

Ročník XI.

newslab

časopis laboratórnej medicíny



2020

Identifikácia metabolických ciest v patogenéze diabetickej retinopatie s využitím exómových sekvenačných dát – pilotná štúdia

Identification of metabolic pathways in pathogenesis of diabetic retinopathy using exome sequencing – a pilot study

Protinádorové účinky vitamínu D

Anti-tumour effects of vitamin D

Molekulové metódy detekcie mutácií v kinázovej doméne fúzneho génu BCR-ABL1 u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou

Molecular detection methods of mutations in the kinase domain of fusion gene BCR-ABL1 in patients with chronic myelocyte leukemia

Kazuistika toxoplazmovej meningoencefalitídy s fatálnym koncom u HIV pacienta

The case report of toxoplasmic meningoencephalitis with fatal outcome in HIV patient

Karcinosarkómu podobný endometrioidný karcinóm: popis prípadu non-high-grade tumoru

Carcinosarcoma-like endometrioid carcinoma of the uterus: case report of rare non-high-grade tumor

newslab – recenzovaný časopis laboratórnej medicíny ponúka autorom priestor na uverejnenie výsledkov ich vedecko-výskumnej práce formou prehľadových článkov, pôvodných prác, noviniek v odbore alebo kazuistík.

newslab už jedenásť rokov prináša čitateľom najnovšie poznatky z oblasti vedy a výskumu. Jeho hlavnou cieľovou skupinou sú lekári, vedecko-výskumní pracovníci na univerzitách a laboratórni pracovníci. Je distribuovaný aj do všetkých dôležitých vedeckých knižníc.

Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

Všetky uverejnené príspevky autorov sú recenzované.

Vydavateľ: MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.
Redakcia: MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.
Periodicita: 2x ročne
Počet strán: 70 – 100
Náklad: 5 000 ks

Aktuálne vydanie nájdete na stránke www.newslab.sk.

V prípade záujmu o publikovanie nás kontaktujte na e-mailovej adrese: redakcia@newslab.sk.



Malý zvedavec v nás

Všimli ste si, že malé deti majú tendenciu každú hračku, ktorá sa nejako hýbe, má kolieska, pružinky či vo svojom vnútri skryté neviditeľné súčiastky, rozobrať na najmenšie kúsočky a snažia sa na „veľkú radosť svojich rodičov“ prísť na to, ako tá vecička vlastne funguje? Alebo keď ich pozornosť upúta nová hračka, všetkými prostriedkami, celou svojou silou a mocou sa snažia dostať ju do svojho dosahu a čím skôr preskúmať všetky jej detaily?

Prečo a ako to deti robia?

Deti sa nepýtajú, či sa to dá, nehľadajú dôvody, prečo to nejde, neodkladajú veci na ne-skôr. Idú vytrvalo za svojim, bez ohľadu na okolnosti, nič pre ne nie problém, každý cieľ je pre ne blízko, nájdu vždy spôsob ako ho dosiahnuť, nedajú sa ničím odradiť. Každé malé dieťa vie, čo je to nadšenie, odhodlanie, vytrvalosť, schopnosť prekonať prekážky. Neutíchajúca zvedavosť a túžba odhaliť, ako veci fungujú, poháňa ich rúčky a nôžky, mobilizuje malého človečička k akrobatickým kúskom, ktoré nás uvádzajú do úžas-u a musíme obdivovať, čo všetko ten malý zvedavec dokáže. Je zaujímavé, že tieto vlastnosti majú skoro všetky deti. Vedia, ako dosiahnuť svoje.

Ako je to však s nami dospelými?

Zvedavosť a túžba odhaliť, ako veci fungujú, je hybným motorom, hlboko zakódovaným v ľudskej DNA, čo ľudí poháňa vpred, núti nás klásť si nové otázky a hľadať správne odpovede.

Občas si však pri pohľade na bežný pracovný ruch musím klásť otázku: Kam sa podel ten malý zvedavec v nás? Ten, ktorý nadšene skúma svet okolo seba, rozumie mu, oduševnene bojuje za svoje myšlienky, nedá sa ničím odradiť a prekoná všetky prekážky? Počúvame ešte jeho hlas, ktorý nám každé ráno vraví: Dokážeš to, zvládneš to?

Žijeme v rýchlej a komplikovanej dobe. Každý deň sa na nás valí prúd informácií. Hovorí sa, že sú najcennejšou komoditou. Zrejme na tom niečo pravdy bude, no nemôžem sa ubrániť úsmevu, ak si uvedomím, že sú to len jednotky a nuly, čo nás niekedy tešia a niekedy život neočakávane komplikujú.

V takej chvíli sa skúsme myslou vrátiť do detstva a uverme tomu, v čo verí každé malé dieťa: s malým zvedavcom v nás to spoločne zvládneme!

P. S.: Som si istý, že ak čítate NewsLab, určite aj vy patríte k tým dospelým, v ktorých kúsok toho malého zvedavca z detstva zostal. Keď sa vám zajtra ráno prihovorí, pozdravujte ho odo mňa!



MVDr. Juraj Kulčár, MBA

Pôvodné práce

- Identifikácia metabolických ciest v patogenéze diabetickej retinopatie s využitím exómových sekvenčných dát – pilotná štúdia** 5
Andrej Ficek, Andrea Šoltýsová, Ľudevít Kádaši
- Epidemiologické charakteristiky pacientov s diabetom mellitom a diabeticou retinopatiou na Slovensku: výsledky zo štúdie DIARET SK** 9
Marta Ondrejková, Monika Gajdošová, Iveta Tvrdá, Jana Fabková, zastupujúci tím štúdie DIARET SK
- Prevalencia diabetickej retinopatie na Slovensku: výsledky zo štúdie DIARET SK** 14
Marta Ondrejková, Monika Gajdošová, Iveta Tvrdá, Jana Fabková, zastupujúci tím štúdie DIARET SK

Prehľadové práce

- Využitie proteomiky pri diagnostike a monitoringu ochorení** 20
Veronika Lukáčová
- Nové prístupy k diagnostike lyzozómových ochorení na báze stanovenia voľných oligosacharidov v moči** 24
Marek Nemčovič, Zuzana Pakanová, Anna Šalingová, Claudia Šebová, Mária Ostrožlíková, Ján Mucha
- Laboratórna diagnostika karcinoidov** 27
Zuzana Cingelová
- Protinádorové účinky vitamínu D** 33
Beáta Bolerázska, Tomáš Koky
- Molekulové metódy detekcie mutácií v kinázovej doméne fúzneho génu BCR-ABL1 u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou** 37
Michaela Bezečná, Ľubica Majerová, Renata Lukačková

- Potenciálna terapia pre alkaptonúriu – príbeh spolupráce vedy, kliniky a pacientov** 41
Andrea Zaťková, Helena Glasová, Richard Imrich

Kazuistiky

- Kazuistika toxoplazmovej meningoencefalitídy s fatálnym koncom u HIV pacienta** 47
Vojtech Boldiš, František Ondriska, Ľubor Kováč, Miroslav Ondriska, Marcela Bastlová, Jakub Steinhübel, Kamila Bírová
- Diferenciálna diagnostika ložísk v mozgu – možná komplikácia infekčnej endokarditídy?** 51
Lucia Bednárová, Miriama Babel'ová, Barbora Slabá, Ivan Vojtech, Zuzana Čarnická, Ivan Vulev
- Carcinosarcoma-like endometrioid carcinoma of the uterus: case report of rare non-high-grade tumor** 55
Michal Zámečník, Jozef Kuruc, Michal Gaman, Branislav Bystrický
- Ileus pri farmakoterapii chronickej hnačky** 61
Samuel Horák, Pavol Janega
- Homogénne sa farbiace oblasti u pacientov s leukémiou (kazuistiky)** 63
Andrea Blahová, Alexandra Oravcová, Kristína Lengyelová, Alena Žákovičová, Kristína Horváthová, Lucia Žideková, Renata Lukačková

Uspeli sme v zahraničí

- Európska cytogenomická konferencia v Salzburgu – prezentácia posteru** 69
12th European Cytogenomics Conference 2019 (Salzburg, Austria, July 6. – 9. 2019)
Alexandra Oravcová

Ročník 11, 2020, číslo 1
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: marec 2020

Redakčná rada:

Šéfredaktorka:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Členovia:

Dr. Domenico Pangallo, DrSc.
Dr. Boris Klempa, DrSc.
RNDr. Martin Radina
Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.
Prof. Ján Turňa, CSc.
Ing. Pavol Sulo, CSc.
Dr. Bálint Nagy, PhD.
MUDr. Peter Bohuš
MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.
MUDr. Ján Lazúr
Mgr. Peter Baráth, PhD.
RNDr. Ján Radvánszky, PhD.
RNDr. Renata Lukačková
MUDr. Emília Miková
doc. MUDr. Silvia Toporcerová, PhD., MBA

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.
Jána Bottu 2, 917 01 Trnava
redakcia@newslab.sk, www.newslab.sk
IČO: 37 98 68 05

Výkonné redaktorky:

Mgr. Slavomíra Šindelářová
Mgr. Mária Žeglenová, PhD.

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Lucia Vecseiová

Všetky články sú plne recenzované.

Registrácia MK SR pod číslom EV 5164/15

ISSN 1338-9661 (tlačené vydanie)

ISSN 2454-0021 (online)

Časopis je indexovaný v Bibliographia medica Slovaca (BMS).

Citácie sú spracované v CiBaMed.

Citacia skratka: Newslab

Na informačné a nekomerčné účely je dovolené články v publikácii newslab voľne a bezplatne sťahovať, kopírovať, distribuovať, tlačiť, prehľadávať a odkazovať na ne. Je však potrebné, ak je to podľa spôsobu použitia možné, uvádzať ich autora a zdroj. Použitie článkov na iné účely a iným spôsobom je možné len so súhlasom vydavateľa.

Vydavateľ nenesie zodpovednosť za údaje a názory autorov jednotlivých článkov či inzerátov.

Identifikácia metabolických ciest v patogenéze diabetickej retinopatie s využitím exómových sekvenačných dát – pilotná štúdia

Andrej Ficek, Andrea Šoltýsová, Ľudevít Kádaši

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Katedra molekulárnej biológie

Diabetická retinopatia je jednou z najčastejších mikrovaskulárnych komplikácií diabetu mellitu a patrí medzi najčastejšie príčiny straty zraku v rozvinutých krajinách. Hyperglykémia, hypertenzia či zvýšená hladina lipidov, ktoré patria medzi hlavné faktory, však predstavujú približne len 10 % rizika vzniku a rozvoja tohto ochorenia. Veľký význam so snahou odhaliť presný mechanizmus sa pripisuje genetickým faktorom. V tejto pilotnej štúdii sme analýzou zastúpenia DNA variantov získaných celoexómovou analýzou u pacientov s diabeticou retinopatiou a skupine diabetickej pacientov bez retinopatie identifikovali metabolické cesty, ktoré by mohli zohrávať úlohu v mechanizme vzniku tohto ochorenia. Medzi významné dráhy patrili dráhy podieľajúce sa na O-glykozylácii, viaceré metabolické dráhy bunkovej organizácie a komponentov či metabolizmus kolagénu, lipidov, plazmatického lipoproteínu, selénu a mnohé ďalšie. Analýza zastúpenia metabolických ciest kombinuje efekt slabých účinkov viacerých variantov a zvyšuje tak silu informácie prevažne v asociačných štúdiách s malým počtom vzoriek. **Kľúčové slová:** diabetická retinopatia, exómové sekvenovanie, analýza metabolických ciest

Identification of metabolic pathways in pathogenesis of diabetic retinopathy using exome sequencing – a pilot study

Diabetic retinopathy is one of the most common microvascular complications of diabetes mellitus and is a common cause of vision loss in western countries. Hyperglycaemia, hypertension and dyslipidaemia, which are among the main factors, however, represent only approximately 10% of total risk of development and disease progression. Various genetic variants are considered and tested intensively to unveil the exact pathophysiological mechanism. In this pilot study, we analysed the representation of DNA variants identified by exome sequencing in the group of patients with diabetic retinopathy and diabetic patients without retinopathy, to identify metabolic pathways that could play a role in the disease onset. Among the significant pathways those involved in O-glycosylation, metabolic pathways of cellular organization and components, metabolism of collagen, lipids, plasma lipoprotein, and selenium were most represented. Metabolic pathway analysis combines the weak effects of multiple variants and increases the power of information mainly in association studies conducted on a small number of samples.

Keywords: diabetic retinopathy, exome sequencing

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 5 – 8

Úvod

Diabetická retinopatia (DR) je jednou z najčastejších mikrovaskulárnych komplikácií DM a radí sa medzi najčastejšie príčiny straty zraku u ľudí stredného a vyššieho veku. Vznik a progresia diabetickej retinopatie sú spojené s predĺženým trvaním diabetu, hyperglykémiou, hypertenziou a so zvýšenou hladinou lipidov. Tieto faktory však predstavujú len 10 % rizika vzniku a rozvoja tohto ochorenia a predpokladá sa existencia ďalších faktorov, spomedzi ktorých sa najväčší význam pripisuje genetickým faktorom. Presný mechanizmus vzniku ochorenia nie je jasný, ale je známe, že do patogenézy diabetickej retinopatie je zapojených viacero biochemických dráh. Spomínané biochemické mechanizmy zahŕňajú napríklad polyolovú metabolickú dráhu, neenzymatickú glykáciu a tvorbu koncových produktov pokročilej glykácie, oxidačný stres, aktiváciu proteínkinázy C a mnohé iné⁽¹⁾.

Účasť genetických faktorov na vzniku DR je študovaná vo veľkej miere najmä analýzou variantov vybraných kandidátnych génov a v poslednom období čoraz častejšie celogenómovými asociačnými analýzami (GWAS), ktoré sa stali ústrednou metódou na štúdium genetickej zložitosti

komplexných ochorení, pričom umožnili identifikáciu mnohých asociovaných chromozómových oblastí⁽²⁾. Pri takýchto štúdiách je výrazne limitované mapovanie kauzálnych variantov s malou populačnou frekvenciou a malým účinkom, ktoré možno identifikovať iba pri analýzach veľkých skupín, často dosahujúcich niekoľko tisíc testovaných jedincov, čo výrazne zvyšuje laboratorné a finančné nároky takýchto štúdií. Ďalšou nevýhodou v konvenčnom prístupe GWAS analýz je využitie nekódujúcich, často medzigénových jednonukleotidových (SNP) polymorfizmov, pomocou ktorých väzba k samotným kauzálnym variantom nemusí byť vždy spoľahlivo odhalená. V posledných rokoch sa preto v asociačných štúdiách využívajú prístupy sekvenovania novej generácie, často so zameraním na exóm s možnosťou priamej identifikácie kauzálného variantu⁽³⁾. Napriek zapojeniu týchto pokročilých highthroughput postupov analýzy DNA zostáva spojitosť genetických faktorov s diabeticou retinopatiou stále otázná, pretože napriek mnohým štúdiám výsledky nie sú konzistentné, čo je spôsobené pravdepodobne najmä v dôsledku multifaktoriálnej povahy ochorenia, tiež však malého počtu vzoriek v jednotlivých štúdiách a ťažkostí pri kontrole kovariátov

tejto choroby⁽³⁾. Identifikácia kauzálnych variantov je v prípade väčšiny multifaktoriálnych ochorení navyše komplikovaná najmä z dôvodu existencie a účasti variantov tzv. malého účinku, ktorých jednotlivá identifikácia je ťažká a na ich odhalenie je často potrebná analýza ich vzájomných vzťahov. Z tohto dôvodu je jedným z prístupov na objasnenie molekulárnej patogenézy využitie súčasnej analýzy variantov vzhľadom na ich príslušnosť k rovnakým metabolickým cestám. Analýza metabolických ciest kombinuje efekt viacerých variantov malého účinku, a tým zvyšuje silu štúdie⁽⁴⁾. Takýto prístup môže upriamiť analýzu na metabolickú cestu, v ktorej sú následne sledované aj iné zriedkavé varianty, ktoré nemuseli byť nutne zachytené v primárnej asociačnej štúdií. Zároveň tento typ analýzy odhaľuje možnú spojitosť skupiny variantov s fenotypom, a teda pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré je nevyhnutné na identifikáciu biomarkerov na diagnostiku a liečbu.

V tejto pilotnej štúdií sme sa na základe analýzy variantov získaných exómovým sekvenovaním pacientov s diabetickou retinopatiou a kontrol spočívajúcich z pacientov s DM bez diabetickej retinopatie zamerali na identifikáciu možných kandidátnych metabolických ciest pre ďalšie štúdium tohto komplexného ochorenia.

Experimentálna časť

Materiál a metodika

Všetky genomické analýzy boli uskutočnené na DNA vzorkách periférnej krvi pacientov izolovaných štandardnými automatizovanými postupmi (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit, MagNA Pure LC 2.0 Instrument, Roche, Švajčiarsko) získanými v rámci riešenia projektu.

Príprava knižníc pre exómové sekvenovanie bola uskutočnená pomocou Nextera Rapid Capture Exome kitu (Illumina) s veľkosťou cieľovej sekvencie 37 Mb podľa odporúčaní výrobcu. Jednotlivé kroky prípravy aj kvalita pripravenej knižnice boli overené využitím kapilárnej elektroforézy systémom Agilent 2100 Bioanalyzer s použitím Agilent High Sensitivity DNA Kitu (Agilent, USA). Pripravené knižnice boli analyzované systémom NextSeq 500 Illumina s využitím NextSeq 500 High Output Kitu. Analyzované dáta boli bioinformaticky spracované pomocou web-based BaseSpace aplikácie (Illumina) a GALAXY servera⁽⁵⁾. Analýza variantov aj identifikácia variantov vykazujúcich signifikantne rozdielne alelové zastúpenie medzi skupinami pacientov boli uskutočnené pomocou Ingenuity variant analysis softvéru (Qiagen) využitím asociačného testu s bonferroniho korekciou. Analýza zastúpenia variantov v metabolických cestách bola vyhodnotená pomocou databázy ConsensusPathDB⁽⁶⁾.

Výsledky

Exómovou analýzou bolo skúmaných 24 nepríbuzných pacientov s diabetom mellitom 2. typu rozdelených do dvoch skupín podľa prítomnosti diabetickej retinopatie. 12 pacientov vo veku 40 až 65 rokov (priemer 52,5 roka) trpelo diabetom kratšie ako 6 rokov, pričom u nich boli diagnostikované príznaky neproliferatívnej formy diabetickej retinopatie s prítomnosťou mikroaneuriziem, hemorágií a mäkkých exudátov. Zvyšných 12 pacientov vo veku 48 až 84 rokov (priemer 65 rokov) predstavovali pacienti s diabetom

mellitom pretrvávajúcim viac ako 17 rokov, avšak bez nálezu diabetickej retinopatie. V rámci uskutočnenej exómovej analýzy s priemernou hĺbkou čítania cieľových sekvencií 150x bolo u pacientov identifikovaných celkovo viac ako 120 000 variantov s minimálnym pokrytím 20 čítaní, z ktorých 2 034 variantov, lokalizovaných v 1 417 génoch, vykazovalo signifikantne rozdielne alelové zastúpenie medzi dvomi skupinami pacientov (s p-hodnotou $\leq 0,05$, obrázok 1). Samotná analýza príslušnosti identifikovaných génov k metabolickým cestám (over-representation analysis) pomocou integrovanej databázy ConsensusPathDB odhalila spolu 166 metabolických ciest, ktoré boli zastúpené signifikantným počtom identifikovaných génov. Identifikované metabolické cesty pochádzali z 11 databáz. Medzi metabolické dráhy, v ktorých sa v signifikantne zvýšenej miere vyskytovali gény obsahujúce nami identifikované varianty, patrili:

O viazaná glykozylácia ($p = 2,05e-05$), O-glykozylácia mucínov ($p = 9,84e-05$) a TSR proteínov ($p = 0,0411$) aj terminácia biosyntézy O-glykánov ($p = 2,57e-05$)

Bunková organizácia. Viaceré metabolické cesty zodpovedné za organizáciu extracelulárneho matrixu a interakciu receptorov ECM ($p = 2,31e-05$, 0,00027), interakcie integrínov a beta-1 integrínu bunkových povrchov ($p = 2,37e-05$, 8,28e-05) či interakcie laminínov ($p = 0,0154$)

Metabolizmus kolagénu, jeho biosyntézy ($p = 2,86e-05$) a formácie ($p = 9,47e-05$) aj trimerizácie reťazcov a degradácie ($p = 9,96e-05$, 0,00166)

Metabolizmus lipidov, zastúpený viacerými cestami ako mitochondriálna beta-oxidácia dlhých a stredne dlhých reťazcov ($p = 0,00287$, 0,00107), predĺženie reťazca mastných kyselín v mitochondrii ($p = 0,00821$) či syntéza eikozanoidov ($p = 0,00311$) a iné.

Metabolizmus plazmových lipoproteínov a ich klírensu ($p = 0,0123$, 0,00525)

Signálne dráhy ako dráha ovplyvňujúca hladinu cAMP cez G alfa podjednotky ($p = 0,00639$) či NOTCH1 ($p = 0,0143$) a NOTCH3 ($p = 0,0218$) signálne dráhy

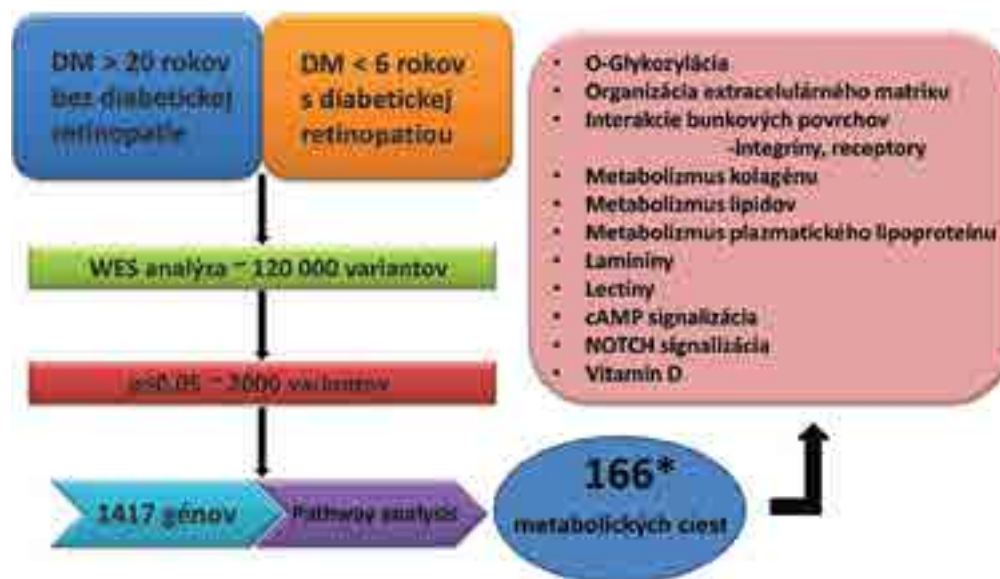
Metabolické cesty spájané so selénom a kyselinou selénovou ($p = 0,00109$) a metabolizmus zlúčenín obsahujúcich selén ($p = 0,0225$)

Spomedzi 2 034 variantov vykazujúcich signifikantne rozdielne zastúpenie medzi skupinami boli identifikované aj varianty v 32 génoch, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze retinálnych ochorení, napríklad CNGA1 (retinitis pigmentosa), ERCC6 (macular degeneration), NBAS (optic atrophy and retinal dystrophy), OPN1SW (tritanopia), POC5 (syndromic disease with retinitis pigmentosa), RP1L1, CDH3 (macular dystrophy) a iné.

Diskusia

Presný mechanizmus vzniku diabetickej retinopatie doposiaľ nie je napriek mnohým štúdiám celkom objasnený, je však známe, že do patogenézy je zapojených viacero biochemických dráh pre reguláciu hyperglykémie, hypertenzie, zápalu, hladiny lipidov a mnohé ďalšie. V tejto pilotnej štúdií sme analýzou dát exómoveho sekvenovania 24 pacientov identifikovali celkovo 166 kandidátnych metabolických ciest, z ktorých najviac zastúpenými boli cesty zapojené do O-glykozylácie, organizácie ECM, metabolizmu kolagénu,

Obrázok 1. Prehľad analýz a získaných výsledkov pilotnej štúdie zameranej na identifikáciu skupín metabolických ciest pre štúdium asociácie genetických markerov s diabetickou retinopatiou. *166 metabolických ciest bolo identifikovaných v 11 databázach (BioCarta, Inoh, Humancyc, Reactome, Kegg, Smpdb, EHMN, Netpath, Signalink, Pid a Wikipathways) pričom v niektorých prípadoch sa môžu identifikované metabolické cesty prekrývať.



selénu, lipidov a plazmových lipoproteínov. Za jeden z hlavných faktorov vzniku DR je považovaný pretrvávajúci, subklinický zápal, ktorý v dôsledku hyperglykémie, oxidačného stresu, nadmernej glykácie a hypertenzie vedie k zvýšenému tlaku retinálnej vaskulatury, neovaskularizácii, hemorágii a leukostáze, ktorá je významným javom DR⁽⁷⁻¹⁰⁾. Centrálnu úlohu zápalu v patogenéze DR potvrdzujú aj štúdie zamerané na podávanie protizápalových liekov, ktoré bránia progresii DR⁽¹¹⁾. Pretrvávajúca expresia proinflamačných cytokínov, chemokínov a aktivácia solubilných a bunkových adhézných molekúl koreluje s progresiou DR a prispieva k leukostáze zvyšovaním interakcie leukocytov s endoteliálnymi bunkami. K zvýšenej adhézii leukocytov prispievajú zmeny v uhlodíkových reťazcoch membrán leukocytov, pri ktorých v dôsledku zápalovej aktivácie N-acetylglukózamyltransferázy (C2GNT) dochádza k ich O-glykozylácii, ktorej zvýšená miera koreluje s progresiou a závažnosťou DR aj diabetickojej nefropatie⁽⁸⁾. Lokálny zápal spôsobuje tiež aktiváciu mikrogliálnych buniek, ktorá vedie k zvýšenej produkcii metaloproteináz (MMPs). Úlohu MMPs vo vzťahu k organizácii extracelulárneho matrixu a interakcii ECM receptorov analyzovali viaceré štúdie, pri ktorých bolo preukázané, že degradáciu komponentov ECM sa MMPs podieľajú na regulácii proliferácie, neovaskulogenézy a tkanivového remodelingu^(12,13). Varianty MMP-2 boli sledované aj vo vzťahu ku kolagénu IV, ktorého akumulácia spôsobujúca zväčšenie bazálnej mem-

brány kapilár je známym patologickým nálezom DR a diabetickojej nefropatie^(14,15). Úloha selénu bola skúmaná v súvislosti s reguláciou enzýmov zúčastňujúcich sa na ochrane proti oxidačnému stresu, pričom bolo ukázané, že suplementácia selénom pomáha zmierneniu tvorby mikrovaskulárnych lézií v retine a má protektívny efekt pred oxidačným stresom indukovaným glukózou^(16,17). Viaceré hypotézy vznikali ohľadne úlohy plazmových lipoproteínov. Kým pri zdravej retine lipoproteíny neprechádzajú krvno-retinálnou bariérou, v prípade diabetickojej retiny môže byť táto bariéra narušená, preto lipoproteíny môžu hrať nepriamu, ale dôležitú úlohu v modulácii následkov tohto porušenia⁽¹⁸⁾. Súvislosť DR a plazmových lipidov bola preukázaná vo viacerých štúdiách priamym meraním koncentrácie cholesterolu, LDL, HDL, LDL a HDL fosfolipidov, triglyceridov, a apolipoproteínov A a B, pričom bola pozorovaná zvýšená koncentrácia viacerých z nich práve u pacientov s DR^(19,20). V rámci tejto pilotnej štúdie boli identifikované viaceré metabolické cesty, ktoré môžu byť kandidátmi pre ďalšie štúdie, úloha jednotlivých génov a ich variantov však musí byť sledovaná analýzou väčšieho súboru pacientov.

Pod'akovanie: 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. Heng LZ, Comyn O, Peto T, et al. Diabetic retinopathy: Pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabetic Medicine* 2013; 30(6): 640-650.
2. Sharma A, Valle ML, Beveridge C, et al. Unraveling the role of genetics in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2019; 33(4): 534-541.

3. Han J, Lando L, Skowronska-Krawczyk D, et al. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 2019; 19(9): 67.
4. Kao PYP, Leung KH, Chan LWC, et al. Pathway analysis of complex diseases for GWAS, extending to consider rare variants, multi-omics and interactions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; 1861(2): 335-353

5. Afgan E, Baker D, Batut B, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(W1): W537-W544.
6. Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, et al. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D793-800.
7. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, et al. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews* 2007; 3(1): 3-14.
8. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Coppini D, et al. Activity of the glycosylating enzyme, core 2 GlcNAc (beta1,6) transferase, is higher in polymorphonuclear leukocytes from diabetic patients compared with age-matched control subjects: relevance to capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2000; 49(10): 1724-1730.
9. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007; 2007: 43603
10. Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, et al. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(11): 1631-40.
11. Kern TS, Miller CM, Du Y, et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes* 2007; 56(2): 373-379.
12. Mohammad G, Kowluru RA. Novel role of mitochondrial matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6): 3832-3841.
13. Yang J, Fan XH, Guan YQ, et al. MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2010; 3: 137-140.
14. Alcolado JC, Baroni MG, Li SR, Galton DJ. Genetic variation around the collagen IV 1a gene locus and proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Hum Hered* 1993; 43(2): 126-130.
15. Arkkila PE, Rönnemaa T, Koskinen PJ, et al. Biochemical markers of type III and I collagen: association with retinopathy and neuropathy in type 1 diabetic subjects. *Diabet Med* 2001; 18(10): 816-821.
16. González de Vega R, García M, Fernández-Sánchez ML, et al. Protective effect of selenium supplementation following oxidative stress mediated by glucose on retinal pigment epithelium. *Metallomics* 2018; 10(1): 83-92.
17. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001; 50(8): 1938-1942.
18. Yu JY, Lyons TJ. Modified Lipoproteins in Diabetic Retinopathy: A Local Action in the Retina. *J Clin Exp Ophthalmol* 2013; 4(6): pii: 314.
19. Sinav S, Onelge MA, Onelge S, et al. Plasma lipids and lipoproteins in retinopathy of type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Ann Ophthalmol* 1993; 25(2): 64-66.
20. Malaguarnera G, Gagliano C, Bucolo C, et al. Lipoprotein(a) serum levels in diabetic patients with retinopathy. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 943505.



Mgr. Andrej Ficek, PhD.

Prírodovedecká fakulta UK
Katedra molekulárnej biológie
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
e-mail: andrej.ficek@uniba.sk

Epidemiologické charakteristiky pacientov s diabetom mellitom a diabetickou retinopatiou na Slovensku: výsledky zo štúdie DIARET SK

Marta Ondřejková¹, Monika Gajdošová¹, Iveta Tvrďá², Jana Fabková², zastupujúci tím štúdie DIARET SK

¹Špecializovaná nemocnica v odbore oftalmológia, Zvolen

²Novartis Slovakia, s. r. o., Bratislava

Diabetická retinopatia (DR) je hlavnou príčinou slepoty u pacientov s diabetom mellitom (DM). DIARET SK je prvá epidemiologická a multicentrická štúdia na Slovensku, ktorej cieľom bolo vyhodnotiť epidemiologické charakteristiky u slovenských pacientov s DM 1. a 2. typu a DR. Epidemiologický a multicentrický prieskum zahŕňal 4 078 dospelých pacientov (vo veku ≥ 18 rokov) od 51 diabetológov a 47 oftalmológov. Do štúdie bolo zaradených 3 700 pacientov (DM 1. typu = 295, DM 2. typu = 3 405). Priemerný glykovaný hemoglobín (HbA1c (% DCCT)) bol 7,5 (1,4) u pacientov s DM 2. typu a 8,5 (1,6) u pacientov s DM 1. typu. Priemer trvania DM 2. typu bol kratší v porovnaní s DM 1. typu (7,5 [5,2] vs 10,3 [6,9] roka). Najčastejšími faktormi, ktoré prispievali u slovenských pacientov k vzniku DR a DEM, boli trvanie ochorenia a vyšší HbA1c.

Kľúčové slová: diabetická retinopatia, diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, diabetický edém makuly, glykovaný hemoglobín

Epidemiological characteristics of patients with diabetic retinopathy in Slovakia: results from the DIARET SK study

Diabetic retinopathy (DR) is the major cause of blindness in patients with diabetes mellitus (DM). DIARET SK is the first epidemiological and multi-centre study in Slovakia aimed at evaluating the epidemiological characteristics in Slovak patients with type 1 and type 2 DM and DR. The epidemiological and multicenter survey included 4078 adult patients (≥ 18 years of age) from 51 diabetologists and 47 ophthalmologists. The study enrolled 3700 patients (type 1 DM = 295, type 2 DM = 3405). The mean (SD) glycated hemoglobin (HbA1c) was 7.5^(1,4) in type 2 DM patients and 8.5^(1,6) in type 1 DM patients. The mean duration of type 2 DM was shorter compared to type 1 DM (7.5 [5.2] vs 10.3 [6.9] years). The most frequent factors contributing to the development of DR and DEM in Slovak patients were disease duration and higher HbA1c.

Keywords: diabetic retinopathy, type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, diabetic macular oedema, glycated hemoglobin

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 9 – 13

Úvod

Diabetes mellitus (DM) je jedným z najväčších zdravotných problémov 21. storočia. Podľa údajov Medzinárodnej federácie diabetu (International Diabetes Federation) z roku 2017 má takmer 425 miliónov ľudí vo veku 20 – 79 rokov diabetes⁽¹⁾. Predpokladá sa, že do roku 2030 sa počet pacientov s DM zvýši o 69 % v rozvojových a o 20 % v rozvinutých krajinách⁽²⁾. Diabetická retinopatia (DR) je hlavnou príčinou straty zraku u dospelých vo veku 20 – 74 rokov⁽³⁾. Viac ako tretina pacientov s DM má príznaky DR a tretina z nich je postihnutá diabetickou retinopatiou ohrozujúcou zrak (VTDR), ktorá je definovaná ako závažná neproliferatívna DR alebo proliferatívna DR (PDR), alebo prítomnosť diabetického edému makuly (DEM)⁽²⁾. Trvanie diabetu a zlá kontrola glykémie sú najdôležitejšie rizikové faktory spojené s vývojom DR a väčšinou chronických komplikácií súvisiacich s diabetom. Významné klinické štúdie, ako je „The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications (DCCT/EDIC)“, preukázali, že intenzívna liečba hyperglykémie účinne oneskoruje nástup a spomaľuje progresiu komplikácií pri DM vrátane DR⁽⁴⁾. Dokázalo sa, že okrem straty zraku prispievajú DR a DEM k rozvoju ďalších

komplikácií súvisiacich s cukrovkou vrátane nefropatie, periférnej neuropatie a kardiovaskulárnych príhod^(5,6). V tejto práci uvádzame výsledky štúdie DIARET SK (Prevalencia diabetického RETinopatie a dopad genetických faktorov na vznik diabetického retinopatie u pacientov s DM 1. a 2. typu na Slovensku), ktorej cieľom bolo zistiť epidemiologické a rizikové faktory pacientov s DM a DR.

Materiál a metódy

DIARET SK bol epidemiologický, multicentrický prieskum u dospelých pacientov (vo veku ≥ 18 rokov) s DM 1. a 2. typu, ktorí spĺňali kritériá na zaradenie a podpísali formulár informovaného súhlasu s epidemiologickým výskumom. Každý zaradený pacient absolvoval vyšetrenie oboch očí aj u oftalmológa. Pacientom bol pridelený unikátny identifikačný kód, aby sa zachovala anonymita, a identitu pacienta poznal iba ošetrojúci lekár. Údaje sa zbierali u 51 diabetológov a 47 oftalmológov v období február až december 2015. Zaradenie pacientov prebiehalo počas návštev u diabetológov, pri ktorých im boli vyšetrené potrebné parametre a tie boli elektronicky zaznamenané spolu s retrospektívnymi anamnestickými údajmi. Aby sa zabezpečil nezaujatý výber, pacienti

boli vyberaní každý deň skríningu podľa vopred špecifikovaného poradia. Zahrnutí boli všetci pacienti s DM (1. aj 2. typu) bez ohľadu na trvanie DM a bez ohľadu na očné komplikácie v pacientovej anamnéze alebo pri vyšetrení diabetológom. Pacienti boli vyradení, ak mali 1) < 18 rokov, 2) gestačný diabetes alebo sekundárny – indukovaný diabetes, 3) diabetickú ketoacidózu alebo hyperosmolárnu kómu a 4) zneužívali alkohol alebo mali akútnu intoxikáciu alkoholom.

Štatistická analýza: Akékoľvek zaujatie bolo eliminované použitím vopred špecifikovaného kvázi náhodného procesu výberu pacientov. Vďaka vyššiemu počtu pacientov sa očakávali najpresnejšie výsledky v zmysle štatistickej chyby vrátane celkovej prevalencie a identifikácie rizikových faktorov prispievajúcich k vzniku DR. Primárne cieľové výsledky sú uvádzané Wilsonovým skóre 95 % intervalu spoľahlivosti (IS). Analýza vplyvu rizikových faktorov na prevalenciu DR a DEM sa realizovala pomocou multivariačnej logistickej regresie. Miera chýbajúcich hodnôt bola všeobecne nízka. Nedopĺňali sa chýbajúce dáta. V analýzách korelácií alebo logistických regresí boli použité všetky dáta s dostupnými výsledkami. Charakteristiky pacienta boli opisované štandardnými metódami deskriptívnej štatistiky – celkový počet pacientov (N), percentuálny podiel (%), priemer, medián, minimum, maximum, štandardná odchýlka (SD).

Výsledky

Konečný súbor dát obsahoval údaje od 4 014 pacientov. Pomocou kvázi náhodného prístupu bolo zaradených 3 700 pacientov (DM 2. typu = 3 405, DM 1. typu = 295), 16 (DM 2. typu = 15, DM 1. typu = 1) bolo zaradených v skupine vopred špecifikovanej s trvaním DM < 5 rokov s históriou DR a 298 (DM 2. typu = 204, DM 1. typu = 94) pacientov s trvaním DM ≥ 20 rokov. Výsledky sú uvádzané zvlášť podľa typu DM.

Podiel žien bol podobný v oboch skupinách s DM 2. aj 1. typu (1 806 [53 %] vs 154 [52,2 %], v uvedenom poradí). Priemerný vek (SD) v čase diagnostikovania DM bol 53,4 (9,5) roka u pacientov s DM 2. typu a 27,6 (12,9) roka s DM 1. typu. Priemerný vek (SD) pacientov bol 60,9 (9,5) roka u pacientov s DM 2. typu a 37,9 (12,1) roka u pacientov s DM 1. typu. Väčšina pacientov v skupine s DM 2. typu bola vo veku medzi 50 – 70 rokov, zatiaľ čo v skupine s DM 1. typu boli do 45 rokov (**obrázok 1 A a B**).

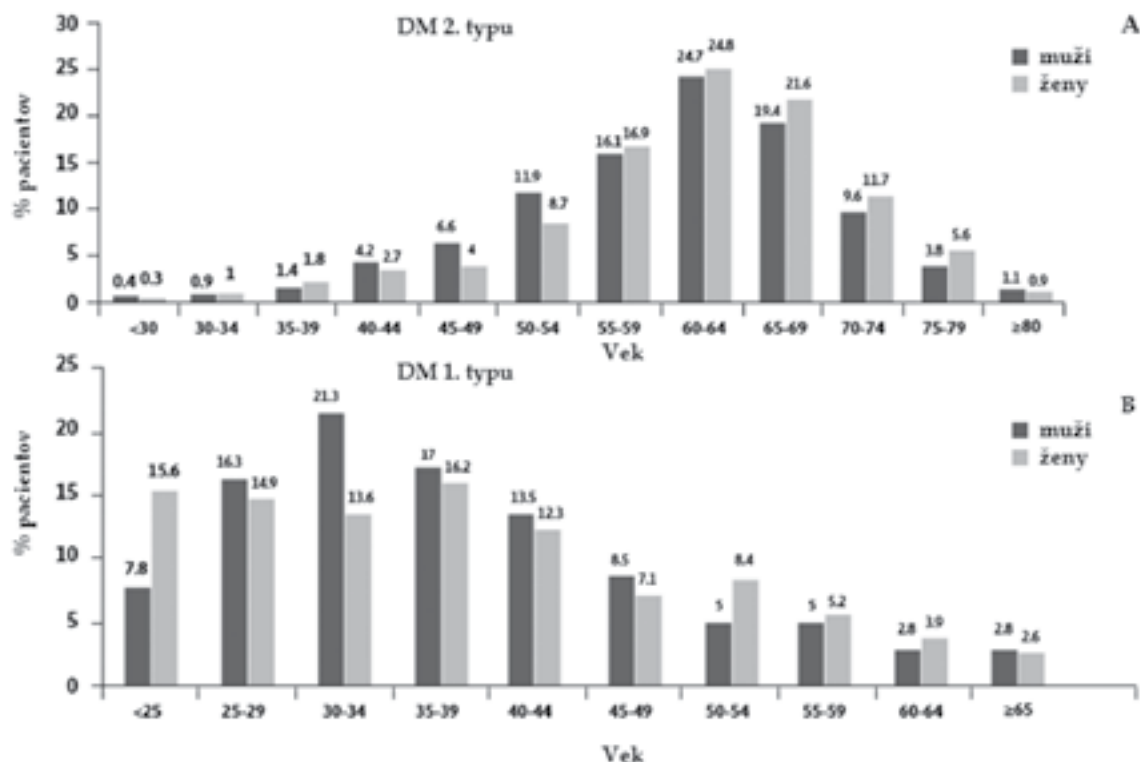
Priemer (SD) trvania DM 2. typu bol 7,5 (5,2) roka a DM 1. typu 10,3 (6,9) roka. Trvanie ochorenia DM 2. typu u väčšiny (69,4 %) pacientov bolo < 10 rokov a viac ako ≥ 20 rokov iba u 40 (1,2 %) pacientov. Zo všetkých pacientov s DM 1. typu malo 46,8 % trvanie ochorenia < 10 rokov a iba 5,4 % ≥ 20 rokov. Trvanie DM 2. a 1. typu kategorizované podľa rokov trvania je zobrazené na **obrázku 2 C a D**.

Priemer (SD) HbA1c (% DCCT) bol 7,5 (1,4) u pacientov s DM 2. typu a 8,5 (1,6) u pacientov s DM 1. typu. Hladiny HbA1c sa u väčšiny (72,6 %) pacientov s DM 2. typu pohybovali medzi 6 % – 8,5 %, zatiaľ čo u väčšiny (63,7 %) pacientov s DM 1. typu sa hladiny HbA1c pohybovali medzi 6,5 % – 9 %. Celkovo 55,2 % pacientov s DM 2. typu a 81,8 % pacientov s DM 1. typu malo hladiny HbA1c nad normálnym rozpätím (< 7 %)⁽⁷⁾. Pri DM 2. typu mali 2 % pacientov hladiny HbA1c > 11, zatiaľ čo pri DM 1. typu malo hladiny HbA1c > 11 5,8 % pacientov (**obrázok 3 E a F**).

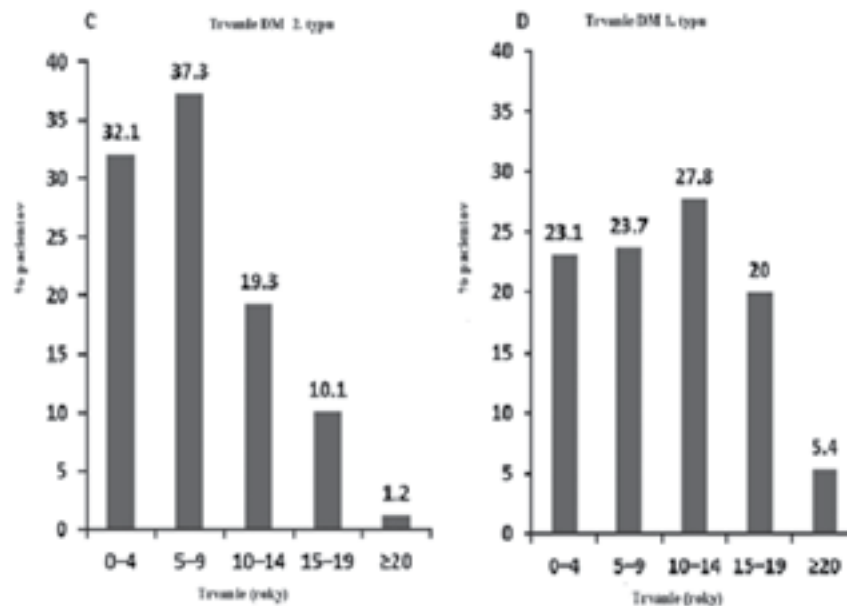
DCCT, štúdia kontroly a komplikácií diabetu; HbA1c, glykovaný hemoglobín

Prevalencia DR bola vyššia u pacientov s DM 2. a 1. typu s trvaním ochorenia ≥ 20 rokov v porovnaní s trvaním DM < 20 rokov (**tabuľka 1**).

