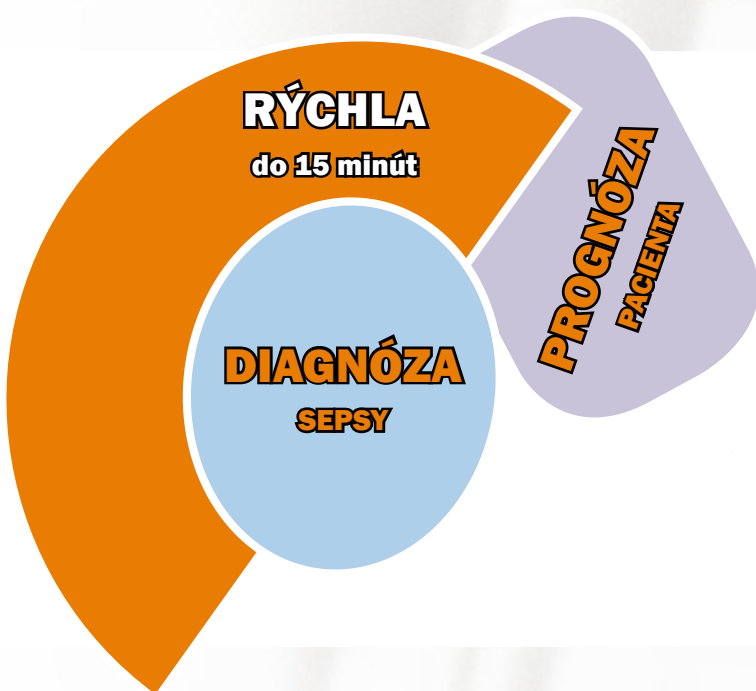
✉ acusera@randox.com

🌐 www.randoxqc.com

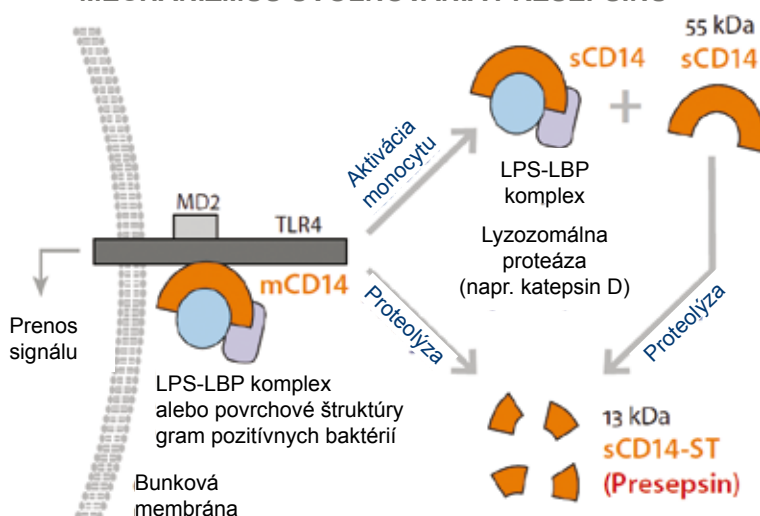


PRESEPSIN

NOVÝ MARKER SEPSY



MECHANIZMUS UVOĽŇOVANIA PRESEPSÍNU



CHCETE SA DOZVEDIEŤ VIAC?



www.medesa.cz

Tel.: 00420 602 263 748

Medesa

...dodávateľ laboratórnej techniky a služieb...

KLIENSKA ZÓNA

VŠETKO, ČO POTREBUJETE, V JEDNEJ DÁVKE



- osobné konto prispôbené na mieru
- dostupnosť informácií 24 / 7 dní v týždni
- online výsledky laboratórnych vyšetrení
- dôležité správy o legislatívnych usmerneniach v zdravotníctve
- okamžité informácie o novinkách a aktualitách
- jednoduchý spôsob registrácie na odborné podujatia
- možnosť zapojiť sa do vedeckých štúdií
- a mnoho ďalších výhod