Obrázok 1 (A a B). Rozloženie veku u pacientov s DM 1. (B) a 2. typu (A)



Obrázok 2 (C a D). Trvanie DM 2. a 1. typu



Tabuľka 1. Prevalencia akejkoľvek DR podľa trvania a typu DM

| Trvanie (roky) | DM 2. typu | | | DM 1. typu | | |
|----------------|----------------|--------------|--------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| | N | n | Prevalencia per 100 (95 % IS)* | N | n | Prevalencia per 100 (95 % IS)* |
| 0 – 4 | 1 092 | 65 | 5,95 (4,7; 7,52) | 68 | 7 | 10,29 (5,08; 19,76) |
| 5 – 9 | 1 270 | 157 | 12,36 (10,66; 14,29) | 70 | 10 | 14,29 (7,95; 24,34) |
| 10 – 14 | 658 | 148 | 22,49 (19,47; 25,84) | 82 | 30 | 36,59 (26,98; 47,39) |
| 15 – 19 | 345 | 122 | 35,36 (30,5; 40,54) | 59 | 27 | 45,76 (33,7; 58,34) |
| 20 – 24 | 144 (30 + 114) | 72 (19 + 53) | 50 (41,94; 58,06) | 42 (8 + 34) | 26 (6 + 20) | 61,9 (46,81; 75) |
| 25 – 29 | 56 (4 + 52) | 36 (2 + 34) | 64,29 (51,19; 75,54) | 27 (4 + 23) | 16 (3 + 13) | 59,26 (40,73; 75,49) |
| ≥ 30 | 44 (6 + 38) | 25 (3 + 22) | 56,82 (42,22; 70,32) | 41 (4 + 37) | 27 (3 + 24) | 65,85 (50,55; 78,44) |

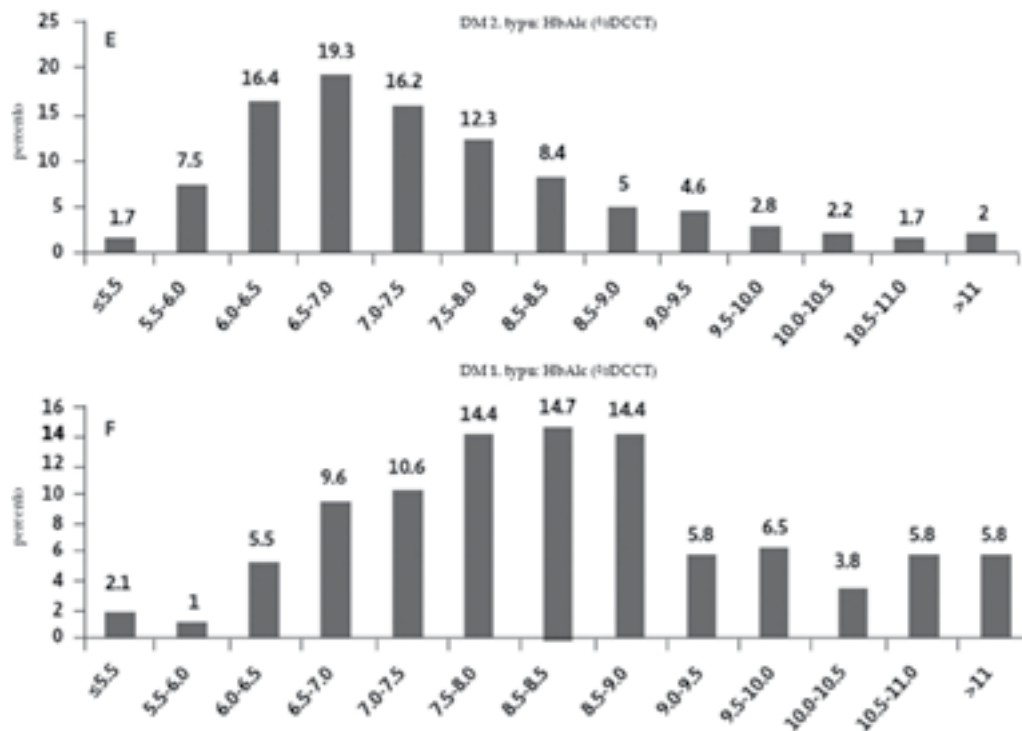
Diskusia

Štúdia DIARET SK bola prvá a zatiaľ jediná na Slovensku, v ktorej sa hodnotili epidemiologické charakteristiky pacientov s DM a DR a ich vplyv na vznik DR a DEM. Prevalencia DM stúpa s rastúcim vekom⁽⁸⁾ a spôsobuje komplikácie súvisiace s DR. DR je kľúčovým indikátorom mikrovaskulárnych komplikácií súvisiacich s DM. V tejto štúdii bol priemerný vek pacientov s DM 2. typu vyšší ako u pacientov s DM 1. typu a naše výsledky sú podobné, ako výsledky hlásené z nedávno publikovanej dánskej štúdie⁽⁹⁾. Skúmanie rizikových faktorov tiež odhalilo zaujímavé úvahy v klinickej praxi aj vo výskume. Hyperglykémia zostáva najdôležitejším modifikovateľným rizikovým faktorom DR. HbA1c predstavuje chronickú koncentráciu glukózy v krvi a používa sa ako marker na predpovedanie budúcich komplikácií súvisiacich s DM a ako kritický parameter na hodnotenie vplyvu ochorenia⁽¹⁰⁾. Na zistenie efektu znížených hladín glukózy v krvi na mikrovaskulárne komplikácie u pacientov s DM 2. typu a 1. typu sa realizovalo niekoľko klinických štúdií. Výsledky štúdií naznačili, že chronické zníženie hladín glukózy v krvi následne znížilo riziko DR⁽¹¹⁻¹⁴⁾. Výsledky zo štúdie kontroly a komplikácií diabetu (Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)) v USA a Kanade pre DM 1. typu⁽¹¹⁾ a z prospektívnej štúdie DM v Spojenom kráľovstve (the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)) pre DM 2. typu⁽¹²⁾ ukázali veľmi významné zníženia (DCCT, $p < 0,001$; UKPDS, $p = 0,009$)

incidencie a progresie DR u pacientov randomizovaných na prísnu kontrolu glukózy v krvi ($HbA1c < 7\%$). Na druhej strane výsledky zo štúdií ADVANCE a ACCORD ukázali, že agresívna kontrola glykémie ($< 6,5\%$) významne neznižila riziko retinopatie^(15,16).

V štúdii DIARET, bez ohľadu na typ DM, mala väčšina pacientov priemerné hladiny HbA1c nad normálnym rozpätím ($> 7\%$). Priemerné hladiny HbA1c boli vyššie u pacientov s DM 1. typu v porovnaní s pacientmi 2. typu, čo môže byť jedným z dôvodov vyššej prevalencie DR u pacientov s DM 1. typu v štúdii DIARET SK. Tieto výsledky zo štúdie DIARET SK sú podobné ako výsledky hlásené zo španielskej populácie (priemer [SD]: $7,38 \pm 1,29\%$ pre DM 2. typu a $8,38 \pm 1,16\%$ pre DM 1. typu). Autori vyššie hodnoty akýchkoľvek DR pri DM 1. typu vysvetľujú dvoma rôznymi príčinami: (i) dlhšie trvanie DM ($13,63 \pm 8,42$ roka u pacientov s DM 1. typu v porovnaní s $8,25 \pm 6,1$ roka u pacientov s DM 2. typu) a (ii) zlá metabolická kontrola meraná pomocou HbA1c ($8,38 \pm 1,16\%$ u pacientov s DM 1. typu v porovnaní so $7,38 \pm 1,29\%$ u pacientov s DM 2. typu)⁽¹⁹⁾. V liverpoolskej štúdii bol medián trvania DM pri 2. type 3,2 roka a pri DM 1. typu 12,8 roka, vo waleskej štúdii 5,3 roka a 16,7 roka v uvedenom poradí a v dánskej štúdii 8 rokov a 19 rokov v uvedenom poradí⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. V našej štúdii bol medián trvania DM 7 rokov u pacientov s DM 2. typu a 10 rokov u pacientov s DM 1. typu. V štúdii DIARET SK väčšina pacientov s DM 2. typu (69,4 %) udávala

Obrázok 3 (E a F). Priemerné hladiny HbA1c u pacientov s DM 2. a 1. typu



trvanie ochorenia < 10 rokov a iba 30,6 % pacientov s DM 2. typu a 53,2 % s DM 1. typu > 10 rokov. To môže byť jeden z dôvodov vyššej prevalencie DR medzi pacientmi s DM 1. typu v tejto štúdiu podobne, ako to bolo pozorované v predchádzajúcich publikovaných štúdiách⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Táto epidemiologická štúdia na slovenskej populácii potvrdzuje výsledky predchádzajúcich štúdií v iných populáciách, že glykemická expozícia (trvanie pôsobenia DM a HbA1c) je prevládajúcim faktorom pri vzniku DR. Včasná detekcia, dobrá kontrola HbA1c a rýchla liečba umožňujú prevenciu zrakového poškodenia súvisiaceho s DM, lepší manažment týchto pacientov a zníženie záťaže liečbou. Pacienti s DM si vyžadujú pravidelné sledovanie lekármi primárnej starostlivosti, aby optimalizovali svoj glykemický index a aby sa zabránilo vývoju a progresii DR a ďalších komplikácií súvisiacich s DM. Údaje zo štúdie DIARET SK poskytujú základ na porovnanie slovenských epidemiologických údajov so štúdiami z iných krajín, poskytujú pohľad na manažment a lepšie porozumenie tohto ochorenia ohrozujúceho zrak. DIARET SK je prvá rozsiahla, dobre kontrolovaná epidemiologická štúdia, ktorá hodnotila epidemiologické charakteristiky pacientov s DM

a DR. Hlavnou silnou stránkou tejto štúdie je veľká vzorka pacientov. Pokiaľ je nám známe, zatiaľ nebola publikovaná žiadna iná epidemiologická štúdia s takým vysokým počtom pacientov.

Podakovanie: 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.

MUDr. Marta Ondrejková, PhD.: Potvrdzujem, že som dostala finančnú podporu od farmaceutických spoločností Novartis a Bayer ako členka Advisory Boardu a investigátorka v klinických štúdiách.

MUDr. Monika Gajdošová: Spolupracujem s farmaceutickými spoločnosťami Novartis, Bayer, Allergan a Zeiss ako konzultantka. Som členka Advisory Boardu spoločností Novartis, Bayer, Allergan a hlavná skúšajúca vo viacerých klinických štúdiách.

MUDr. Iveta Tvrda a MUDr. Jana Fabková: Potvrdzujeme, že sme zamestnankyne medicínskeho oddelenia spoločnosti Novartis Slovakia, s. r. o., Žižkova 22B, Bratislava.

LITERATÚRA

1. IDF DIABETES ATLAS – 8TH EDITION. dostupné na: <http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html> (prístup 29. októbra 2019).
2. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2012; 35(3): 556-564.
3. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376(9735): 124-136.
4. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes* 2015; 64(2): 631-642.

5. Hagg S, Thorn LM, Putaala J, et al. Incidence of stroke according to presence of diabetic nephropathy and severe diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013; 36(12): 4140-4146.
6. Mottl AK, Pajewski N, Fonseca V, et al. The degree of retinopathy is equally predictive for renal and macrovascular outcomes in the ACCORD Trial. *J Diabetes Complications* 2014; 28(6): 874-879.
7. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012; 35(6): 1364-1379.

8. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5): 1047-1053.
9. Larsen MB, Henriksen JE, Grauslund J, et al. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in 17 152 patients from the island of Funen, Denmark. *Acta Ophthalmologica* 2017; 95(8): 778-786.
10. Selvin E, Steffes MW, Zhu H, et al. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N Engl J Med* 2010; 362(9): 800-811.
11. Diabetic retinopathy after two years of intensified insulin treatment. Follow-up of the Kroc Collaborative Study. The Kroc Collaborative Study Group. *JAMA* 1988; 260(1): 37-41.
12. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352(9131): 837-853.
13. Dahl-Jorgensen K, Brinchmann-Hansen O, Hanssen KF, et al. Effect of near normoglycaemia for two years on progression of early diabetic retinopathy, nephropathy, and neuropathy: the Oslo study. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293(6556): 1195-1199.
14. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329(14): 977-986.
15. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 358(24): 2545-2559.
16. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358(24): 2560-2572.
17. Younis N, Broadbent DM, Harding SP, et al. Prevalence of diabetic eye disease in patients entering a systematic primary care-based eye screening programme. *Diabet Med* 2002; 19(12):1014-1021.
18. Thomas RL, Dunstan FD, Luzio SD, Chowdhury SR, North RV, Hale SL, et al. Prevalence of diabetic retinopathy within a national diabetic retinopathy screening service. *Br J Ophthalmol* 2015; 99(1): 64-68.
19. Romero-Aroca P, Navarro-Gil R, Valls-Mateu A, et al. Differences in incidence of diabetic retinopathy between type 1 and 2 diabetes mellitus: a nine-year follow-up study. *Br J Ophthalmol* 2017; 101(10): 1346-1351.



MUDr. Marta Ondřejková, PhD.

Špecializovaná nemocnica v odbore oftalmológia Zvolen
Kuzmányho nábrežie 28, 960 01 Zvolen
e-mail: marta.ondrejкова@oftal.sk

Prevalencia diabetickej retinopatie na Slovensku: výsledky zo štúdie DIARET SK

Marta Ondrejková¹, Monika Gajdošová¹, Iveta Tvrdá², Jana Fabková², zastupujúci tím štúdie DIARET SK

¹Špecializovaná nemocnica v odbore oftalmológia, Zvolen

²Novartis Slovakia, s. r. o., Bratislava

DIARET SK je prvá epidemiologická a multicentrická štúdia na Slovensku, ktorej cieľom bolo vyhodnotiť prevalenciu diabetickej retinopatie (DR) u slovenských pacientov s diabetom mellitom (DM) 1. a 2. typu. Epidemiologický a multicentrický prieskum zahŕňal 4 078 dospelých pacientov (vo veku ≥ 18 rokov). Do štúdie bolo zaradených 3 700 pacientov (DM 1. typu = 295, DM 2. typu = 3 405). U pacientov s DM 2. typu bolo 516 (15,5 %) prípadov DR, 19 (0,56 %) proliferatívnej DR (PDR) a 106 (3,11 %) prípadov diabetickeho edému makuly (DEM). U pacientov s DM 1. typu bolo 86 (29,15 %) prípadov DR, 10 (3,39 %) PDR a 12 (4,07 %) DEM. DIARET je prvá rozsiahla, dobre kontrolovaná epidemiologická štúdia, ktorá vyhodnotila prevalenciu DR na Slovensku. Tieto údaje môžu slúžiť ako základ na porovnanie s inými štúdiami a zároveň pomôcť lepšiemu porozumeniu a manažmentu tohto ochorenia ohrozujúceho zrak.

Kľúčové slová: diabetickej retinopatia, diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, diabetickej edém makuly, glykovaný hemoglobín

Prevalence of diabetic retinopathy in Slovakia: results from DIARET SK study

DIARET SK is the first epidemiological and multicenter study in Slovakia to evaluate the prevalence of diabetic retinopathy in Slovak patients with Type 1 and 2 diabetes mellitus (DM). An epidemiological and multi-center survey included 4078 adult patients (aged ≥ 18 years). The study enrolled 3700 patients (Type 1 DM = 295, Type 2 DM = 3405). In the Type 2 DM patients, there were 516 (15.5%) cases of DR, 19 (0.56%) proliferative DR (PDR) and 106 (3.11%) cases of diabetic macular edema (DEM). In type 1 DM patients, there were 86 (29.15%) cases of DR, 10 (3.39%) PDR, and 12 (4.07%) DEM. DIARET is the first large-scale, well-controlled epidemiological study to assess the prevalence of DR in Slovakia. These data can serve as a basis for comparison with other studies while helping understanding better and managing this vision-threatening disease.

Keywords: diabetic retinopathy, type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, diabetic macular edema, glycated hemoglobin

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 14 – 18

Úvod

Diabetickej retinopatia (DR) je hlavnou príčinou slepoty u dospelých v produktívnom veku a takisto u pacientov s diabetom mellitom (DM). Udáva sa, že je príčinou 4,8 % prípadov slepoty⁽¹⁾. Celosvetová prevalencia DR u pacientov s DM sa udáva okolo 34,6 %⁽²⁾ a vyskytuje sa najmä u pacientov vo veku 20 – 74 rokov^(3,4). Dostupné údaje o prevalencii DR sú však nekonzistentné. Uvádza sa, že prevalencia DR je vyššia u pacientov s DM 1. typu v porovnaní s DM 2. typu⁽⁵⁾. Očakáva sa, že prevalencia DR sa bude ďalej zvyšovať v dôsledku zvyšujúcej sa prevalence DM, starnutia populácie a zvyšovania strednej dĺžky života pacientov s DM. DR sa klasifikuje do dvoch typov: neproliferatívna diabetickej retinopatia (NPDR) a proliferatívna DR (PDR)⁽³⁾. PDR je pokročilé štádium DR a vyskytuje sa v dôsledku abnormálnej angiogenézy na povrchu sietnice⁽³⁾. Je známe, že včasná detekcia a rýchla liečba najmä DR ohrozujúcej zrak (VTDR) umožňujú prevenciu zhoršenia zraku spojenú s DM. Udáva sa, že včasná liečba môže znížiť riziko straty zraku u jednotlivcov až o 57 %⁽⁶⁾. Systematický skrining DR je dôležitý pri identifikácii pa-

cientov, ktorí potrebujú odporúčanie k špecialistovi, najmä pacientom s VTDR. V súčasnosti nie sú dostupné údaje o prevalencii DR, jej štádiách a DEM na Slovensku. Slovensko nemá národný skriningový program pre DR a doteraz nemalo ani údaje o prevalencii DR u pacientov s DM. V tejto práci prvýkrát uvádzame výsledky o prevalencii DR u slovenských diabetickej pacientov zo štúdie DIARET SK „Prevalencia DIAbetickej RETinopatie a dopad genetických faktorov na vznik diabetickej retinopatie u pacientov s DM 1. a 2. typu na Slovensku“.

Materiál a metódy

DIARET SK bola epidemiologická multicentrická štúdia u dospelých pacientov (vo veku ≥ 18 rokov) s DM 1. a 2. typu, ktorí spĺňali kritériá na zaradenie a podpísali formulár informovaného súhlasu s epidemiologickým výskumom. Pacienti boli vyradení, ak mali < 18 rokov, gestačný diabetes alebo sekundárny – indukovaný diabetes, diabetickej ketoacidózu alebo hyperosmolárnu kómu a zneužívali alkohol alebo mali akútnu intoxikáciu alkoholom.

Zaraďovanie pacientov prebiehalo počas návštevy u diabetológa, pri ktorej im vyšetroval potrebné parametre, ktoré boli elektronicky zaznamenané spolu s retrospektívnymi anamnestickými údajmi. Aby sa zabezpečil nezaujatý výber, pacienti boli vyberaní každý deň skriningu podľa vopred špecifikovaného poradia. Zahrnutí boli všetci pacienti s DM (1. aj 2. typu) bez ohľadu na trvanie DM a bez ohľadu na očné komplikácie v pacientovej anamnéze alebo pri vyšetrení diabetológom. Každý zaradený pacient absolvoval vyšetrenie oboch očí u oftalmológa vrátane najlepšej korigovanej zrakovkej ostrosti (BCVA), biomikroskopie štrbinovou lampou a optickej koherentnej tomografie (OCT). Dáta sa zaznamenávali elektronicky s použitím zabezpečeného softvéru. Pacientom bol pridelený unikátny identifikačný kód, aby sa zachovala anonymita, a identitu pacienta poznal iba ošetrojúci lekár. Údaje sa zbierali u 51 diabetológov a 47 oftalmológov v období február až december 2015. Vďaka epidemiologickému charakteru štúdie bez sledovania a skúšanej liečby sa nevyskytli nežiaduce reakcie na liek ani nežiaduce udalosti, ktoré by bolo potrebné hlásiť.

Štatistická analýza

Celkovo bolo náhodným výberom zaradených 3 700 pacientov. Aby sa zaručila dostatočná veľkosť vzorky medzi častých skupín pacientov pre štatistickú analýzu, všetci pacienti zo skupín špecifikovaných vopred boli zaradení do štúdie, aj keď boli mimo špecifikovaného poradia. Miesto pre 500 pacientov bolo rezervované pre špeciálne

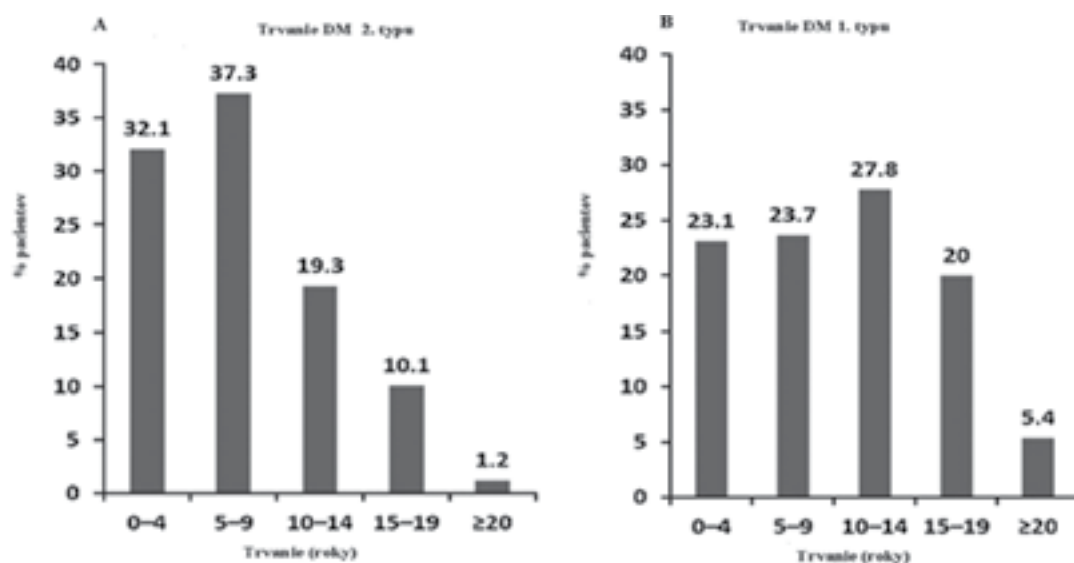
podskupiny: pacienti s trvaním DM ≥ 20 rokov a pacienti s trvaním DM < 5 rokov s históriou DR. Aj keď sa zozbierali dáta od menej pacientov, veľkosť vzorky bola dostatočná pre naplnenie primárnych a sekundárnych cieľov tejto epidemiologickej štúdie. Primárne cieľové výsledky boli sprevádzané Wilsonovým skóre 95 % intervalu spoľahlivosti (IS). Kalkulácia prevalencie pre každé štádium DR a DEM sa analyzovala pomocou rovnakých metód aj pre celkovú prevalenciu DR. Miera chýbajúcich hodnôt bola všeobecne nízka. Nedopĺňali sa chýbajúce dáta. V analýzach korelácií alebo logistických regresíí boli použité všetky dáta s dostupnými výsledkami. Trvanie DM od diagnostikovania sa vyhodnocovali ako kontinuálne kovarianty. Charakteristiky pacienta boli opisované štandardnými metódami deskriptívnej štatistiky – celkový počet pacientov (N), percentuálny podiel (%), priemer, medián, minimum, maximum, štandardná odchýlka (SD).

Výsledky

Priemer (SD) trvania DM 2. typu bol 7,5 (5,2) roka a DM 1. typu 10,3 (6,9) roka. Trvanie ochorenia DM 2. typu u väčšiny (69,4 %) pacientov bolo < 10 rokov a viac ako 20 rokov iba u 40 (1,2 %) pacientov (**obrázok 1A**). Zo všetkých pacientov s DM 1. typu malo 46,8 % trvanie ochorenia < 10 rokov a iba 5,4 % ≥ 20 rokov (**obrázok 1B**).

Prevalencia DR bola vyššia u pacientov s DM 2. a 1. typu s trvaním ochorenia ≥ 20 rokov v porovnaní s trvaním DM < 20 rokov (**tabuľka 1**).

Obrázok 1 (A a B). Trvanie DM 2. a 1. typu



Tabuľka 1. Prevalencia akejkoľvek DR podľa trvania a typu DM

| Trvanie (roky) | DM 2. typu | | | DM 1. typu | | |
|----------------|---------------|--------------|--------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| | N | n | Prevalencia per 100 (95 % IS)* | N | n | Prevalencia per 100 (95 % IS)* |
| 0 – 4 | 1 092 | 65 | 5,95 (4,7; 7,52) | 68 | 7 | 10,29 (5,08; 19,76) |
| 5 – 9 | 1 270 | 157 | 12,36 (10,66; 14,29) | 70 | 10 | 14,29 (7,95; 24,34) |
| 10 – 14 | 658 | 148 | 22,49 (19,47; 25,84) | 82 | 30 | 36,59 (26,98; 47,39) |
| 15 – 19 | 345 | 122 | 35,36 (30,5; 40,54) | 59 | 27 | 45,76 (33,7; 58,34) |
| 20 – 24 | 144 (30 + 11) | 72 (19 + 53) | 50 (41,94; 58,06) | 42 (8 + 34) | 26 (6 + 20) | 61,9 (46,81; 75) |
| 25 – 29 | 56 (4 + 52) | 36 (2 + 34) | 64,29 (51,19; 75,54) | 27 (4 + 23) | 16 (3 + 13) | 59,26 (40,73; 75,49) |
| ≥ 30 | 44 (6 + 38) | 25 (3+22) | 56,82 (42,22; 70,32) | 41 (4 + 37) | 27 (3 + 24) | 65,85 (50,55; 78,44) |

Počty prípadov z náhodne vybraných pacientov a pacientov v preddefinovanej podskupine s trvaním DM ≥ 20 rokov sú zobrazené zvlášť v zátvorkách.

Prevalencia PDR bola tiež vyššia u pacientov s DM s trvaním ≥ 20 rokov v porovnaní s pacientmi s trvaním DM < 20 rokov, bez ohľadu na typ DM. V porovnaní s DM 2. typu bola prevalencia PDR vyššia u pacientov s DM 1. typu s trvaním ochorenia ≥ 20 rokov (**tabuľka 2**).

DEM mal najvyššiu prevalenciu medzi pacientmi s DM 2. typu s trvaním ochorenia > 20 rokov. Tieto dáta naznačujú stabilný nárast prevalence DEM s trvaním DM pri oboch typoch DM (**tabuľka 3**).

Celková prevalencia akejkolvek DR u pacientov s DM 2. typu bola 15,15 % a 3,35 % pre DR ohrozujúcu zrak (VTDR). Pacienti muži mali mierne vyššiu prevalenciu DR bez ohľadu na typ (16,70 %) v porovnaní s pacientkami ženami (13,79 %) (**tabuľka 4**).

Celková prevalencia akejkolvek DR u pacientov s DM 1. typu bola 29,15 % (**tabuľka 5**).

Diskusia

DIARET SK bola prvá štúdia na Slovensku, v ktorej sa hodnotila prevalencia diabetickej retinopatie (DR) a ťažkých štádií DR (PDR, DEM) u pacientov s diabetom mellitom (DM) 1. a 2. typu. DR je kľúčovým indikátorom mikrovaskulárnych komplikácií súvisiacich s DM. Prevalencia DM stúpa s rastúcim vekom a spôsobuje komplikácie súvisiace s DR. Súhrnná analýza, ktorá zahŕňala 22 896 ľudí s DM z 35 populačných štúdií v USA, Austrálii, Európe a Ázii (v rokoch 1980 – 2008) ukázala, že celková prevalencia akejkolvek DR (pri DM 1. typu a 2. typu) bola 34,6 % (95 % CI 34,5 – 34,8) a 7 % (6,9 – 7) VTDR. Celková prevalencia DR pri DM 2. typu bola 25,2 % a VTDR 6,9 %⁽⁶⁾. Prevalencia DR sa pohybuje od 10 do 50 % v závislosti od populácie, metód používaných pri skríningu DR a rokov trvania DM. Preto prevalencia DR by sa mala analyzovať opatrne. Zistilo sa, že prevalencia sa v priebehu času

Tabuľka 2. Prevalencia PDR podľa trvania a typu DM

| Trvanie (roky) | DM 2. typu | | | DM 1. typu | | |
|----------------|----------------|------------|-------------------------------|---------------|------------|-------------------------------|
| | N | n | Prevalencia per 100 (95% IS)* | N | n | Prevalencia per 100 (95% IS)* |
| 0 – 4 | 1 092 | 1 | 0,09 (0,02; 0,52) | 68 | 1 | 1,47 (0,26; 7,87) |
| 5 – 9 | 1 270 | 4 | 0,31 (0,12; 0,81) | 70 | 2 | 2,86 (0,79; 9,83) |
| 10 – 14 | 658 | 5 | 0,76 (0,32; 1,77) | 82 | 3 | 3,66 (1,25; 10,21) |
| 15 – 19 | 345 | 7 | 2,03 (0,99; 4,13) | 59 | 1 | 1,69 (0,3; 9) |
| ≥ 20 | 244 (40 + 204) | 10 (2 + 8) | 4,1 (2,24; 7,38) | 110 (16 + 94) | 10 (3 + 7) | 9,09 (5,01; 15,93) |

Počty prípadov z náhodne vybraných pacientov a pacientov v preddefinovanej podskupine s trvaním DM ≥ 20 rokov sú zobrazené zvlášť v zátvorkách.

Tabuľka 3. Prevalencia DEM podľa trvania a typu DM

| DEM | DM 2. typu | | | DM 1. typu | | |
|-----------------|----------------|-------------|-------------------------------|---------------|------------|-------------------------------|
| | N | n | Prevalencia per 100 (95% IS)* | N | n | Prevalencia per 100 (95% IS)* |
| 0 – 4 roky | 1 092 | 10 | 0,92 (0,5; 1,68) | 68 | 1 | 1,47 (0,26; 7,87) |
| 5 – 9 rokov | 1 270 | 10 | 1,89 (1,27; 2,8) | 70 | 3 | 4,29 (1,47; 11,86) |
| 10 – 14 rokov | 658 | 10 | 5,02 (3,59; 6,96) | 82 | 3 | 3,66 (1,25; 10,21) |
| 15 – 19 rokov | 345 | 10 | 9,57 (6,89; 13,13) | 59 | 4 | 6,78 (2,67; 16,18) |
| ≥ 20 rokov | 244 (40 + 204) | 43 (6 + 37) | 17,62 (13,35; 22,89) | 110 (16 + 94) | 10 (1 + 9) | 9,09 (5,01; 15,93) |

Počty prípadov z náhodne vybraných pacientov a pacientov v preddefinovanej podskupine s trvaním DM ≥ 20 rokov sú zobrazené zvlášť v zátvorkách.

Tabuľka 4. Celková prevalencia diabetickej retinopatie u pacientov s DM 2. typu

| DM 2. typu | Celkovo (N) | Prípady (n) | Prevalencia per 100 (95% IS)* | |
|---------------|-------------|-------------|-------------------------------|----------------|
| Všetci | | | | |
| Akákoľv. DR | 3 405 | 516 | 15,15 | (13,95; 16,36) |
| PDR | 3 405 | 19 | 0,56 | (0,31; 0,81) |
| DEM | 3 405 | 106 | 3,11 | (2,53; 3,7) |
| VTDR | 3 405 | 114 | 3,35 | (2,74; 3,95) |
| Muži | | | | |
| Akákoľv. DR | 1 599 | 267 | 16,70 | (14,87; 18,53) |
| PDR | 1 599 | 11 | 0,69 | (0,28; 1,09) |
| DEM | 1 599 | 57 | 3,56 | (2,66; 4,47) |
| VTDR | 1 599 | 60 | 3,75 | (2,82; 4,68) |
| Ženy | | | | |
| Akákoľv. DR | 1 806 | 249 | 13,79 | (12,2; 15,38) |
| PDR | 1 806 | 8 | 0,44 | (0,14; 0,75) |
| DEM | 1 806 | 49 | 2,71 | (1,96; 3,46) |
| VTDR | 1 806 | 54 | 2,99 | (2,2; 3,78) |

Tabuľka 5. Celková prevencia diabetickej retinopatie u pacientov s DM 1. typu

| DM 1. typu | Celkovo (N) | Prípady (n) |
|---------------|-------------|-------------|
| Všetci | | |
| Akákoľv. DR | 295 | 86 |
| PDR | 295 | 10 |
| DEM | 295 | 12 |
| VTDR | 295 | 17 |
| Muži | | |
| Akákoľv. DR | 141 | 42 |
| PDR | 141 | 5 |
| DEM | 141 | 5 |
| VTDR | 141 | 8 |
| Ženy | | |
| Akákoľv. DR | 154 | 44 |
| PDR | 154 | 5 |
| DEM | 154 | 7 |
| VTDR | 154 | 9 |

mení, pravdepodobne v súvislosti so zlepšenou zdravotnou starostlivosťou o pacientov s DM, a aj štúdie ako DIARET SK môžu poskytnúť lepší prehľad o týchto zmenách. V tejto štúdii bola prevencia akejkoľvek DR u pacientov s DM 2. typu 15,5 % a pre VTDR bola 3,35 %. U pacientov s DM 1. typu bola prevencia akejkoľvek DR 29,15 % a pre VTDR bola 5,76 %. Tieto čísla sú nízke v porovnaní s prevenciou DR pozorovanou vo švédskych aj v dánskej populácii. Vo švédskych štúdiách bola prevencia akejkoľvek DR 27,9 % pri DM 2. typu a 41,8 % pri DM 1. typu, v dánskej štúdii bola prevencia 21,2 % u pacientov s DM 2. typu a 54,3 % s DM 1. typu^(7,8). Výsledky systematického skríningu realizovaného v Liverpoole ukázali podiely pacientov s DR a VTDR 25,3 % a 6 % u pacientov s DM 2. typu a 45,7 % a 16 % u pacientov s DM 1. typu⁽⁹⁾. V národnom skríningu vo Walese bol podobný počet prípadov DR a VTDR, a to 30,3 % a 2,9 % u pacientov s DM 2. typu a 56 % a 11,2 % u pacientov s DM 1. typu⁽¹⁰⁾. Aj výsledky nedávno realizovanej štúdie Romero-Aroca, et al. v Španielsku preukázali vyššiu prevenciu DR (47,26 % u pacientov s DM 2. a 1. typu)⁽¹¹⁾. Dáta zo štúdie DIARET SK naznačujú, že muži s DM majú mierne vyššiu prevenciu DR bez ohľadu na typ ochorenia v porovnaní s pacientkami ženami (16,70 vs 13,79). Podobné zistenia boli hlásené aj v štúdiách z Liverpoolu (pomer šancí [OR] muži: 2,15, 95 % IS 1,39 – 3,31; P = 0,001), Wales (DM 2. typu: 59,1 % vs 40,9 %; DM 1. typu: 54,7 % vs 45,3 %), a švédske štúdie (30,9 % vs 27,4 %)⁽⁸⁻¹⁰⁾. V štúdii DIARET bola

vysoká prevencia DEM u pacientov s trvaním DM > 15 rokov bez ohľadu na typ DM. Prevencia DEM bola v predchádzajúcich publikovaných populačných štúdiách rôzna. V dánskej štúdii publikovanej v roku 2006 bola prevencia DEM 12,8 % u pacientov s DM 2. typu a 7,9 % u pacientov s DM 1. typu⁽¹²⁾, v Austrálii 7,6 % pre oba typy DM⁽¹³⁾, v Kanade 15,7 % pre oba typy DM⁽¹⁴⁾ a v Nórsku 3,9 % pre oba typy DM⁽¹⁵⁾. Výsledky našej štúdie ukazujú prevenciu DEM medzi 0,92 % – 17,62 % pre DM 2. typu a medzi 1,47 % – 9,09 % u pacientov s DM 1. typu v závislosti od rokov trvania DM. DIARET SK je prvá rozsiahla, dobre kontrolovaná epidemiologická štúdia, ktorá hodnotila prevenciu DR na základe FP a OCT. Použitie OCT bolo veľkou výhodou v štúdii, pretože je presnejšia na diagnostiku DEM ako FP. Preto dáta o DEM zahrnuté v tejto štúdii sú spoľahlivé a presné. Pokiaľ je nám známe, zatiaľ nebola publikovaná žiadna iná epidemiologická štúdia s takým vysokým počtom pacientov s použitím OCT na diagnostiku DEM. Hlavnou silnou stránkou tejto štúdie je veľká vzorka pacientov. Štúdia DIARET SK je prvá a jediná štúdia, ktorá ponúka pohľad na prevenciu DR na Slovensku. Výsledky tejto štúdie môžu slúžiť na porovnanie so štúdiami v iných populáciách, a zároveň lepšie porozumenie tohto ochorenia ohrozujúceho zrak. Zároveň sa môžu využiť do budúcnosti ako podklad pre hľadanie inovatívnych spôsobov manažovania pacientov s DM, plánovanie a zavedenie nákladovo efektívnych celonárodných skríninových programov u pacientov s DM, ktoré Slovensko momentálne nemá implementované v oblasti verejného zdravia.

Podakovanie: 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.

MUDr. Marta Ondrejková, PhD.: Potvrďujem, že som dostala finančnú podporu od farmaceutických spoločností Novartis a Bayer ako členka Advisory Boardu a investigátor v klinických štúdiách.

MUDr. Monika Gajdošová: Spolupracujem s farmaceutickými spoločnosťami Novartis, Bayer, Allergan a Zeiss ako konzultant. Som členka Advisory Boardu spoločností Novartis, Bayer, Allergan a hlavná skúšajúca vo viacerých klinických štúdiách.

MUDr. Iveta Tvrdá a MUDr. Jana Fabková: Potvrďujeme, že sme zamestnankyne medicínskeho oddelenia spoločnosti Novartis Slovakia, s. r. o., Žižkova 22B, Bratislava.

LITERATÚRA

- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. Bull World Health Organ 2004; 82(11): 844-8451.
- IDF DIABETES ATLAS – 8TH EDITION. Dostupné na: <http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html> (prístup 28. október 2019).
- Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. Lancet 2010; 376(9735): 124-136.
- Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. JAMA 2007; 298(8): 902-916.
- Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. Diabetes Care 2012; 35(3): 556-564.

- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs – an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Ophthalmology 1991; 98: 786-806.
- Larsen MB, Henriksen JE, Grauslund J, et al. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in 17 152 patients from the island of Funen, Denmark. Acta Ophthalmol 2017; 95(8): 778-786.
- Heintz E, Wirehn AB, Peebo BB, et al. Prevalence and healthcare costs of diabetic retinopathy: a population-based register study in Sweden. Diabetologia 2010; 53(10): 2147-2154.

9. Younis N, Broadbent DM, Harding SP, et al. Prevalence of diabetic eye disease in patients entering a systematic primary care-based eye screening programme. *Diabet Med* 2002; 19(12): 1014-1021.
10. Thomas RL, Dunstan FD, Luzio SD, et al. Prevalence of diabetic retinopathy within a national diabetic retinopathy screening service. *Br J Ophthalmol* 2015; 99(1): 64-68.
11. Romero-Aroca P, Navarro-Gil R, Valls-Mateu A, et al. Differences in incidence of diabetic retinopathy between type 1 and 2 diabetes mellitus: a nine-year follow-up study. *Br J Ophthalmol* 2017; 101(10): 1346-1651.
12. Knudsen LL, Lervang HH, Lundbye-Christensen S, et al. The North Jutland County Diabetic Retinopathy Study: population characteristics. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(11): 1404-1409.
13. Kaidonis G, Mills RA, Landers J, et al. Review of the prevalence of diabetic retinopathy in Indigenous Australians. *Clin Exp Ophthalmol* 2014; 42(9): 875-882.
14. Petrella RJ, Blouin J, Davies B, et al. Demographics, and Treatment Characteristics of Visual Impairment due to Diabetic Macular Edema in a Representative Canadian Cohort. *J Ophthalmol* 2012; 2012: 159167.
15. Bertelsen G, Peto T, Lindekleiv H, et al. Tromso eye study: prevalence and risk factors of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2013; 91(8): 716-721.



MUDr. Marta Ondřejková, PhD.
Špecializovaná nemocnica v odbore oftalmológia Zvolen
Kuzmányho nábrežie 28, 960 01 Zvolen
e-mail: marta.ondrejкова@oftal.sk

KLIENSKA ZÓNA

VŠETKO, ČO POTREBUJETE, V JEDNEJ DÁVKE



- osobné konto prispôbené na mieru
- dostupnosť informácií 24 hodín/7 dní v týždni
- online výsledky laboratórných 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

Využitie proteomiky pri diagnostike a monitoringu ochorení

Veronika Lukáčová

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

V súčasnosti sú imunodetekčné techniky zavedeným štandardom na identifikáciu a kvantifikáciu bielkovín vo vzorkách v klinickej diagnostike. Napriek tomu však majú svoje obmedzenia, ako je detekcia viacerých analytov súčasne. Moderné proteomické prístupy založené na hmotnostnej spektrometrii sú v porovnaní s imunodetekčnými technikami citlivejšie, dokážu tiež pracovať s malými objemami vzoriek a rýchlo podať potrebnú informáciu o ich proteínovom zložení. Z uvedených dôvodov je hmotnostná spektrometria veľmi vhodnou metódou na identifikáciu známych, ale aj nových biomarkerov v klinických vzorkách. Tie sú významnými ukazovateľmi aktuálneho stavu pacienta. Práve preto zavedenie hmotnostnej spektrometrie do proteomickej analýzy v klinickom laboratóriu vedie ku skvalitneniu diagnostických metód.

Kľúčové slová: hmotnostná spektrometria, proteomika, biomarkery, diagnostika

Proteomics in the diagnostics and monitoring of diseases

Immunodetection techniques are established standards for the identification and quantification of proteins in samples in clinical diagnostics. However, they have limitations, such as the detection of multiple analytes at the same time. Modern proteomic approaches based on mass spectrometry are more sensitive than immunodetection techniques. They can also work with small sample volumes and quickly provide the necessary information about their protein composition. For the above reasons, mass spectrometry is a very suitable method for identifying both known and novel biomarkers in clinical specimens. These are essential indicators of the patient's current condition. It is the reason why the introduction of mass spectrometry into proteomic analysis in a clinical laboratory leads to improved diagnostic methods.

Keywords: mass spectrometry, proteomics, biomarkers, diagnostics

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 20 – 23

V klinickej praxi sa neustále zvyšuje význam laboratórneho vyšetrenia na zistenie aktuálneho stavu pacienta. Jedným z nich je identifikácia proteínov v klinických vzorkách, ktorá vedie k diagnostike chorého pacienta. Moderné proteomické prístupy založené na hmotnostnej spektrometrii pomáhajú zisťovať zmeny bielkovinového zloženia biologických vzoriek alebo monitorovať proces liečby po podaní účinných látok. V neposlednom rade dávajú možnosť identifikovať biomarkery nádorových aj nenádorových ochorení v jednoducho dostupnom klinickom materiáli. Čoraz častejšie sa kladie dôraz na ich zavedenie do klinického laboratória, pretože sú citlivejšie v porovnaní so zaužívanými diagnostickými technikami.

Proteomika a hmotnostná spektrometria

Proteomika, vychádzajúca z proteínovej chémie, je od svojho vzniku v 90. rokoch 20. storočia veľmi rýchlo sa rozvíjajúcou vednou disciplínou, ktorá sa venuje štúdiu proteómu. Pod pojmom proteóm chápeme súbor všetkých proteínov v organizme, na rozdiel od genómu je však proteóm dynamický a jeho zloženie sa v bunke mení v závislosti od času, miesta alebo fyziologického stavu. Pojem proteóm prvýkrát použil Marc Wilkins v roku 1994 pri charakterizácii bielkovín patogénnej baktérie, pričom pod týmto pojmom rozumel proteínový komplement genómu⁽¹⁾.

Hmotnostná spektrometria je analytickou technikou, ktorá využíva separáciu nabitých častíc v elektrickom alebo magnetickom poli podľa pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Táto citlivá technika sa v spojení s chromatografickými

prístrojmi využíva v klinickej praxi na identifikáciu a kvantifikáciu malých molekúl, ako sú liečivá, metabolity, drogy, pesticídy alebo toxíny. V posledných rokoch sa však hmotnostná spektrometria využíva aj na analýzu väčších molekúl, peptidov a proteínov. Umožnilo to najmä zavedenie tzv. mäkkých ionizačných techník, napr. MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) a ESI (*Electrospray Ionization*). Ako prvá sa do zdravotníckej praxe etablovala technika MALDI-MS, ktorá sa využíva v klinickej mikrobiológii na rýchlu identifikáciu baktérií⁽²⁾. Pre jednotlivé bakteriálne kolónie sú vytvorené hmotnostné spektrá dominantných bielkovín a iných biomolekúl, ktoré predstavujú akýsi unikátny „odtlačok prsta“ skúmaného organizmu. Jeho softvérovým porovnaním s databázou referenčných spektier môžeme následne rýchlo získať jeho mikrobiologickú identitu.

Proteomika, ktorá za posledných 30 rokov prešla vývojom ohľadne citlivosti, presnosti, výkonu a dynamického rozsahu, predstavuje v súčasnosti perspektívne riešenie pre mnohé klinické otázky⁽³⁾. Spoločne s hmotnostnou spektrometriou umožňuje meranie absolútneho alebo relatívneho zastúpenia tisícov proteínov v jednej vzorke. Tie sú, ako už bolo spomenuté, v organizme variabilné a ich množstvo je dynamické. Preto niektoré z detegovaných proteínov, tzv. biomarkery, môžu slúžiť ako indikátory konverzie biologických procesov na patogénne alebo farmakologické odpovede na terapeutický zásah. V súčasnosti sa hmotnostná spektrometria okrem proteomiky využíva aj v toxikológii, testovaní liečiv alebo v operačných sálach, kde je chirurgický nôž pripojený

k hmotnostnému spektrometru, pričom je schopný rozlišovať medzi zdravým a rakovinovým tkanivom⁽⁴⁾. Hmotnostná spektrometria aplikovaná v toxikológii je schopná identifikovať vyššie percento vzoriek pozitívnych na omamné látky v porovnaní s imunodetekciou⁽⁵⁾.

Spracovanie vzorky

Cieľom proteomickej analýzy je popis čo najväčšieho množstva proteínov vo vzorke. Tie musia byť najprv enzymaticky rozštiepené na peptidy, pričom si zachovávajú vnútornú aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je potrebná na identifikáciu bielkoviny. Zmes peptidov môže byť následne separovaná na kvapalinovom chromatografe s priamou analýzou na tandemovom hmotnostnom spektrometri (LC-MS/MS). Získané hmotnostné spektrá predstavujú veľké objemy dát, na ktorých spracovanie sa využíva bioinformatika. Pomocou nej sú zo spektier odvodené aminokyselinové sekvencie proteínov, ktoré vzorka pôvodne obsahovala (**obrázok 1**). Použitím tohto prístupu možno identifikovať napr. v HeLa bunkách okolo 4 800 rôznych proteínov počas jednej LC-MS/MS analýzy trvajúcej 140 minút⁽⁷⁾.

V klinických laboratóriách sa na diagnostiku mnohých ochorení bežne používajú vzorky krvnej plazmy, tkaniva alebo moču. Napríklad, bielkovina fetuín-A v moči slúži ako biomarker na stanovenie rizika tvorby obličkových kameňov. Štúdia vedcov z Iránu ukázala, že hodnoty fetuínu-A v moči a pravdepodobnosť vzniku obličkových kameňov medzi sebou inverzne korelujú⁽⁸⁾.

Vyšetrenie sa dá robiť aj zo slín alebo iných biologických tekutín. V prípade vzoriek slín bolo objavených päť predpokladaných biomarkerov (MMP1, PADI1, TNC, CSTA a MMP3), ktoré mali výrazne zmenené hladiny proteínov pri porovnaní zdravých jedincov a pacientov s rakovinou ústnej dutiny. Vo vzorkách krvnej plazmy v tomto prípade neboli pozorované zmeny v hladinách proteínov⁽⁹⁾.

Veľmi dôležitým aspektom, ktorý treba brať do úvahy, je dynamický rozsah koncentrácie jednotlivých bielkovín. Bohato zastúpené proteíny sťažujú identifikáciu ďalších proteínov v tej istej vzorke, ktoré sú oproti nim vo veľmi malom množstve. Príkladom najkomplexnejšieho proteómu v ľudskom tele je krvná plazma. Pri jej proteomickej analýze bolo identifikovaných viac ako 5 000 proteínov⁽¹⁰⁾. Práve jej bohaté zloženie však robí jej analýzu náročnou v klinickom laboratóriu, keď sa dôraz kladie nielen na presnosť, ale aj na rýchlosť

analýzy. Najviac zastúpeným proteínom v krvnej plazme je sérový albumín (koncentrácia 35 – 50 mg/ml), naopak, najmenej zastúpeným je interleukín-6 (koncentrácia 0 – 5 pg/ml), pričom rozdiel v ich koncentráciách je až 10 rádo⁽¹¹⁾. Väčšinu, až 99 % plazmy, tvorí 22 najzastúpenejších proteínov⁽¹²⁾. K zvyšnému 1 % patria aj sekretované proteíny pochádzajúce z viacerých orgánov ľudského tela. Práve preto je krvná plazma veľmi dobrým modelom na identifikáciu biomarkerov. Pri proteomickej analýze krvnej plazmy použil Geyer a kol. objem 1 µl, pričom boli schopní identifikovať viac než 300 proteínov počas extrémne krátkeho času merania (20 min.). Cieľom analýzy od odobratia vzorky až po vyhodnotenie výsledkov trvala okolo troch hodín. Z identifikovaných proteínov až 49 patrilo medzi biomarkery schválené Americkým úradom pre kontrolu potravín a liečiv⁽¹³⁾.

Hmotnostná spektrometria vs imunodetekcia

Hmotnostná spektrometria poskytuje veľmi dobré výsledky v porovnaní s tradičnými imunodetekčnými technikami. Napriek tomu, že ELISA testy sú v klinickej praxi zavedeným štandardom pre kvantifikáciu proteínov, majú obmedzenie v detekcii viacerých analytov súčasne a nie sú špecifické pre proteínové izoformy. V prípade použitia sekundárnych protilátok môže tiež dochádzať k nešpecifickému signálu.

Príkladom lepších výsledkov hmotnostnej spektrometrie v porovnaní s imunodetekciou môže byť sledovanie hladiny tyreoglobulínu v krvi⁽¹⁴⁾. Tyreoglobulín je proteín využívaný ako biomarker na hodnotenie účinnosti liečby pri rakovine štítnej žľazy a tiež na zisťovanie, či nedochádza k jej recidíve. Približne 25 % pacientov trpiacich týmto ochorením je však pozitívnych na prítomnosť antityreoglobulínových protilátok, čo môže spôsobovať falošnú negativitu vyšetrenia v prípade použitia imunodetekcie. Hmotnostná spektrometria tiež odstraňuje falošnú pozitivitu výsledku, ktorú môžu spôsobovať heterofilné protilátky⁽¹⁵⁾. Ďalším príkladom, keď sa môže získať nesprávny výsledok z dôvodu prítomnosti heterofilných protilátok, je stanovenie hladiny troponínu I, ktorý je dôležitý pri diagnostike akútneho infarktu myokardu⁽¹⁶⁾. Čas potrebný na inkubáciu protilátok so vzorkou pri využití techniky ELISA je porovnateľný s časom analýzy vzorky na hmotnostnom spektrometri⁽¹⁷⁾. V prípade Western blot analýzy, ktorá sa tiež používa v klinickom laboratóriu, je problémom kvantifikácia identifikovaného proteínu⁽¹⁸⁾.

Obrázok 1. Schéma pracovného postupu proteomickej analýzy. Klinické vzorky od pacientov sú po odobratí spracované podľa ich typu. Proteíny v nich sú enzymaticky rozštiepené na peptidy a analyzované LC-MS/MS. Zaznamenané dáta sú bioinformaticky spracované, pričom poskytujú informáciu o stave pacienta⁽⁶⁾.



Využitie proteomiky v diagnostike závažných ochorení

Biomarkery sú neoceniteľnými nástrojmi na detekciu, diagnostiku a prognózu ochorenia a v neposlednom rade tiež výber adekvátnej liečby pre pacienta. Práve hmotnostná spektrometria je veľmi vhodnou platformou na rýchlu identifikáciu známych biomarkerov a taktiež identifikáciu nových. Jej hlavnou výhodou je v tomto prípade možnosť identifikácie veľkého množstva proteínov v jednom experimente.

Príkladom biomarkera, ktorého hladina sa dá veľmi dobre sledovať pomocou hmotnostnej spektrometrie, je proteín lipokalín asociovaný so želatínázou neutrofilov (NGAL)⁽¹⁹⁾. Ten je včasným indikátorom akútneho poškodenia obličiek, pretože je jeden z prvých proteínov, ktorého koncentrácie v moči sa rýchlo zvyšujú po ischemických alebo nefrotoxických podnetoch. Na porovnanie, hladina kreatinínu sa zvyšuje až 72 hodín od poškodenia, keď už môže dochádzať k funkčnému zlyhaniu obličiek. Stanovenie množstva bielkoviny NGAL má veľký význam u pacientov po závažných chirurgických zákrokoch alebo u pacientov, ktorí prídu v kritickom stave na pohotovosť a u ktorých je podozrenie, že mohlo dôjsť k poškodeniu obličiek.

Rakovina je druhou najčastejšou príčinou úmrtí na celom svete. V roku 2018 bola zodpovedná za 9,6 milióna úmrtí, teda približne za každé šieste úmrtie⁽²⁰⁾. Je študovaná hlavne na genomickej úrovni, proteomika sa však javí ako veľmi sľubná komplementárna technológia, pretože umožňuje náhľad na proteínovej úrovni. Napríklad pri rakovine vaječníkov bolo zistené, že proteín CT45 je markerom pri pozitívnej odpovedi na chemoterapiu⁽²¹⁾. Jedným z najzávažnejších ochorení je rakovina žalúdka, pri ktorej je miera prežitia len niečo vyše 30 %⁽²²⁾. Preto je skorá diagnostika mimoriadne dôležitá. V skorom štádiu je jej priebeh takmer bezpríznakový a do dnešného dňa nebol objavený vhodný biomarker pre počiatočné štádium tohto ochorenia. Nedávna štúdia krvnej plaz-

my však odhalila 11 proteínov, ktoré by v budúcnosti pomohli odlišiť pacientov s ochorením rakoviny žalúdka od zdravých jedincov⁽²³⁾. Hmotnostná spektrometria predstavuje nádej aj pre pacientov, u ktorých nebola účinná chemoterapia. Tím vedcov z Nemecka odobral vzorky tkaniva z pľúcnych metastáz pacienta s urachálnym karcinómom. Pri porovnaní so zdravým pľúcny tkanivom boli odhalené viaceré proteíny s výrazne zvýšeným zastúpením v metastázovom tkanive. Jedným z nich bola histónová demetyláza LSD1, ktorá už bola identifikovaná pri iných druhoch rakoviny. Pred podaním vhodnej liečby v podobe inhibítora proteínu LSD1 boli objavené metastázy aj v pečeni pacienta a už sa ho nepodarilo zachrániť. Napriek tomu, táto štúdia poskytla rýchlu a reprodukovateľnú možnosť aplikácie hmotnostnej spektrometrie do klinického laboratória. Môže byť vhodná aj pre pacientov, u ktorých nezabrali iné druhy liečby. Celková analýza, od spracovania vzorky až po vyslovenie záverov, trvala len dva dni⁽²⁴⁾.

Záver

Práve vďaka aplikácii hmotnostnej spektrometrie a proteomiky bol v posledných desaťročiach zaznamenaný značný pokrok v diagnostike a prognóze mnohých ochorení. Hmotnostná spektrometria dokáže pracovať s malými objemami vzoriek a rýchlo podať potrebnú informáciu o ich proteínovom zložení. V spojení s bioinformatikou je schopná identifikovať rozdiely v hladinách proteínov vo vzorkách pacientov a určiť tak nasledujúci postup liečby. Hmotnostná spektrometria má všetky predpoklady na to, aby sa úspešne etablovala do klinického laboratória a skvalitnila prístupy v diagnostických metódach.

Podakovanie: 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. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-1094.
2. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1614-1619.
3. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016; 537: 347-355.
4. Balog J, Szaniszló T, Schaefer KC, et al. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2010; 82: 7343-7350.
5. Kahl KW, Seither JZ, Reidy LJ. LC-MS-MS vs ELISA: Validation of a Comprehensive Urine Toxicology Screen by LC-MS-MS and a Comparison of 100 Forensic Specimens. *J Anal Toxicol* 2019; 43: 734-745.
6. Doll S, Gnad F, Mann M. The Case for Proteomics and Phospho-Proteomics in Personalized Cancer Medicine. *Proteomics Clin Appl* 2019; 13: e1800113.
7. Beck S, Michalski A, Raether O, et al. The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 2014-2029.
8. Mehraei A, Guitynavard F, Nikoobakht MR, et al. The relationship between serum and urinary Fetuin-A levels and kidney stone formation among kidney stone patients. *Cent European J Urol* 2017; 70: 394-399.

9. Chi LM, Hsiao YC, Chien KY, et al. Assessment of candidate biomarkers in paired saliva and plasma samples from oral cancer patients by targeted mass spectrometry. *J Proteomics* 2020; 211: 103571.
10. Keshishian H, Burgess MW, Gillette MA, et al. Multiplexed, quantitative workflow for sensitive biomarker discovery in plasma yields novel candidates for early myocardial injury. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 2375-2393.
11. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 845-867.
12. Pietrowska M, Wlosowicz A, Gawin M, et al. MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1073: 57-76.
13. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, et al. Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell Systems* 2016; 2: 185-195.
14. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, et al. Measurement of thyroglobulin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in serum and plasma in the presence of antithyroglobulin autoantibodies. *Clin Chem* 2013; 59: 982-990.
15. Netzel BC, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Usefulness of a thyroglobulin liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for evaluation of suspected heterophile interference. *Clin Chem* 2014; 60: 1016-1018.

16. Nørlund H, Bovin A. False positive troponin I due to heterophile antibodies. *Ugeskr Laeger* 2017; 179: V05170412.
17. <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
18. Aebersold R, Burlingame AL, Bradshaw RA. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12: 2381-2382.
19. Ji H, Xu L, Su J, et al. Absolute quantification of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin by UHPLC/MS/MS and the diagnostic efficacy of AKI. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2019; 34: e8637.
20. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
21. Coscia F, Lengyel E, Duraiswamy J, et al. Multi-level Proteomics Identifies CT45 as a Chemosensitivity Mediator and Immunotherapy Target in Ovarian Cancer. *Cell*. 2018; 175: 159-170.
22. <https://www.cancer.net/cancer-types/stomach-cancer/statistics>
23. Zhou B, Zhou Z, Chen Y, et al. Plasma proteomics-based identification of novel biomarkers in early gastric cancer. *Clin Biochem* 2020; 76: 5-10.
24. Doll S, Kriegmair MC, Santos A, et al. Rapid proteomic analysis for solid tumors reveals LSD1 as a drug target in an end-stage cancer patient. *Mol Oncol* 2018; 12: 1296-1307.



Mgr. Veronika Lukáčová

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Jána Bottu 2, 917 01 Trnava

e-mail: lukacova.veronika21@gmail.com

Nové prístupy k diagnostike lyzozómových ochorení na báze stanovenia voľných oligosacharidov v moči

Marek Nemčovič¹, Zuzana Pakanová¹, Anna Šalingová², Claudia Šebová², Mária Ostrožlíková², Ján Mucha¹

¹Centrum excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV, Bratislava

²Centrum dedičných metabolických ochorení, oddelenie laboratórnej medicíny NÚDCH, Bratislava

Diagnostika lyzozómových ochorení vyžaduje vysokopersonalizovaný prístup, pretože tieto ochorenia pokrývajú široké spektrum dedičných metabolických porúch s odlišnými molekulárnymi podstatami. Rýchlou a perspektívnou alternatívou sa popri tradičných metódach stáva štruktúrna analýza voľných oligosacharidov v moči pacientov pomocou MALDI TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie. Týmto novým diagnostickým prístupom sme presne definovali reprezentatívne profily voľných oligosacharidov obsiahnutých v moči, typické pre vybrané poruchy metabolizmu glykokonjugátov.

Kľúčové slová: diagnostika, glykogenózy, lyzozómové ochorenia, MALDI TOF/TOF

New approaches in the diagnosis of lysosomal storage disorders based on the determination of free oligosaccharides in urine

The diagnosis of lysosomal storage disorders requires a highly personalized approach as these diseases cover a wide range of hereditary metabolic disorders with highly specific and different molecular bases. In addition to traditional methods, structural analysis of free oligosaccharides in patients' urine using MALDI TOF/TOF mass spectrometry is a fast and reliable alternative. This new diagnostic approach defines representative profiles of free oligosaccharides in urine typical for selected disorders of glycoconjugate metabolism, determined with high accuracy.

Keywords: diagnostics, glycogenoses, lysosomal storage disorders, MALDI TOF/TOF

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 24 – 26

Úvod

Napriek odhadovanému predpokladu, že zriedkavými ochoreniami trpí na Slovensku až 300 000 ľudí⁽¹⁾, molekulová podstata týchto ochorení je mnohokrát unikátna, a preto ich diagnostika vyžaduje maximálne personalizovaný prístup. Lyzozómové ochorenia (z angl. Lysosomal Storage Disorders – LSD) tvoria širokú skupinu zriedkavých dedičných metabolických ochorení, v rámci ktorej ich rozdeľujeme na:

A.) poruchy v štiepení a degradácii glykánov a glykoproteínov (napr. alfa- a beta-manozidóza, sialidóza), glykolipidov (napr. GM1 gangliosidóza, Gaucherova a Fabryho choroba), glykozaminoglykánov (napr. MPS I-III) a mukopolysacharidov (napr. MPS IV), B.) poruchy v štiepení a degradácii lipidov – sfingolipidov (napr. Niemann Pick typu A alebo B) a triacylglyceridov, C.) poruchy v degradácii proteínov a D.) poruchy lyzozómových transportných proteínov (napr. mukolipidózy III a IV)⁽²⁾.

Jednotlivé LSD sú sprevádzané hromadením nedegradovaných produktov v tkanivách a glykokonjugátov v moči v dôsledku nedostatočnej aktivity lyzozómových degradačných enzýmov (hydroláz). Niektoré z nich, napr. voľné oligosacharidy obsiahnuté v moči (z angl. free oligosaccharides – FOS), majú charakteristický profil, špecifický pre dané ochorenie. FOS možno detegovať rýchlou, presnou a neinvazívnou diagnostickou metódou – tandemovou hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF/TOF, ktorá presne definuje štruktúrne zloženie nahromadených oligosacharidov v moči a predstavuje alternatívu tradičných skríningových techník, ako je metóda tenkovrstvovej chromatografie (TLC), ktorej

identifikácia metabolitov spočíva v porovnávaní pohyblivosti FOS nachádzajúcich sa vo vzorke so štandardnou zmesou oligosacharidov s 1 – 9 hexóзовými jednotkami. Táto metóda je vhodným prvotným skríningovým prístupom, v prípade hraničného, resp. pozitívneho výsledku je však ďalšia charakterizácia pozorovaného profilu esenciálna. Na rozlíšenie, či kumulované FOS pochádzajú zo stravy alebo sú tvorené patologickými, špecifickými metabolitmi, predstavuje vhodné využitie vysokorobustná MALDI TOF/TOF analýza.

LSD ochorenia sú typické multisystémovými klinickými príznakmi s trvalou progresiou v dôsledku neustáleho hromadenia nedegradovaného substrátu. Niektoré príznaky sa môžu spočiatku javiť ako nevýznamné, resp. typické pre inú či bežnejšiu chorobu (napríklad vracanie, hypoglykémia, hypotónia, letargia, kŕče, hluchota, všeobecné neprospevanie, psychomotorická retardácia) a môžu sa prejavovať v akomkoľvek veku, od fetálneho obdobia až po senium. Kombinovaná prevalencia LSD predstavuje až 1 : 5 000 živonarodených⁽³⁾, a preto je ich včasná a spoľahlivá diagnostika esenciálnym faktorom ovplyvňujúcim život pacientov a ich rodín. Oddelenie glykobiológie Chemického ústavu SAV v spolupráci s Centrom dedičných metabolických porúch NÚDCH v Bratislave zaviedlo a optimalizovalo analytickú metódu na stanovenie profilov voľných oligosacharidov v moči, ktorá v porovnaní s tradičnými konvenčnými metódami disponuje vysokou presnosťou, špecificitou, citlivosťou a môže byť použitá okrem prvotného diagnostického prístupu aj v prípade monitorovania účinnosti terapie.

Materiál a metóda

Vzorky moču odobraté od pacientov s rôznymi lyzozómovými ochoreniami (beta-manozidóza, alfa-manozidóza, rôzne typy mukopolysacharidóz, mukolipidóza, gangliozidóza I. a II. typu, sialidóza) a glykogenózou II. typu (Pompeho choroba), resp. od zdravých fyziologických jedincov ako negatívnych kontrol, boli uchovávané pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do ich spracovania. Riedený moč bol po odstránení nerozpustného sedimentu lyofilizovaný a takto vysušené vzorky sa derivatizovali permetyláciou (PerMe) s jódmetanom v zásaditom prostredí NaOH, ktorého nadbytok bol následne odstránený extrakciou s chloroformom. Pripravené PerMe FOS sa po vysušení rekonštituovali do 50 % metanolu a v pomere 1 : 1 s matricou 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinou sa naniesli na MALDI platničku. Analýza PerMe FOS sa uskutočnila na tandemovom hmotnostnom spektrometri (UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF, Bruker Daltonics, MA, USA) v reflektro-nom pozitívnom iónovom móde. Postanalytická interpretácia nameraných spektier bola spracovaná softvérom GlycoWorkbench a ProteinScape 3. 0.

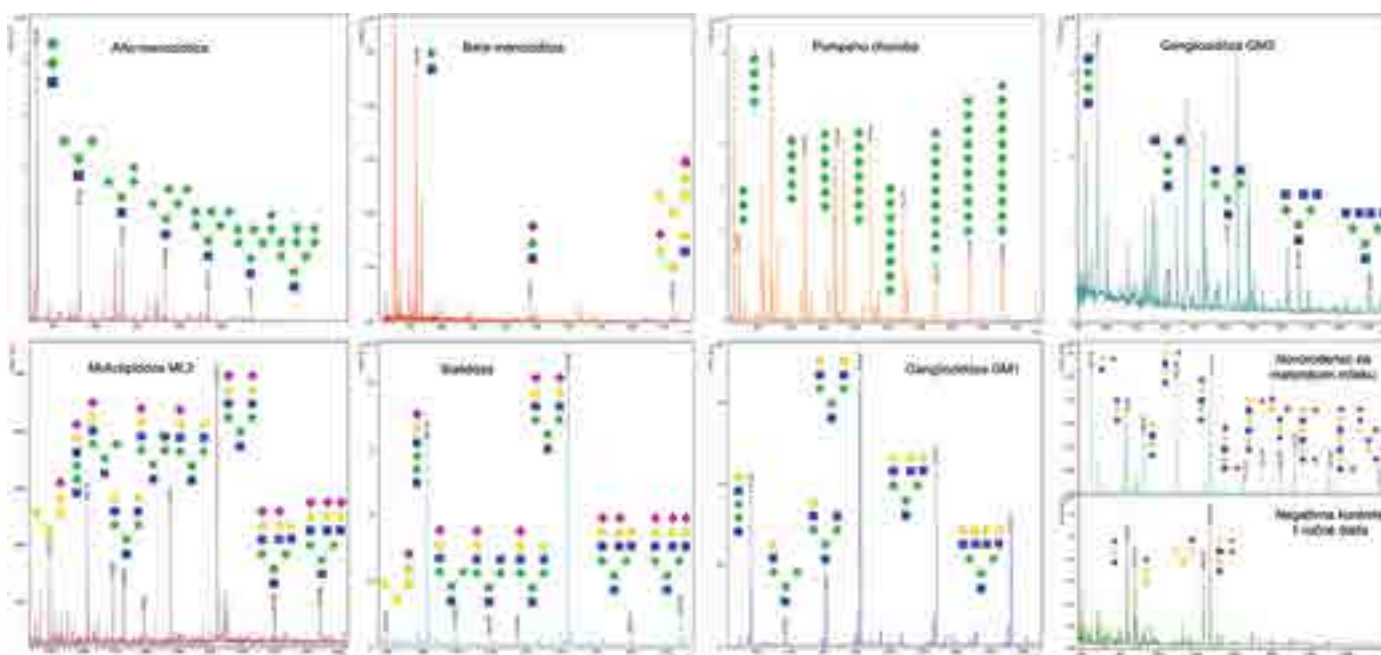
Výsledky

Analýzou permetylovaných FOS boli stanovené charakteristické močové profily pre 7 vybraných LSD. V spektrách FOS kontrolných vzoriek (zdravé kontroly) bolo pozorovaných niekoľko štandardných voľných oligosacharidov, ktoré sú prítomné medzi všetkými vekovými skupinami, najmä m/z 838,40, 879,43, 1 240,61 a 1 274,62. V spektrách novorodencov na materskom mlieku sa potvrdili špecifické FOS pochádzajúce z materského mlieka. Získané výsledky analýz profilov FOS sú v zhode s dátami publikovanými v literatúre^(4,5).

FOS reprezentatívnych profilov LSD (**obrázok 1**), získané analýzou MALDI TOF/TOF permetylovaných oligosacharidov obsiahnutých v moči pacientov, predstavujú typické zloženie oligosacharidov vyplývajúce z nefunkčnosti alebo nižšej aktivity špecifických lyzozómových hydroláz:

- **Alfa-manozidóza (MAN2B1)** – v dôsledku tejto poruchy katabolizmu glykokonjugátov dochádza k akumulácii viacjednotkových manóz naviazaných na β -N-acetylhexozamín z redukujúceho konca oligosacharidu.
- **Beta-manozidóza (MANBA)** – prítomné charakteristické spektrum s nadbytkom disacharidu Man(β 1-4)GlcNAc a sialylovaného trisacharidu NeuAc(α 2-6)Man(β 1-4)GlcNAc vzniká pravdepodobne netypickou sialyzáciou prekursora Man(β 1-4)GlcNAc. V prípade diagnostiky beta-manozidózy je dôležité rozlíšiť štruktúry týchto špecifických di- a trisacharidov od tých, ktoré môžu byť exogénneho pôvodu (laktóza, sialyllaktóza) a vylúčiť tak falošne pozitívny výsledok.
- **Pompeho choroba (GAA)** – v dôsledku poruchy degradácie glykogénu na monoglukózové jednotky dochádza k akumulácii polyhexóz od tetrasacharidu Glc4 (Glc α 1-6Glc α 1-4Glc α 1-4Glc) po Glc8.
- **Gangliozidóza GM2 ((HEXA) (HEXB))** – charakteristický profil FOS reprezentujú oligosacharidy s terminálnymi GlcNAc v dôsledku zníženej degradácie β -N-acetylgalaktózamínu z neredukujúceho konca oligosacharidu nefunkčnou hexozaminidázou.
- **Mukolipidóza ML2 (GNPTAB)** – v spektre sa pozoruje hromadenie rôznych FOS s variabilnými terminálnymi monosacharidmi – manózami, galaktózami či sialovými kyselinami v dôsledku nedostatočnej funkcie niektorých lyzozómových hydroláz, napr. sialidáz, beta-galaktosidáz

Obrázok 1. Charakteristické hmotnostné spektrá FOS reprezentatívnych LSD profilov (alfa-manozidózy, beta-manozidózy, Pompeho choroby, gangliozidózy GM2, mukolipidózy ML2, gangliozidózy GM1 a sialidózy) a zdravých kontrol (1- a 2-ročné dieťa).



◆ Sialová kyselina, ▲ Fukóza, ● Manóza, ● Galaktóza, ■ N-acetyl-glukóзамín, ■ N-acetyl-galaktóзамín

alebo alfa-manozidáz, enzýmov využívajúcich produkty GlcNAc-fosfotransferázy (GNTP) – fosforylované manózy.

- **Gangliozidóza GM1 (GLB1)** – charakteristické spektrum v dôsledku nefunkčnej beta-galaktozidázy predstavuje akumuláciu galaktozylovaných FOS. Pozorovaný rozdiel v GM1 a GM2 FOS profiloch jednoznačne poukazuje na konkrétne miesto prerušenia príslušnej metabolickej dráhy, a tak umožňuje tieto dve gangliozidózy špecificky rozlíšiť.
- **Sialidóza (NEU1)** – v hmotnostnom spektre moču sú prítomné dominantné sialylované FOS. Profil je na prvý pohľad podobný ako pri mukopolidóze ML2, v prípade sialidózy sú však všetky kumulované oligosacharidy zakončené kyselinou sialovou.

Diskusia

Analýza voľných oligosacharidov v moči 7 referenčných vzoriek LSD pacientov s využitím hmotnostnej spektrometrie (MALDI TOF/TOF) identifikovala štruktúrne zloženie prítomných oligosacharidov. Určením presnej štruktúry oligosacharidov v súčinnosti s používanými skríniniovými technikami je účinná a rýchla metóda v diagnostike vybraných lyzozómových ochorení pred následnou molekulárnogenetickou analýzou. Jej výhoda, okrem vysokej citlivosti a presnosti, spočíva v predpoklade jednoduchej automatizácie na 96- i viacjamkový formát, čo môže byť využité v prípade celoplošného alebo novorodeneckého skríningu.

Od dostupnosti vzoriek závisí profilovanie a vytváranie referenčných databáň voľných oligosacharidov obsiahnutých vo vzorkách pacientov týchto ochorení. Charakterizujeme prítomnosť špecifických voľných oligosacharidov v moči siedmich geneticky potvrdených LSD ochorení získaných z Centra dedičných metabolických porúch NÚDCH v Bratislave. Z medzinárodných databáz poznáme niekoľko ďalších LSD referenčných spektier, napr. pre fukozidózu, aspartylglukózaminúriu, Gaucherovo ochorenie a iné^(4,5). Pretože ide o veľmi zriedkavé ochorenia, možnosť pridávať referenčné FOS

profily je obmedzená v závislosti od počtu LSD diagnostikovaných pacientov. Napríklad k dnešnému dňu na Slovensku nie je žiadny pacient trpiaci fukozidózou. S neustále sa rozvíjajúcim spoľahlivým skríninom a včasným zachytním pacientov sa však postupne budú môcť pridávať FOS profily všetkých 60 LSD ochorení a bude sa môcť vypracovať podrobná štúdia, ktorá by pojednávala aj výsledky profilov FOS v závislosti od veku, progresu ochorenia, a pod. Spolupráca medzi lekármi a vedeckými laboratóriami prispieva k verifikácii a dôkladnejšiemu objasneniu nejednoznačných, resp. hraničných nálezov v selektívnom skríningu pre suspektné LSD.

Záver

Tenkovrstvová chromatografia (TLC) je v súčasnosti v klinických laboratóriách primárna a štandardne používaná metóda na analýzu voľných oligosacharidov v moči. TLC má limity v špecificite a citlivosti analýz a neposkytuje štruktúrnu analýzu oligosacharidov FOS, ktorá je často v diagnostike lyzozómových ochorení nevyhnutná. V sérii niekoľkých LSD ochorení a kontrolných vzoriek moču sme aplikovali metódy hmotnostnej spektrometrie MALDI TOF/TOF a určili sme štruktúry dominantných oligosacharidov pre vybrané subtypy. Prezentovaná metóda je významným prínosom v diagnostike LSD, urýchľuje rozhodovací diagnostický proces a v súčasnosti je už aj na Slovensku dostupná pre pacientov s podozrením na niektorú z uvedených lyzozómových chorôb.

Konflikt záujmov: Autori deklarujú, že nemajú žiadny konflikt záujmov, a zároveň čestne vyhlasujú, že práca nebola publikovaná v inom periodiku.

Podakovanie: Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4 a grantom č. 2/0130/18 Slovenskej grantovej agentúry pre vedu VEGA.

LITERATÚRA

1. <https://www.zriedkavechoroby.sk/zakladny-prehľad/co-su-zriedkave-choroby/>
2. Greiner-Tollesrud OK, Berg T. Lysosomal storage disorders. *Lysosomes* 2005; 60-73.
3. Schultz ML, Tecedor L, Chang M, et al. Clarifying lysosomal storage disorders. *Trends in Neuroscience* 2011; 34: 401-410.

4. Xia B, Asif G, Arthur L, et al. Oligosaccharide Analysis in Urine by MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. *Clinical Chemistry* 2013; 59(9): 1357-1368.
5. Michalski JC, Klein A. Glycoprotein lysosomal storage disorders: α - and β -mannosidosis, fucosidosis and α -N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1455(2-3): 69-84.



Ing. Marek Nemčovič, PhD.

Centrum excelentnosti pre glykomiku
Chemický ústav SAV
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
e-mail: marek.nemcovic@savba.sk

Laboratórna diagnostika karcinoidov

Zuzana Cingelová

Klinická biochémia, Medirex, a. s.

Karcinoidy sú relatívne vzácne nádory. Patria do skupiny neuroendokrinných tumorov, ktoré vychádzajú z neuroendokrinného tkaniva a majú určité spoločné charakteristiky. Rastú veľmi pomaly, rozmerovo sú malé, a preto bývajú často diagnostikované až v pokročilom štádiu. Nemusia ich sprevádzať prakticky žiadne príznaky alebo sú ich príznaky typické aj pre celý rad iných chorôb, preto odhalenie môže trvať celé mesiace až roky. Vzhľadom na to, že patria medzi endokrinne aktívne nádory a produkujú rôzne spektrum hormonálne aktívnych substancií, veľmi dôležitú úlohu hrá laboratórna diagnostika daných parametrov. Medzi najčastejšie hormonálne aktívne látky, ktorých hodnotu stanovujeme na našom pracovisku, patrí sérotonín, NSE, CgA v sére a 5-HIAA v moči. Špecifita a senzitivita daných markerov je veľmi vysoká, pri niektorých typoch karcinoidov skoro 100 %, a preto je veľmi potrebná pri včasnej diagnostike daných nádorov.

Kľúčové slová: karcinoid, sérotonín, NSE, CgA, 5-HIAA

Laboratory diagnosis of carcinoids

Carcinoids are quite rare tumours. They belong to the group of neuroendocrine tumours, which originate from neuroendocrine tissue and have some common characteristics. They grow very slowly and are small. Therefore, they are often diagnosed in the late stage of the disease. In addition, there are no specific clinical signs, so to find a correct diagnosis may take months or even years. As they belong to the active neuroendocrine tumours and produce different hormonal active substances, laboratory diagnosis of these parameters is very important. To the most common hormonal active substances there belong parameters, which are analysed in our laboratory such as serotonin, NSE, CgA in serum and 5-HIAA in the urine. Specificity and sensitivity of these parameters are very high, in some cases of carcinoid around 100% and so their analysis is very important in the early diagnosis of these tumours.

Keywords: carcinoid, serotonin, NSE, CgA, 5-HIAA

Newsrab, 2020; roč. 11 (1): 27 – 32

Úvod

Karcinoidy predstavujú svojrázny typ nádorov, ktoré sa štruktúrou, histologicky aj biologickým správaním líšia od bežných epitelových nádorov GIT-u. Patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce tumory zo skupiny neuroendokrinných nádorov (NET). Incidencia týchto nádorov v posledných rokoch výrazne stúpa. Z hľadiska svojej hormonálnej aktivity tvoria veľmi pestrú a heterogénnu skupinu. Ich základom sú neuroendokrinné enterochromafinné bunky (EC), ktoré sa vyskytujú v rôznych anatomických častiach tela, najčastejšie však v tráviacom trakte vrátane pankreasu, v pľúcach, menej často v ováriách či štítnej žľaze. Väčšinou ide o pomaly rastúce nádory. Často bývajú diagnostikované neskoro, v mnohých prípadoch už ako diseminované ochorenie. Karcinoidy môžu dlhší čas rásť asymptomaticky, môžu sa manifestovať onkologickými príznakmi alebo sa pri endokrinne funkčných nádoroch manifestujú karcinoidovým syndrómom. Klinické prejavy sú závislé od typu spektra hormonálne aktívnych substancií. Diagnóza karcinoidov je založená na použití zobrazovacích metód podľa lokalizácie nádoru, tiež na histologickom náleze a z laboratórnych vyšetrení na stanovení sérotonínu, chromogranínu A a neurónovej špecifickej enolázy (NSE) v sére a kyseliny 5-hydroxyindoloctovej (5-HIAA) v moči.

Epidemiológia karcinoidov

Karcinoidy sa vyskytujú v počte asi 1-2 prípady na 100 000 obyvateľov ročne. Tvoria len 0,49 % zo všetkých malignít. Predominantne sa vyskytujú u žien, vrchol výskytu je medzi 40. až 60. rokom veku. U detí nachádzame karcinoidy zriedka, a to najviac v apendixe⁽¹⁾.

Keďže nádory vyrastajú z neuroendokrinných buniek, frekvencia ich výskytu koreluje s hustotou týchto buniek. V najväčšom endokrinnom orgáne človeka, v čreve, sa nachádza približne 60 % karcinoidov. Viac ako 25 % karcinoidových nádorov rastie v bronchopulmonálnom trakte⁽²⁾.

Karcinoidy bývajú najviac lokalizované v tenkom čreve. Nádory tenkého čreva akéhokoľvek druhu sa vyskytujú zriedka a tvoria iba 1 % všetkých nádorov gastrointestinálneho traktu. V tejto skupine však karcinoidy majú významné postavenie svojím 50 % zastúpením medzi malignitami tenkého čreva. Rastú veľmi pomaly, rozmerovo sú pomerne malé, preto bývajú často diagnostikované až v pokročilom štádiu. Nemusia ich sprevádzať prakticky žiadne príznaky alebo sú ich príznaky typické pre celý rad iných chorôb, preto odhalenie môže trvať mesiace až roky. Výskyt karcinoidov podľa lokalizácie je uvedený v **tabuľke 1**. Existujú tiež veľmi neobvyklé a extrémne vzácne lokalizácie primárneho výskytu karcinoidov – žlčník a žlčové cesty, vaječníky, semenníky, močový mechúr, prostata, mliečna žľaza, týmus⁽³⁾.

Karcinoidy apendixu bývajú zo všetkých týchto nádorov najmenej zhubné, len zriedka vzdialene metastazujú. Bývajú diagnostikované náhodne pri chirurgickom výkone pre apendicitídu (asi 1/200 – 300 prípadov) a okolo 87 % ľudí s takto diagnostikovaným a odstráneným nádorom prežíva dlhšie ako 5 rokov. Druhú skupinu s dobrou prognózou tvoria karcinoidy rekta s 5-ročným prežívaním v 72 %. Ak sú však v čase stanovenia diagnózy prítomné vzdialené metastázy a pacient sa nelieči, klesá 5-ročné prežitie na hodnotu 27 %⁽³⁾.

Etiológia karcinoidov je prakticky neznáma. Vo väčšine prípadov sa vyskytujú sporadicky. Familiárny výskyt je veľmi zriedkavý, menej ako 1 % pacientov s karcinoidom má pozitívnu rodinnú anamnézu. Relatívne riziko vzniku karcinoidu počas života u pokrvného príbuzného je 3,6 %⁽⁴⁾.

Rozdelenie karcinoidov

Donedávna bola používaná schéma rozdelenia karcinoidov podľa klasifikácie Williamsa a Sandlera z roku 1963, ktorá sa opiera o rozdelenie nádorov podľa rôznych úsekov embryonálneho čreva a poukazovala na vzťah morfológie a topografie ich výskytu⁽⁵⁾.

Toto delenie sa pri súčasných poznatkoch javí ako prekonané, je však jednoduché, zrozumiteľné, a preto sa aj dnes s vedomím určitej nepresnosti používa v literatúre. Táto klasifikácia delí karcinoidy na tri skupiny – karcinoidy vychádzajúce z predného úseku embryonálneho čreva (foregut karcinoidy), karcinoidy zo stredného úseku (midgut karcinoidy) a karcinoidy zo zadného úseku embryonálneho čreva (hindgut karcinoidy)⁽¹⁾ (**tabuľka 2**).

Karcinoidy žalúdka

Predstavujú asi 2 – 4 % zo všetkých karcinoidov GIT-u a iba 0,3 % malígnych nádorov žalúdka⁽⁶⁾. Vznik žalúdočného karcinoidu sa dáva do súvislosti s iným ochorením žalúdka, pri ktorom dochádza k zvýšenej produkcii gastrínu. Ide predovšetkým o chronickú atrofickú gastritídu spojenú s enterálnou metapláziou žalúdočnej sliznice. Najčastejšia lokalizácia je fundus žalúdka⁽³⁾.

Bronchopulmonálne karcinoidy

Vyskytujú sa v 1 – 6 % zo všetkých primárnych pľúcnych neoplázií. Predstavujú 10 – 12 % všetkých karcinoidov. Vychádzajú z neuroendokrinných buniek lokalizovaných v bronchiálnej sliznici. Najčastejšie sa vyskytuje u mužov – 2,5/100 000. Z hľadiska biologických vlastností zahŕňajú benígnejšie formy v podobe typických karcinoidov až po

malígne atypické formy. Malobunkový pľúcny karcinoid je najmalígnejšou formou. Metastazuje v regionálnych mediastinálnych lymfatických uzlinách, v pečeni, vzácne v kostiach a koži. Pri produkcii ACTH dochádza k rozvoju Cushingovho syndrómu⁽⁷⁾.

Karcinoidy tenkého čreva

Karcinoidy tenkého čreva predstavujú najpočetnejšiu skupinu (asi 50 %) gastrointestinálnych karcinoidov. Vzhľadom na to, že adenokarcinómy tenkého čreva sa vyskytujú vzácne, karcinoidy patria k najčastejším malígnym nádorom vyskytujúcim sa v tejto lokalizácii (60 %). Najčastejšie sú lokalizované v ileu⁽⁸⁾.

Biologické vlastnosti karcinoidov tenkého čreva sú dané predovšetkým ich veľkosťou a spôsobom rastu. Nádory menšie ako 1 cm metastazujú iba v 2 %, zatiaľ čo nádory väčšie ako 2 cm metastazujú v 80 %⁽⁷⁾.

Karcinoidy apendixu

Zvláštnu skupinu karcinoidových nádorov GIT-u predstavujú karcinoidy apendixu. Sú relatívne časté, tvoria 34 % všetkých karcinoidov GIT-u a sú najčastejšími epitelovými nádormi apendixu (90 %). Incidencia kulminuje u žien vo veku 15 – 19 rokov a u mužov vo veku 20 – 24 rokov. Môžu sa objaviť aj u detí⁽³⁾.

Klinické prejavy karcinoidov

Klinické prejavy sú závislé od lokalizácie primárneho nádoru, rozsahu ochorenia a spektra hormonálnej produkcie nádorom. Karcinoidy majú väčšinou malé rozmery, bývajú dlho asymptomatické, môžu sa manifestovať všeobecne onkologickými príznakmi alebo sa pri endokrinne funkčných nádoroch manifestujú karcinoidovým syndrómom⁽¹⁾.

Pri pľúcnych tumoroch býva klinickým prejavom skôr kašeľ, dýchavičnosť, hemoptýza alebo bolesť na hrudníku vyplývajúca z lokalizácie tumoru⁽¹⁾.

Karcinoidy žalúdka a čriev sa môžu prejavovať krvácaním, a to okultným s postupnou anemizáciou alebo manifestným vo forme hematemézy či melény. Nádory čreva môžu viesť k obštrukcii alebo enterorégií. Tumory v duodéne či pankrease môžu spôsobovať obštrukčný ikterus⁽¹⁾.