XN-9000 DI



Nová generácia hematologickej linky



XN

XN RAD: ORIGINÁLNA TECHNOLOGIA ŠITÁ NA MIERU

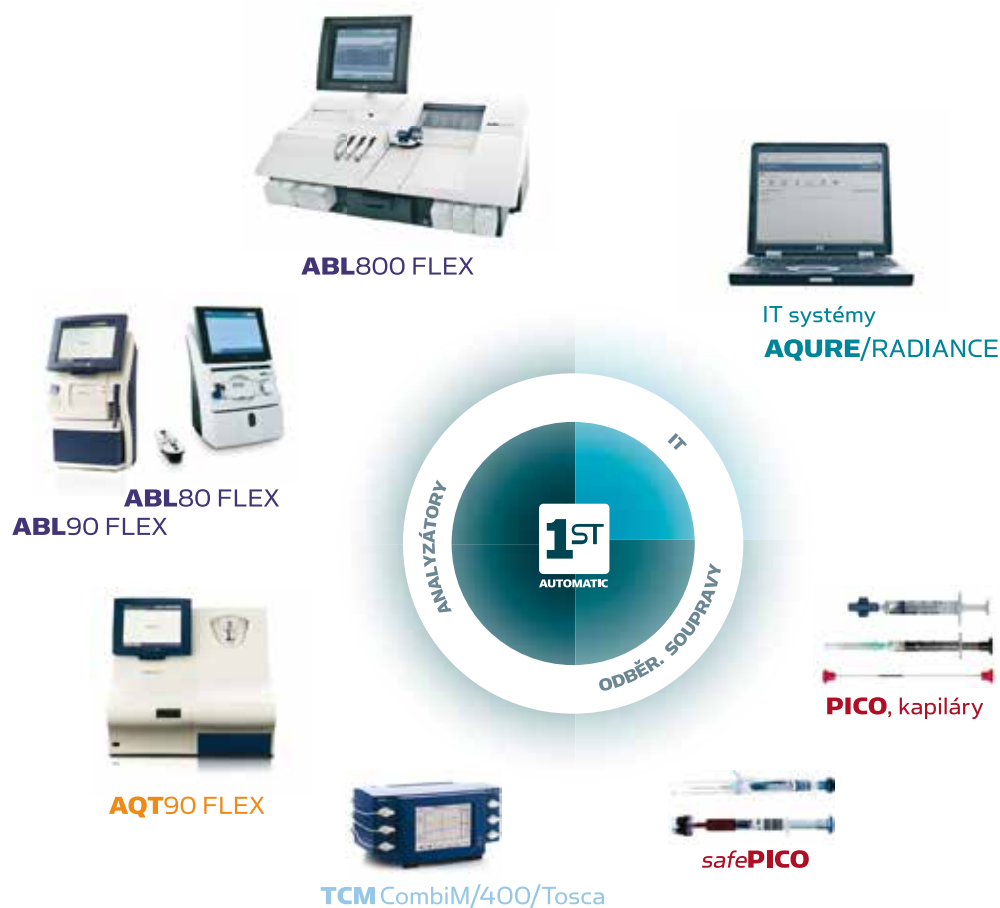
Sme presvedčení, že si Vaša práca zaslúži naše veľké uznanie. Zaslúži si technológiu, ktorá Vám prácu čo najviac spríjemní a zjednoduší. Preto sme starostlivo načúvali Vaším želaniam a vyvinuli sme nový hematologický analyzátor XN. Ďakujeme, že ste spolu s nami vytvorili nový XN rad.

„Budeme sa tešiť na Vaše ďalšie návrhy na zlepšenie, aby sme Vám aj naďalej mohli prinášať čo najlepšiu podporu pri Vašej práci.“

GIVING EVERYTHING. EVERY DAY.

Sysmex Slovakia s.r.o., Trenčianska 47, 821 09 Bratislava, Tel.: +421 2 6453 2881-2 · office@sysmex.sk · www.sysmex.sk

Komplexné riešenie pre akútnu diagnostiku v režime POCT pre klinické oddelenia a laboratóriá



ABL

pH	cCl ⁻	cGlu	ctHb
cH ⁺	cCa ²⁺	cLac	sO ₂
pCO ₂	cK ⁺	cCrea	FO ₂ Hb
pO ₂	cNa ⁺	ctBil	FCOHb
			FMetHb
			FHHb
			FHbF

AQT

Troponin I, T
CK-MB
Myoglobin
NT-proBNP
CRP
βhCG
D-dimer
PCT NEW 2015

TCM

tcpO₂
tcpCO₂
SpO₂
Pulse rate

World Leader in Acute Care Testing

RADIOMETER s.r.o.

zastúpenie pre ČR a SR

Křenova 3, 162 00 Praha 6, Tel.: +420 220 400 300
Email: office@radiometer.cz, Web: www.radiometer.com

www.medirexgroupacademy.sk
www.laboratornadiagnostika.sk