Karcinoidový syndróm

Karcinoidový syndróm sa môže vyvinúť u 10 až 18 % pacientov s karcinoidovým nádorom. Klasický karcinoidový syndróm typicky zahŕňa vazomotorické, kardiálne

Tabuľka 1. Výskyt karcinoidov podľa lokalizácie a percenta výskytu

| lokalizácia karcinoidov | výskyt (%) |
|-------------------------|------------|
| žalúdok | 2 – 4 |
| pankreas | 2 – 3 |
| tenké črevo | 39 |
| hrubé črevo | 5 – 7 |
| apendix | 26 |
| rektum | 15 |
| pečeň | > 1 |
| pľúca | 10 |

Zdroj: <http://neuroendokrinni-nadory.cz/downloads/sbornik-karcinoid.pdf>

Tabuľka 2. Lokalizácia karcinoidov

| | Lokalizácia | Percento zastúpenia |
|---------------------------|---|---------------------|
| Foregut karcinoidy | Respiračný trakt, týmus, žalúdok, proximálne duodénum, pankreas | 10 – 15 % |
| Midgut karcinoidy | Ileum, jejunum, apendix, proximálna časť hrubého čreva | 50 – 70 % |
| Hindgut karcinoidy | Distálna časť hrubého čreva a rektum | 15 – 20 % |

Zdroj: LOUTHAN, O. 2005. Neuroendokrinné nádory. Klinické pohľady. Praha: Grada, 2005. 344 s. ISBN 80-2471-16-2

a gastrointestinálne príznaky. Najčastejšími prejavmi sú flush, hnačka, kardiálne poškodenie, bronchiálna astma, hypotenzia alebo hypertenzia. Ku klinicky manifestným prejavom syndrómu dochádza v prítomnosti metastáz v pečeni alebo ak je nádor lokalizovaný mimo gastrointestinálneho traktu a uvoľňované hormonálne látky sú vyplavované priamo do cirkulácie – napríklad pri nádoroch lokalizovaných v ováriu, v testes alebo v pľúcach⁽⁹⁾.

Medzi hlavné prejavy karcinoidového syndrómu patrí kožný **flush**. Vyskytuje sa v 25 – 73 % prípadov metastázujúceho karcinómu. V typickej podobe sa prejavuje náhlym vznikom červeného alebo červenofialového erytému hornej časti tela, hlavne na tvári a na krku. Pacient ho vníma ako pocit horúčavy a svrbenia. Častými sprievodnými príznakmi sú hnačka, búšenie srdca, slzenie, opuch tváre alebo spojoviek⁽⁷⁾.

Prvé ataky flushu v skorých fázach ochorenia sú prchavé, trvanie nepresahuje 5 minút. Neskôr je ich výskyt prolongovaný, trvá aj hodiny. Pri pokročilejších ochoreniach môže byť flush aj fixovaný, permanentne hnedočervený a pacient nepociťuje žiadne subjektívne príznaky⁽⁷⁾.

Karcinoidové poškodenie srdca

Vyskytuje sa v 10 – 50 % prípadov karcinoidového syndrómu. Patogenéza postihnutia srdca nie je doposiaľ celkom jasná, ale určitú úlohu hrá vylučovanie sérotonínu a iných vazoaktívnych látok nádorovými bunkami, ktoré vedie k poškodeniu endokardu. Dôležitým faktorom je nielen absolútne množstvo sérotonínu, ale tiež dĺžka expozície⁽¹⁰⁾. Postihnutie srdca je charakterizované fibrózou endokardu, ktorá vytvára plaky porcelánového vzhľadu v dutinách pravého srdca a často spôsobuje retrakciu a fixáciu cípov trikuspidálnej a pulmonálnej chlopne. Tri najčastejšie chlopňové poškodenia sú tvorené trikuspidálnou insuficienciou, pulmonálnou insuficienciou a trikuspidálnou stenózou. Kardiálne príznaky sa objavujú v pokročilých fázach ochorenia a zmeny sú ireverzibilné. Až polovica pacientov s karcinoidovým syndrómom zomiera na pravostranné srdcové zlyhanie⁽⁹⁾.

Laboratórna diagnostika

Karcinoid predstavuje z hľadiska diagnostiky zložitý a komplexný problém. Vyplýva to v podstate z jeho biologických vlastností. Na rozdiel od klasicky hormonálnych aktívnych tumorov vychádzajúcich z difúzneho endokrinného systému, kde klinicky majú prevahu prejavy hypersekrecie jedného konkrétneho hormónu, podľa ktorého sa nádor označuje (gastrinóm, inzulínóm, somatostatínóm, glukagonóm, vipóm atď.), pri karcinoide je situácia odlišná. Klasický karcinoid produkuje hlavne sérotonín, prostaglandíny a za určitých okolností celý rad tzv. gastrointestinálnych hormónov, napr. gastrín, somatostatín, vazoaktívny intestinálny peptid (VIP), taktiež peptidové a proteínové látky, napr. ACTH⁽³⁾.

Medzi hormonálne aktívne látky, ktoré najčastejšie stanovujeme pri diagnostike karcinoidu v našom laboratóriu, patria: sérotonín, NSE, chromogranín A v sére a 5-HIAA v moči.

Sérotonín

Sérotonín (5-hydroxytryptamín, 5-HT) je biologicky aktívna látka, ktorá sa vyskytuje v trombocytoch, v bunkách GIT-u a v menšej miere aj v CNS. Vzniká syntézou z aminokyseliny L-tryptofánu (**obrázok 1**).

Na našom pracovisku sa stanovuje sérotonín v sére HPLC pomocou HPLC analyzátoru Agilent 1200.

Odber treba realizovať do štandardnej biochemickej skúmavky so separačným gélom. Referenčné hodnoty sú u oboch pohlaví **667 – 1 097 nmol/l**.

Nevýhodou vyšetrenia je kolísanie hladiny počas dňa v sére, z dôvodu krátkeho biologického polčasu sérotonínu. Preto je základným postupom laboratórnej diagnostiky karcinoidu vyšetrenie denného odpadu jeho hlavného metabolitu, kyseliny 5-hydroxyindolactovej, v moči za 24 hodín⁽¹¹⁾.

5-hydroxyindolactová kyselina (5-HIAA)

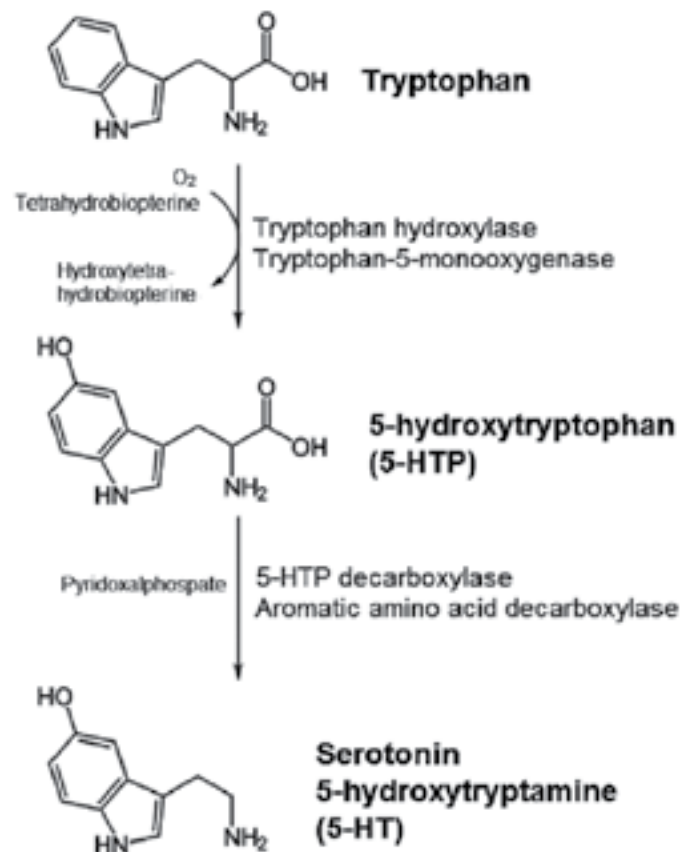
Pri podozrení na karcinoid sa používa ako jedna z prvých laboratórnych metód vyšetrenie 5-hydroxyindolactovej kyseliny (5-HIAA) v moči. 5-HIAA je významný metabolit sérotonínu, vzniká oxidačnou deamináciou enzýmom monooxidáza a vylučuje sa do moču⁽⁷⁾ (**obrázok 2**).

Vyšetrenie 5-HIAA v moči za dodržania podmienok zberu moču je prakticky 100 % špecifické. Moč sa zbiera 24 hodín do tmavej nádoby s pridaním 10 ml 25 % HCl. 5-HIAA v moči sa stanovuje HPLC metódou pomocou HPLC analyzátoru Agilent 1200⁽¹²⁾.

Referenčné hodnoty sú u oboch pohlaví **10,5 – 47,1 μmol/24 hod**.

Pred vyšetrením 5-HIAA v moči je nutné dodržať 2-3-dňovú diétu z vylúčením potravín, ktoré by falošne zvyšovali hladinu sérotonínu a následne 5-HIAA v moči⁽¹¹⁾ (**tabuľka 3**).

Obrázok 1. Biosyntéza sérotonínu

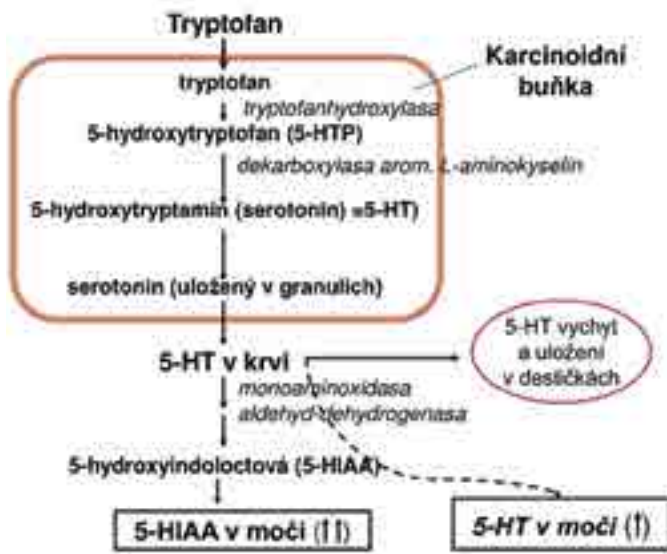


Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Serotonin-5-HT-bio-synthesis-pathway-5-HT-is-synthesized-from-the-amino-acid_fig3_315771564

Okrem potravín obsahujúcich sérotonín patria medzi interferujúce faktory rôzne lieky a ochorenia, ktoré významne ovplyvňujú hladinu sérotonínu a odpad 5-HIAA v moči⁽¹¹⁾ (**tabuľka 4**).

V prípadoch významného zvýšenia hodnôt odpadov 5-HIAA v moči existuje pozitívna korelácia medzi hmotnosťou nádoru a hladinou 5-HIAA v moči. Vyšetrenie slúži i na monitorovanie priebehu a efektivity liečby, prípadnej pooperačnej recidívy alebo progresie po predchádzajúcej úspešnej odpovedi na konzervatívnu terapiu. K najbežnejším

Obrázok 2. Metabolická cesta sérotonínu a 5-HIAA



Zdroj: <https://www.slideserve.com/ashley/biogenn-aminy-a-neuroendokrinn-tumory-biochemie-patobiochemie-klinick-v-znam-laboratorn-vy-etren>

Tabuľka 3. Obsah sérotonínu v rôznych potravinách

| Potraviny svysokým obsahom sérotonínu > 3 ug/g | |
|--|----------|
| butternut – tekvica muškátová | 398 ug/g |
| čierny vlašský orech | 304 ug/g |
| vlašský orech | 87 ug/g |
| orechy hickory-shagbark nut (Carya ovata) | 143 ug/g |
| pekanové orechy | 29 ug/g |
| banány | 30 ug/g |
| ananás | 17 ug/g |
| kivi | 5,8 ug/g |
| slivky | 4,7 ug/g |
| paradajky | 3,2 ug/g |
| Potraviny so stredným obsahom sérotonínu 0,1 – 3 ug/g | |
| avokádo | 1,5 ug/g |
| datle | 1,7 ug/g |
| grapefruit | 0,9 ug/g |
| olivy | 0,2 ug/g |
| baklažán | 0,2 ug/g |
| Potraviny nízkym obsahom sérotonínu < 0,1 ug/g | |
| rôzne plody: pistácie, muškátový oriešok, slnečnicové semiačka, jahody, borievky, ostružiny, brusnice, jablká, čerešne, mango, hrušky, broskyne, pomaranč, citrón, mrkva, uhorky, hlávkový šalát, limetka | |
| Potraviny s veľmi nízkym obsahom sérotonínu < 0,1 ug/g | |
| ďalšie potraviny: rôzne druhy mäsa, pečená šunka, pečené kura, ryby, syr parmezán, obilniny, ryža, zemiaky, káva, čaj, mlieko | |

Zdroj: LOUTHAN, O. Diagnostika neuroendokrinných nádorů. [online]. 2012 [cit. 2019.08.02] Dostupné na internete: < <http://neuroendokrinni-nadory.cz/downloads/diagnostika-nen-vysetreni.pdf>

biochemickým vyšetreniam pri karcinoidoch doteraz patrí 24-hodinový zber moču na vyšetrenie 5-HIAA⁽¹¹⁾.

Na našom pracovisku (Medirex, a. s.) okrem špecifických markerov pre diagnostiku karcinoidov (sérotonín a 5-HIAA) stanovujeme aj nešpecifické nádorové markery. Tieto markery s veľkou pravdepodobnosťou signalizujú prítomnosť NET, ale samy osebe nepodávajú bližšiu informáciu o vlastnostiach vyšetřovaného NET⁽¹¹⁾. K nešpecifickým markerom patria NSE, chromogranín A, gastrín a kalcitonín.

Neurónová špecifická enoláza

Neurónová špecifická enoláza (NSE) je jeden z 5 izoenzýmov glykolytického enzýmu enolázy (2-fosfo-D-glyceráthydroláza). Vyskytuje sa v rôznych dimerických izoformách zahrňujúcich 3 imunologicky odlišné podjednotky α , β , γ – apodjednotka enolázy sa vyskytuje v rozličných typoch tkanív cicavcov, zatiaľ čo β podjednotka sa nachádza predovšetkým v srdci a priečne pruhovaných svaloch. Izofórm enolázy $\alpha\gamma$ a $\gamma\gamma$, ktoré sú označované ako neurónová špecifická enoláza (NSE) alebo tiež γ enoláza, sa vyskytujú vo vysokých koncentráciách v neurónoch a neuroendokrinných bunkách alebo v tumoroch z nich vzniknutých⁽¹³⁾.

Hodnoty NSE stanovujeme metódou ECLIA pomocou analyzátoru cobas 8000 modul e 801.

Odber treba realizovať do štandardnej biochemickej skúmavky so separačným gélom. Referenčné hodnoty sú u oboch pohlaví **0 – 16,3 $\mu\text{g/l}$** .

Medzi interferencie, ktoré ovplyvňujú hodnotu NSE, patrí hemolýza séra.

NSE sa používa ako imunohistochemický a sérový marker, môže slúžiť aj ako prediktor odpovede na liečbu. Nebol preukázaný vzťah medzi rozsahom nádoru a stupňom zvýšenej hladiny NSE, na rozdiel od sérového chromogranínu A (CgA), kde takýto vzťah bol preukázaný. Tieto rozdiely CgA a NSE sa vysvetľujú odlišnou intracelulárnou lokalizáciou. CgA je lokalizovaný v neurosekrečných granulách a NSE je cytoplazmatický enzým. Preto elevácia NSE sa objavuje pri porušenej integrite bunkovej membrány, zvýšené hodnoty NSE treba preto očakávať skôr pri agresívnejších, rýchlo rastúcich a menej diferencovaných formách NET, ktoré často podliehajú rozpadu

Tabuľka 4. Interferujúce faktory ovplyvňujúce hladinu 5-HIAA

| Neonkologické ochorenia zvyšujúce hladinu 5-HIAA |
|---|
| výrazné bolesti (ischialgie, kŕče hl. a kostrového svalstva), cystická fibróza, krvácanie, malabsorpčné stavy (celiakia, syndróm slepej kľučky), m. Whipple |
| Neonkologické ochorenia znižujúce hladinu 5-HIAA |
| depresia, resekcia tenkého čreva, mastocytóza, fenylketonúria, Downov syndróm |
| Lieky zvyšujúce hladinu 5-HIAA |
| atenolol, fenacetín, chlórpromazín, levopromazín, tioridazín, prochlórperazín, trifluoperazín, trietylperazín, perfenazín, flufenazín, guaifenezín, melfalám, naproxen, pindolol, rezerpín, acetaminofen, salicyláty, naproxem, L-DOPA, fluorouracil, alkaloidy |
| Lieky znižujúce hladinu 5-HIAA |
| ACTH, tricyklické antidepresíva, etylalkohol, heparín, chlórpromazín, imipramín, inhibítory MAO, izoniazid, levodopa, metyldopa, oktreotid, prometazín, ranitín, salicyláty |

Zdroj: LOUTHAN, O. Diagnostika neuroendokrinných nádorů. [online]. 2012 [cit. 2019.08.02] Dostupné na internete: < <http://neuroendokrinni-nadory.cz/downloads/diagnostika-nen-vysetreni.pdf>

buniek a nekrozám. Falošne vyššie hodnoty bývajú pri renálnej insuficiencii, pri pľúcnych a pečenej ochoreniach. Pre diagnostiku NET však enzým nevykazuje vysoký stupeň diagnostickej presnosti, a preto sa využívajú z onkomarkerov iba CgA a 5-HIAA⁽¹¹⁾.

Chromogranín A

Chromogranín A (CgA) je kyslá bielkovina zložená zo 439 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 48 kDa. Je produkován a secernovaný endokrinnými a neuroendokrinnými bunkami spolu s peptidovými hormónmi a neurotransmitermi, predovšetkým so sérotonínom a s glukagónmi. CgA je súčasťou mnohých intracelulárnych a extracelulárnych procesov. Je lokalizovaný v denzných sekrečných granulách skladujúcich peptidové hormóny a vo vezikulách obsahujúcich katecholamíny. Nachádza sa v neurónoch, v CNS a periférnych sympatických neurónoch. Iné orgány bohaté na CgA sú napr. prištítna telieska, pľúca, exokrinné bunky pankreasu, bunky produkujúce inzulín a glukagón. Hlavný zdroj sekrecie CgA je dreň nadobličiek⁽¹¹⁾.

Hodnoty CgA stanovujeme metódou ELISA pomocou analyzátoru Dynex DSX.

Odber treba realizovať do štandardnej biochemickej skúmavky so separačným gélom. Referenčné hodnoty sú u oboch pohlaví **0 – 100 µg/l**.

Stanovenie hodnôt CgA ako neuroendokrinného sérového markera sa využíva v diagnostike, v hodnotení vývoja ochorenia a odpovedi na liečbu. Pri väčšine nádorov produkujúcich CgA sú hladiny cirkulujúceho peptidu výrazne nad hranicu normy a výskyt falošne pozitívnych a falošne negatívnych výsledkov nebýva častý. Najčastejším dôvodom falošne pozitívnych nálezov je renálna insuficiencia. Senzitivita CgA je pri neuroendokrinných tumoroch 70 – 95 % a špecificita 70 – 80 %. Vyšetrenie je najpresnejšie pri nádoroch s intenzívnou sekrečnou aktivitou, hlavne pri metastázujúcich midgut karcinoidoch a pri tumoroch pankreasu⁽¹¹⁾ (**tabuľka 5**).

Existuje priama korelácia medzi celkovou hmotnosťou nádoru a plazmatickou hladinou CgA. Taktiež existuje vzťah k histologickému typu, kde najvyššie hodnoty exprimuje karcinoid, a to stonásobne zvýšené oproti norme. Vysoká hladina CgA je nezávislým prognostickým faktorom zlej prognózy pri pokročilých stavoch. Pri diagnostike a stanovení hladiny CgA treba myslieť na faktory – interferencie spôsobujúce falošné zvýšenie hladiny CgA. Mierne zvýšenie bolo zistené u žien v postmenopauzálnom období, hlavne v rámci zvýšenia gonadotropínov. Vyššie hladiny CgA bývajú aj u zdravých tehotných žien, kde CgA je produkováný placentou. Rýchly vzostup hladiny CgA spôsobí taktiež liečba nízkymi dávkami omeprazolu. Falošne pozitívne hodnoty CgA sa vyskytujú tiež u chorých so zápalovými ochoreniami čriev, s atrofickou gastritídou, s hepatálnou a renálnou insuficienciou⁽¹¹⁾.

LITERATÚRA

1. Barkmanová J. Karcinoidy. *Onkologie* 2009; 3(6): 336-342.
2. Cempírková V, Havránek P. Karcinoid. *Vnitř Lék* 2005; 51(9): 938-939.
3. Petruželka L. Karcinoid. *Maxdorf* 2003; 3-6.
4. Babovic-Vuksanovic D, Constantinou CL, Rubin J, et al. Familial occurrence of carcinoid tumors and association with other malignant neoplasms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1999; 8(8): 715-719.

Tabuľka 5. Validita chromogranínu A ako markera neuroendokrinných tumorov

| NET | Validita |
|---|------------|
| Midgut karcinoidy | 87 % |
| Foregut karcinoidy | 79 % |
| Tumory buniek ostrovčekov pankreasu | 72 – 100 % |
| Nefunkčné tumory buniek ostrovčekov pankreasu | 62 % |
| Gastrinómy | 100 % |
| Malobunkový karcinóm pľúc | 39 – 75 % |
| Fechromocytóm | 80 – 90 % |
| Medulárny karcinóm štítnej žľazy | 50 – 100 % |

Zdroj: LOUTHAN, O. *Diagnostika neuroendokrinných nádorů*. [online]. 2012 [cit. 2019.08.02] Dostupné na internete: < <http://neuroendokrinni-nadory.cz/downloads/diagnostika-nen-vysetreni.pdf>

Záver

Karcinoidy patria do skupiny neuroendokrinných tumorov (NET) so širokou biologickou a klinickou charakteristikou a s relatívne nízkou incidenciou. Najvyšší výskyt karcinoidov je v oblasti gastrointestinálneho traktu, a to hlavne v tenkom čreve, v rekte a v žalúdku. Klinické prejavy nádoru závisia od jeho primárnej lokalizácie a endokrinnnej aktivity. Medzi najčastejšie prejavy patrí kašeľ, dušnosť, dyspepsia, abdominálne bolesti, obštipácia, hnačka. Vzhľadom na to, že karcinoidy patria medzi endokrinné aktívne nádory a produkujú rôzne spektrum hormonálne aktívnych substancií, veľmi dôležitú úlohu hrá laboratórna diagnostika daných parametrov. Medzi najčastejšie hormonálne aktívne látky, ktorých hodnotu stanovujeme, patrí sérotonín, NSE, CgA v sére a 5-HIAA v moči. Špecificita a senzitivita daných markerov sú veľmi vysoké, pri niektorých typoch NET-ov a karcinoidov skoro 100 %, a preto veľmi potrebná pri včasnej diagnostike daných nádorov.

Zoznam skratiek:

- 5-HIAA** – kyselina 5-hydroxyindoloctová
- ACTH** – adrenokortikotropný hormón
- CgA** – chromogranín A
- CNS** – centrálny nervový systém
- EC** – enterochromafinné bunky
- ECLIA** – ElectroChemiLuminiscenčná Imuno Analýza
- ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay
- GIT** – gastrointestinálny trakt
- HCl** – kyselina chlorovodíková
- HPLC** – (High Performance Liquid Chromatography) – vysokoučinná kvapalinová chromatografia
- NET** – neuroendokrinné tumory
- NSE** – neurónová špecifická enoláza
- VIP** – vazoaktívny intestinálny peptid

5. Williams ED, Sandler M. The classification of carcinoid tumors. *The Lancet* 1963; 281(1): 238-239.
6. Papotti M, Cassoni P, Volante M, et al. Ghrelin – Producing Endocrine Tumours of the Stomach and Intestine. *The Journal of Endocrinology and Metabolism* 2001; 86(10): 5052-5059.
7. Louthan O. *Neuroendokrinní nádory. Klinické pohľady*. Praha: Grada 2005; 344 s. ISBN 80-2471-16-21.

8. Sweeney JF, Rosemurgy AS. Carcinoid Tumors of the Gut. *Cancer Control Journal* 1997; 4(1): 18-24.
9. Kiňová S, Koreň M. Neuroendokrinné nádory v ambulancii praktického lekára. *Via practica* 2014; 11(3-4): 118-121.
10. Talafa V, Pastucha D, Zeman K, a spol. Karcinoid a jeho kardiálna manifestácia. *Vnitř Lék* 2012; 58(11): 867-870.
11. Louthan O. Diagnostika neuroendokrinných nádorů. *Neuroendokrinní nádory* 2012; 1-16.
12. Kiňová S. Neuroendokrinné tumory z pohľadu internistu a endokrinológa. *Onkológia* 2011; 6(4): 194-198.
13. https://pimeservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=9e848582-ff02-e611-e396-00215a9b3428



MUDr. Zuzana Cingelová
Klinická biochémia, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: zuzana.cingelova@medirex.sk

Protinádorové účinky vitamínu D

Beáta Bolerázska^{1,2}, Tomáš Koky¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF Košice

²Klinická biochémia, Medirex, a. s., Košice

Nedostatok vitamínu D bol pôvodne odhalený ako príčina krivice v dôsledku nedostatočnej expozície slnečnému žiareniu alebo príjmu potravín bohatých na vitamín D. Okrem svojej úlohy pri homeostáze vápnika a kostí vitamín D participuje na regulácii mnohých ďalších bunkových funkcií. Receptor vitamínu D (VDR) je takmer všeobecne exprimovaný v jadrových bunkách. Spektrum endokrinnnej aktivity vitamínu D je teda oveľa širšie ako homeostáza vápnika/kostí a systém vitamín D – VDR sa v tomto ohľade podobá spektru iných ligandov jadrových receptorov, ako sú hormóny štítnej žľazy.

Vzhľadom na široký rozsah súčasných poznatkov o vitamíne D sa v tomto príspevku podrobnejšie venujeme vzťahu vitamínu D k vzniku a progresii nádorových ochorení, kde sa opakovane potvrdili jeho významné antikancerogénne vlastnosti. K tým najdôležitejším patrí indukcia zastavenia bunkového cyklu, stimulácia apoptózy a inhibícia angiogenézy, ale uplatňuje sa aj pri zápaloch asociovaných s nádorovým ochorením a reparatívnych procesoch DNA a metastázovaní.

Kľúčové slová: vitamín D, kancerogenéza, protinádorové účinky

Anti-tumour effects of vitamin D

Vitamin D deficiency was initially discovered as the cause of rickets due to insufficient exposure to sunlight or intake of vitamin D-rich foods. In addition to its role in calcium and bone homeostasis, vitamin D participates in the regulation of many other cellular functions. The vitamin D receptor (VDR) is almost universally expressed in nuclear cells. Thus, the spectrum of vitamin D endocrine activity is much broader than calcium/bone homeostasis, and the vitamin D-VDR system resembles that of other nuclear receptor ligands, such as thyroid hormones, in this respect.

Given the full range of current knowledge about vitamin D, we discuss in more detail the relationship of vitamin D to cancer development and progression, where its significant anticancerogenic properties have been repeatedly confirmed. The most important are induction of cell cycle arrest, stimulation of apoptosis and inhibition of angiogenesis. Still, it is also applied to inflammation associated with cancer and reparative DNA processes and metastasis.

Keywords: vitamin D, carcinogenesis, antitumor effects

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 33 – 36

Úvod

V súčasnosti sa na vitamín D nahliada ako na steroidný hormón rozpustný v tukoch, ktorého genómové účinky sú sprostredkované po naviazaní na špecifický receptor. K potvrdeným účinkom vitamínu D okrem uchovania zdravých kostí (tzv. klasické účinky) radíme tzv. neklasické, nonkalciemické účinky. Tie sa aktuálne sledujú pri autoimunitných a kardiovaskulárnych ochoreniach, precitlivenosti na infekcie, pri vzniku nádorových ochorení, ale aj v súvislosti s priebehom fyziologického starnutia. Vzhľadom na široký rozsah súčasných poznatkov sa v tomto príspevku budeme podrobnejšie venovať vzťahu vitamínu D k vzniku a progresii nádorových ochorení, kde sa opakovane potvrdili jeho významné antikancerogénne vlastnosti. K tým najdôležitejším patrí indukcia zastavenia bunkového cyklu, stimulácia apoptózy a inhibícia angiogenézy⁽¹⁾, ale uplatňuje sa aj pri zápaloch asociovaných s nádorovým ochorením, reparatívnych procesoch DNA a metastázovaní. Prehľad mechanizmov účinku vitamínu D s antikancerogénnym efektom sumarizuje **tabuľka 1**.

Tabuľka 1. Mechanizmy protinádorových účinkov vitamínu D⁽²⁾

| | |
|------------------------------|---|
| Proliferácia | Zvýšenie expície proteínov p21 a p27 |
| | Zníženie expície CDKs, cyklínov a produktov génov MYC a RB |
| Apoptóza | Zvýšenie expície BAX |
| | Zníženie expície BCL – 2 |
| | Zvýšenie senzitivity na rádioterapiu a chemoterapiu |
| Diferenciácia | Diferenciácia buniek myeloidnej leukémie na monocytu |
| | Zvýšenie expície faktorov diferenciácie ako kazeín, lipidy, PSA, E-cadherin |
| Zápal | Inhibícia expície COX-2, PG receptorov, stresových kináz a NF-κB signalizácie |
| | Zvýšenie odpovede TIMP1 a E-cadherinu |
| Invazivita a tvorba metastáz | Zníženie expície MMP9, α6-integrínu, 4-integrínu a aktivátora plazminogénu |
| Angiogenéza | Pokles hladín HIF1-α, VEGF, IL-8, tenascin C a PGE2 |

Indukcia zastavenia bunkového cyklu a stimulácia apoptózy

Proliferujúca bunka prechádza vysoko usporiadanými fázami G1, S, G2 a M v sekvencii, z ktorých kritické sú S (fáza syntézy DNA) a M (fáza mitózy). Vstup do nich (začiatok S fázy a M fázy) je prísne regulovaný, čo vedie k vzniku dvoch „kontrolných bodov“ v cykle. Poškodenie DNA z akejkoľvek príčiny môže zastaviť bunkový cyklus v hociktovej z týchto fáz a presný priebeh cyklu v nich určuje genetickú stabilitu bunky. Všeobecne najväčší antiproliferačný účinok má indukcia zastavenia bunkového cyklu založená na blokáde G1 fázy⁽²⁶⁾, ktorú možno dosiahnuť navodením zvýšenej tvorby proteínov p21 a p27. Pri aktívnej forme vitamínu D 1,25-(OH)₂D₃ sa preukázala schopnosť zastaviť bunkový cyklus v nádorových bunkových líniách aj vo fáze G2/M⁽³⁾. Vitamín D je schopný navodiť apoptózu nádorových buniek už na génovej úrovni prostredníctvom inhibície známeho antiapoptotického génu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)⁽⁴⁾, indukciou proapoptotických génov, ako je DAP (Death-Associated Protein-3), CFKAR (caspase 8 apoptosis-related cysteine peptidase) a FADD (Fas-Associated protein with Death Domain)⁽⁵⁾, a dokáže dokonca aktivovať proautofagický gén beclin-1⁽⁶⁾. Okrem toho kalcitriol zvyšuje aktivitu proapoptotických proteínov Bax a μ -calpain^(3,7-9). Schopnosť navodenia apoptózy je jednoznačne jednou z najdôležitejších funkcií proteínu p53, známeho hlavného regulátora apoptózy a produktu tumor-supresorového génu TP53. Pri viacerých nádorových bunkových líniách bolo zistené, že mechanizmus indukcie apoptózy prostredníctvom vitamínu D varíruje v závislosti od typu bunky a môže byť sprostredkovaný proteínom p53, ale aj bez jeho prítomnosti^(10,11).

Inhibícia angiogenézy

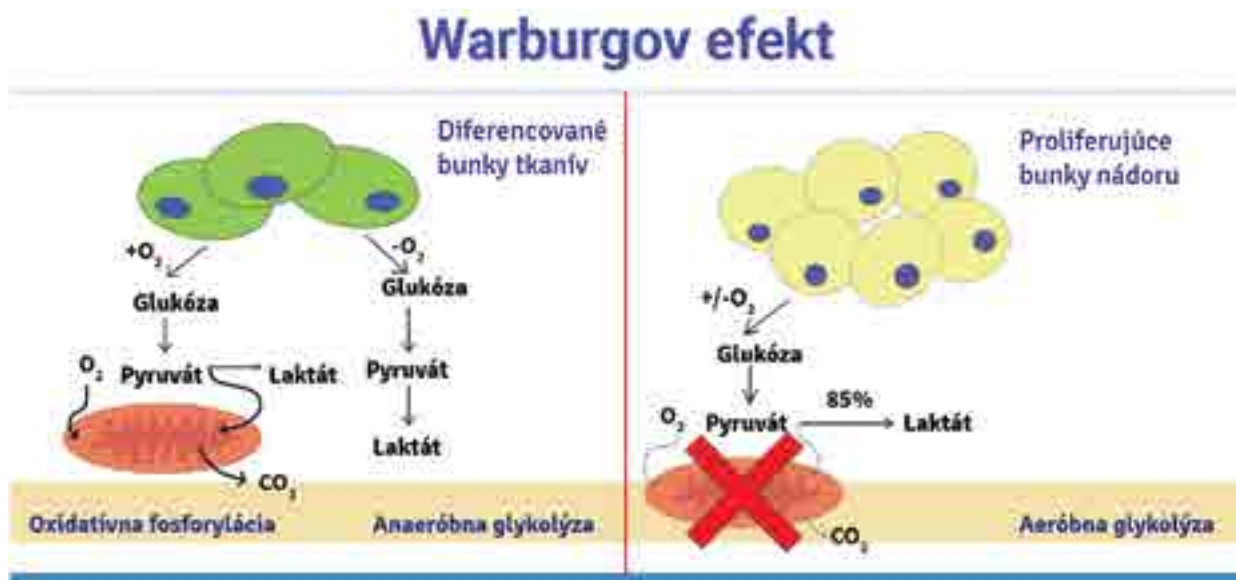
Efekt vitamínu D na angiogenézu bol prvýkrát opísaný v roku 1990, keď sa zistilo, že 1,25-(OH)₂D₃ a jeho analóg 22-oxo-1,25-D₃ inhibuje embryonálnu angiogenézu v choriovej membráne⁽¹²⁾.

Podpora angiogenézy nádoru, jeho invázie a metastázovania môže byť dôsledkom aktivácie tzv. spínačov angiogenézy, ktorých aktiváciu kontroluje predovšetkým endoteliálny rastový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)⁽¹³⁾. Bolo preukázané, že vitamín D dokáže znižovať expresiu VEGF v nádorových bunkách a tiež znižuje odpoveď endoteliálnych buniek na tento faktor⁽¹⁴⁾. Zákonite je hypoxia výrazný induktor tvorby VEGF a počas jej pôsobenia, za súčasnej aplikácie vitamínu D, dochádzalo k významnému zníženiu tvorby VEGF⁽¹⁵⁾.

Glykolytický metabolizmus nádorových buniek

Kalcitriol svojimi antikancerogénnymi účinkami zasahuje aj do energetického metabolizmu nádorových buniek. Anaeróbny spôsob spracovania glukózy preferovaný malígne transformovanými bunkami je negatívne regulovaný aktívnymi formami vitamínu D. Santos a kol. (2017) vo svojej štúdií na bunkových kultúrach získaných z karcinómu prsníka zaznamenali pokles miery glykolýzy po podaní vitamínu D. Vitamín D dokázal znížiť expresiu membránových glukózových transportérov GLUT1 a tak spomaliť utilizáciu glukózy nádorovými bunkami. Dokázaná bola aj supresia aktivity mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin), ktorý je súčasťou signálnej dráhy Warburgovho efektu – tzn. preferencie anaeróbnej glykolýzy nádorovými bunkami. Santos a kol. (2017) dokázali aj zníženú produkciu laktátu po liečbe vitamínom D (**obrázok 1**)⁽¹⁶⁾.

Obrázok 1. V patologicky nezmenenom tkanive je 85 % energie vo forme ATP produkovanej v procese oxidatívnej fosforylácie v mitochondriách; anaeróbna glykolýza je proces rezervovaný pre akútne epizódy hypoxie (intenzívne cvičenie), v tomto procese pyruvát dočasne nevstupuje do citrátového cyklu a je metabolizovaný na laktát, produkt anaeróbnej glykolýzy. Warburgov efekt predstavuje chronickú, nonoxidatívnu produkciu ATP v cytoplazme buniek premenou pyruvátu na laktát pri normoxických podmienkach. Malígne transformované bunky využívajú Warburgov efekt na produkciu 85 % energie⁽¹⁷⁾.



Zápal asociovaný s nádormi a vitamín D

Zápal asociovaný s nádormi je dôležitou súčasťou viacerých aspektov tumorogenézy a vývoja nádorového ochorenia. K potvrdeným účinkom vitamínu D patrí taktiež schopnosť znižovať tvorbu prozápalových cytokínov aj ich biologickú aktivitu, čo predstavuje významný protizápalový efekt⁽¹⁸⁾. Zápalová reakcia sprevádzajúca rast nádoru je vo všeobecnosti charakterizovaná prítomnosťou zápalových buniek, mediátorov zápalovej reakcie, ako sú cytokíny, chemokíny, prostaglandíny a kyslíkové radikály⁽¹⁹⁾. Práve aktivita VEGF významne závisí aj od mediátorov zápalu. Schopnosťou znížiť zápalovú reakciu môže teda vitamín D prostredníctvom VEGF zasahovať aj do nádorovej angiogenézy. V literatúre sa opisuje tiež vznik nádorových ochorení v dôsledku chronického zápalového procesu. So vznikom nádorových ochorení, obzvlášť s procesom, ktorý vedie od zápalu ku kancerogéze, sa opakovane spája skupina transkripčných faktorov známych pod označením NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), ktoré sa podieľajú na kontrole transkripcie DNA, produkcie cytokínov a bunkového prežívania⁽²⁰⁾. V porovnaní so zdravými bunkami mali mnohé nádorové bunky zvýšené hladiny NF- κ B. Potvrdilo sa, že kalcitriol je schopný blokať aktiváciu NF- κ B⁽²¹⁾ a táto inhibícia sa javí ako veľmi sľubná možnosť protinádorovej liečby. Kalcitriol vykazuje protizápalovú aktivitu vo viacerých typoch malígnych nádorov. Zmenami expresie NF- κ B, jeho translokácie do jadra a väzby na špecifické sekvencie na DNA vitamín D znižoval expresiu prozápalovo pôsobiaceho cytokínu IL-8 napríklad v bunkách karcinómu prostaty D⁽²¹⁾. Vitamín D mení expresiu NF- κ B pôsobením na IGFBP-3 (insuline-like growth factor binding protein), ktorý reguluje funkciu NF- κ B⁽²²⁾.

Vitamín D významne zasahuje aj do syntézy a biologickej aktivity prostaglandínov v zmysle ich inhibície. Prostaglandíny podporujú karcinogézu, pozitívnym spôsobom indukujú bunkovú proliferáciu, angiogézu a vplývajú na rozvoj metastáz. Vitamín D vstupuje do ich metabolizmu a biologickej aktivity 3 základnými mechanizmami:

inhibíciou enzýmu cyklooxygenáza 2 (COX-2), ktorý je kľúčový v syntéze prostaglandínov

upreguláciou expresie enzýmu 15-hydroxyprostaglandín-dehydrogenáza (15-PGDH), ktorý je zodpovedný za degradáciu prostaglandínov

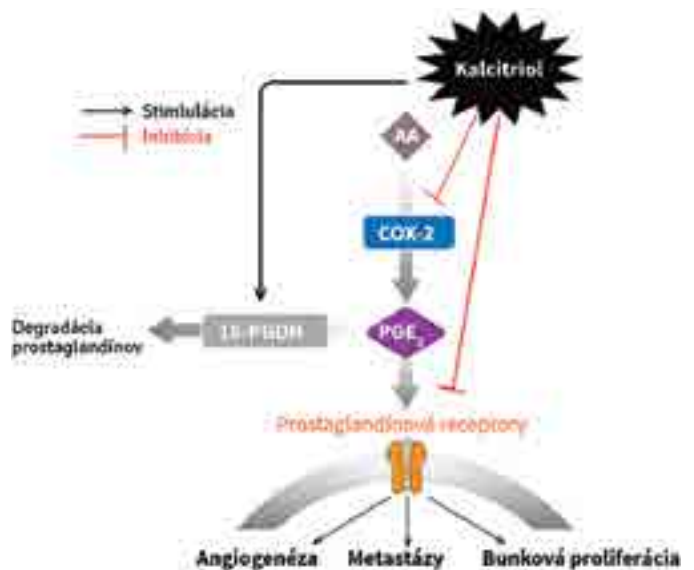
downreguláciou expresie membránových prostaglandínových receptorov, esenciálnych pre bunkovú signalizáciu (**obrázok 2**)⁽²²⁾

Krishan a Feldmann (2011)⁽²²⁾ rovnako uvádzajú, že dôležitými cieľovými molekulami vitamínu D v procese zápalu sú aj MAP kinázy. Napríklad expresia MAP kinázy – fosfatázy 5 (MKP5) je indukovaná kalcitriolom a následne inhibuje stresový proteín p38, čo vedie k zníženiu expresie prozápalových cytokínov, najmä IL-6.

Úloha vitamínu D v prevencii nádorovej invazivity a vzniku metastáz

Vznik metastáz je komplexný proces zahŕňajúci bunkovú adhéziu, migráciu, inváziu, proliferáciu a angiogézu⁽²¹⁾. Pre kancerogézu na molekulovej úrovni majú veľký význam signálne dráhy v bunke. Poruchy v týchto kaskádach – obvykle overexpresia alebo inhibícia určitého medzičlánku kaskády – môžu v bunke vyvolať zmeny, ktoré jej poskytujú proliferáčnne výhody.

Obrázok 2. Vplyv vitamínu D na stimuláciu a inhibíciu metabolizmu prostaglandínov⁽²²⁾



Úloha vitamínu D v súvislosti s nádorovou invazivitou sa v súčasnosti podrobne študuje pri kolorektálnom karcinóme. Pri tomto type nádoru sa až v 90 % objavuje porucha v priebehu Wnt/betakatenínovej signálnej dráhy, a to na úrovni betakatenínu (proteín podieľajúci sa na medzibunkovom adhéznom spojení). Presun tohto proteínu z cytoplazmy do bunkovej membrány dokáže ovplyvniť hladina vitamínu D⁽²³⁾.

Diáz a kol. (2010)⁽²⁴⁾ uvádzajú, že vitamín D je silným induktorom expresie cystatínu D, inhibítora cysteínových proteáz z katepsínovej rodiny. Cystatín D sa podieľa na antikanerogénnych účinkoch vitamínu D, taktiež najmä v prípadoch kolorektálneho karcinómu. Je zapojený do procesov znižujúcich migračnú aktivitu buniek a potláča funkcie génov tzv. epiteliálno-mezenchymálneho prechodu. Práve produkty týchto génov sú schopné potláčať fyziologicky prítomnú polaritu epitelových buniek, ktorá je tiež daná prítomnosťou špecifických adhezívnych štruktúr.

Vitamín D sa tiež zúčastňuje na regulácii matrixových metaloproteáz (MMPs) a špecifických tkanivových inhibítorov matrixových metaloproteáz (TIMPs). MMPs sú proteázy dependentné od zinku, schopné degradovať zložky extracelulárneho matrixu a bazálnej membrány. MMPs aj TIMPs bývajú často dysfunkčné pri malígnych nádorových ochoreniach a tieto dysfunkčné zmeny prispievajú k invazivite a potenciálu zakladať vzdialené metastázy.

Viacere štúdie poukázali na skutočnosť, že suplementácia vitamínu D znižuje expresiu metaloproteázy 9 (MMP 9) a zvyšuje expresiu TIMP 1 pri karcinóme prsníka a prostaty⁽²⁴⁾.

Záver

V súčasnosti je vitamín D pre svoje biologické vlastnosti považovaný za hormón a pre široké spektrum pôsobenia sa oprávnene prirovnáva k hormónom štítnej žľazy. Epidemiologické štúdie naznačujú, že nedostatok vitamínu D by mohol zohrávať dôležitú úlohu aj v etiológii rôznych typov nádorových ochorení u ľudí. Protinádorová aktivita sa aktuálne zaraďuje medzi jeho neklasické (nonkalcemické)

účinky a môže byť sprostredkovaná viacerými mechanizmami vrátane inhibície bunkovej proliferácie, indukcie apoptózy, stimulácie diferenciacie, potlačenia invázie nádoru, metastázy

zy a angiogenézy. Predklinický výskum naznačuje, že aktívny metabolit vitamínu D (ev. jeho analóg) by sa mohol uplatniť ako preventívna a terapeutická protirakovinová látka.

LITERATÚRA

1. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
2. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(5): 342-357. doi: 10.1038/nrc3691. Epub 2014 Apr 4.
3. Jiang F, Li P, Fornace AJ Jr, et al. G2/M arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in ovarian cancer cells mediated through the induction of GADD45 via an exonic enhancer. *J Biol Chem* 2003; 278(48): 48030-48040.
4. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, et al. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology* 2000; 141: 10-17.
5. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 2014; 21: 319-329.
6. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, et al. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1297-1309.
7. James SY, Mackay AG, Colston KW. Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1996; 58(4): 395-401.
8. Diaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, et al. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Research* 2000; 60(8): 2304-2312.
9. Kumagai T, Shih LY, Hughes SV, et al. 19-Nor-1,25(OH)2D2 (a novel, noncalcemic vitamin D analogue), combined with arsenic trioxide, has potent antitumor activity against myeloid leukemia. *Cancer Research* 2005; 65(6): 2488-2497.
10. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22(56): 9030-40.
11. Chakraborti CK. Vitamin D as a promising anticancer agent. *Indian J Pharmacol* 2011; 43(2): 113-120.
12. Oikawa T, et al. 1990. Inhibition of angiogenesis by vitamin D3 analogues. *European Journal of Pharmacology* 1990; 178(2), s. 247-250.
13. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 2008; 659(1-2): 15-30.
14. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, et al. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Research* 2000; 87(3): 214-220.
15. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther* 2007; 6: 1433-1439.
16. Santos JM, et al. 2017. Vitamin D3 decreases glycolysis and invasiveness, and increases cellular stiffness in breast cancer cells. *J Nutr Biochem* 2018; 53: s. 111-120.
17. Gibas KJ. The Retrograde Signal: Dependency on Glucose Marks the Cancerous Phenotype. *Austin J Nutr Metab* 2017; 4(2): 1051.
18. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, et al. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(17): 7917-7925.
19. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 436-444.
20. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013; 12: 86.
21. MA Y, et al. 2016. Mechanistic Insights of Vitamin D Anticancer Effects. *Vitamins and Hormones* 2016; 100: s. 395-431.
22. Krishan AV, Feldman D. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 2011; 51: s. 311-336.
23. Piccoto G, et al. 2012. Molecular Aspects of Vitamin D Anticancer Activity. *Cancer Investigation* 2012; 30: s.604-614
24. Diáz S Á, et al. Proteases, protease inhibitors and cancer. *Cell Cycle* 2010; 9(1): s. 32-37.

MUDr. Beáta Bolerázka, PhD.

Klinická biochémia, Medirex, a. s.

Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice

e-mail: beata.bolerazska@medirex.sk

Molekulové metódy detekcie mutácií v kinázovej doméne fúzneho génu *BCR-ABL1* u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou

Michaela Bezecná¹, Ľubica Majerová², Renata Lukačková²

¹Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

²Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Zavedenie liečby inhibítormi tyrozínkinázy (TKI) u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou výrazne ovplyvnilo prognózu tohto ochorenia. Liečba použitím TKI znamená významný benefit, 25 – 35 % pacientov však potrebuje v priebehu 5 rokov zmenu liečby z dôvodu rezistencie alebo zlyhania liečby. Najčastejším mechanizmom zodpovedným za rezistenciu je rozvoj mutácií v kinázovej doméne. Za štandard pre skrining mutácií vo fúznom géne *BCR-ABL1* sa považuje Sangerovo sekvenovanie. V súčasnosti sa najviac pracuje na implementácii technológie sekvenovania novej generácie ako štandardného vyšetrovacieho postupu.

Kľúčové slová: mutácie v kinázovej doméne Abl1, Sangerovo sekvenovanie, sekvenovanie novej generácie NGS (next generation sequencing)

Molecular detection methods of mutations in the kinase domain of fusion gene bcr-abl1 in patients with chronic myelocyte leukemia

The implementation of the treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with chronic myelocyte leukemia has significantly influenced the prognosis of the disease. TKI treatment is a significant benefit, but 25-35% of patients need to change treatment within 5 years due to resistance or treatment failure. The most common mechanism responsible for resistance is the development of mutations in the kinase domain. Sanger sequencing is considered the standard method for screening mutations in the *BCR-ABL1* fusion gene. Currently, most work is being done to implement the next-generation sequencing technology as a standard method.

Keywords: mutations in the Abl1 kinase domain, Sanger sequencing, next-generation sequencing (NGS)

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 37 – 40

Úvod

Chronická myelocytová leukémia (CML) je klonálne myeloproliferatívne ochorenie, ktoré je výsledkom neobmedzenej expanzie buniek v kostnej dreni. Diferenciácia buniek sa zastavuje v štádiu blastov. Charakteristickým znakom CML je prítomnosť Philadelphia (Ph) chromozómu, ktorý vzniká recipročnou translokáciou medzi dlhými ramienkami chromozómov 9 a 22. Pri uvedenej translokácii t(9;22)(q34;q11) dochádza k fúzii génu *BCR* na chromozóme 22 s génom *ABL1* na chromozóme 9. Výsledkom je vznik patologického fúzneho génu *BCR-ABL1*⁽¹⁾. Neliečená CML prebieha v troch fázach, ktoré určujú progresiu ochorenia počtom trombocytov a blastových buniek v krvi a kostnej dreni. Prvotné štádium CML predstavuje chronická fáza (*angl. chronic phase, CP*), v ktorej je diagnostikovaných až 90% pacientov. Počas CP nezrelé blastové bunky proliferujú a diferencujú pomaly, v dôsledku čoho môže CP pretrvávať mesiace až roky. Diagnóza CML sa stanoví hematologickým a cytogenetickým vyšetrením a následne sa začne liečba inhibítormi tyrozínkinázy (TKI). V prvej línii liečby v CP sa pacienti v podmienkach SR môže podávať buď imatinib, alebo nilotinib v závislosti od stratifikácie pacienta pri stanovení diagnózy. Agresívnejšou formou CML je akcelerovaná fáza (*angl. accelerated phase, AP*), pri ktorej dochádza k zvýšenej proliferácii blastových buniek v periférnej krvi a kostnej dreni. V AP sa u pacientov môžu vyskytnúť prídavné chromozómové aberácie ako

prítomnosť extra chromozómu 8 alebo izochromozómu 17q (pozostáva z dvoch dlhých ramienok 17. chromozómu), ktoré sú považované za marker progresie ochorenia. Bez liečby progreduje AP do fatálnej blastovej fázy (*angl. blastic phase, BP*). Táto fáza sa správa ako chemorezistentná akútna leukémia. Pacientom v BP sa odporúča transplantácia krvotvorných buniek, ktorej predchádza kombinovaná liečba intenzívnou chemoterapiou a TKI. Prognóza je však krajne nepriaznivá. Vzhľadom na limitovanú účinnosť liečby pacientov v BP, je prínosom včasný záchyt prídavných zmien u rizikových pacientov⁽²⁾.

Éra tyrozínkinázových inhibítorov

Spočiatku bola liečba CML založená na podávaní perorálnej chemoterapie v podobe cytotoxických látok ako busulfán alebo hydroxyurea. U väčšiny liečených pacientov však nedosiahla dostatočnú liečebnú odpoveď a takmer všetci pacienti progredovali do AP a BP. Od roku 1981 sa na liečbu CML začal používať interferón-alfa (IFN- α). Ukázalo sa, že IFN- α má priamy antiproliferačný účinok a inhibuje patologickú sebaobnovu myeloidných progenitorov. Štandardnou liečebnou metódou pre pacientov v CP a AP bola transplantácia krvotvorných buniek, ktorá však bola zaťažovaná rizikom vysokej morbidita a mortality (napr. reakcia štepu proti hostiteľovi, GvHD). Vývoj malej molekuly imatinibmesylátu – tyrozínkinázového inhibítora spôsobil v roku 2000 revolúciu v liečbe

CML. Bolo dokázané, že TKI silne interferujú s interakciou medzi proteínom Bcr-Abl1 a adenosíntrifosfátom (ATP). TKI sa viaže v blízkosti väzobného miesta ATP, a tým sa stabilizuje tyrozínkináza v inaktívnej konformácii. Inhibíciou tohto procesu sa zastaví aktivácia signálnych dráh, ktoré podporujú leukemický fenotyp bunky. Tyrozínkinázy sú dôležitými mediátormi signálnej kaskády vo fyziologických bunkách. Určujú kľúčové úlohy v rôznych biologických procesoch, ako je proliferácia, diferenciácia, metabolizmus a apoptóza. Deregulovaná aktivita tyrozínkinázy je základom pre patogenézu ľudských onkologických ochorení.

Imatinib predstavuje TKI prvej generácie. Medzi TKI 2. generácie patrí bosutinib, dasatinib a nilotinib. Ponatinib je TKI 3. generácie. Cieľená terapia vo forme selektívnych TKI významne zlepšila prognózu, predĺžila celkové prežívanie aj kvalitu života pacientov s CML⁽³⁾.

Rezistencia proti TKI

Za chemorezistenciu nádorových buniek je zodpovedný celý rad bunkových mechanizmov. Rozoznávame dve kategórie rezistencie proti liečbe imatinibom, resp. TKI všeobecne – primárnu a sekundárnu. Ak nie je zaznamenaná odpoveď po iniciálnej liečbe, hovoríme o primárnej rezistencii. V prípade, keď momentu vzniku rezistencie predchádza liečebná odpoveď, ide o sekundárnu rezistenciu. Primárna rezistencia (vnútorná) sa vzťahuje na mechanizmy prítomné v bunke skôr, ako boli vystavené inhibítoru TK. Sekundárna rezistencia (získaná) je reprezentovaná farmakologickými parametrami, ktoré ovplyvňujú účinnosť liečiv molekulárnymi zmenami. Pri sekundárnej rezistencii dochádza k strate liečebnej odpovede. Bolo dokázané, že nádorové mikroprostredie prispieva k vnútornej, ale aj získanej rezistencii proti liečivám. Na mechanickej úrovni klasifikujeme rezistenciu proti TKI ako nezávislú od Bcr-Abl1 alebo závislú od Bcr-Abl1. Závislá rezistencia zahŕňa mechanizmy, najčastejšie bodové mutácie, ktoré sú priamo závislé od kinázy Bcr-Abl1. Rezistencia nezávislá od Bcr-Abl1 je sprostredkovaná rôznymi alternatívnymi signálnymi dráhami v nádorových bunkách. Klinická rezistencia je pozorovaná prostredníctvom obidvoch mechanizmov, pričom získaná rezistencia je pravdepodobnejšie závislá od Bcr-Abl1. Primárna rezistencia má tendenciu byť nezávislá od Bcr-Abl1. Rezistencia proti TKI je spojená s nepriaznivými klinickými výsledkami⁽⁴⁾.

Sekundárna rezistencia

Mutácie v kinázovej doméne *BCR-ABL1* génu sú najčastejšou príčinou sekundárnej rezistencie proti liečbe TKI. Bolo opísaných viac ako 100 mutácií v Abl1 tyrozínkinázovej doméne. Najznámejšou mutáciou u rezistentných pacientov je c.944C > T vedúca k zámene aminokyselín treonínu za izoleucín v pozícii 315 proteínu Bcr-Abl1 (p. T315I), ktorá spôsobuje posun Abl1 kinázy k aktívnej konformácii. Naopak, mnohé bodové „missense“ mutácie Abl1 kinázovej domény pravdepodobne nemajú príčinnú súvislosť so vznikom rezistencie, v niektorých prípadoch môže byť takáto mutácia prítomná aj pri dostatočnej odpovedi na liečbu. Preto interpretácia kauzálnej súvislosti rezistencie a mutácie musí vychádzať z klinického stavu a aktuálnych laboratórnych výsledkov monitorovania.

Bodové mutácie v kinázovej doméne *BCR-ABL1* génu možno detegovať pomocou viacerých metód s rôznou úrovňou senzitivity aj časovej a manuálnej náročnosti. V bežnej laboratórnej praxi je najpoužívanější metódou priame sekvenovanie Abl1 kinázovej domény (senzitivita 10 – 20%), alelovo špecifická PCR (ASO-PCR – allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction, senzitivita 0,01 – 0,1%) a NGS sekvenovanie (sekvenovanie novej generácie, senzitivita 1%).

Možnosti detekcie prítomnosti mutácií pomocou molekulových metód

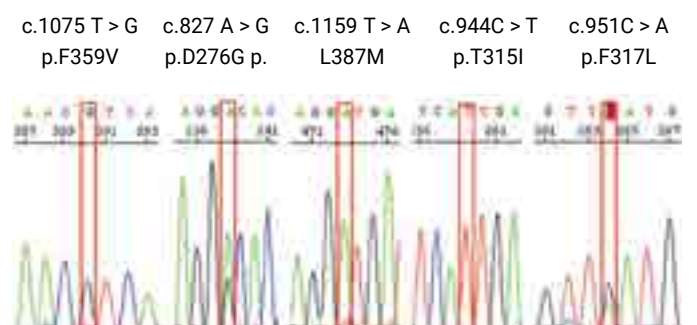
Sangerovo sekvenovanie

Sangerovo sekvenovanie je najrozšírenejšia metóda pri rutinnom monitorovaní pacientov, ale má obmedzenú citlivosť detekcie 15 – 20%. Pred samotným Sangerovým sekvenovaním musí prebehnúť amplifikácia fúzneho génu *BCR-ABL1* pomocou nested polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). V prvom kroku nested PCR sa amplifikuje celá kinázová doména fúzneho génu *BCR-ABL1*. V druhom kroku nested PCR dochádza k amplifikácii fragmentu Abl1 kinázy. Produkty PCR sa analyzujú sekvenovaním. Princípom Sangerovho sekvenovania je syntéza nového reťazca DNA pomocou DNA polymerázy a inkorporácia terminačného dideoxynukleozidtrifosfátu (ddNTP). Termináciou syntézy vznikajú rôzne dlhé DNA fragmenty, ktoré sú zakončené konkrétnym ddNTP. Po skončení sekvenovania prebehne elektroforetická separácia vzniknutých DNA fragmentov na základe ich veľkosti (**obrázok 1**). Výsledné sekvencie sa porovnávajú s referenčnou sekvenciou zdravého jedinca. Reakčná zmes Sangerovho sekvenovania musí obsahovať templátovú (vyšetrovanú) DNA, DNA polymerázu, dNTP, ddNTP, špecifický primer a reakčný pufor.

Alelovošpecifická PCR

Alelovošpecifická PCR (AS-PCR) poskytuje informáciu o prítomnosti alebo neprítomnosti mutácie na jednej alele génu. Na stanovenie genotypu je nutné, aby prebehli dve PCR reakcie, jedna slúži len na amplifikáciu alely bez mutácie, druhá reakcia je špecifická pre mutantnú alelu (**obrázok 2**). Príslušné PCR primery sú sekvenčne identické, odlišujú sa len v nukleotide na 3' konci, čím sa zabezpečí preferenčná amplifikácia jednej alely pred druhou. Na vylúčenie nesprávnej genotypizácie v dôsledku zlyhania PCR sa do každej z reakcií

Obrázok 1. Sekvenogramy mutácií detegovaných na oddelení genetiky, Medirex



pridáva ďalší pár alelovonespecifických primerov pre amplifikáciu kontrolného fragmentu. AS-PCR ponúka výhody v podobe rýchlejších výsledkov analýzy, nižších nákladov a ľahšieho pracovného protokolu. Jej detekčný limit je 0,5 – 1% mutovanej alely⁽⁵⁾. Nevýhodou metódy je, že je schopná detegovať len konkrétnu mutáciu.

NGS – sekvenovanie novej generácie

NGS (sekvenovanie novej generácie) umožňuje detegovať a kvantifikovať variant v Bcr-Abl1 transkriptoch až na úrovni 1%. NGS pozostáva z troch krokov. V prvom kroku dochádza

Obrázok 2. AS-PCR: Detekcia prítomnosti mutácie T315I pomocou AS-PCR. Dráha 1 – 6: prítomnosť mutácie T315I (veľkosť asi 200 bp) a kontrolného fragmentu (veľkosť asi 500 bp), dráha 7 – 12: prítomnosť len kontrolného fragmentu (veľkosť asi 500 bp), bez detekcie mutácie T315I.

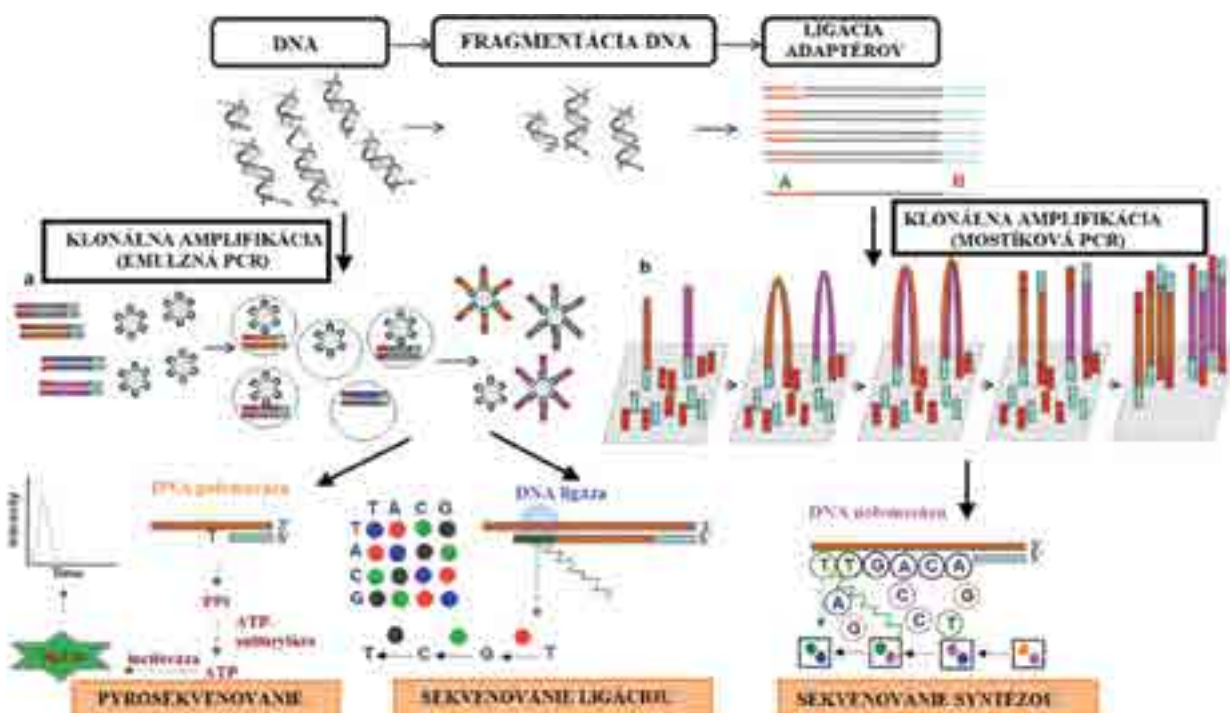


k vytvoreniu sekvenačnej knižnice fragmentáciou genomickej DNA. V druhom kroku sa sekvenačná knižnica amplifikuje. V treťom kroku dochádza k masívnemu paralelnému sekvenovaniu každej jednej molekuly DNA v špeciálnom sekvenátore (**obrázok 3**). Presnosť NGS metódy závisí od počtu čítaní každého fragmentu DNA. U pacientov so zlyhaním na liečbe TKI sa môžu vyskytnúť mutácie pod detekčným limitom Sangerovho sekvenovania, ktoré sa rutinne využíva vo väčšine laboratórií. NGS metóda môže byť užitočná u pacientov, ktorí nezlepšujú svoje odpovede na terapiu druhou, resp. treťou líniou TKI. U pacientov v AP a BC je často detegovaných viac mutácií, keď metóda NGS môže poskytnúť jednoduchý spôsob identifikácie viacerých mutácií u jedného pacienta⁽⁶⁾.

Záver

Cielená liečba pomocou TKI výrazne zlepšila prognózu aj kvalitu života pacientov s CML. Problémom terapie však zostáva rezistencia, preto je potrebné poznať biologickú podstatu rezistencie a prispôbiť jej liečebnú stratégiu. Potvrdenie mutácie v kinázovej doméne ako príčiny rezistencie má veľký klinický význam, pretože umožňuje včas ovplyvniť neefektívnu terapiu. Podľa typu zistenej mutácie dochádza k zvýšeniu dávky podávaného liečiva alebo k zmene liečby. V prípade rezistencie proti imatinibu možnosť úspešnej terapie prinášajú TKI 2. generácie, resp. 3. generácie, niektoré z nich už v súčasnosti zastávajú miesto aj v prvolínievej liečbe CML. V ojedinelých prípadoch do úvahy prichádza aj alogénna transplantácia krvotvorných buniek. Úlohou molekulovej genetiky je presná a rýchla detekcia mutácií aj ďalšie monitorovanie vývoja mutovaného leukemického klonu.

Obrázok 3. Princíp NGS sekvenovania (upravené podľa Arora, 2019)⁽⁷⁾. Základom NGS sekvenovania je chemická reakcia (DNA syntéza alebo ligácia). Signál z chemických reakcií je následne transformovaný do sekvenačných dát. Dáta sú analyzované pomocou viacerých softvérov, napr. Finalist Dx, Ingenuity a IGV.



LITERATÚRA

1. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes J E. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clinic Proceedings* 2015; 90(10): 1440-1454.
2. Gong Z, Medeiros L.J., Cortes, JE, et al. Cytogenetics-based risk prediction of blastic transformation of chronic myeloid leukemia in the era of TKI therapy. *Blood Advances* 2017; 1(26): 2541-2552.
3. Jabbour E. Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice. *American Journal of Hematology* 2015; 91(1): 59-66.
4. Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, et al. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting BCR-ABL Drug Resistance Mutations in Chronic Myelogenous Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Molecular Diagnostics* 2009; 11: 4-11.
5. Kockan B, Toptas T, Atikündüz Tuglular AT, et al. Molecular screening and the clinical impacts of BCR-ABL KD mutations in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Oncology Letters* 2018; 15(2): 2419-2424.
6. Soverini S, Abruzzese E, Bocchia M, et al. Next-generation sequencing for BCR-ABL1 kinase domain mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia: a position paper. *Journal of Hematology & Oncology* 2019; 12: 131.
7. Arora PM. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. *Microbial Technology for the Welfare of Society* 2019; (313-341), ISBN 978-981-13-8843-9.

Bc. Michaela Bezečná

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4
e-mail: bezeznamiska@gmail.com

Potenciálna terapia pre alkaptonúriu – príbeh spolupráce vedy, kliniky a pacientov

Andrea Zaťková¹, Helena Glasová^{1,2}, Richard Imrich^{1,3}

¹Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

²Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka Univerzita v Bratislave

³Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

V priebehu posledných 10 rokov sme svedkami zvýšeného záujmu o alkaptonúriu (AKU, OMIM, No. 203500), zriedkavé ochorenie, ktoré má na Slovensku primát. Kým celosvetová incidencia AKU je 1 : 250 000 až 1 : 500 000, na Slovensku sa ochorenie vyskytuje omnoho častejšie – 1 : 19 000⁽¹⁾. V januári 2019 sa skončila klinická časť projektu DevelopAKUre (7RP EÚ), ktorého súčasťou bolo klinické skúšanie SONIA 2 zamerané na testovanie efektívnosti a bezpečnosti lieku nitizinón v liečbe tohoto ochorenia. Výskum sa uskutočnil pod vedením vedcov Kráľovskej univerzitnej nemocnice v Liverpoole (RLUH) a britskej Spoločnosti pre alkaptonúriu (AKU Society). V medzinárodnom konzorciu však boli aktívne zapojené aj 2 pracoviská zo Slovenska, ako aj mnohí slovenskí pacienti, preto chceme príbeh AKU priblížiť aj čitateľom Newslabu. Výsledky štúdie SONIA 2 neboli zatiaľ publikované, ale výrobca lieku, firma SOBI (Swedish Orphan Biovitrum) už komunikovala svoj úmysel požiadať Európsku liekovú agentúru (the European Medicines Agency, EMA) o povolenie používať liek pre AKU. To dáva mnohým pacientom nádej, že AKU bude pravdepodobne jedným z ochorení, pre ktoré v roku 2020 budeme mať možnú terapiu. V súčasnosti sa tento liek vo viacerých krajinách používa mimo schválenej indikácie (off-label).

Kľúčové slová: alkaptonúria, HGD gén, porucha metabolizmu, liečba zriedkavých ochorení, nitizinón

Potential therapy for alcaptonuria – a story of cooperation among science, clinic and patients

Over the past 10 years, we have witnessed an increased interest in the rare disease alcaptonuria (AKU, OMIM, No. 203500), which has a primate in Slovakia. While the worldwide incidence of AKU is 1 : 250 000 to 1 : 500 000, the disease is much more common in Slovakia – 1 : 19000⁽¹⁾. In January 2019 a clinical part of the DevelopAKUre project (FP7 EU) finished, which included the SONIA2 study to test the effectiveness and safety of nitizinone in the treatment of the disease. The research was conducted under the leadership of scientists at the Royal University Hospital in Liverpool (RLUH) and the British Alcaptonuria Society (AKU Society). However, two teams from Slovakia as well as many Slovak patients were actively involved in the international consortium, so we want to bring a closer story of AKU to readers of Newslab. The results of the SONIA2 study have not been published yet, but the drug manufacturer, SOBI (Swedish Orphan Biovitrum) has already communicated its intention to ask the European Medicines Agency (EMA) for permission to use the medicine for AKU. It gives many patients the hope that AKU is likely to be one of the diseases, for which we will have therapy in 2020. This drug is currently being used off-label in several countries.

Keywords: alcaptonuria, HGD gene, metabolic disorder, treatment of rare diseases, nitisinone

Newslab, 2020; roč. 11 (1): 41 – 45

Z histórie výskumu AKU

AKU je ochorenie, pri ktorého definícii bol na začiatku minulého storočia prvýkrát spomenutý pojem „vrodená porucha metabolizmu“ s mendelistickou autozomálne recesívnou dedičnosťou⁽²⁾. Konkrétny metabolický blok pri AKU bol opísaný o 50 rokov neskôr ako deficit homogentizát-1,2-dioxygenázy (HGD), enzýmu zodpovedného za štiepenie kyseliny homogentizovej (HGA) v metabolizme fenylalanínu a tyrozínu⁽³⁾. O ďalších 40 rokov bola špecifikovaná genetická podstata ochorenia u človeka a gén kódujúci tento enzým bol mapovaný vďaka väzbovej analýze v rodinách aj slovenských pacientov na chromozóm 3q13.33^(4,5). Krátko nato bola opísaná štruktúra génu a identifikované prvé mutácie v rodinách

pacientov⁽⁶⁾. HGD gén pozostáva zo 14 exónov a celosvetová HGD mutačná databáza (<http://hgddatabase.cvtisr.sk>), ktorú sme vytvorili a spravujeme, do dnešných dní eviduje 212 rôznych variantov tohto génu, identifikovaných približne u 530 pacientov z celého sveta^(7,8).

Dôležitým bodom v dejinách výskumu AKU bol vznik AKU Society (2003, www.akusociety.org), prvej AKU pacientskej organizácie na svete. Od začiatku bolo jej cieľom poskytnúť podporu a informácie pacientom a rodinám, ako aj umožniť vzájomné stretávanie a spoznávanie AKU pacientov v Spojenom kráľovstve, ale aj na medzinárodnej úrovni, aby sa tak zabránilo pocitom sociálnej izolovanosti, ktorou pacienti so zriedkavými chorobami často trpia. Pri zrode tejto

organizácie bol Dr. Lakshminarayan Ranganath z Liverpoolu a pacient Robert Gregory, ku ktorým sa čoskoro pridali aj Dr. Nicolas Sireau, otec dvoch detí s AKU. Ich dlhoročná práca, neúnavné kampane, financovanie výskumných projektov a budovanie partnerstiev viedli aj k vytvoreniu konzorcia DevelopAKUre a série významných medzinárodných klinických skúšok SONIA 1, SONIA 2 a SOFIA v Európe (2012 – 2019), o ktorých budeme hovoriť neskôr.

V roku 2013 v Liverpoole založili tiež prvé Národné centrum AKU Roberta Gregoryho (NAC) (so sídlom v Royal University Hospital), pomenované práve po spoluzakladateľovi AKU Society. NAC odvtedy poskytuje vyšetrenia a liečbu ľuďom s AKU žijúcim v Anglicku a Škótsku. Následne bolo zriadených niekoľko sesterských spoločností AKU vo viacerých krajinách vrátane Slovenska, aby sa tak zvýšila informovanosť o AKU (Klub čiernych kostí – Slovensko, AIMAKU – Taliansko, DSAKU – Nemecko, ALCAP – Francúzsko, AKU Society Netherlands, AKU Society Asia-Pacific, AKU Society North America, Jordánska spoločnosť AKU, Brazílska spoločnosť AKU a AKU Society India). Tieto spoločnosti zohrávajú kľúčovú úlohu pri vyhľadávaní aj udržiavaní pacientov ochotných zapojiť sa do biomedicínskeho výskumu vrátane klinických štúdií, čo je náročné zvlášť pri zriedkavých ochoreniach.

AKU na Slovensku

Výskum AKU na Slovensku má svoju dlhoročnú tradíciu vďaka vyššiemu výskytu tohto ochorenia u nás. Prvý prípad AKU na Slovensku opísal prof. Siťaj v roku 1944 a v roku 1951 prof. Neuwirth objavil veľký súbor pacientov na Kysuciach, ktorý potom ďalej klinicky študovali s kolegami prof. Siťajom a prof. Urbánkom. Na základe ich práce bola v roku 1956 publikovaná veľká monografia *Alkaptonúria a ochronóza*⁽⁹⁾, ktorá predstavuje prvý veľký komplexne spracovaný súbor chorých s alkaptonúriou a ochronózou vo svete.

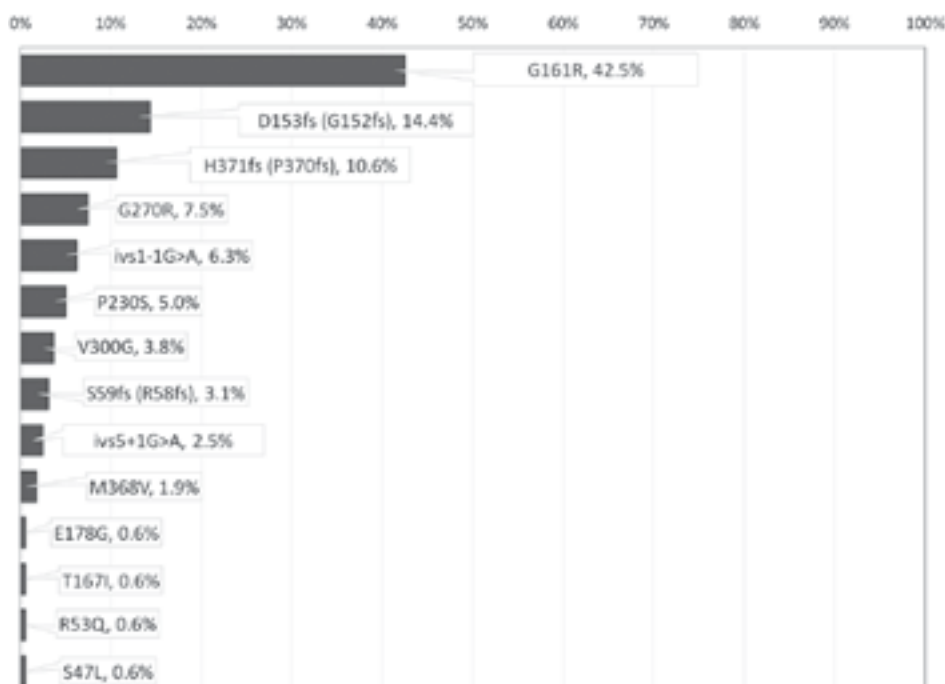
Na ich štúdie neskôr (po roku 1968) nadviazal ďalší významný slovenský pediater, zakladateľ slovenskej lekárskej genetiky, profesor Štefan Sršeň spolu s manželkou docentkou Sršňovou a ďalšími spolupracovníkmi z Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského. Skrúingom vyšetrili 610 000 obyvateľov Slovenska a do roku 1996 zaevidovali 204 pacientov s alkaptonúriou, z toho 106 detí do 15. roku života, čo predstavuje najväčší súbor detských pacientov na svete⁽¹⁰⁾. Vykonali tiež skrúing v skupine 509 192 novorodencov, na základe ktorého odhadli incidenciu AKU na Slovensku na 1 : 19 000⁽¹¹⁾. V spolupráci s laboratóriom v Münsteri (Nemecko) uskutočnili aj prvé genetické štúdie u slovenských pacientov⁽¹¹⁾.

Pri počte obyvateľov asi 5 miliónov sa odhaduje, že na Slovensku by malo v súčasnosti byť okolo 270 pacientov s AKU a asi 72 450 zdravých prenášačov. V súčasnosti sa AKU pacientom venujú jednak miestni reumatológovia, ale hlavne NÚRCH v Piešťanoch, ktorý je neformálnym centrom starostlivosti o AKU pacientov u nás.

Genetike AKU sa v laboratóriu genetiky človeka ÚKTV, BMC SAV (predtým ÚMFG SAV) venujeme od roku 1998. V spolupráci s Dr. Bošákom a neskôr prof. Rovenským z NÚRCH v Piešťanoch sme uskutočnili komplexné genetické analýzy v rodinách, ktoré ukázali, že na Slovensku máme až 14 rôznych HGD variantov spôsobujúcich toto zriedkavé ochorenie (**obrázok 1**). Tento výsledok naznačuje, že zvýšenú frekvenciu AKU u nás nemožno vysvetliť len klasickým efektom zakladateľa, ako sa predpokladalo na základe identifikácie zvýšeného výskytu ochorenia hlavne v oblasti bývalých genetických izolátov na Kysuciach⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Analýza haplotypov spojených s jednotlivými mutáciami v rodinách naznačuje, že časť mutácií bola na Slovensko importovaná počas niekoľkých migrácií európskej populácie, ktoré sa rozšírili do západnej Európy, pričom druhú skupinu tvoria mutácie, ktoré majú svoj pôvod skutočne u nás⁽¹²⁾.

Obrázok 1. Percentuálne zastúpenie 14 variantov HGD génu identifikovaných u AKU pacientov pochádzajúcich z 80 rodín zo Slovenska (160 AKU chromozómov)



Je možné, že došlo k náhodnému zvýšeniu počtu mutácií na Slovensku, pričom k ich udržaniu a rozšíreniu prispela následná genetická izolácia a genetický drift. K identifikácii vyššieho počtu pacientov s AKU na Slovensku prispel aj aktívny spôsob vyhľadávania chorých, ktorý má u nás dlhoročnú tradíciu.

Laboratórium genetiky človeka BMC SAV sa v priebehu rokov stalo medzinárodným centrom genetickej analýzy AKU pacientov. V roku 2010 sme zriadili a spravujeme už spomínanú celosvetovú HGD mutačnú databázu (<http://hgddatabase.cvtisr.sk>)^(7,8). Táto databáza obsahuje varianty identifikované v našom laboratóriu, ale aj publikovaných v celosvetovej odbornej literatúre. V databáze sú k dispozícii aj výsledky analýz predpokladaného efektu jednotlivých missense mutácií génu na štruktúru a funkciu HGD proteínu, aj jednotlivé haplotypy spojené s HGD mutáciami na Slovensku a v iných krajinách.

Klinické príznaky ochorenia a mechanizmus vzniku ochronózy

V dôsledku metabolického bloku pri AKU dochádza už od narodenia k hromadeniu kyseliny homogentízovej (HGA), ktorá sa čiastočne vylučuje močom. Keďže HGA sa oxidáciou mení na hnedočierny pigment, ako prvý príznak je väčšinou identifikované tmavnutie moču na vzduchu (homogentizúria).

Nevylúčená HGA sa v priebehu rokov postupne hromadí v tele pacientov, a to hlavne v spojivovom tkanive. To vedie neskôr k závažným multisystémovým poškodeniam, ktoré sa začínajú prejavovať už medzi 20. – 30. rokom života. Ochronóza – tmavé sfarbenie spojivových tkanív, hlavne chrupky – sa manifestuje na ušniciach, v menšom rozsahu aj na koži a očných bielkach. Akumulácia ochronotického pigmentu v chrupkách vedie postupne k bolestivej degeneratívnej ochronotickej artropatii, poškodzujúcej hlavne chrbticu, bedrové, ramenné a kolenné kĺby. Vážnou komplikáciou je kalcifikácia aortálnych a mitrálnych chlopní. Často sa vyskytujú obličkové a prostatické kamene.

Počiatková pigmentácia je pozorovaná v jednotlivých chondrocytoch kalcifikovanej chrupky a v ich okolitom matrici⁽¹⁵⁾. Toto spôsobuje ložiskovú stuhnutosť chrupky a mení sa rozloženie zaťaženia. Následne sa ochronóza šíri smerom do hyalínovej chrupky. Pigmentovaná chrupka vytvára akoby škrupinu, ktorá je tuhá a láme sa, čo má vplyv na podkladovú trabekulárnu košť. Ochronotická chrupka nie je schopná poskytnúť potrebnú ochranu kosti pred normálnym mechanickým zaťažením a začína jej agresívna resorpcia. Fragmenty chrupky sú prítomné aj v kostnej dreni aj v synoviálnom tkanive⁽¹⁵⁾. Ochronóza teda spôsobuje bolestivé ničenie veľkých kĺbov nesúcich váhu a fúzie stavcov. Celý proces sprevádzajú chronický slabší zápal a amyloidóza⁽¹⁶⁾. Progredujúce poškodenie vedie k invalidizácii.

Prehľad klinických príznakov pri AKU sumarizujú práce^(17,18) vrátane opisu spôsobu určenia skóre AKUSSI (Alkaptonuria Severity Score Index) používaného na hodnotenie závažnosti a progresie príznakov AKU.

Nová nádej pre terapiu AKU

Kauzálna liečba AKU momentálne ešte nie je k dispozícii. Doposiaľ boli možnosti liečby AKU limitované a zamerané

len na zmiernenie príznakov. Hlavným cieľom je kontrola bolesti, fyzioterapia a rehabilitácia a v prípade nevyhnutnej potreby náhrada poškodených kĺbov.

S cieľom znížiť hladinu HGA a jej oxidácie na ochronotický pigment bolo v minulosti odporúčané aj požívanie rôznych kombinácií antioxidantov, chýbajú však dáta potvrdzujúce efektívnosť týchto postupov. Naopak, kyselina askorbová je kofaktorom dioxygenázy 4-hydroxyfenylpyruvátu, a teda môže prispieť k zvýšeniu produkcie HGA. Pacientom sa tiež odporúča nízkoproteínová diéta, dlhodobá compliance je však problematická.

Nádej pre AKU pacientov predstavuje nitizinón. Tento liek je inhibítor enzýmu p-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenázy, zodpovedného za premenu hydroxyfenylpyruvátu na HGA. Pôvodne indikovaný na liečbu hereditárnej tyrozinémie typ 1 (Orfadin[®]) vyvinutý firmou SOBI). Už v roku 2011 publikované výsledky klinickej štúdie, uskutočnenej National Institute of Health (USA), ukázali, že nitizinón znižuje hladinu HGA v moči až o 95 %⁽¹⁹⁾. Štúdia však nepreukázala klinickú účinnosť nitizinónu, pretože sa nepotvrdilo zlepšenie pohyblivosti bedrového kĺbu AKU pacientov, čo bol hlavný výstupný parameter štúdie⁽¹⁹⁾. Vďaka aktivitám AKU spoločnosti z Anglicka, ktorá bola iniciátorom novej vlny záujmu o toto zriedkavé ochorenie, vzniklo v roku 2012 už spomínané DevelopAKUre konzorcium, ktoré s podporou projektu 7RP Európskej komisie začalo novú štúdiu s cieľom testovať nitizinón pre AKU. NÚRCH v Piešťanoch, RLUH v Liverpoole a Hospital Necker v Paríži boli 3 centrami klinického skúšania, v ktorých prebiehali postupne 3 štúdie – SONIA 1, SONIA 2 a SOFIA (<http://www.developakure.eu/>). Na projekte sa podieľalo aj oddelenie genetiky človeka ÚKTV, BMC SAV, ktoré bolo zodpovedné za mutačnú analýzu u všetkých pacientov zapojených do štúdií.

Prvá štúdia projektu, SONIA 1, bola realizovaná v Liverpoole a v Piešťanoch. Išlo o krátku štúdiu, trvala 4 týždne a určila dávku 8 mg nitizinónu denne ako nejefektívnejšiu na zníženie koncentrácie HGA v moči pacientov⁽²⁰⁾.

Do dlhodobej štúdie SONIA 2 bolo už zapojených 138 pacientov a jej cieľom bolo preukázať, že nitizinón je efektívny a bezpečný na použitie u AKU pacientov. Kontrolnú skupinu 69 pacientov, ktorí boli bez liečby, porovnali so 69 pacientmi, ktorí počas 4 rokov užívali 10 mg nitizinónu denne. Pacienti z oboch skupín pravidelne navštevovali centrá klinického skúšania a mali sledované viaceré parametre, ktoré sa na záver štúdie porovnali. Definitívne výsledky tejto štúdie, ktorej klinická časť sa skončila v januári 2019, ešte neboli publikované, no výrobca lieku, SOBI, už komunikoval svoj úmysel požiadať Európsku liekovú agentúru (EMA) o povolenie používať liek pre AKU.

Doterajšie skúsenosti s nitizinónom, či už v štúdiu SONIA 2, alebo v prípade off-label liečby, ukazujú, že je nevyhnutný multiodborový prístup k manažmentu pacientov s AKU. Okrem prirodzenej úlohy reumatológa a klinického genetika je potrebné komplexný prístup doplniť o kvalitné nutričné poradenstvo. Pre možný výskyt keratopatie počas liečby nitizinónom ako hlavného a očakávaného nežiaduceho účinku, bude potrebné zaviesť pravidelné biochemické monitorovanie koncentrácie tyrozínu v sére a sledovanie pacientov očným lekárom. Vznik keratopatie sa dáva do súvislosti práve so zvýšením hladiny tyrozínu počas liečby nitizinónom, no

presný mechanizmus nie je úplne jasný. Z pohľadu klinického výskumu bude preto potrebné zamerať sa na hľadanie biomarkerov vzniku keratopatie.

Otvorená prierezová štúdia SOFIA, do ktorej sa zapojilo 32 pacientov s AKU a 30 kontrolných jedincov, prebiehala len v Liverpoole. Cieľom štúdie bolo zistiť, v akom veku sa poškodenie pri AKU začína, čo sa týka klinicky manifestovaných aj subklinických prejavov ochorenia⁽²¹⁾. Primárnym výsledkom bol sledovanie prítomnosti ochronózy v ušnej biopsii. Sekundárne výsledky zahŕňali analýzu fotografií očí a uší, koncentráciu HGA v sére a v moči aj markery poškodenia/zápalu/oxidácie tkanív, MRI, test chôdze, kvality života a index závažnosti skóre alkaptonúrie (qAKUSSI). Ochronóza v tkanive biopsie z ucha bola prítomná už u 20-ročného pacienta, čo naznačuje, že subklinické prejavy sú pozorovateľné ešte pred týmto vekom.

V súčasnosti prebiehajú prípravy na pediatrickú klinickú štúdiu. Informácie z týchto štúdií budú dôležité pre rozhodovanie, v akom veku treba začať liečbu, aby sa zabránilo rozvoju príznakov.

Zvierací model AKU

Dôležitú úlohu vo výskume AKU zohralo vytvorenie experimentálneho modelového organizmu – AKU myši. Využíva sa pri štúdiu patofyziológie AKU a tiež efektu potenciálnej liečby. V roku 2014 bol publikovaný nový myšší model AKU⁽²²⁾, pri ktorom už od začiatku života možno pozorovať lineárne stúpajúcu ochronózu, pričom priemerné celoživotné hladiny HGA v plazme zostávajú relatívne konštantné. Je zaujímavé, že u týchto myši nebolo pozorované konečné/terminálne štádium pigmentácie kalcifikovaných a hyalínových chrupiek, charakteristické pre AKU u ľudí, čo naznačuje, že ochronóza u myši reprezentuje skoré štádiá prítomné v kĺboch u človeka s AKU. Celoživotné podávanie nitizínou týmto AKU myšiam viedlo k 88% zníženiu plazmatického

HGA a k úplnému blokovaniu pigmentácie chondrocytov, čím sa potvrdilo, že ak sa nitizín začne podávať včas, môže zastaviť priebeh ochronózy^(22,23).

Variabilita závažnosti ochorenia

U pacientov s AKU bola pozorovaná variabilita v závažnosti ochorenia. Už v roku 2000 Rodriguez a kol.⁽²⁴⁾ pozorovali rozdielnu reziduálnu aktivitu HGD enzýmu nesúceho rôzne missense mutácie, čo sme následne potvrdili aj v našej práci⁽⁶⁾. Predpokladalo sa, že práve rozdielna reziduálna aktivita určuje aj rozdiely v závažnosti ochorenia. V rámci štúdie SONIA 2 sme preto uskutočnili analýzu korelácie medzi genotypom a fenotypom, konkrétne u pacientov s mutáciou G161R, pri ktorej je zachované len 1 % aktivity enzýmu, v porovnaní so skupinou nesúcou mutácie M368V a A122V, ktoré, naopak, mali asi až 30 % aktivity divokého typu⁽⁶⁾. Hoci medzi oboma skupinami bol pozorovaný rozdiel v hladine HGA vylučovanej močom za 24 h, kompenzovanej na príjem proteínov, tento rozdiel sa však neprejavil do významných rozdielov v sledovaných klinických parametroch⁽⁶⁾.

To znamená, že pri AKU sa nepotvrdil priamy efekt typu mutácie *HGD* génu na variabilitu fenotypu ochorenia. Pretože je pozorovaná vysoká intra- aj interindividuálna variabilita hladín HGA v moči, predpokladáme, že je závislá hlavne od celkového príjmu bielkovín v strave (t. j. tyrozínu) a od renálnych funkcií⁽²⁵⁾.

Nevyklúčujeme však, že môžu prispievať aj ďalšie faktory – genetické alebo biomechanické. V budúcnosti sa bude treba zamerať na identifikáciu týchto potenciálnych faktorov, a to analýzou súrodeneckých párov, u ktorých je rozdielnosť fenotypu pozorovaná. Zároveň bude potrebné identifikovať faktory, ktoré prispievajú k rozvoju keratopatie počas liečby nitizínom a vypracovať komplexný protokol manažmentu pacientov s AKU.

LITERATÚRA

1. Srsen S, Koska L, Kapralik I. [Alkaptonuria in the Upper Hron Region in Slovakia (author's transl)]. *Cas Lek Cesk* 1978; 117(49): 1517-1522.
2. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 1902; 2: 1616-1620.
3. La Du BN. Alkaptonuria. In: Scriver CR, Beauder AL, Sly W, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. New York: McGraw Hill; 1958: 1371-1386.
4. Janocha S, Wolz W, Srsen S, et al. The human gene for alkaptonuria (AKU) maps to chromosome 3q. *Genomics* 1994; 19(1): 5-8.
5. Pollak MR, Chou YH, Cerda JJ, et al. Homozygosity mapping of the gene for alkaptonuria to chromosome 3q2. *Nat Genet* 1993; 5(2): 201-204.
6. Fernández-Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, et al. The molecular basis of alkaptonuria. *Nat Genet* 1996; 14(1): 19-24.
7. Zatkova A, Sedlackova T, Radvansky J, et al. Identification of 11 Novel Homogentisate 1,2 Dioxygenase Variants in Alkaptonuria Patients and Establishment of a Novel LOVD-Based HGD Mutation Database. *JIMD Reports* 2012; 4: 55-65.
8. Ascher DB, Spiga O, Sekelska M, et al. Homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD) gene variants, their analysis and genotype-phenotype correlations in the largest cohort of patients with AKU. *Eur J Hum Genet* 2019; 27(6): 888-902.
9. Sifaj Š, Červeňanský J, Urbánek T. Alkaptonúria a ochronóza. Vol 1. Bratislava: Slovenská akadémia vied; 1956.
10. Srsen S, Muller CR, Fregin A, Srsnova K. Alkaptonuria in Slovakia: thirty-two years of research on phenotype and genotype. *Mol Genet Metab* 2002; 75(4): 353-359.
11. Gehrig A, Schmidt SR, Muller CR, Srsen S, Srsnova K, Kress W. Molecular defects in alkaptonuria. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 76(1-2): 14-16.
12. Zatkova A, Beltrán-Valero de Bernabé D, Polakova H, et al. High frequency of alkaptonuria in Slovakia: evidence for the appearance of multiple mutations in HGO involving different mutational hot spots. *Am J Hum Genet* 2000; 67(5): 1333-1339.
13. Zatkova A, Beltrán-Valero de Bernabé D, Polakova H, et al. Allele heterogeneity of alkaptonuria causing mutations and possible reasons for high incidence of this disease in Slovakia. *Lekarsky Obzor* 2000; 49: 347-352.
14. Zatkova A. An update on molecular genetics of Alkaptonuria (AKU). *J Inherit Metab Dis* 2011; 34(6): 1127-1136.
15. Gallagher JA, Taylor AM, Boyde A, et al. Recent advances in understanding the pathogenesis of ochronosis. *Reumatologia* 2012; 50(4): 316-323.
16. Millucci L, Braconi D, Bernardini G, et al. Amyloidosis in alkaptonuria. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38(5): 797-805.
17. Ranganath LR, Cox TF. Natural history of alkaptonuria revisited: analyses based on scoring systems. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34(6): 1141-1151.
18. Ranganath LR, Norman BP, Gallagher JA. Ochrotonic pigmentation is caused by homogentisic acid and is the key event in alkaptonuria leading to the destructive consequences of the disease-A review. *J Inherit Metab Dis* 2019; 42(5): 776-792.
19. Introne WJ, Perry MB, Troendle J, et al. A 3-year randomized therapeutic trial of nitizine in alkaptonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 103(4): 307-314.

20. Ranganath LR, Milan AM, Hughes AT, et al. Suitability Of Nitisinone In Alkaptonuria 1 (SONIA 1): an international, multicentre, randomised, open-label, no-treatment controlled, parallel-group, dose-response study to investigate the effect of once daily nitisinone on 24-h urinary homogentisic acid excretion in patients with alkaptonuria after 4 weeks of treatment. *Ann Rheum Dis* 2016; 75(2): 362-367.
21. Cox TF, Psarelli EE, Taylor S, et al. Subclinical Ochronosis Features In Alkaptonuria: A Cross-Sectional Study. *BMJ Innovations* (in press). 2019.
22. Preston AJ, Keenan CM, Sutherland H, et al. Ochronotic osteoarthropathy in a mouse model of alkaptonuria, and its inhibition by nitisinone. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(1): 284-289.
23. Keenan CM, Preston AJ, Sutherland H, et al. Nitisinone Arrests but Does Not Reverse Ochronosis in Alkaptonuric Mice. *JIMD Rep* 2015; 24: 45-50.
24. Rodriguez JM, Timm DE, Titus GP, et al. Structural and functional analysis of mutations in alkaptonuria. *Hum Mol Genet* 2000; 9(15): 2341-2350.
25. Ranganath LR, Khedr M, Milan AM, et al. Nitisinone arrests ochronosis and decreases rate of progression of Alkaptonuria: Evaluation of the effect of nitisinone in the United Kingdom National Alkaptonuria Centre. *Mol Genet Metab* 2018; 125(1-2): 127-134.



Mgr. Andrea Zatková, PhD.
Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava
e-mail: andrea.zatkova@savba.sk

LIQUID-BASED CYTOLÓGIA (LBC)

DÔLEŽITÁ SÚČASŤ PREVENTÍVNEJ GYNEKOLOGICKEJ PREHLIADKY

Najmodernejšie cytologické vyšetrenie na spoľahlivý záchyt nádorových zmien buniek krčka maternice už v ich včasných štádiách.

Liquid **B**ased **C**ytology

www.zenskeveci.com/cytologia

V laboratóriách Medicyt používame pri vyhodnocovaní cytologických preparátov ako jediní na Slovensku počítačom riadený automatický mikroskop, ktorý pracuje nepretržite 24 hodín denne a rozpozná aj tie najmenšie zmeny, ktoré by mohli ľudskému oku uniknúť. Spoľahlivý výsledok vyšetrenia tak prechádza dvojitou kontrolou – automatického mikroskopu aj lekára cytológa.



Kazuistika toxoplazmovej meningoencefalitídy s fatálnym koncom u HIV pacienta

Vojtech Boldiš¹, František Ondriska^{1,2}, Ľubor Kováč³, Miroslav Ondriska⁴, Marcela Bastlová¹, Jakub Steinhübel¹, Kamila Bírová²

¹Klinická mikrobiológia, Úsek parazitológie, Medirex, a. s., Bratislava

²Trnavská univerzita, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnava

³Klinická mikrobiológia, Úsek virológie, sérológie a molekulyvej biológie infekčných ochorení, Medirex, a. s., Bratislava

⁴Rádiologické oddelenie DFNSP, Bratislava

Opis prípadu

Na Slovensku dokumentujeme veľmi ojedinele diagnostikovaný prípad neurotoxoplazmózy u 60-ročného HIV pacienta v štádiu AIDS. Dôvodom hospitalizácie pacienta boli časté horúčky, vracanie, epileptické záchvaty a poruchy vedomia. Rádiologické vyšetrenia (CT a MR) potvrdili v mozgu prítomnosť mnohopočetných nálezov (16 ložísk na periférii). V parazitologickom laboratóriu (Medirex, a. s.) sme vylúčili neuroinfekciu spôsobenú parazitickými pôvodcami ako *Toxocara* spp. a *Echinococcus* spp. Potvrdili sme však neurotoxoplazmózu na základe dôkazu DNA *Toxoplasma gondii* v likvore pacienta a prítomnosti špecifických IgG protilátok v sére pacienta. V likvore však nedošlo k žiadnej produkcii antitoxoplazmových protilátok, čo bol pravdepodobne dôsledok imunitného deficitu vyplývajúceho z HIV statusu. Napriek vhodne indikovanej terapii sa zdravotný stav pacienta zhoršoval (strata reči i pohyblivosti všetkých končatín), až pacient umrel v priebehu niekoľkých týždňov.

Kľúčové slová: *Toxoplasma gondii*, neurotoxoplazmóza, meningoencefalitída, HIV pacient

The case report of toxoplasmic meningoencephalitis with fatal outcome in HIV patient

Description of the case

In Slovakia, we document a very rare case of neurotoxoplasmosis in a 60-year-old HIV patient in the AIDS stage. The patient was hospitalized due to frequent fever, vomiting, epileptic seizures and consciousness disorders. Radiological examinations (CT and MR) confirmed the presence of multiple findings in the brain (16 foci in the periphery). In the parasitological laboratory (Medirex Ltd.), we had excluded neuroinfection caused by parasitic agents such as *Toxocara* spp. and *Echinococcus* spp. However, we confirmed neurotoxoplasmosis based on detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the patient's cerebrospinal fluid and the presence of specific IgG antibodies in the patient's serum. There was no production of anti-toxoplasmic antibodies in the cerebrospinal fluid, possibly due to the immune deficit resulting from HIV status. Despite the appropriately indicated therapy, the patient's health deteriorated (loss of speech and mobility of all limbs), and the patient died within a few weeks.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, neurotoxoplasmosis, meningoencephalitis, HIV patient

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 47 – 50

Úvod

Toxoplazmóza je zoonotické ochorenie spôsobené tkanivovým parazitickým prvkom *Toxoplasma gondii*, ktorého definitívnym hosťiteľom sú mačky. Parazit je celosvetovo rozšírený a okrem človeka jeho hosťiteľmi sú rôzne teplotné živočíchy. *Toxoplasma gondii* parazituje intracelulárne a u väčšiny imunokompetentných osôb nespôsobuje klinicky manifestné ochorenie, až 80 % prípadov prebieha asymptomaticky. Najčastejšie postnatálne získaná akútna toxoplazmóza prebieha ako lymfoglandulárna forma (zväčšenie lymfatických uzlín v oblasti krku, v podpazuší a inguinách, ktoré sú zvyčajne nebolestivé). Parazit však môže spôsobiť devastujúce ochorenie v určitých skupinách pacientov, najmä kongenitálne infikovaných detí, pacientov po orgánových transplantáciách, u onkologických osôb a pacientov so získaným syndrómom imunitnej deficiencie (AIDS).

Kongenitálna toxoplazmóza u narodených detí spôsobuje hydrocefalus, mikrocefáliu a kalcifikáty (tzv. triádu príznakov). Ku kongenitálnej infekcii môže dôjsť v prípade, keď je žena v gravidite infikovaná prvýkrát. Frekvencia transplacentárnych prenosov je nižšia na začiatku tehotnosti, pričom však klinická závažnosť pre infikovaný plod v 1. trimestri je maximálna a má zlú prognózu (abort či chorioretinitídu). Pre očnú toxoplazmózu sú príznačné charakteristické lézie v sietnici. Veľmi nebezpečné sú reaktivácie latentnej či chronickej infekcie u imunosuprimovaných pacientov, kde býva najčastejšie postihnutá centrálna nervová sústava a ochorenie sa mnohokrát končí fatálne. Charakteristickými príznakmi neurotoxoplazmózy sú difúzna encefalopatia, meningoencefalitída, mozgové lézie sprevádzané bolesťami hlavy, poruchami vedomia, teplotami a pneumóniami.

Infikovať sa možno alimentárnou cestou po prehltnutí infekčných štádií (zelenina či ovocie kontaminované oocystami, nedostatočne tepelne upravené mäso s tkanivovými cystami), transplacentárne, krvnou transfúziou a orgánovými transplantátmi. Z epidemiologického hľadiska je výskyt toxoplazmózy na Slovensku vysoký, o čom svedčí približne 40 % IgG séroprevencia u našich pacientov (Ondriska et al., 2003; Strhársky et al., 2009).

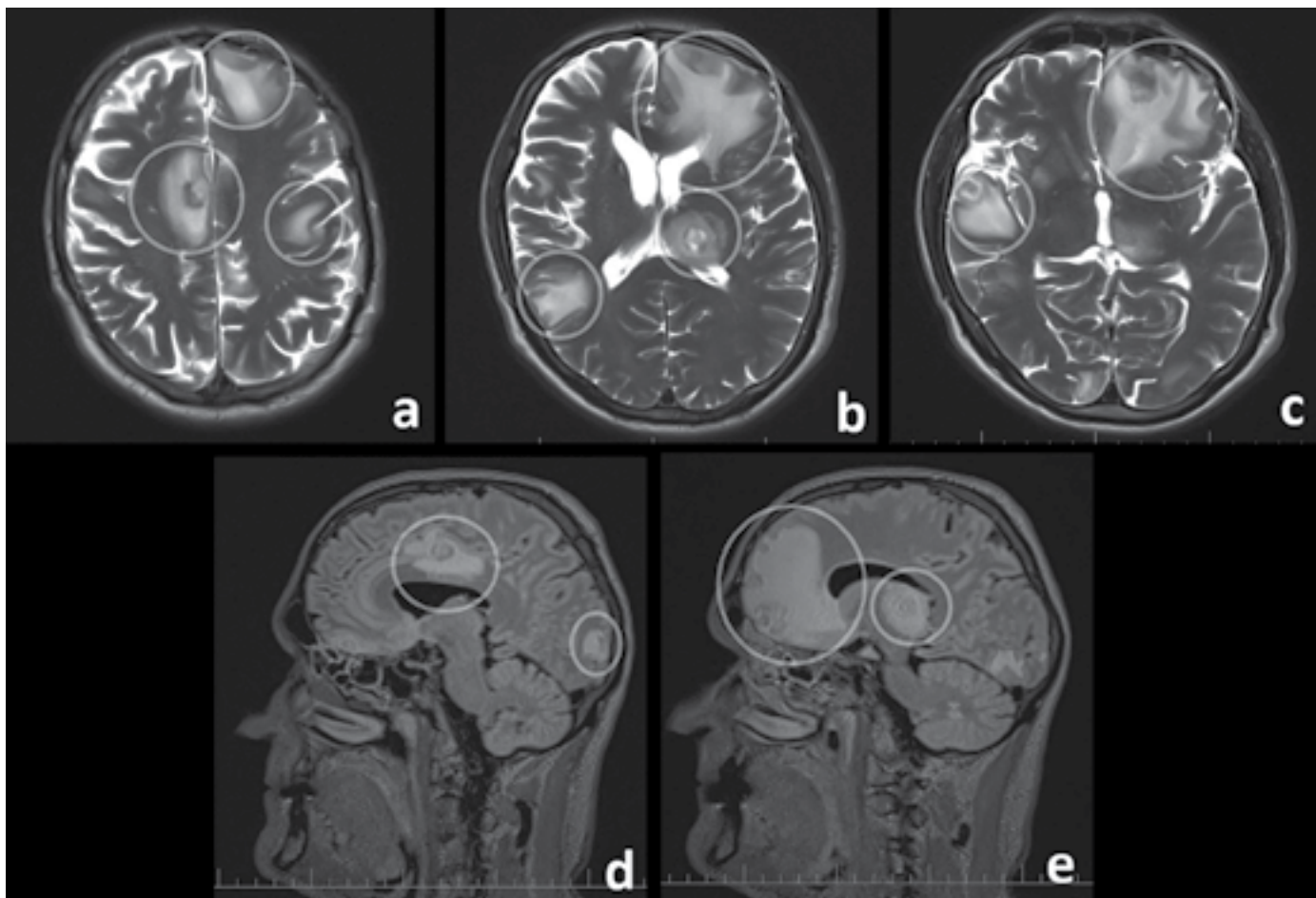
V rutinej diagnostike je zlatým štandardom nepriama diagnostika, čiže dôkaz špecifických protilátok proti *T. gondii* (IgG, IgM, IgA, reakcia väzby komplementu pre dôkaz celkových protilátok a aviditný test pre stanovenie sily väzby antigén – protilátka). Sérologické vyšetrenie by malo v prvom rade zistiť, či je pacient infikovaný, a ak áno, v druhom kroku určiť štádium infekcie. Detekcia DNA *T. gondii* pomocou PCR sa považuje za nenahraditeľnú v diagnostike toxoplazmózy u imunosuprimovaných pacientov s AIDS, transplantovaných a u ďalších imunokompromitovaných osôb, pri očnej a kongenitálnej toxoplazmóze. Veľmi dôležitou informáciou pri diagnostike suspektnej neurotoxoplazmózy, očnej či kongenitálnej toxoplazmózy je vyšetrenie okrem likvoru, očnej tekutiny či plodovej vody paralelne aj sérum pacienta. Správne a včasné určenie štádia toxoplazmózy je rozhodujúcim signálom na začatie terapie (pyrimetamín, sulfónamidy a spiramycín).

Infekciu možno predchádzať v podobe preventívnych opatrení, najmä v dodržiavaní prísnych hygienických návykov (umývanie ovocia či zeleniny pred konzumovaním, umývanie rúk po kontakte s pôdou, dostatočná tepelná úprava mäsa), ale i v sérologickom skríningu rizikových skupín (tehotné ženy a transplantovaní pacienti).

Klinické nálezy a laboratórna identifikácia neurotoxoplazmózy

Dokumentujeme veľmi raritne diagnostikovaný prípad neurotoxoplazmózy u 60-ročného HIV pacienta v štádiu AIDS. Pacient bol prijatý vo februári 2019 na neurologické oddelenie nemocnice v Skalici z dôvodu niekoľkokomesačných febrilit, respiračných i močových infekcií a prekonanej tromboflebitídy. Pri prijatí bol pacient mobilný, pri vedomí, spolupracujúci, tlakovo a pulzovo stabilizovaný. V marci 2019 sa stav hospitalizovaného začal rapídne zhoršovať, bol u neho zaznamenaný rozvoj ataxie, bradypsychizmu, komunikoval stručne, nie vždy zrozumiteľne, často vracal a mal epileptické záchvaty. Rádiológovia pomocou CT a MR vyšetrení mozgu detegovali mnohopočetné ložiskové nálezy (16 ložísk na periférii, **obrázok 1a – e**) a CT vyšetrenie brucha potvrdilo fokálne lézie (suspekt. MTS) na pečeni. V mozgu bola lokalizácia multifokálnych lézií supra- a infratentoriálne, kortikosubkortikálne so zasahovaním do bielej hmoty, corpus callosum, v ľavom

Obrázok 1 a – e. MR mozgu: postihnutie bielej aj sivej hmoty, mnohopočetné ložiská prevažne na periférii, ale taktiež v mozočku a corpus callosum



(prepojenie mozgových hemisfér, foto: D. Lisická, L. Greguš)

talame, v pravom putamene, v mozočku s perifokálnym edémom. Z laboratórných vyšetrení bola dokázaná reaktivita na HIV, čo bolo následne v NRC potvrdené a potvrdené ako HIV pozitívita. Absolútny počet CD4+ T-lymfocytov klesol na hodnotu 0,11. Pacient bol následne preložený na Klinikum infektológie a geografickej medicíny LF UK v Bratislave.

Echinokokovú ani toxokarovú neuroinfekciu sme v parazitologickom oddelení Medirex, a. s., nedokázali. Pomocou real-time PCR sme však detegovali DNA *Toxoplasma gondii* v likvore (**obrázok 2**), pričom k intratekálnej produkcii protilátok nedošlo a v sére boli prítomné iba protilátky triedy IgG proti *T. gondii* (**obrázok 3**). Na základe laboratórných i klinických výsledkov sme stanovili suspektný diagnostický záver svedčiaci o neurotoxoplazmóze.

Napriek podávanej terapii (daraprim, emticitabinum/tenofovir a darunavir) sa zdravotný stav pacienta zhoršoval. Vedomie bolo na úrovni somnolencie, došlo k strate reči i pohyblivosti všetkých končatín. Aj pri komplexnej starostlivosti sa prehlbovala porucha vedomia i s respiračnou insuficienciou,

až pacient umrel dňa 7. 4. 2019 (exitus letalis). Pitevný nález sa taktiež viac-menej prikláňal k diagnostickému záveru toxoplazmovej meningoencefalitíde.

Zhrnutie

Predstavili sme v poradí 4. prípad neuroinfekcie spôsobenej tkanivovým parazitom *T. gondii* na Slovensku, ktorý sa však ako jediný skončil fatálne. Vzhľadom na vysoký výskyt toxoplazmózy (40 %) v našich podmienkach a následnej latentnej infekcie žiada si toto ochorenie významnú pozornosť najmä z dôvodu reaktívácie tejto infekcie počas imunosupresie (onkologické ochorenie, transplantácie, AIDS, gravidita). Prezentovaný prípad neurotoxoplazmózy spôsobenej oportúnnym parazitom poukazuje na nevyhnutnosť systematicky vyšetrovať imunosuprimované osoby (AIDS, pacienti v transplantačnom programe) na prítomnosť toxoplazmovej infekcie.

Práca bola podporená projektom KEGA 013TTU-4/2019.

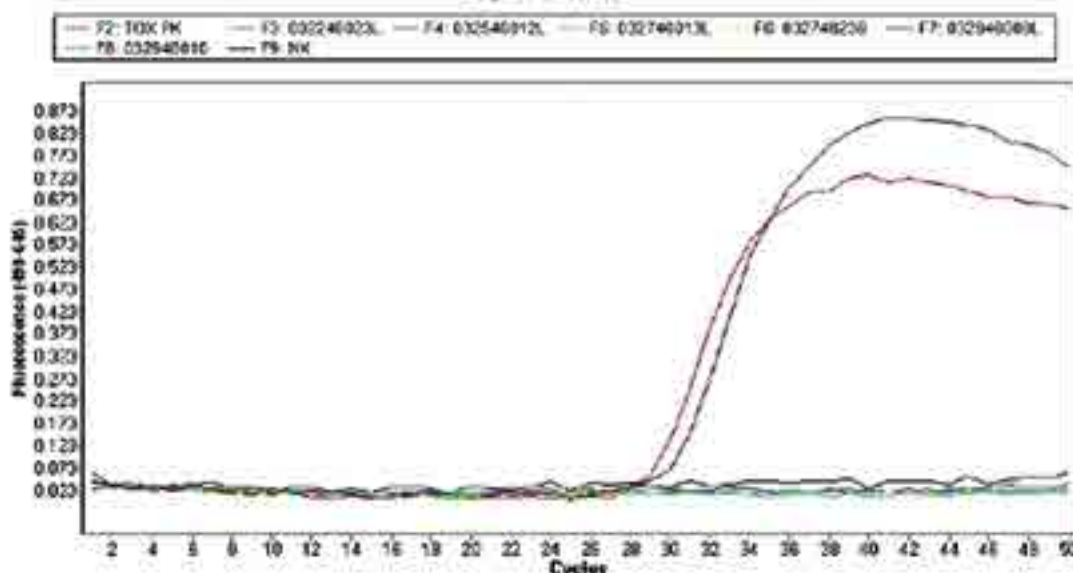
Obrázok 2. Dôkaz DNA *Toxoplasma gondii* pomocou real-time PCR, primery amplifikujúce 134 bp, opakujúci sa element z genómu *T. gondii*, hybridizačná próba Red 640

Abs Quant/Fit Points for TOX (Abs Quant/Fit Points)

Results

| Inc | Pos | Name | Type | CP | Concentration | Standard | Status |
|-----|-----|------------|-----------------------------|-------|---------------|----------|--------|
| ☐ | F2 | TOX PK | Positive Control/Calibrator | 20.15 | | | |
| ☐ | F3 | 032246023L | Unknown | | | | |
| ☐ | F4 | 032546012L | Unknown | | | | |
| ☐ | F5 | 032746013L | Unknown | | | | |
| ☐ | F6 | 032746236 | Unknown | | | | |
| ☐ | F7 | 032946000L | Unknown | 20.95 | | | |
| ☐ | F8 | 032946010 | Unknown | | | | |
| ☐ | F9 | NK | Negative Control | | | | |

Amplification Curves



Obrázok 3. Parazitologicko-sérologické vyšetrenia na diagnostiku suspektnej neuroinfekcie

| Parameter | Výsledok | Jed. | Textový výsledok | Ref.interval |
|--|----------|-------|------------------|-----------------|
| L_Toxoplasma gondii PCR | pozit. | | | |
| S_Toxoplasma IgA - ELISA | | titer | negatívny | (cut-off 1:100) |
| S_Toxoplasma IgG - ELISA | 49,378 | IU/ml | pozitívny | (cut-off 15) |
| S_Toxoplasma IgM - ELISA | | titer | negatívny | (cut-off 1:100) |
| S_Toxoplasma KFR: | negat. | | | |
| L_Toxoplasma IgA - ELISA | | titer | negatívny | (cut-off 1:100) |
| L_Toxoplasma IgG - ELISA | | IU/ml | negatívny | (cut-off 15) |
| L_Toxoplasma IgM - ELISA | | titer | negatívny | (cut-off 1:100) |
| Interpretácia výsledku: | | | | |
| Ide o neštandardný sérologický toxoprofil v porovnaní s výsledkom PCR reakcie. Prítomnosť IgG protilátok iba v sére pacienta svedčia o latentnej toxoplazmovej infekcie. Avšak pozitívny výsledok real time PCR (2 krát opakovaný) nevylučuje, že môže ísť o neurotoxoplazmovú infekciu. Po obdržaní tohto výsledku je nutné pre objektivnejšie vyhodnotenie tejto situácie urobiť kontrolné vyšetrenie minimálne vyšetrenia séra na prítomnosť protilátok a ak by bolo možné aj likvor pacienta. Urgentnosť terapie odporúčame zväžiť podľa kliniky pacienta. | | | | |
| Dr. Boldiš | | | | |
| S_E.histolytica IgG - ELISA | | U | negatívny | (cut-off 10) |
| S_Taenia solium IgG - ELISA | | U | negatívny | (cut-off 10) |
| Poznámka: | | | | |
| L TOX PCR uvoľnil Dr. Boldiš | | | | |
| S_E.granulosus IgG - ELISA | | | negatívny | (cut-off 1:100) |
| S_E.granulosus IgG - hemaglut | negat. | | | |
| S_Toxocara IgG - ELISA | | titer | negatívny | (cut-off 1:100) |
| S_E.multilocularis IgG EIA | | | negatívny | (cut-off 1:100) |

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 5th ed., ASM Press, Washington, D.C. 2007; 1202 s.
- Hurley RA, Taber KH. Latent Toxoplasmosis gondii: emerging evidence for influences on neuropsychiatric disorders, Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 2012; 24: 376-383.
- Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology, III. (Eds.), Springer (ed.), New York 2008; 1573 s.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of Clinical Microbiology. ASM press, Washington, D.C. 2007; 2399 s.
- Ondriska F, Boldiš V, Garajová M, Mrva M. Klinická parazitológia 1. vyd. Bratislava UK Prírodovedecká fakulta. 2016; 233 s
- Ondriska F, Boldiš V, Reiterová K. Parazitológia pre všeobecných lekárov, vyd. Edičný rad pre všeobecného lekára číslo 5, Raabe, Bratislava, 2015; 5: 116 s.
- Ondriska F, Čatár G, Vozárová G. The significance of complement fixation test in clinical diagnosis of toxoplasmosis. Bratisl Lek Listy 2003; 104, 189-196.
- Parlog A, Schlüter D, Dunay IR. Toxoplasma gondii-induced neuronal alterations. Parasite Immunology 2015; 37, 159-170.
- Schmidt DD, Roberts LS. Foundations of parasitology. Eight ed., McGraw-Hill Companies, N.York, 2009; 701 s
- Strhársky J, Klement C, Hrubá F. Seroprevalence of Toxoplasma gondii antibodies in the Slovak Republic. Folia Microbiologica 2009; 54: 553-558.



RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.

Klinická mikrobiológia, Úsek parazitológie, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16, Bratislava
e-mail: vojtech.boldis@medirex.sk

Diferenciálna diagnostika ložísk v mozgu – možná komplikácia infekčnej endokarditídy?

Lucia Bednárová¹, Miriama Babel'ová¹, Barbora Slabá², Ivan Vojtech², Zuzana Čarnická³, Ivan Vulev³

¹Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s., Bratislava

²Interná klinika, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

³Neurologická a neurochirurgická klinika, CINRE, Bratislava

Infekčná endokarditída (IE) je ochorenie, ktoré spôsobujú rôzne mikroorganizmy, najčastejšie však stafylokoky a streptokoky. Patologický proces je väčšinou lokalizovaný na srdcových chlopniach a podľa priebehu sa rozdeľuje na akútnu, subakútnu a chronickú endokarditídu. Klinický priebeh je veľmi rôznorodý, príznaky sú málo špecifické a vyskytujú sa v rôznych kombináciách. Základom diagnostiky je pozitívna hemokultivácia a echokardiografické vyšetrenie. Priebeh a vznik komplikácií závisia od etiologického agensu a adekvátnej terapie. Medzi najzávažnejšie komplikácie patrí poškodenie chlopňového systému a embolizácie. Primárna liečba spočíva v podávaní antibiotík počas 4-6 týždňov. K operačnému riešeniu sa pristupuje až po zlyhaní antibiotickej terapie. V kazuistike predstavíme prípad 24-ročného muža, ktorý bol prijatý na Internú kliniku Onkologického ústavu sv. Alžbety s diagnózou viacpočetných ložísk v mozgu neznámej etiológie.

Kľúčové slová: infekčná endokarditída, *Abiotrophia defectiva*, infekčná aneurizma

Differential diagnosis of brain foci - a possible complication of infective endocarditis?

Infective endocarditis (IE) is a disease caused by various microorganisms, but mostly by staphylococci and streptococci. The pathological process is mostly localized in the heart valves and is divided into acute, subacute and chronic endocarditis. The clinical course is very diverse. The symptoms are not very specific and occur in different combinations. The basis of diagnosis constitutes of positive blood cultures and echocardiography. The course and development of complications depend on the etiological agent and adequate therapy. The most serious complications include heart valve damage leading to heart failure and excessive embolization rates. The primary treatment consists of administering antibiotics for 4-6 weeks. The surgical solution is used only after the failure of antibiotic therapy. In the case report, we will present a case of a 24-year-old man who was admitted to the Internal Clinic of the Oncological Institute with the diagnosis of multiple deposits of unknown etiology in the brain.

Keywords: infective endocarditis, *Abiotrophia defectiva*, infectious aneurysm

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 51 – 54

Úvod

Napriek pokrokom v poznatkoch medicínskych technológií a v antimikrobiálnej terapii je infekčná endokarditída (IE) stále ťažko diagnostikovateľné ochorenie spojené s vážnymi komplikáciami a stáva sa čoraz častejším problémom s vysokou úmrtnosťou.

Abiotrophia defectiva patrí do skupiny satelitných streptokokov, označovaných aj ako nutrične deficientné varianty streptokokov. Prvýkrát boli identifikované v roku 1961 (Frenkel a Hirsch) ako grampozitívne koky neschopné syntetizovať tioly, vitamín B₆ a pyridoxín a boli považované za nutrične mutanty viridujúcich streptokokov⁽¹⁻⁵⁾. Pôvodné dva druhy, *Streptococcus defectivus* a *Streptococcus adiacens*, boli zaradené do rodu *Abiotrophia*. Na základe hybridizácie chromozomálnej DNA-DNA v roku 1989⁽³⁾ a sekvenácie 16S rRNA v rokoch 1995 a 2000^(2,5) boli izoláty reklasifikované na dva rody, *Abiotrophia* a *Granulicatella*, ktoré zahŕňajú štyri druhy: *Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella adiacens*, *Granulicatella elegans* a *Granulicatella balaenopterae*. Skupina zahŕňa viridujúce streptokoky, ktoré sú charakteristické satelitným rastom okolo niektorých iných baktérií, prevažne z rodu *Staphylococcus* spp. (**obrázok 1**)^(2,3,5).

A. defectiva je súčasťou fyziologickej flóry faryngu, urogenitálneho a intestinálneho traktu. Ojedinele sa podieľa na rôznych patologických procesoch. Boli opisované nálezy z abscesov mozgu, pankreasu, infekcií rán, osteomyelitídy, zo septickej artritídy, z keratitídy a z ucha pri otitis media. Taktiež je to zriedkavá, ale nie neobvyklá príčina IE, často s negatívnym kultivačným nálezom (culture-negative endocarditis)^(6,10,13).

Obrázok 1. Rast kmeňa *A. defectiva* na krvnom agare Columbia pri čiare stafylokoka s pozitívnou koagulázou (*S. aureus*)



(foto – autor)

V článku uvádzame prípad IE spôsobenej *Abiotrophia defectiva* u zdravého mladého muža s natívnymi chlopňami. Počas ochorenia sa u pacienta rozvinuli komplikácie, ktoré vyústili do náhrady mitrálnej chlopne.

Kazuistika

24-ročný pacient, bez anamnézy interných ochorení s potvrdenou alergiou na penicilín a bez iných anamnesticky významných údajov, bol v novembri 2018 prijatý na Internú kliniku Onkologického ústavu s cieľom diferenciálnej diagnostiky viacpočetných ložísk v mozgu.

Pacient udával niekoľko mesiacov trvajúcu únavu, subfebrilitu, úbytok hmotnosti (8 kg za posledné dva mesiace), kŕčovité bolesti brucha, pocit stuhnutosti kĺbov (členok, sánka). Bol opakovane ambulantne empiricky liečený antibiotikami bez zlepšenia stavu. Absolvoval komplexné mikrobiologické vyšetrenia s negatívnym nálezom.

Pred hospitalizáciou na Internej klinike absolvoval pacient v júli 2018 pre výrazné bolesti brucha a zvýšené zápalové parametre (leukocyty $13,4 \times 10^9$, C-reaktívny proteín 53 mg/l) laparoskopicky apendektómiu, pri ktorej sa však zápal apendixu histologicky nepotvrdil. Gastroenterologické vyšetrenie bolo len s nálezom gastropatie. Bolesti brucha ustúpili až po vylúčení lepku.

V septembri 2018 pre náhle vzniknuté tunelové videnie, bolesti a točenie hlavy, tinitus bol pacient hospitalizovaný na Neurologickej klinike, kde v rámci diferenciálnej diagnostiky absolvoval magnetickú rezonanciu (MR) mozgu s opisom viacpočetných bilaterálnych lézií supratentoriálne. Vzniklo podozrenie na metastázy, lymfóm alebo sarkoidózu.

V rámci pátrania po onkologickom ochorení bolo doplnené vyšetrenie PET/CT, pri ktorom bol nález na mozgu hodnotený ako suspektná primárna vaskulitída centrálnej nervovej sústavy (CNS) a boli opísané aj zmeny na obličkách a slezine. Následne bol pacient prijatý s diagnózou C79.3 (sekundárny zhubný nádor mozgu a mozgových plien) na Internú kliniku Onkologického ústavu. Vo vstupných laboratórnych parametroch bola prítomná anémia ľahkého stupňa, CRP 33 mg/l, sedimentácia 49/89 mm/h, pozitivita cANCA protilátok (protilátky proti neutrofilným leukocytom). Ostatné parametre (hormóny štítnej žľazy, onkomarkery, neuronálne autoprotilátky) boli v norme.

Obrázok 2. Aneuryzma cievy so zápalovým lemom na MR mozgu



(zdroj – zdravotná dokumentácia pacienta)

Zo zobrazovacích vyšetrení pacient absolvoval echokardiografické vyšetrenie, kde bol opísaný len nález drobného fluidotoraxu, zhrubnutého zadného papilárneho svalu a ľahká až stredne ťažká pľúcna hypertenzia. Počítačová tomografia (CT) hrudníka, brucha a malej panvy bola len s opisom relatívne čerstvých renálnych infarktov, ktoré by mohli byť príznakom vaskulitídy. Na opakovanej MR mozgu bola zachytená aneuryzma cievy inzulárne vpravo so zápalovým lemom a známky arteritídy na inom mieste (**obrázok 2**).

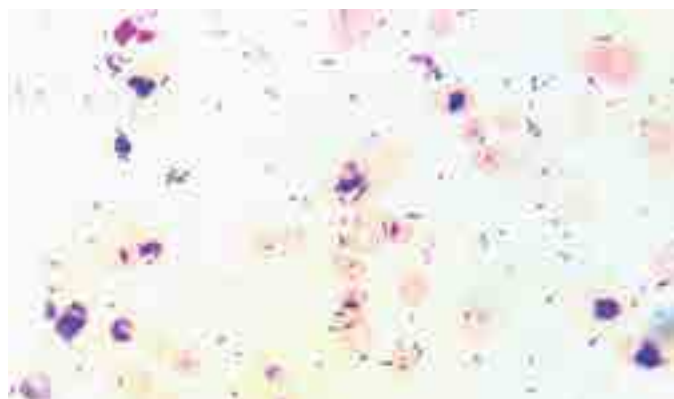
Vzhľadom na izoláciu kmeňa *A. defectiva* z hemokultúry (**obrázok 3**) a systolický šelest bolo doplnené aj transezofágové echokardiografické (TEE) vyšetrenie, ktoré diagnózu infekčnej endokarditídy nepotvrdilo. Kmeň bol identifikovaný metódou hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF, Bruker, Nemecko) a bol citlivý na všetky testované antibiotiká (penicilín, ampicilín, erytromycín, klindamycín, vankomycín, cefuroxím, ceftriaxon, ofloxacin). Napriek opakovanému negatívnemu echokardiografickému vyšetreniu bola začatá kombinovaná liečba ceftriaxonom a gentamicínom.

Na základe pozitivity autoprotilátok cANCA, PET/CT nálezu a supponovanú vaskulitídu ciev bol pacient preložený do Národného ústavu reumatických chorôb (NÚRCH), kde sa reumatologické ochorenie vylúčilo. Počas hospitalizácie v NÚRCH pokračovali v antibiotickej liečbe, ale v redukovaných dávkach (cefotaxím len v jednej dennej dávke, ceftriaxon údajne nebol dostupný).

Na pokračovanie intravenózneho liečby s diagnózou suspektnéj infekčnej endokarditídy s periférnymi embolizáciami bol pacient preložený na rajónne interné oddelenie. Počas hospitalizácie bola opäť v hemokultúre zachytená *A. defectiva*. TEE vyšetrenie bolo opätovne negatívne. Antibiotická liečba bola ukončená po 6 týždňoch jej trvania – po negatívnej hemokultivácii a vzniku alergie na ceftriaxon a neskôr aj na vankomycín. Pacient bol prepustený do ambulantnej starostlivosti bez ďalšej liečby.

Mesiac po prepustení pacient ambulantne absolvoval plánovanú kontrolnú MR mozgu, kde bolo zaznamenané zmenšenie ložísk postkontrastného vysycovania, pretrvávala zmenšená mykotická (infekčná) aneuryzma v oblasti inzuly vpravo. Rádiológ hodnotil nález v súlade s klinickými a laboratórnymi údajmi ako septickú arteritídu (vaskulitídu) s mykotickou (infekčnou) aneuryzmou inzulárne l.dx. (pri infekcii

Obrázok 3. Preparát pozitívnej hemokultúry farbený podľa Grama s nálezom grampozitívnych kokov



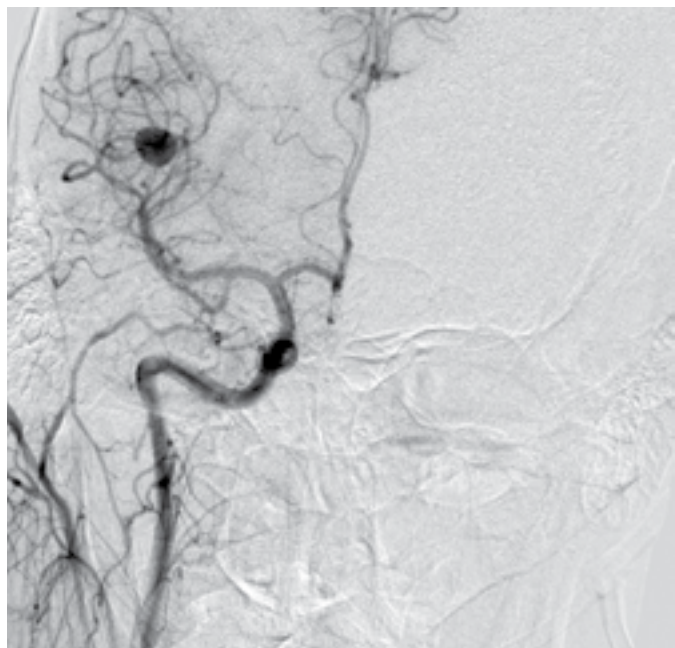
(foto – autor)

A. defectiva). Na kontrole pacient subjektívne udával celkové zlepšenie, intermitentne však pociťoval búšenie srdca a opätovne zaznamenal zvýšenú teplotu (37,2 °C). Z hemokultúry odobratej pri afebrilnom stave bola nasledujúci deň hlásená znovu *A. defectiva*.

Pacient nebol akceptovaný na rajónnom internom oddelení, preto bol znovu prijatý na hospitalizáciu na interné oddelenie Onkologického ústavu. Pred hospitalizáciou v deň prijatia absolvoval objednané TEE v Národnom ústave srdcových a cievnych chorôb s nálezom závažnej mitrálnej regurgitácie, v ľavej predsieni sa nachádzali vlajúce mobilné vegetácie upnuté na predný cíp mitrálnej chlopne, s vysokým embolizačným potenciálom. Na základe nálezu na TEE bola odporúčaná náhrada mitrálnej chlopne, pred ktorou pacient absolvoval extrakciu zuba v rámci defokizácie, ktorý bol pravdepodobným zdrojom infekcie. Opätovne bola začatá intravenózna antibiotická liečba s ohľadom na alergickú anamnézu (penicilín, ceftriaxon, vankomycín) – kombinácia gentamicín s moxifloxacinom. Dňa 15. 2. 2019 pacient podstúpil operáciu mitrálnej chlopne za mechanickú náhradu. Počas operácie bolo tkanivo chlopne odoslané na kultiváciu, kde bol znova potvrdený nález *A. defectiva*. Po operácii pokračovala antibiotická liečba kombináciou moxifloxacinu prechodne s klindamycínom, následne s rifampicínom a bola doplnená antikoagulačnou terapiou. Pre suspektnú centrálnu neurotoxicitu moxifloxacinu bol nahradený linezolidom.

Po troch mesiacoch po náhrade mitrálnej chlopne pacient absolvoval panangiografiu mozgu s nálezom sakulárnej vydutiny v periférii kaudálneho trunku artéria cerebri media vpravo veľkosti 9,2 x 7 mm, ktorá bola následne ošetrená implantáciou koilov (**obrázok 4, 5**). Výkon prebehol bez komplikácií. Po opakovanej kontrole je pacient v stabilizovanom stave, bez teplôt a iných subjektívnych ťažkostí.

Obrázok 4. Panangiografia mozgu so záchytom infekčnej aneurizmy – pred výkonom



(foto – CINRE)

Diskusia

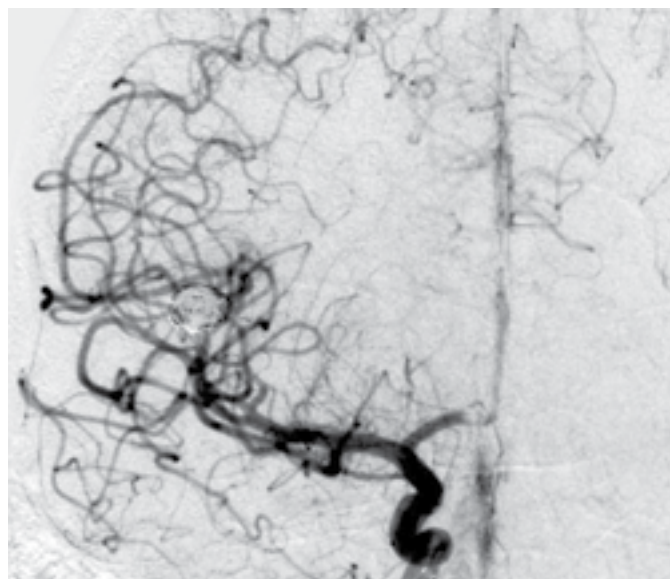
Incidencia prípadov IE je 1,9 – 6,2 prípadu/100 000 obyvateľov ročne. V populácii s vysokým počtom intravenózných narkomanov a starších ľudí je incidencia výskytu IE vyššia. V predantibiotickej ére v prvej polovici 20. storočia sa medián veku pacientov s IE pohyboval medzi 20. – 35. rokom. V súčasnosti sa ochorenie posúva do vyšších vekových kategórií (50 – 74 rokov), pričom u mladých ľudí sú v literatúre opísané len prípady rizikových skupín pacientov (intravenózni narkomani, pacienti s vrodenou alebo so získanou srdcovou chybou, pacienti s umelou náhradou srdcovej chlopne), u ktorých je vysoká predispozícia na vznik ochorenia. IE sa častejšie vyskytuje u mužov ako u žien, niekedy aj v pomere 4 : 1^(8,10,11,12).

Ako systémové ochorenie vedie IE k charakteristickým patologickým zmenám vo viacerých cieľových orgánoch. Časti doštičkovej fibrínovej matrice vegetácie sa môžu uvoľňovať z infikovanej srdcovej chlopne a pohybovať sa krvným riečiskom. Takéto septické emboly môžu atakovať takmer akýkoľvek orgánový systém v tele a môžu sa klinicky prejaviť vytvorením viscerálneho abscesu alebo môže dôjsť k infarktu myokardu, obličiek, sleziny, mezenterie a kože.

Vysoká frekvencia embolizácií bola zaznamenaná hlavne pri endokarditídach vyvolaných *S. aureus*, *Candida spp.*, *Abiotrophia sp.* a baktériami skupiny HACEK. Celkovo sa systémové embolizácie vyskytujú v 22 – 50 % prípadov a najčastejšie ide o embolizáciu do mozgu. Inou komplikáciou je vytvorenie mykotickej aneurizmy, ako dôsledok vyplavenia úlomkov vegetácie do vasa vasorum. Lokálne zoslabnutie a vydutina arteriálnej steny spôsobujú tlak, takže môže dôjsť k ruptúre a ku krvácaniu^(6,8,13).

Podozrenie na IE vzniká u febrilných pacientov s bakteriémiou a prítomnosťou nového alebo meniaceho sa srdcového

Obrázok 5. Panangiografia mozgu so záchytom infekčnej aneurizmy – po výkone



(foto – CINRE)

šelestu. IE je diagnostikovaná na základe prítomnosti vegetácie na echokardiografii a pozitívneho kultivačného nálezu z krvi pri hemokultivácii. Neurologické komplikácie, ktoré vznikajú embolizáciou do CNS, sa často objavujú už v úvode IE alebo sú dokonca prvým prejavom ochorenia, ktoré privedú pacienta k lekárovi. Približne 50 – 60 % neurologických komplikácií vzniká ešte pred stanovením diagnózy IE^(10,11).

Za najčastejšiu príčinu endokarditídy sa vo všeobecnosti považujú viridujúce streptokoky a stafylokoky. Medzi ďalšie etiologické agensy patria baktérie skupiny HACEK (*Haemophilus spp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*), gramnegatívne paličky, enterokoky a kvasinky rodu *Candida*^(8,10,12).

Odhaduje sa, že *A. defectiva* spôsobuje približne 5-6 % z celkového počtu streptokokových endokarditíd so závažnými komplikáciami, ktoré vyžadujú chirurgický zákrok, ak nie je dostatočne skoro identifikovaná a liečená^(1,4). Vďaka virulencnému potenciálu má vysokú afinitu k endovaskulárnym štruktúram, dôsledkom čoho vzniká deštrukcia srdcovej chlopne, čo vedie k srdcovému zlyhaniu a septickej embolizácii⁽¹⁰⁾.

A. defectiva je štandardne citlivá na vankomycín, ceftriaxon a aminoglykozidy, 90 % izolátov je však rezistentných

proti penicilínu⁽⁷⁾. Podľa pokynov American Heart Association je odporúčaná kombinovaná terapia penicilínom a gentamicínom počas 4 až 6 týždňov^(7,8). Napriek dobrej citlivosti na antibiotiká a adekvátnej terapii si takmer polovica prípadov vyžaduje chirurgický zákrok pozostávajúci z náhrady chlopne. Aj pri najlepšej dostupnej terapii je súčasná úmrtnosť pri IE približne 25 %^(9,10,13).

Záver

Infekčná endokarditída je spôsobená poškodením endokardu srdca, po ktorom nasleduje mikrobiálna, zvyčajne bakteriálna kolonizácia. IE je multisystémové ochorenie a v prípade, že nie je liečené, končí sa smrťou pacienta.

Cieľom článku bolo opísať nešpecifické klinické prejavy IE a zvýšiť povedomie lekárov a mikrobiológov o IE spôsobenej *A. defectiva*. V úvode opakované negatívne TEE vyšetrenie nevyklučuje diagnózu IE a pri diagnostike treba zohľadniť celkový klinický obraz pacienta. Naša kazuistika opisuje prípad pacienta s viacpočetnými ložiskami v mozgu, ktoré boli prvými prejavmi a zároveň komplikáciou IE. Včasná a správna identifikácia patogénneho mikroorganizmu a vhodne nastavená terapia je dôležitá na dosiahnutie úspešnej liečby.

LITERATÚRA

1. Ruoff KL. Nutritionally variant streptococci. *Clinical Microbiology Reviews* 1991;4(2): 184-190. doi: 10.1128/cmr.4.2.184.
2. Collins MD, Lawson PA. The genus *Abiotrophia* is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella galaenopterae* comb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; 50(11): 365-369.
3. Bouvet A, Grimont F, Grimont PA. *Streptococcus defectivus* sp. nov. and *Streptococcus adiacens* sp. nov, nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. *Int J Sys Bacteriol* 1989; 39: 290-294.
4. Pinkney JA, Nagassar RP, Roye-Green KJ, et al. *Abiotrophia defectiva* endocarditis. *BMJ Case Reports* 2014; 2014: p. bcr2014207361. doi: 10.1136/bcr-2014-207361.
5. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, et al. Transfer of *Streptococcus adiacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1995; 45(4): 798-803. doi: 10.1099/00207713-45-4-798.
6. Murray PR, Baron EJ, Landry ML, et al. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. ASM press Washington DC, 2007; 443-454p.
7. Alberti MO, Hindler JA, Humphries RM. Antimicrobial susceptibilities of *Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella adiacens*, and *Granulicatella elegans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60: 1411-1420.
8. Holland TL, Badurkalo LM, Bayer AS, et al. Infective endocarditis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16059.
9. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1): 177-207.
10. Beneš J, Gregor P. Infekční endokarditída. 1. vydanie. Praha: Triton 2002; 23-138p.
11. Beneš J, et al. Infekční lékařství. 1. vydanie. Galén 2009; 431-438p.
12. Vallejo FAG. Epidemiology of Infective Endocarditis. *Contemporary Challenges in Endocarditis* 2016; IntechOpen, doi: 10.5772/65030
13. Rudrappa M, Kokatnur L. Infective Endocarditis due to *Abiotrophia defectiva* and its feared complications in an immunokompetent person: Rare, but real. *J Glob Infect Dis* 2017; 9(2): 79-81.



RNDr. Lucia Bednárová

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 821 06 Bratislava

e-mail: lucia.bednarova@medirexgroup.sk

Carcinosarcoma-like endometrioid carcinoma of the uterus: case report of rare non-high-grade tumor

Michal Zámečník^{1,2}, Jozef Kuruc³, Michal Gaman⁴, Branislav Bystrický^{5,6}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava, Slovak Republic

²Agel, a. s., Laboratory of Surgical Pathology, Nový Jičín, Czech Republic

³Medicyt, s. r. o., Laboratory of Surgical Pathology, Trenčín, Slovak Republic

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty Hospital, Trenčín, Slovak Republic

⁵Oncology Department, Faculty Hospital, Trenčín, Slovak Republic

⁶Faculty of Health, Alexander Dubček University, Trenčín, Slovak Republic

A rare case of endometrioid carcinoma of the uterine corpus with sex cord like formation and hyalinization in a 54-ys-old woman is described. It was low stage (pT1a) tumor composed predominantly of common endometrioid carcinoma grade 2, with exophytic area of biphasic carcinosarcoma-like component. This area contained glands of endometrioid carcinoma with shadow and squamous cells and with transitions to mesenchymal appearing stromal component. The stromal component was of low-grade appearance, and it was composed of spindle to ovoid cells which formed compact fascicles or which lay in abundant myxoid and hyalinized matrix. The tumor expressed estrogen and progesterone receptors, beta-catenin and cyclin D1, and it was negative for p53, myogenic markers (actin, desmin) and stromal marker CD10. Morphological and immunohistochemical features were different from those of malignant mixed mullerian tumor, and they were suggestive of beta-catenin mutated carcinoma. However, distinction of this tumor from high-grade carcinosarcoma is difficult, especially by examination of intraoperative frozen section. Knowledge of this tumor entity and immunohistochemical technique are important for correct diagnosis.

Keywords: endometrioid carcinoma with sex cord like formation and hyalinization, carcinosarcoma, shadow cell differentiation, adenoacanthoma, uterus, beta-catenin

Karcinosarkómu podobný endometrioidný karcinóm: popis prípadu non-high-grade tumoru

Opísaný je prípad endometrioidného karcinómu tela maternice, so "sex-cord like" štruktúrami a hyalinizáciou. Šlo o tumor u 54-ročnej ženy s nízkym štádiom nádorového postihnutia. Histologicky mal štruktúru grade 2 endometrioidného karcinómu so „shadow cell“ a skvamocelulárnou diferenciáciou. V tumore bolo navyše exofytické ložisko s bifázickou morfológiou. Stromálny komponent v tejto časti tumoru bol nízkomaligného výzoru, obsahoval vretenovité a ovoidné bunky uložené buď kompaktne, alebo v hojnom myxohyalínnom matrice. Imunohistochemicky exprimoval tumor estrogénové a progesterónové receptory, beta-katenín a cyklín D1. Negatívne boli p53, myogénne markery (dezmin, aktín) a marker stromálnej diferenciácie CD10. Morfológia a imunohistochemia tumoru sa líšili od klasického vysokostupňového maligného mulleriánskeho tumoru (karcinosarkómu) a silne suponovala beta katenín-mutovaný karcinóm. Diferenciálna diagnóza tumoru môže byť ťažká, najmä v peroperačnej rýchlej biopsii. Pre diagnózu je dôležité poznanie tejto novej jednotky a imunohistochemia.

Kľúčové slová: endometrioidný karcinóm so „sex-cord like“ štruktúrami a s hyalinizáciou, karcinosarkóm, „shadow cell“ diferenciácia, adenoakantóm, maternica, beta-katenín

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 55 – 60

Introduction

In 2005, Murray et al. described a rare variant of endometrioid carcinoma (EC), which strongly resembled malignant mixed mullerian tumor (MMMT) histologically, but which behaved like common non-high-grade endometrioid carcinoma (EC)⁽¹⁾. This tumor termed „EC with sex cord like formation and hyalinization“ (ESCFH) contains, in addition to endometrioid glands, areas with morphology that resembles sar-

coma. After Murray et al s paper, several additional reports were added to the literature⁽²⁻³⁾. All of these studies emphasized that the tumor strongly mimics MMMT, although his behavior is similar to that of common non-high-grade EC. As both epithelial and stromal component appear non-high-grade, a term „low-grade carcinosarcoma“ was proposed⁽⁴⁾. In this report, we would like to present our recent case of this rare lesion.

Materials and methods

The tissue was fixed in 10% formalin and processed routinely. The sections were stained with hematoxylin and eosin. For immunohistochemistry, the following primary antibodies were used: alpha smooth muscle actin (prediluted, 1A4), h-caldesmon (1:200, h-CD), desmin (prediluted, D33), S100 protein (prediluted, polyclonal), HMB45 (prediluted, HMB45), estrogen receptor (ER) (1:100, EP1), progesterone receptor (PR) (1:25, PgR636), pancytokeratin (1:200, AE1/AE3), epithelial membrane antigen (EMA) (prediluted, E29), vimentin (1:100, Vim 3B4), Ki-67 (prediluted, MIB1), p63 (1:50, DAK-p63), p53 (prediluted, DO-7), MLH1 (prediluted, ES05), MSH2 (prediluted, FE11), MSH6 (prediluted, EP49), PMS2 (prediluted, EP51), alpha-inhibin (prediluted, R1), calretinin (1:100, DAK-Calret 1), CD31 (1:50, JC70A), podoplanin (1:100, D2-40) (all from DAKO, Glostrup, Denmark), myo-D1 (prediluted, EP212, Cell Marque, Rocklin, USA), SOX10 (1:50, EP268, Cell Marque, Rocklin, USA), CD10 (prediluted, SP67, Ventana, Tuscon, USA), CD34 (prediluted, QBend/10, Ventana, Tuscon, USA), beta-catenin (prediluted, 14, Cell Marque, Rocklin, USA), cyclin D1 (prediluted, SP4-R, Ventana, Tuscon, USA). Immunostaining was performed according to standard protocols using an avidin-biotin complex labeled with peroxidase or alkaline phosphatase. Microwave antigen pretreatment was used for immunoreactions with h-caldesmon, CD10, CD34, estrogen receptor, and progesterone receptor. Appropriate positive and negative controls were applied.

Case report

A 54-ys-old, para 0, gravida 0, woman underwent dilatation and curettage for one year lasting irregular postmenopausal bleeding. The curettage specimen contained non-high grade EC, and therefore a hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy was performed. Previous medical history of the patient (according to her information) included laparoscopic removal of a benign ovarian cyst 30 years ago. Additional medical history was unremarkable.

Pathological findings

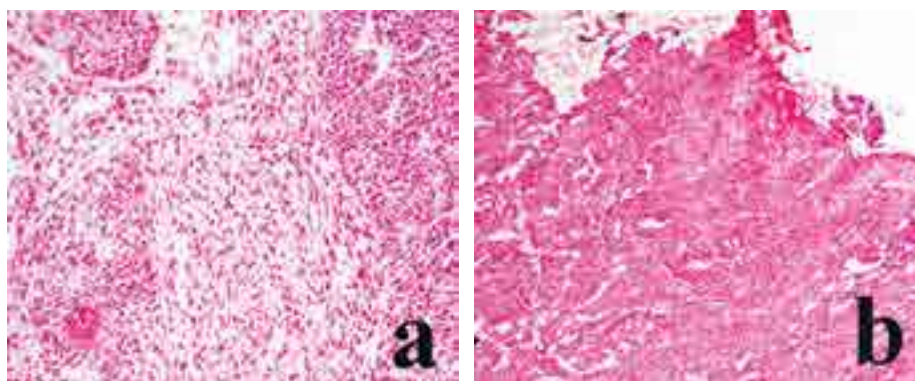
Curettage specimen exhibited non-high-grade EC (grade 2 FIGO) with squamous and shadow cell differentiation⁽⁵⁻⁸⁾ and with beta-catenin nuclear accumulation in squamous cells (**Figure 1**). Beta-catenin stained, in addition, the cytoplasm and cell membranes of all neoplastic cells. ER and PR were positive in 80% and 50% of the cells, respectively.

Routine intraoperative consultation was performed with an aim to determine the depth of myometrial invasion of the tumor. Surprisingly, one of frozen sections showed biphasic neoplasm suggesting MMMT with homologous stromal component (**Figure 2a**). However, another frozen section showed „pure“ non-high grade EC (**Figure 2a**). Invasive margin in the myometrium contained only EC without sarcoma-like pattern. Considering previous non-high-grade histologic finding in the curettage specimen along with apparently focal nature of the biphasic morphology seen in the frozen

Figure 1. Curettage specimen. **(a)** Endometrioid carcinoma with cluster of shadow cells. **(b)** Beta-catenin in the nuclei of squamous cells. **(c)** Estrogen receptor is positive in the glandular cells (upper half of the photomicrograph) and negative in the squamous cells (lower half).



Figure 2. Frozen sections. **(a)** Biphasic pattern that simulates malignant mixed müllerian tumor. **(b)** An area with „pure“ endometrioid carcinoma of non-high-grade morphology, with adenoacanthomatous features (upper).



section, the diagnosis of MMT was not rendered, and the final classification of the tumor was deferred. The tumor infiltrated inner half of the myometrium and therefore a staging lymphadenectomy was not performed.

Grossly, the resection specimen of hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy included uterus measuring 11 cm x 9 cm x 6 cm. A 55 mm tumor was found in the mucosa and myometrium of the posterior wall of the uterine corpus. The tumor was flat, with central irregular polypoid prominence. It had gross appearance of common endometrial EC, with fragile tissue on its surface. Both adnexa were unremarkable.

Histologically (Figure 3), permanent sections exhibited typical glandular and cribriform EC, FIGO grade 2. This pattern was seen in 90% of the neoplasm. In addition, exophytic part of the tumor, comprising 10% of the tumor volume, contained glands of EC admixed with a non-high-grade mesenchymal appearing component of spindle to epithelioid cells. The glands in this area showed conspicuous squamous differentiation with formation of shadow cells and with keratin material. The mixture of the glands with the stromal component resulted in striking biphasic appearance. The fusiform and epithelioid cells of the stroma formed clusters, cords and ill-defined fascicles. They were often embedded in the hyalinized or myxoid matrix. In addition, the stroma contained isolated clusters of shadow cells in the reactive appearing fibrosis and numerous dystrophic calcifications. An osteoid formation was not found. In the invasive margin in

the myometrium, rare clusters of carcinoma cells were seen in the podoplanin-negative vascular spaces, which was interpreted by us as a hemovascular invasion⁽⁹⁻¹¹⁾. Lymphatic podoplanin-positive spaces did not contain any tumor cells.

Immunohistochemically (Figure 4), pancytokeratin and EMA were positive in the carcinomatous component and in some stromal cells (Figure 4a). Beta-catenin was seen in cells of the basal and parabasal layer of the epithelium and in almost all cells of the stromal component (Figure 4b). Cyclin D1 stained both epithelial and stromal cells (Figure 4c). P63 was positive in squamous cells and in rare cells of the glandular epithelium. S100 protein stained focally the cells of myxoid and chondroid areas (Figure 4d). MIB1 highlighted low proliferation in both stromal and squamous cells. Only 3 percent of these cells were positive, whereas glandular cells displayed MIB1 expression in 40 percent of the nuclei (Figure 4e). Vimentin stained both components, except of squamous cell differentiation. CD10 was slightly positive in squamous cells and it stained luminal surface of the glandular epithelium. Inhibin and calretinin were negative, ruling out sex cord differentiation in complex neoplasm such as stromal sarcoma with glands and sex cord like structures⁽¹²⁾. CD31 and D2-40 highlighted non-neoplastic endothelium, confirming hemovascular invasion of the tumor. The tumor was negative for p53, alpha-smooth muscle actin, desmin, h-caldesmon, myo D1, CD34, SOX10, HMB45, inhibin and calretinin. MMR proteins (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) did not show any loss of positivity.

Figure 3. Histological findings in the resection specimen. (a) Endometrioid carcinoma pattern was predominant. (b) Biphasic pattern with hyalinized low-grade appearing stromal component. (c) Spindle cell transformation of adenoacanthomatous carcinoma. (d) An area of myxoid and hyalinized stromal component. In lower right corner, a small nodule of squamous cells is seen. (e) Focal chondroid appearance of the stromal component resembled chondroid pattern of salivary pleomorphic adenoma. (f) Hemovascular invasion of the tumor.

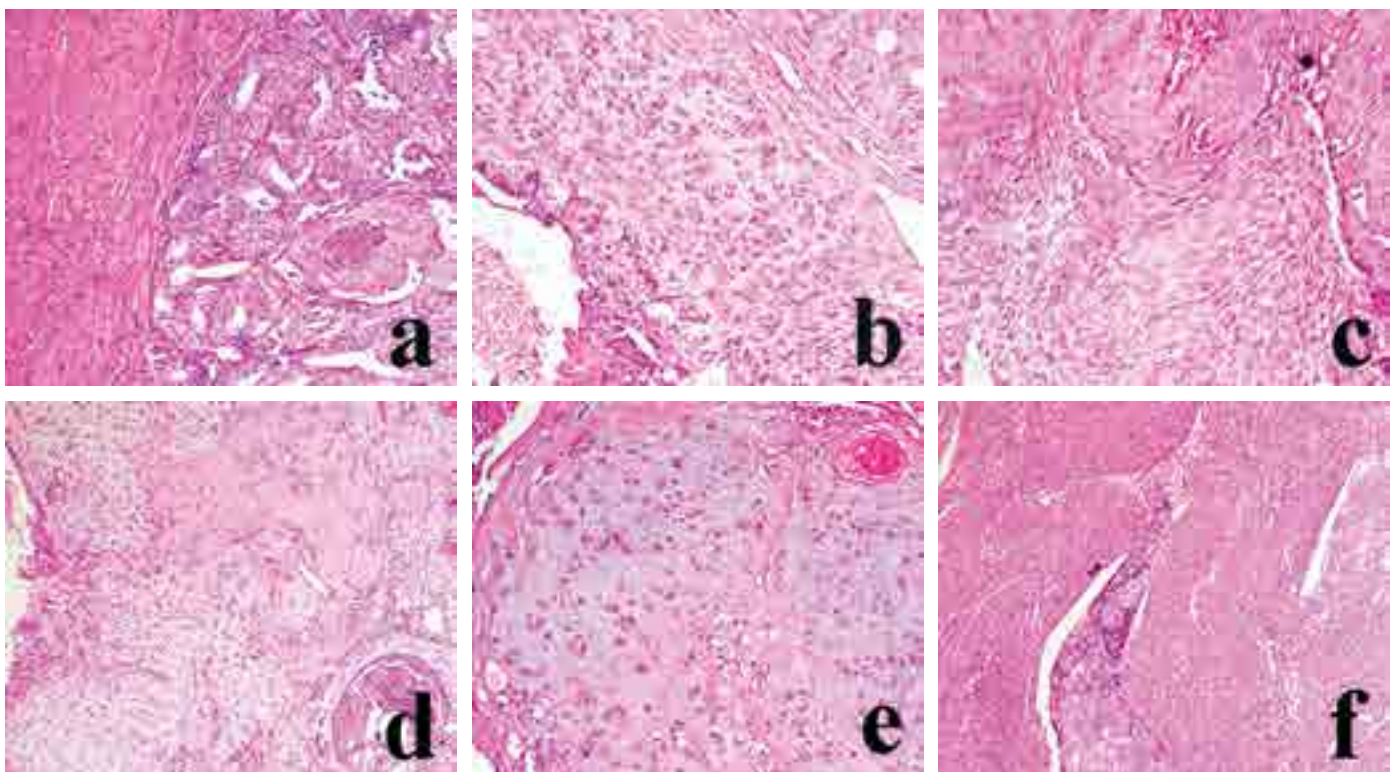
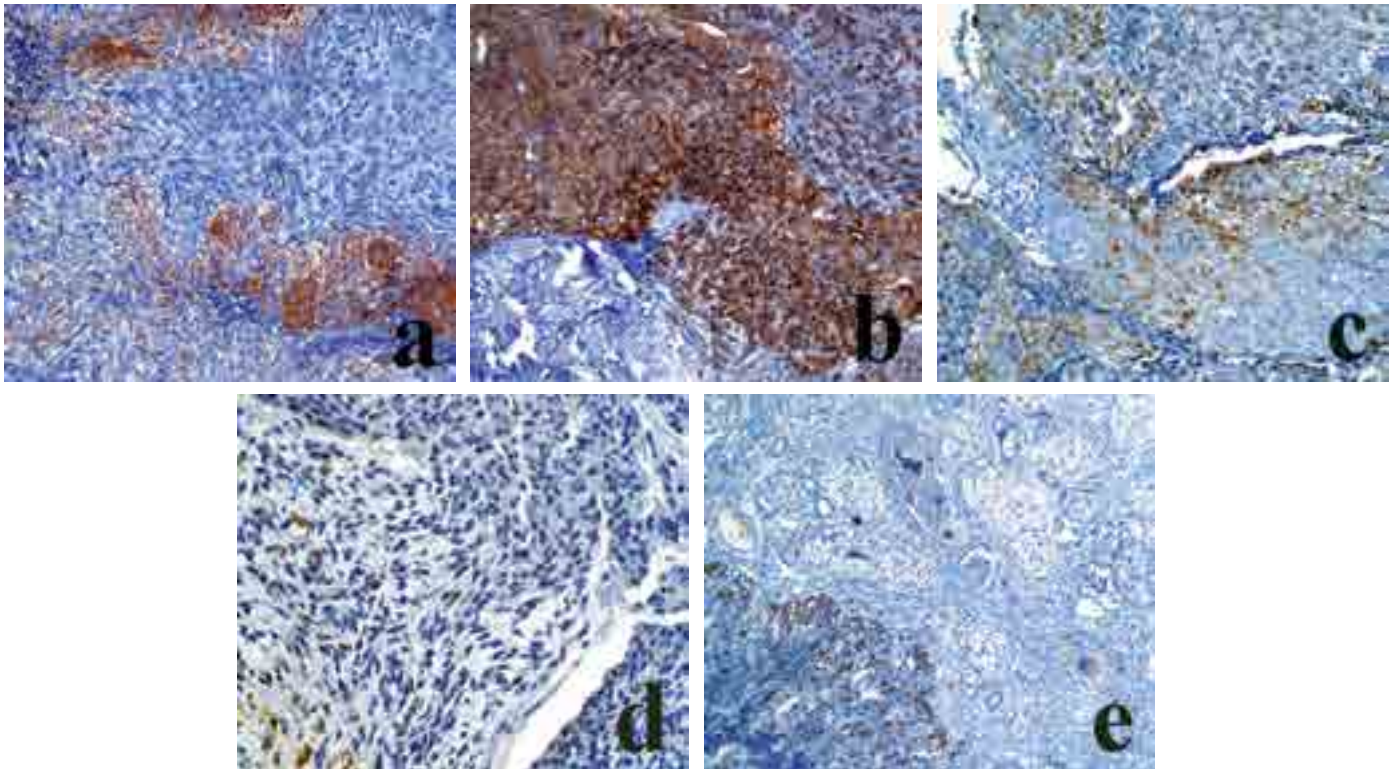


Figure 4. Immunohistochemical findings. (a) Pancytokeratin AE1/AE3 in the epithelium and in rare stromal cells. (b) Nuclear beta-catenin positivity in both epithelial and stromal components. Shadow cells and keratin material are negative (left and bellow). (c) Cyclin D1 was seen in both epithelial and stromal component. (d) Scattered S100 protein positive cells in the stromal component. (e) MIB1 shows high proliferation of adenocarcinoma component (left and bellow) contrasting with low proliferation in myxoid and hyalinized stromal component.



Our final diagnosis was ESCFH, with 5 mm invasion into 20 mm thick myometrium (stage 1 A) and with beta-catenin positive squamous and shadow cell differentiation, suggesting CTNNB1 mutated carcinoma⁽¹³⁾. Because the tumor showed hemovascular invasion, one published carcinosarcoma with low-grade appearance had dismal prognosis⁽¹⁴⁾ and CTNNB1 mutated EC represents an aggressive subgroup of non-high grade EC⁽¹²⁻¹³⁾, we proposed that an adjuvant therapy should be considered for the patient. Patient was staged as pT1aNxMx, her Ca125 and HE4 serum markers were negative. After discussion at multidisciplinary meeting and with the patient, adjuvant chemotherapy with carboplatin and paclitaxel was proposed. Two months after the surgery, clinical examinations found no sign of metastasis and recurrence.

Discussion

The present tumor shows features of ESCFH^(1-3,17-19). The non-high grade appearing glands of EC were admixed with cords and fascicles of epithelioid or fusiform cells within hyalinized stroma. The tumor resembles strongly MMMT, and especially in the frozen section the diagnosis is difficult, as we have experienced in our case. The knowledge of this type of EC is crucial to avoid misdiagnosis of MMMT. Examining frozen section, it was helpful for us that the slides from previous curettage specimen were available for a review. In addition, we have seen in frozen sections that biphasic pattern was strictly focal whereas typical MMMT shows diffuse

biphasic pattern in majority of cases⁽²⁰⁻²²⁾. However, in rare MMMTs the sarcomatous component can be limited even to a single focus, but this seems to be exceedingly rare and the known data about this phenomenon are limited to our knowledge. We have experience with one case of MMMT which was in fact a large EC that contained a single 15x10x10mm focus of gradual transition to pleomorphic and rhabdomyoblastic sarcoma⁽²³⁾. Some published series of MMMT mention very rare cases of MMMT which contained only small amount of biphasic pattern⁽²⁰⁻²²⁾.

Immunohistochemically, our case lacked several typical features of MMMT and this also was helpful for differential diagnosis. It was negative for p53, its epithelial component expressed ER and PR, MIB1 index in the stroma was very low, and the stromal component did not express muscle markers and stromal marker CD10. In addition, the stromal cells were positive for beta-catenin. This expression was found by Wani et al in all cases of ESCFH, which contrasted with beta-catenin negativity of sarcomatous component in all cases of MMMTs⁽²⁾. In the low-grade appearing stromal component, we have seen focal S100 protein positivity in myxoid areas. This expression is very difficult to interpret. It can reflect myoepithelial, schwannian and cartilaginous differentiation, all of which can show myxoma-like morphology. We would favor myoepithelial differentiation, because some cells of the stroma expressed cytokeratin and microscopic picture resembled that of myxoid and chondroid areas in pleomorphic

adenoma of the salivary gland. Moreover, the schwannian phenotype includes SOX10 positivity which was absent in the present tumor⁽²⁴⁾.

Additional interesting finding in our case is squamous and shadow cell differentiation⁽⁵⁻⁸⁾. This „adenocanthomatous“ feature was seen in a great majority of ESCFH^(1,2). We concur with Murray et al that there exists a histogenetic relationship between the squamous cells and the cells of the stroma. It seems to us that catenin+/p63+ cells in the basal layer of squamous nests give rise to stromal cells which retain catenin expression and which also often retain the epithelial immunophenotype.

The cell differentiation positive for beta-catenin and cyclin D1, as it was observed in our case, is frequently associated with CTNNB1 mutation^(13,15-16). According to recent studies, such non-high-grade EC with catenin and cyclin expression behave more aggressively and represent less favorable group in the spectrum of non-high-grade EC^(15,16). Interestingly, one new study of adenoacanthomatous EC by Andrade et al. found that these tumors had a 5.6-fold increased risk for recurrence in comparison with EC without squamous cell differentiation⁽²⁵⁾. However, additional studies of adenoacanthomatous EC are still needed in our opinion,

because the results in previously published series were variable^(26,27).

In conclusion, we have described rare case of ESCFH. The tumor strongly simulated high-grade MMMT especially in frozen section, representing a diagnostic pitfall. In permanent sections, the non-high-grade morphology of both components, conspicuous squamous and shadow cell differentiation and immunohistochemical features different from those of MMMT were most important for the correct diagnosis.

Acknowledgement: *The authors acknowledge the support provided by OP Research and Development: Completion of the multidisciplinary center for biomedical research – BIOMEDIR-ES, ITMS 26210120041, using the financial assistance from the European Regional Development Fund.*

Pod'akovanie: *Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.*

REFERENCES

- Murray SK, Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinomas of the uterine corpus with sex cord-like formations, hyalinization, and other unusual morphologic features: a report of 31 cases of a neoplasm that may be confused with carcinosarcoma and other uterine neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 157-166.
- Wani Y, Saegusa M, Notohara K. Aberrant nuclear beta-catenin expression in the spindle or corded cells in so-called corded and hyalinized endometrioid carcinomas. Another critical role of the unique morphological feature. *Histol Histopathol* 2009; 24: 149-155.
- Sun YH, Tang SX, Wang L, et al. Endometrioid carcinoma with sex cord-like formations and hyalinization of the uterine corpus: a clinicopathologic analysis of 5 cases. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2016; 45: 297-301, in Chinese.
- Zamecnik M, Sokol L, Michal M. Low-grade metaplastic adenocarcinoma (carcinosarcoma) of the uterus: report of an unusual case. *Ann Diagn Pathol* 2005; 9: 335-339.
- Zamecnik M, Michal M. Shadow cell differentiation in tumours of the colon and uterus. *Zentralbl Pathol* 1995; 140: 421-426.
- Zamecnik M, Bartos P, Kasca P. Shadow cell differentiation in endometrioid carcinomas of the uterus. Its frequent occurrence and beta-catenin expression. *Cesk Patol* 2015; 51: 123-126.
- Nakamura T. Shadow cell differentiation from squamoid morule in endometrial adenoacanthoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 13120-13124.
- Nakayama H, Kimura A, Okumichi T, et al. Metaplastic shadow cells in rectal adenocarcinoma: report of a case with immunohistochemical study. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 427-432.
- Krizova A, Clarke BA, Bernardini MQ, et al. Histologic artifacts in abdominal, vaginal, laparoscopic, and robotic hysterectomy specimens: a blinded, retrospective review. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 115-126.
- Kitahara S, Walsh C, Frumovitz M, et al. Vascular pseudoinvasion in laparoscopic hysterectomy specimens for endometrial carcinoma: a grossing artifact? *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 298-303.
- Logani S, Herdman AV, Little JV, et al. Vascular „pseudo invasion“ in laparoscopic hysterectomy specimens: a diagnostic pitfall. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 560-565.
- Richmond AM, Rohrer AJ, Davidson SA, et al. Low-grade endometrial stromal sarcoma with extensive sex cord differentiation, heterologous elements, and complex atypical hyperplasia: Case report and review of literature. *Gynecol Oncol Rep* 2016; 19: 34-38.
- Saegusa M, Okayasu I. Frequent nuclear beta-catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *J Pathol* 2001; 194: 59-67.
- Clearman T, Cimic A, Ellenson LH, et al. Clinically aggressive „low-grade“ uterine carcinosarcoma: A case report. *Gynecol Oncol Rep* 2015; 14: 9-11.
- Costigan DC, Dong F, Nucci MR, et al. Clinicopathologic and immunohistochemical correlates of CTNNB1 Mutated endometrial endometrioid carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2019, Epub ahead of print.
- Kurnit KC, Kim GN, Fellman BM, et al. CTNNB1 (beta-catenin) mutation identifies low grade, early stage endometrial cancer patients at increased risk of recurrence. *Mod Pathol* 2017; 30: 1032-1041.
- Rabban JT, Gilks CB, Malpica A, et al. Issues in the differential diagnosis of uterine low-grade endometrioid carcinoma, including mixed endometrial carcinomas: Recommendations from the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* 2019; 38(Suppl 1): S25-S39.
- Malpica A. How to approach the many faces of endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 2016; 29(Suppl 1): S29-44.
- Bartosch C, Manuel Lopes J, et al. Endometrial carcinomas: a review emphasizing overlapping and distinctive morphological and immunohistochemical features. *Adv Anat Pathol* 2011; 18: 415-437.
- Deligdisch L, Plaxe S, Cohen CJ. Extrauterine pelvic malignant mixed mesodermal tumors. A study of 10 cases with immunohistochemistry. *Int J Gynecol Pathol* 1988; 7: 361-372.

21. Geisinger KR, Dabbs DJ, Marshall RB. Malignant mixed müllerian tumors. An ultrastructural and immunohistochemical analysis with histogenetic considerations. *Cancer* 1987; 59: 1781-1790.
22. Bitterman P, Chun B, Kurman RJ. The significance of epithelial differentiation in mixed mesodermal tumors of the uterus. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 317-328.
23. Zamecnik M. Uterine mixed malignant mesodermal tumors: a case with an unusual distribution of components. *Cesk Patol* 1993; 29: 147-149, in Slovak.
24. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, et al. Sox10 - a marker for not only schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: a systematic analysis of 5134 tumors. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 826-835.
25. Andrade DAPd, da Silva VD, Matsushita GdM, et al. (2019) Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer. *PLoS ONE* 14(10): e0220086.
26. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 1991; 68: 2293-2302.
27. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation. *Hum Pathol* 1998; 29: 924-931.

MUDr. Michal Zámečník

Medicyt, s. r. o.

Legionárska 28, 91171 Trenčín, Slovak Republic

e-mail: zamecnikm@seznam.cz

Ileus pri farmakoterapii chronickej hnačky

Samuel Horak¹, Pavol Janega^{1,2,3}

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

²Ústav experimentálnej medicíny, SAV, Bratislava

³MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Trnava

Pri ileu je v dôsledku rôznych príčin narušená fyziologická motilita čriev. Dôvody jeho vzniku sú rôznorodé, patria k nim mechanické prekážky pasáže obsahu, poruchy prenosu nervového impulzu na svalovinu čreva alebo porucha cievneho zásobenia krvou. Ako jedna z chirurgických diagnóz zo skupiny ochorení so spoločným označením „akútne brucho“ neraz vyžaduje operačnú intervenciu. Závažnosť a mortalita sa medzi jednotlivými typmi ilea líši. Opisujeme prípad 60-ročnej pacientky, u ktorej sa pri farmakoterapii chronickej hnačky loperamidom rozvinul ileus. Diskutuje sa o možných príčinách ileózneho stavu u pacientky.

Kľúčové slová: ileus, farmakoterapia chronickej hnačky, nežiaduce účinky, loperamid

Ileus in chronic diarrhoea drug therapy (case report)

In ileus, the normal motility of the intestines is impaired due to various underlying diseases. Among the numerous causes, there are mechanical blockage of the lumen, disruption of the intestinal innervation or inadequacy of the blood supply. Together with other surgical diagnoses collectively referred to as „acute abdomen, it often leads to surgery. The prognosis and rate of mortality differ depending on the cause of the obstruction. We describe a case of a 60-year-old female patient who developed ileus during treatment of chronic diarrhoea by loperamide. Possible causes of ileus in the patient are discussed.

Keywords: ileus, pharmacotherapy of chronic diarrhoea, adverse effects, loperamide

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 61 – 62

Úvod

Ileus je stav črevnej nepriechodnosti, pri ktorom je narušená pasáž črevného obsahu fyziologickými peristaltickými vlnami aborálnym smerom, následkom čoho vzniká stagnácia a hromadenie črevného obsahu a plynu nad postihnutým miestom. Jeho príčiny sa dajú rozdeliť na mechanické a funkčné. Pri mechanickom ileu je prítomný patologický proces, ktorý fyzicky zabraňuje posunu obsahu črevom, najčastejšie ide o pooperačné intraabdominálne zrasty, rôzne zápalové procesy v brušnej dutine a panve, hernie, divertikulózu, volvulus, črevné a iné brušné nádory, k menej častým príčinám patria cudzie telesá, parazity, koprolity, intususcepčia⁽¹⁾. Pri funkčnom ileu (niekedy nazývanom paralytický ileus) nie je identifikovateľná mechanická príčina nepriechodnosti, podkladom je narušená činnosť svaloviny, napríklad v dôsledku metabolických porúch (hypokaliémia), hypoperfúzie čreva, užívania liekov (po celkovej operačnej anestézii, niektoré antipsychotiká, opioidy)^(1,2).

Pri všetkých typoch ilea dochádza k postupnému hromadeniu obsahu, zvyšovaniu intraluminálneho tlaku, ku kolekcii voľnej tekutiny vnútri čreva, v prípade progresie stavu k postupnému opuchu a ischemizácii steny čreva. To má za následok systémovú poruchu acidobázy a elektrolytov, dehydratáciu až hypovolémiu. Narušená črevná bariérová funkcia môže spôsobiť septický stav vzhľadom na prestup črevných baktérií do cievneho riečiska. Obávanou komplikáciou je ruptúra čreva (pre nadmernú dilatáciu, ischemiu, v prípade mechanického ilea pre hyperperistaltiku) s následnou peritonitídou, ktorá máva napriek včasnému operačnému riešeniu často vysokú mortalitu^(1,3).

Ku klinickým príznakom ilea patrí abdominálny diskomfort, bolesť brucha, meteorizmus s hypersonórnym poklopom, nauzea a vracanie, zastavenie odchodu vetrov a stolice, až šokový stav. Auskultačne je pri paralytickom ileu takmer kompletne vymiznutá peristaltika, pri mechanickom ileu je typická hyperperistaltika pre snahu čreva pretlačiť obsah cez miesto obštrukcie. V diagnostike sú okrem fyzikálneho vyšetrenia užitočné zobrazovacie metódy (natívna snímka brucha, ultrasonografia, počítačová tomografia – CT), ktoré pomáhajú potvrdiť ileózny stav (typická je dilatácia črevných kľúčiek s veľkým množstvom plynu a tvorbou hladiniek) a môžu odhaliť príčinu mechanickej nepriechodnosti⁽⁴⁾.

Prípadová štúdia

60-ročná pacientka s anamnézou inkontinencie stolice s hnačkami, trvajúcej viac ako 6 mesiacov bola prijatá na interné oddelenie pre akútne, opakované vracanie hnedozeleného obsahu s dlhodobo trvajúcimi bolesťami brucha a žalúdka. Udávala, že v stolici nepozorovala známky krvácania alebo čierneho obsahu, v čase pred hospitalizáciou mávala iba malé množstvo stolice nepravidelne. Pacientka dlhodobo neužívala žiadne lieky, iba liek lmodium s účinnou látkou loperamid na hnačku a inkontinenciu stolice. Pri úvodnom fyzikálnom vyšetrení bola pacientka obehovo stabilizovaná, afibrilná, brucho mala v nivaeu hrudníka, priehmatné, bez známok peritoneálneho dráždenia, spočiatku s bolestivosťou v epigastriu, s normálnym poklopom a auskultačne prítomnou peristaltikou, tá dokonca bola viditeľná cez brušnú stenu, per rectum so zvyškami riedkej stolice, na natívnej snímke brucha bez známok pneumoperitonea a hladiniek. Pri prijme

bol vysadený liek užívaný na hnačku. V priebehu hospitalizácie sa brucho dostalo nad niveau hrudníka, stalo sa difúzne palpačne citlivým, bez hmatnej rezistencie, stále bez známk peritoneálneho dráždenia, no výrazne meteoristické, už bez auskultačne prítomnej peristaltickej činnosti, per rectum bola hnedá tuhšia stolica, ktorá bola čiastočne manuálne evakuovaná. CT vyšetrením brucha sa zobrazil extrémne objemný obsah aborálnej časti hrubého čreva, ktorý komprimoval ostatné orgány brucha, perorálne podaná kontrastná látka zostala v žalúdku a hornej časti čriev. V laboratórnych parametroch mala pacientka leukocytózu, retenciu dusíkatých látok, hyponatriémiu, hypokaliémiu, hypochlorémiu. Napriek komplexnej terapii o pár dní pacientka exitovala.

Pri pitve sa našli masívne množstvá tuhej kompaktnej stolice hnedej farby, vyplňajúce priestor od rekta až po aborálnu štvrtinu colon descendens, s výraznou dilatáciou tejto časti čreva (obvod 30 cm), ostatné úseky hrubého a tenkého čreva boli značne dilatované a vyplnené plynom a väčším množstvom hnedozeleného plegického tekutého obsahu. Nenašli sa známky narušenia integrity čriev alebo iných častí gastrointestinálneho traktu, bez známk akútneho peritoneálneho zápalového procesu, bez ascitu a krvácania do brušnej dutiny alebo lúmenu čreva, bez nálezu iných mechanických príčin obštrukcie gastrointestinálneho traktu. Z ostatného nálezu bola identifikovaná pokročilá ateroskleróza aorty a jej vetiev v štádiu kalcifikačných zmien s ložiskovou obštrukciou do 50 %, chronická pyelonefritída obojstranne s akútnou exacerbáciou a bronchopneumónia jedného laloka pľúc.

Diskusia

Voľnopredajné liečivo loperamid patrí do skupiny antidiaríí určených na symptomatickú liečbu akútnej a chronickej hnačky. Viaže sa na opioidné receptory plexus myentericus čreva, spomaľuje uvoľňovanie acetylcholínu a prostaglandínov, čím znižuje propulznú peristaltiku, predlžuje pasáž obsahu črevom a zvyšuje tonus análneho sfinktra⁽⁵⁾. K častým nežiaducim účinkom zo strany gastrointestinálneho traktu pri užívaní loperamidu patrí zápcha, nauzea, flatulencia, menej často bolesť brucha, abdominálny diskomfort, s frekvenciou $\geq 1/10\ 000$ až $< 1/1\ 000$ ileus, megakolon, abdominálna dystenzia. Pri výskyte nežiaducich účinkov aj pri predávkovaní je nutné liek vysadiť, prípadne opakovane podať antidotum naloxón⁽⁵⁾. Napriek tomu, že ide o vysokoúčinný a relatívne bezpečný liek, závažné až letálne nežiaduce účinky

loperamidu vrátane paralytického ilea boli pozorované a publikované už pred vyše päťdesiatimi rokmi naprieč rôznymi vekovými kategóriami, od pediatrickej až po geriatrickú populáciu. Vznik ilea bol pozorovaný pri predávkovaní, no aj pri bežných terapeutických dávkach^(6,7). V minulosti bol opísaný prípad staršej pacientky, u ktorej sa pri liečbe akútnej hnačky, pravdepodobne v dôsledku predávkovania loperamidom, rozvinuli akútne príznaky črevnej nepriechodnosti veľmi podobné opísanej kazuistike. Po vysadení lieku a primerane intenzívnej, no najmä včasnej konzervatívnej terapii sa pacientkin stav kompletne upravil⁽⁷⁾.

V prípade pacientky z tejto kazuistiky nie sú k dispozícii údaje o dĺžke užívania a dávkovaní lieku. Vzhľadom na údaj o hnačkách trvajúcich 6 mesiacov, uvádzaný pacientkou, však možno predpokladať, že liečba loperamidom trvala dlhšie. Príčinou črevnej nepriechodnosti u pacientky pravdepodobne nebol priamo paralytický ileus, ale napriek udávaným hnačkám paradoxne skôr dlhodobo prebiehajúca obstipácia, ktorá vyústila do nahromadenia veľkého množstva skybál v colon sigmoideum a colon descendens, čoho následkom bolo mechanické blokovanie lúmenu čreva so vznikom mechanického ilea, resp. kombinácia mechanického a paralytického ilea s viacfaktorovou etiológiou. Podiel na progresii ilea mohla mať pokročilá ateroskleróza aorty a jej vetiev, ktorá mohla zhoršovať zdravotný stav ischemizáciou čreva. Napriek tomu, že počas hospitalizácie bola pacientka liečená na zápchu konzervatívne a manuálnou evakuáciou stolice, normálnu pasáž sa nepodarilo obnoviť včas. Ileózný stav spolu s exacerbovanou chronickou pyelonefritídou viedol k fatálnej poruche homeostázy a úmrtiu pacientky.

Záver

Farmakologicky navodený ileus je známym nežiaducim účinkom viacerých liekov. Pri včasnom a adekvátne volenom zásahu možno pasáž čreva obnoviť a pacient môže prežiť bez zdravotných následkov⁽⁷⁾. Je nutné mať na zreteli riziko výskytu vzácnejších nežiaducich účinkov liekov, najmä u pacientov súčasne užívajúcich viaceré lieky vrátane voľnopredajných liekov, a zohľadniť ich pri diferenciálnodiagnostických úvahách.

Podakovanie: Tento článok vznikol aj 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. Griffiths S, Glancy DG. Intestinal obstruction. Surgery (Oxford) 2017; 35(3): 157-164.
2. Vilz TO, Stoffels B, Strassburg C, et al. Ileus in Adults. Dtsch Arztebl Int 2017; 114(29-30): 508-518.
3. Bielecki K, Kamiński P, Klukowski M. Large bowel perforation: morbidity and mortality. Tech Coloproctol 2002; 6(3): 177-182.
4. Jackson PG, Raiji MT. Evaluation and management of intestinal obstruction. Am Fam Physician 2011; 83(2): 159-165.

5. Imodium. ADC portál [online]. Bratislava: PharmINFO spol., s. r. o. Dátum revízie textu 07/2019 [cit. 19. 2. 2020]. Dostupné na: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/imodium-808582.html>
6. Von Mühlendahl KE, Bunjes R, Krienke EG. Loperamide-induced ileus. Lancet 1980; 1(8161): 209.
7. Zaniello B, Phillips-Caesar E. Over-the-counter medication overuse and bowel obstruction. J Am Geriatr Soc 2014; 62(2): 400-402.



MUDr. Samuel Horák

Ústav patologickej anatómie
Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
e-mail: samo.horak@gmail.com

Homogénne sa farbiace oblasti u pacientov s leukémiou (kazuistiky)

Andrea Blahová, Alexandra Oravcová, Kristína Lengyelová, Alena Žákovičová, Kristína Horváthová, Lucia Žideková, Renata Lukačková

Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Úvod: Homogénne sa farbiace oblasti (hsr) podobne ako dmin predstavujú cytogeneticky viditeľný znak génovej amplifikácie. Je známe, že obsahujú kópie amplifikovaných DNA segmentov. Ich výskyt je častý v rôznych ľudských nádoroch, v hematologických malignitách ich však detegujeme zriedkavo. Ich úloha v leukemogéneze nie je jasná, sú však asociované s rýchlou progresiou ochorenia a krátkym prežívaním. Mechanizmus vzniku nie presne opísaný. Na cytogenetickej úrovni sa hsr deteguje ako veľká časť difúzne zafarbeného chromatinu včleneného do normálneho chromozómu.

Kazuistiky: Predstavujeme troch pacientov s de novo AML a MDS, ktorí boli v čase diagnózy vyšetrení na našom oddelení genetiky. U všetkých troch bola uskutočnená cytogenetická analýza, FISH a molekulová analýza metódou MLPA. Cytogenetická analýza G-prúžkovaných chromozómov po 24-hodinovej kultivácii buniek kostnej drene odhalila komplexný karyotyp s deléciou dlhého ramena chromozómu 5, prítomnosť hsr oblastí a mnohé ďalšie numerické a štruktúrne zmeny. FISH metóda pomohla odhaliť a špecifikovať aberácie a amplifikácie a stanoviť ich percentuálne zastúpenie.

Výsledky: Všetci prezentovaní pacienti majú spoločné znaky: starší vek, de novo ochorenie AML alebo MDS s komplexným karyotypom, ktorý obsahoval deléciu 5q oblasti, zlú prognózu a krátke prežívanie.

Kľúčové slová: homogénne sa farbiace oblasti, cytogenetická analýza, FISH, komplexný karyotyp

The homogeneously staining regions in patients with leukaemia (case reports)

Introduction: The homogeneously staining regions (hsr) just as the dmin represent cytogenetically visible signs of gene amplification. They contain copies of an amplified DNA segment. Although found in the variety of human cancer cells, their presence in hematologic malignancies is rare. Their role in leukemogenesis is not clear, but they have been reported to be associated with rapid progression and short survival time. The mechanism of their origination is not known exactly. Characteristically, hsr can be detected after chromosome banding in metaphase preparations as a large chunk of diffusely staining chromatin somewhere inside an ordinary chromosome.

Case reports: We report three patients with de novo AML and MDS who were examined by the cytogenetic analysis, FISH and MLPA method in our laboratory at the time of diagnosis. After 24-hour cultivation of bone marrow cells, the analysis of G-banded chromosomes revealed complex karyotype including deletion of the long arm of chromosome 5, the presence of hsr and other numerical and structural changes. The use of FISH method enabled the identification of chromosome aberrations and genes amplified in hsr and the determination of their percentage.

Results: All three patients shared the same characteristics: they were old, *de-novo* diagnosis AML or MDS with complex karyotype including deletion of 5q, bad prognosis and short survival time.

Keywords: homogeneously staining regions, cytogenetic analysis, FISH, complex karyotype

NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 63 – 68

Úvod

Leukémia je malígne ochorenie krvotvorných buniek, pri ktorom dochádza k zmnoženiu a hromadeniu nezrelých foriem bielych krviniek a tie postupne obsadzujú priestory v kostnej dreni a potláčajú normálnu krvotvorbu. S leukémiou sa spájajú rôzne štruktúrne chromozómové zmeny, ako sú translokácie, delécie, inverzie, adície, alebo numerické zmeny, ako sú aneuploidie, polyploidie chromozómov⁽¹⁾. Zriedkavo sa však (~ 1 %) stretávame s cytogeneticky viditeľným znakom amplifikácie DNA. Toto mnohonásobné zmnoženie DNA sa môže vyskytovať extrachromozómovo ako tzv. double minute (dmin), malé párové chromatinové telieska bez centroméry alebo intrachromozómovo, známe ako homogénne sa farbiace oblasti (hsr- homogeneously staining region), keď je zmnoženie integrované do chromozómu (**obrázok 1**). Mechanizmus vzniku nie je úplne objasnený. Prvýkrát

boli opísané v roku 1962 u pacientov s bronchogénnym karcinómom⁽²⁾. Následkom amplifikácie DNA dochádza k zvýšenej expresii génov obsiahnutých v amplikóne, dochádza k modifikácii normálneho bunkového delenia a prežívania buniek. Zmnoženie má potenciálny leukemogénny účinok a je asociované s rýchlou progresiou ochorenia a krátkym časom prežívania. Najčastejšie amplifikovanými génmi sú *MYC*, *MYCN* (neuroblastóm), *HER2/neu* (nádory prsníka), *KMT2A*⁽³⁾.

Materiál a metódy

V článku predstavujeme troch pacientov, u ktorých sme cytogenetickou analýzou detegovali homogénne sa farbiace oblasti a pomocou FISH metódy sme odhalili ich pôvod.

Na cytogenetickú analýzu boli použité vzorky kostnej drene kultivované 24 hodín v kompletnom kultivačnom médiu

pri 37 °C a následne spracované podľa štandardných cytogenetických postupov. Preparáty boli farbené Wrightovým roztokom a u každého pacienta bolo hodnotených 20 G-prúžkových metafáz. Karyotyp bol zapísaný podľa International System of Chromosome Nomenclature (ISCN)⁽⁴⁾.

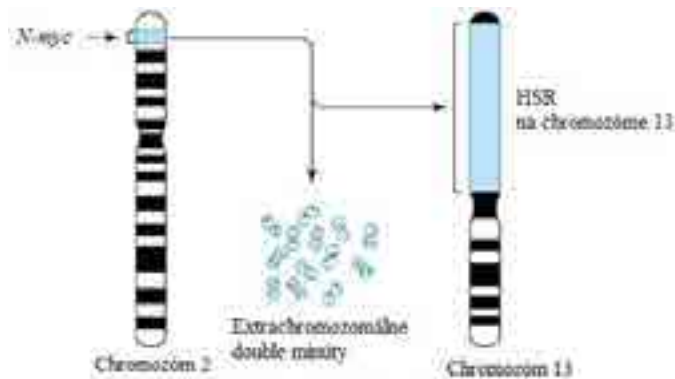
Na FISH analýzu boli použité suspenzie pripravené spojeným postupom. Boli použité nasledovné sondy od firmy Metasystems XL Del(5)(q31), XL 7q22/7q36, XL TP53/17cen, XCE 8 Blue, XL 22q11 IGL BA, XL 20q12/20qter, XL Iso(17q), XCE 12 Orange, XL MLL plus, sonda ZytoLight® SPEC BCL2 DC BA od Zytovision a sonda LSI 21 SO od firmy Abbott. Preparáty a sondy boli denaturované, následne prebehla hybridizácia a hodnotenie 200 interfázových jadier pod fluorescenčným mikroskopom.

Na molekulovej úrovni sa u pacientov po izolácii DNA z kostnej drene alebo periférnej krvi realizovala MLPA analýza pomocou kitu MDS P414-A1. Technika deteguje len numerické zmeny, delécie a amplifikácie. Obsahuje 46 sond pre niekoľko chromozómov, ktoré majú diagnostický alebo prognostický význam pre pacientov s myelodysplastickým syndrómom (MDS) (chromozómy 3, 5q, 7q, 8q, 11q, 12p, 17, 19, 20q, Y).

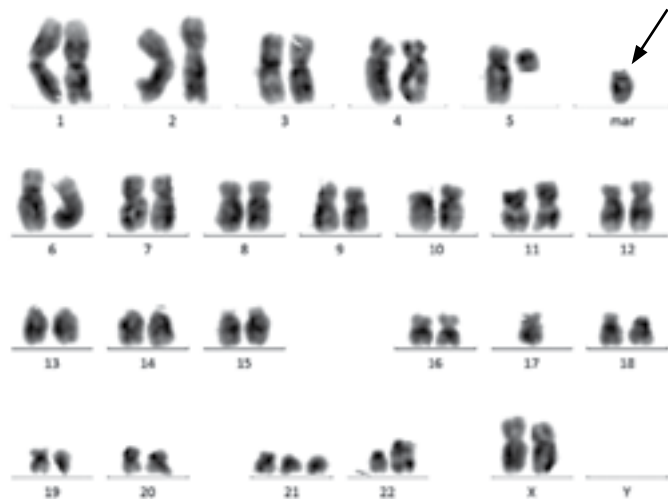
Kazuistika č. 1

V júni 2016 sme na naše oddelenie prijali vzorku kostnej drene 78-ročnej pacientky s diagnózou akútna myeloblastová leukémia (AML) bližšie neurčeného typu. Na cytogenetickej úrovni sme analyzovali 20 G-bandovaných metafáz

Obrázok 1. Vizualne formy amplifikácie DNA



Obrázok 2. Karyotyp pacientky, šípka naznačuje hsr(22)(q11)



a stanovili sme komplexný karyotyp (**obrázok 2**): 47,XX,-der(5)t(5;21)(p11;q21),-17,+21,der(22)t(17;22)(q21;q10),+hsr(22)(q11)[20].

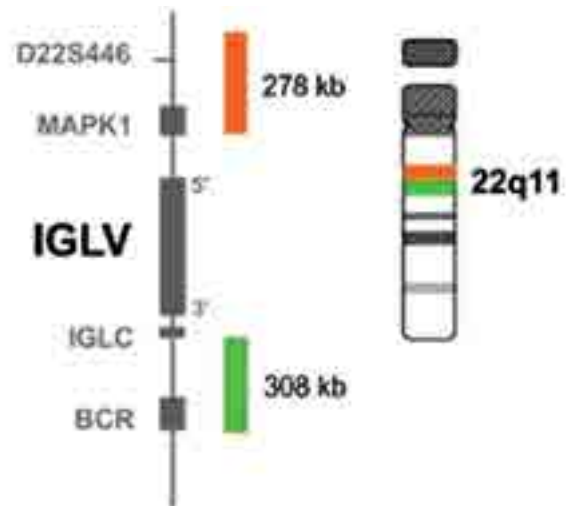
Na preparátoch sme uskutočnili aj FISH analýzu pomocou sond používaných pri diagnóze MDS a zachytili sme zmeny zhrnuté v **tabuľke 1**.

Vyšetrovanie IGL génu lokalizovaného na chromozóme 22 bolo uskutočnené pomocou sondy XL IGL BA z Metasystems (**obrázok 3**). Detegovali sme amplifikáciu len zelenej 3' oblasti (**obrázok 4**), v ktorej sa nachádza gén BCR. Napriek tomu, že

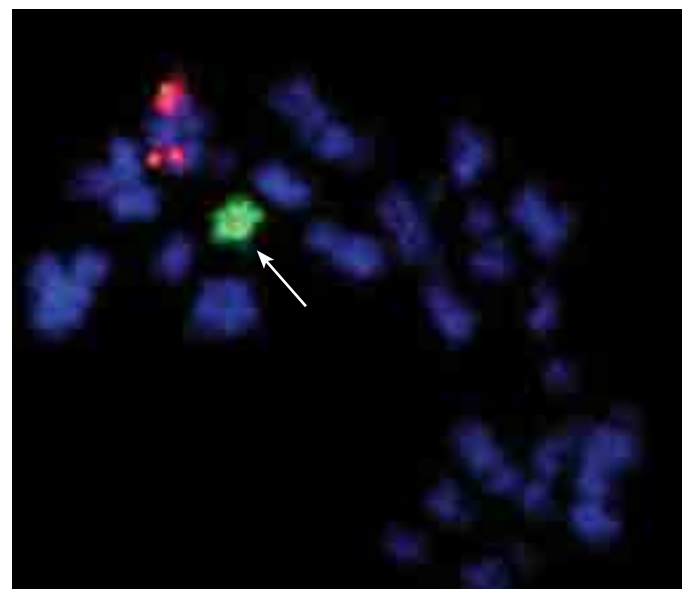
Tabuľka 1. Použité FISH sondy a výsledky analýz

| Sondy | Výsledky |
|-------------|---------------------------------------|
| 5p15/5q31 | Pozitívne delécia 5q31: 84% |
| CEP8 | Negatívne |
| 7/7q22/7q36 | Negatívne |
| TP53(17p13) | Pozitívne -17: 93% |
| 17q22 | Negatívne |
| 20q12 | Negatívne |
| +21 | Pozitívne zisky 21q22: 97% |
| IGL(22q11) | Pozitívne +IGL/amplif. IGLC, BCR: 97% |

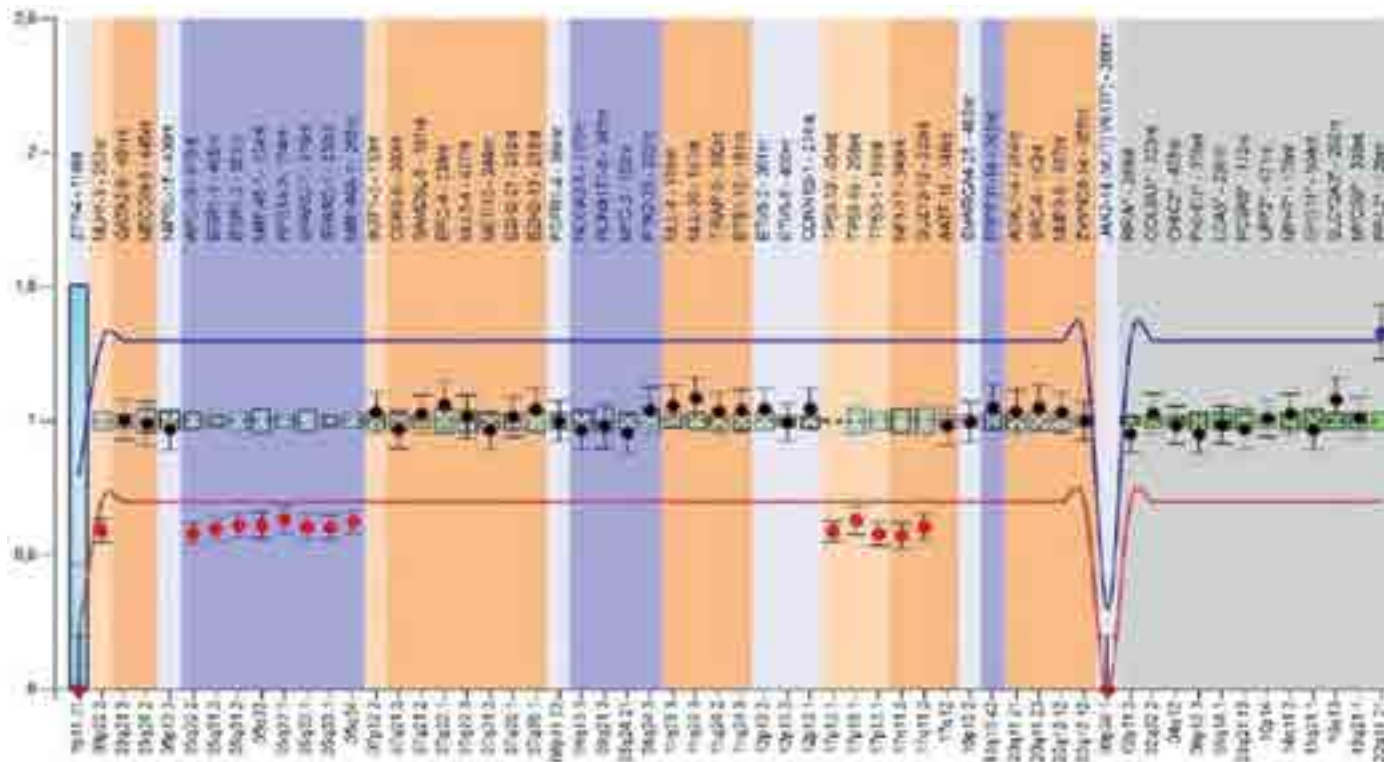
Obrázok 3. Schéma sondy XL IGL BA



Obrázok 4. Amplifikácia 3' oblasti IGL génu (zelený signál)



Obrázok 5. MLPA analýza u pacientky



Tabuľka 2. Použité FISH sondy a výsledky analýz

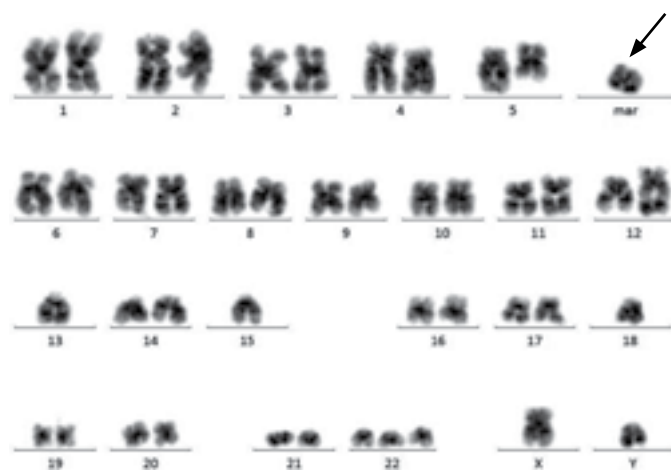
| Sonda | Výsledok |
|-------------|---|
| MLL (11q23) | Pozitívne zisky MLL: 80% |
| 5p15/5q31 | Pozitívne delécia 5q31: 83% |
| BCL2(18q22) | Pozitívne -18q22: 89% |
| IGL(22q11) | Pozitívne zisky IGL: 42% |
| CEP12 | Pozitívne na metafázach der(12)t(11;12;?) |

fúzny proteín bcr/abl patrí k veľmi skúmaným, nie je funkcia normálneho BCR génu úplne objasnená. Predpokladá sa, že má GTP-ázovú aktivitu a reguluje signálne dráhy v bunke⁽⁵⁾. Zároveň sme pacientke detegovali stratu centroméry a krátkych ramien chromozómu 17, na ktorých je lokalizovaný tumorsupresorový gén *TP53*. Býva tiež označovaný ako strážca genómu. Jeho úlohou je udržiavať genómovú stabilitu a integritu, regulovať expresiu mnohých génov s dôležitou úlohou pri bunkovom raste, delení, apoptóze, angiogenéze a má kľúčovú úlohu v ochrane pred tvorbou nádoru^(6,7). MLPA analýza potvrdila amplifikáciu 22q11.21, delécia 5q22-q34, 17p13.1, 17q11.2 a odhalila delécia krátkych ramien chromozómu 3 (3p22.2) (obrázok 5). Pacientka exitovala ešte toho mesiaca.

Kazuistika č. 2

V apríli 2017 sme na naše oddelenie prvýkrát prijali vzorku periférnej krvi 73-ročného pacienta s diagnózou myelodysplastický syndróm (MDS). Na molekulovej úrovni bola realizovaná MLPA analýza, ktorá preukázala prítomnosť amplifikácie chromozómu 11 v oblasti q23.3-q24.3. O mesiac neskôr, v máji, sme prijali vzorku kostnej drene a vyšetrenie bolo doplnené o cytogenetiku a FISH analýzu. Po cytogenetickej analýze sme v 13 metafázach identifikovali komplexný karyotyp s marker chromozómom (obrázok 6): 45,XY,-5,der(11)t(5;11)(p13;q22),+hsr(11)(q23),der(12)t(11;12;?)

Obrázok 6. Karyotyp pacienta so šípkou na hsr(11)(q23)



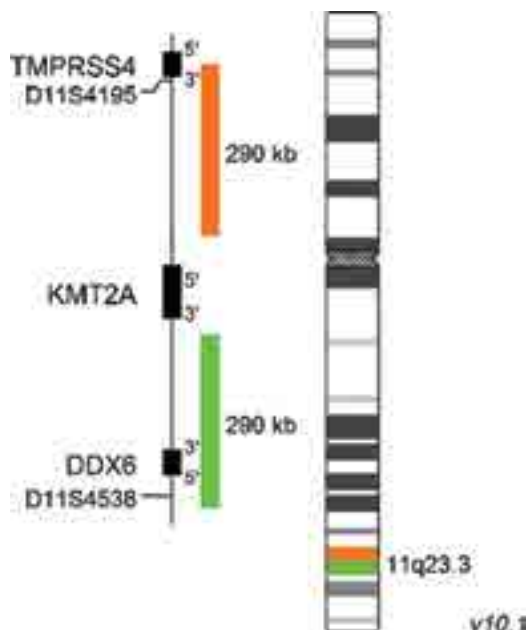
(q23;q11;?),-18[6]/46,idem,+22[7]/46,XY[7]. Výsledky FISH analýz sú uvedené v tabuľke 2.

Pomocou sondy MLL plus dc (obrázok 7) sme odhalili, že marker chromozóm je celý tvorený namnoženým génom *KMT2A* (starší názov *MLL*) a zároveň na chromozóme 11 sa tiež vyskytuje *KMT2A* gén dvakrát za sebou (obrázok 8). *KMT2A* gén kóduje transkripčný koaktívator, ktorý má dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie počas včasného vývoja a hematopoézy⁽⁸⁾.

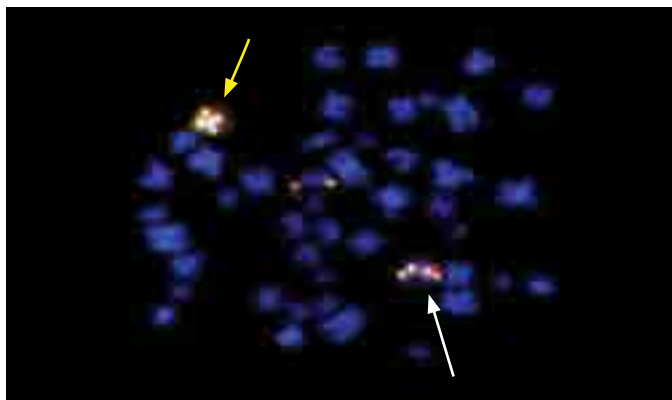
Na obrázku 9 je odhalená delécia oblasti 5q31, ktorá spôsobuje, že nezrelé krvné bunky nie sú schopné dodiferencovať sa normálne a výsledkom je veľa nezrelých foriem buniek a málo zreých. Najčastejšie deletovaný región DNA obsahuje 40 génov.

Na obrázku 10 je potvrdená trizómia chromozómu 22 pomocou FISH metódy. Pacient koncom júna 2017 exitoval.

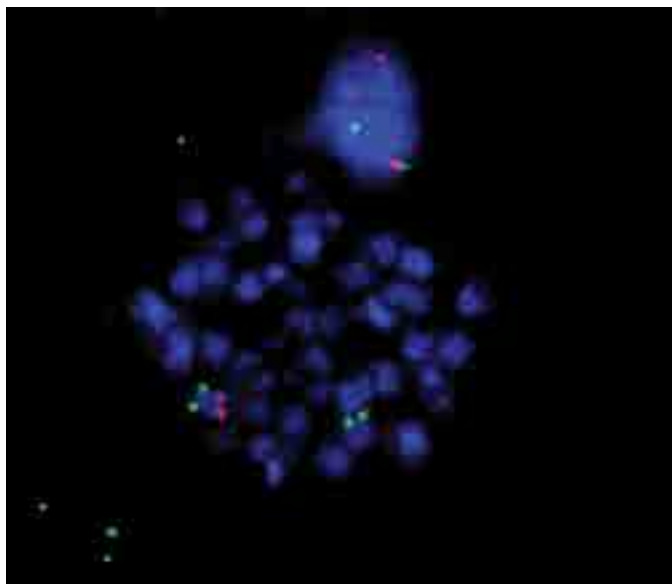
Obrázok 7. Schéma sondy XL MLL Plus



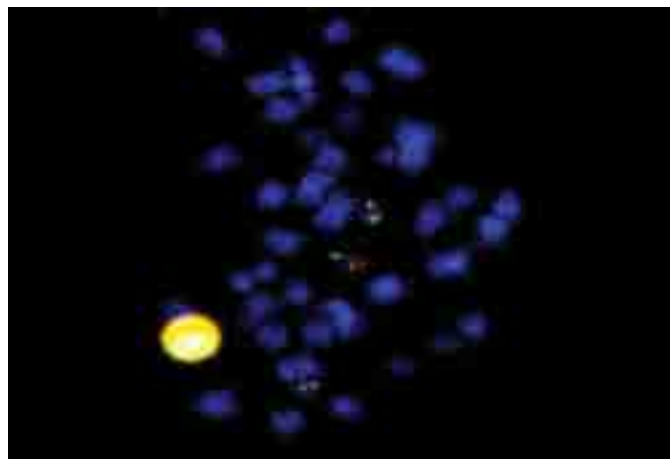
Obrázok 8. FISH vyšetrenie pomocou sondy XL MLL plus so žltou šípkou na hsr(11)(q23) a bielou na chromozóm 11 s duplikáciou KMT2A génu



Obrázok 9. Strata 5q31 znázornená na chromozóme



Obrázok 10. Trizómia chromozómu 22



Kazuistika č. 3

Vzorka kostnej drene 68-ročného pacienta bola v našom laboratóriu prvýkrát vyšetrená v januári 2017. Diagnóza bola myelodysplastický syndróm. V 10-tich metafázach sme určili nasledovný komplexný karyotyp (**obrázok 11**): 47,XY,del(5)(q15q33),der(7)del(7)(q11)t(3;7)(q13;q11),+hsr(21)(q22)[10]/46,XY[10]. Vyšetrenie kostnej drene bolo doplnené o FISH analýzu a výsledky sú zhrnuté v **tabuľke 3**.

V oblasti 21q22, ktorá bola vyšetrená sondou LSI 21 SO (**obrázok 12**) a bola detegovaná amplifikácia (**obrázok 13**), sa nachádza gén *RUNX1* (starší názov *AML1*). Tento gén kóduje transkripčný faktor zodpovedný za reguláciu diferenciácie hematopoetických buniek na zrelé bunky⁽⁹⁾. Pomocou sondy XL 7q22/7q36 bola potvrdená strata dlhých ramien chromozómu 7, keď ostali v karyotype len krátke ramená a centroméra chromozómu 7 (modrá farba, **obrázok 14**).

MLPA analýza potvrdila deléciu 5q22.2-q33.1 a 7q22.3-q36.1 a odhalila deléciu 3p22.2, nezachytenú na cytogenetickej úrovni.

Pacient v marci 2017 exitoval.

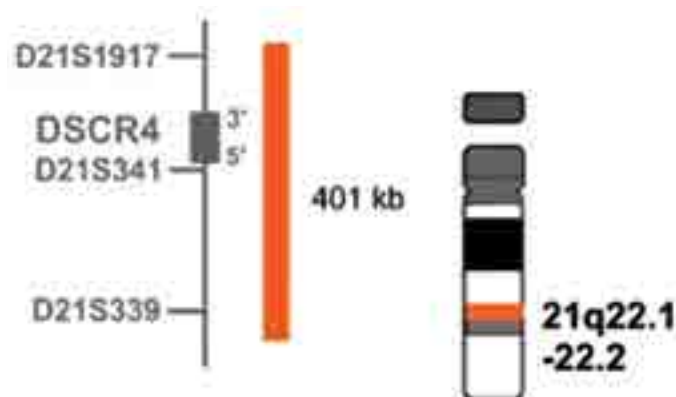
Diskusia

Homogénne sa farbiace oblasti sú chromozómové miesta s mnohonásobným opakovaním (~20 – 100) segmentov DNA. Sú charakteristickým znakom malígneho procesu a zvyčajne sú detegované v pokročilých štádiách malígneho procesu spojené so zlou prognózou. Následkom zmoženia sa môžu vytvárať rôzne veľké markery vyskytujúce sa samostatne alebo sa môžu včleniť do chromozómu. Keďže sa farbja rovnomerne, ich identifikácia pomocou G-bandu je veľmi náročná. Na odhalenie pôvodu zmoženia sa preto najčastejšie využíva FISH metóda.

Hoci boli opísané amplifikácie rôznych génov, najčastejšie amplifikované sú gény z malej génovej rodiny *MYC* (*MYC*, *MYCN*, and *MYCL*). Sú identifikované v mnohých solídnych nádoroch, ako sú nádory mozgu, prsníka, pankreasu, neuroblastóm. V hematologických malignitách sa vyskytujú zriedka, okolo 1 %⁽¹⁰⁾. Tu často amplifikovaným génom býva *KMT2A*, ktorého amplifikáciu sme detegovali u nášho jedného pacienta. *KMT2A* gén je lokalizovaný v lokuse 11q23 a v leukémiách sa vyskytuje hlavne v translokáciách, doteraz bolo identifikovaných viac ako 80 jeho fúznych partnerov⁽¹¹⁾.

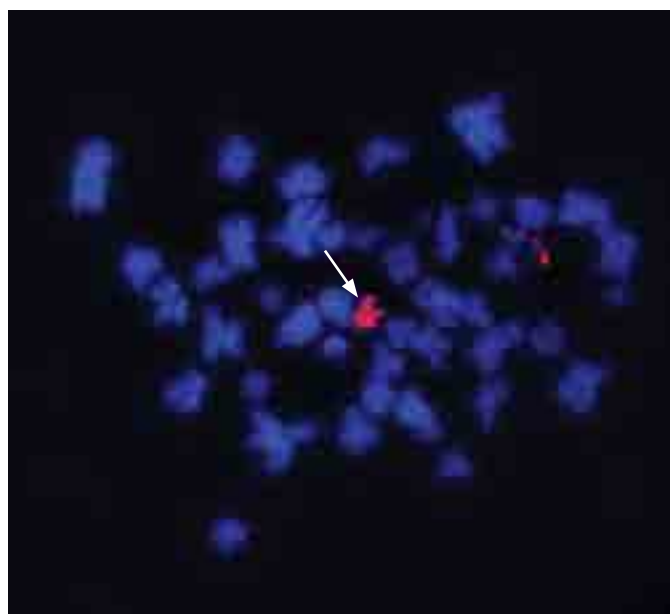
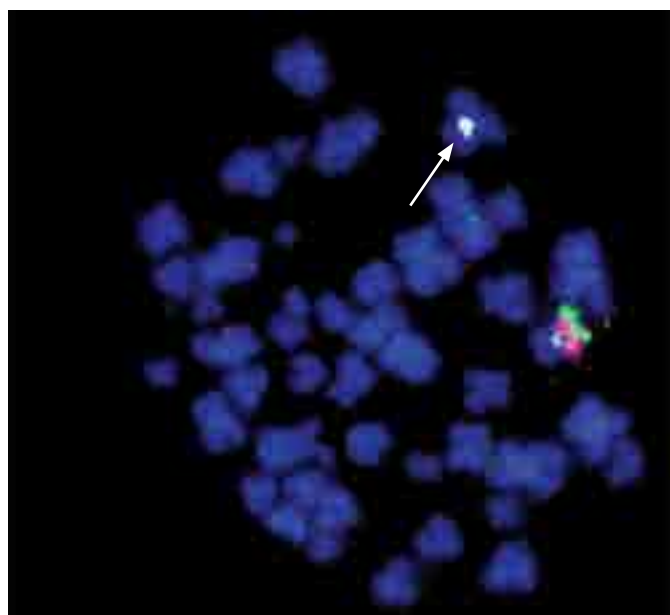
Obrázok 11. Karyotyp pacienta, šípka znázorňuje *hsr(21)(q22)***Tabuľka 3.** Použité FISH sondy a výsledky analýz

| Sonda | Výsledok |
|--------------|--------------------------------|
| 5p15/5q31 | Pozitívne delécia 5q31: 68% |
| CEP8 | Negatívne |
| 7/7q22/7q36 | Pozitívne delécia 7q: 44% |
| TP53 (17p13) | Negatívne |
| 20q12 | Negatívne |
| BCL6 (3q27) | Pozitívne na metafázach t(3;7) |
| +21 | Pozitívne zisky 21: 45% |

Obrázok 12. Schéma sondy LSI 21 SO

Pacienti s amplifikáciou 11q23 sa vyskytujú pomerne zriedkavo, majú však niektoré črty veľmi podobné: sú to pacienti staršieho veku, s de novo ochorením AML/MDS, s komplexným karyotypom a krátkym prežívaním. U 90 % pacientov je tiež prítomná delécia dlhých ramien chromozómu 5, ktorej veľkosť varíruje, ale všetkým pacientom chýba oblasť 5q31⁽¹²⁾.

Druhým najmenším chromozómom v karyotype, ktorý obsahuje ~ 600 génov, je chromozóm 22. Pomocou FISH metódy sme detegovali amplifikáciu jeho 3' oblasti q11, v ktorej sa nachádzajú gény *IGLC* a *BCR*. *IGLC* kóduje imunoglobulínový lambda reťazec, ktorého prestavba je prítomná hlavne v lymfómoch. Pri hematologických malignitách je amplifikácia génu *BCR* zriedkavá, najčastejšie je gén opisovaný v translokácii t(9;22)(q34;q11), na molekulovej úrovni fúzia *bcr/abl*.

Obrázok 13. FISH analýza pomocou sondy LSI 21 SO znázorňujúca amplifikáciu 21q22**Obrázok 14.** FISH vyšetrenie pomocou sondy XL 7q22/7q36, šípka je znázornený deletovaný chromozóm

Gén *BCR* kóduje proteín so serín/treonínkinázovou aktivitou zahrnutý v signálnej transdukcii, jeho presná úloha však nie je odhalená⁽⁵⁾.

Tretím chromozómom, na ktorom sme potvrdili amplifikáciu, bol chromozóm 21. Použitá sonda LSI 21 SO hybridizuje k oblasti 21q22. Ktorý gén z danej oblasti je presne amplifikovaný, nevieme, ale kandidátnym génom je gén *RUNX1* (21q22.1). *RUNX1* gén zohráva významnú úlohu pri hematopoetickej diferenciácii a v mnohých iných bunkových funkciách. Patrí ku génom, ktoré sú pri leukémiách častým cieľovým miestom translokácií. S amplifikáciou génu *RUNX1* sa stretávame hlavne pri detských akútnych leukémiách, no môže sa vyskytovať aj u dospelých s komplexným karyotypom a je spojená so zlou prognózou^(13,14).

Záver

Hsr/dm sa vyskytujú prevažne u starších pacientov s diagnózou AML alebo MDS. U pacientov je prítomný komplexný karyotyp s deléciou dlhých ramien 5. chromozómu so spo-

ločnou deletovanou oblasťou 5q31. S komplexnými zmenami sa tiež spája strata génu *TP53* z chromozómu 17. Pacienti s hsr/dm majú zlú prognózu a krátke prežívanie, čo sa potvrdilo u všetkých nami prezentovaných pacientov.

LITERATÚRA

1. Juliusson, G., & Hough, R., 2016. Leukemia. Tumors in Adolescents and Young Adults, 87-100.
2. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. Cancer Biology 1999; 9: 319-325.
3. Levan G in Encyclopedia of Genetics. Elsevier Science Inc. Thomas L, 2001; p. 963.
4. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Paris: Karger 2016.
5. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR>
6. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/P53>
8. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KMT2A>
9. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/RUNX1>
10. Movafagh A. Homogeneously Staining Regions or Double Minute Chromosomes in Leukemia. Iranian journal of blood and cancer 2012; 2: 101-102.
11. Nguyen D, Haley L, Pallavajjala A, et al. Identification of a novel KM-T2A-SEPT14 fusion in acute myeloid leukemia. Leukemia and Lymphoma 2018; 59(1): 265-267.
12. Herry A, Douet-Guilbert N, Guéganic N, et al. Del(5q) and MLL amplification in homogeneously staining region in acute myeloblastic leukemia: a recurrent cytogenetic association. Annals of Hematology 2006; 85: 244-249.
13. Baldus C, Liyanarachchi S, Mrózek K, et al. Acute myeloid leukemia with complex karyotype and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2 and REG genes. PNAS 2004; 101(11): 3915-3920.
14. Mikhail FM, Sinha KK, Sauntharajah Y, et al. Normal and transforming functions of RUNX1: A perspective. Journal of cellular Physiology 2006; 207(3): 582-593.

**RNDr. Andrea Blahová**

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: andrea.blahova@medirex.sk

Európska cytogenomická konferencia v Salzburgu – prezentácia posteru 12th European Cytogenomics Conference 2019 (Salzburg, Austria, July 6. – 9. 2019)

Alexandra Oravcová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.

The European Cytogeneticists Association, E.C.A., je Európska cytogenetická asociácia registrovaná vo Francúzsku, založená v júli 1997, ktorá pravidelne v dvojročnom intervale organizuje European Cytogenomics Conference (Európsku cytogenomickú konferenciu).

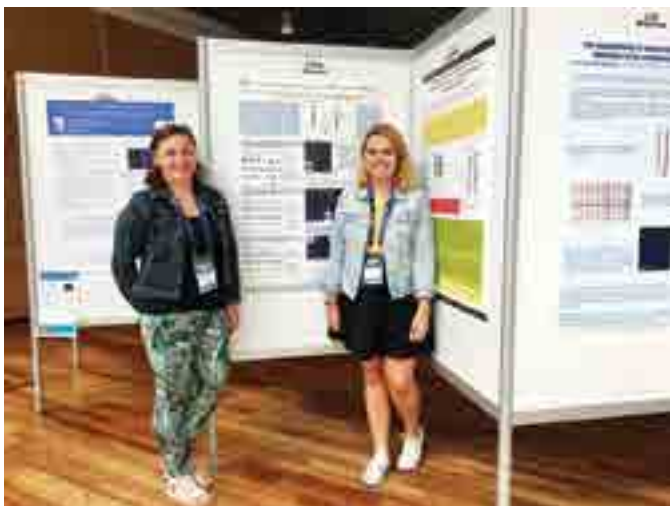
NewsLab, 2020; roč. 11 (1): 69 – 70

V roku 2019 sme sa spolu s kolegyňkou RNDr. Andrejkou Blahovou zúčastnili na tejto medzinárodnej konferencii, a to s cieľom prezentovať oddelenie lekárskej genetiky Medirex, a. s., zaujímavými kazuistikami onkohematologických pacientov, u ktorých sme zaznamenali prítomnosť homogénne sa farbiacich oblastí. Hsr alebo homogénne sa farbiace oblasti sú jedným z viditeľných znakov gébovej amplifikácie. Tieto oblasti obsahujú kópie amplifikovaného segmentu DNA (amplikón), čo vedie k nadexpresii génov obsiahnutých v segmente DNA. Hsr môže byť detegovaný na úrovni cytogenetiky po pruhovaní chromozómov ako viditeľný úsek zafarbeného chromatinu. Mechanizmus vzniku však nie je známy.

Kazuistiku sme prezentovali formou prezentácie posteru s názvom Detection of homogeneously staining regions in leukemic patients, ktorého obsah bližšie opisuje vo svojej pôvodnej práci na strane 63 RNDr. Andrea Blahová s názvom Detekcia homogénne farbiacich sa oblastí u leukemických pacientov.

XXII. konferencia sa uskutočnila od 6. do 9. júla 2019 v rakúskom meste Salzburg, pričom tematicky je opakovane organizovaná so zámerom prezentovania fundamentálneho výskumu dosiahnutého na úrovni cytogenetiky aj s cieľom zhodnotenia kvality cytogenetiky v rámci Európy a vymieňania informácií medzi laboratóriami a vzájomnej pomoci medzi nimi.

Obrázok 1. Prezentácia nášho posteru spolu s kolegyňkou RNDr. Andrejkou Blahovou



Mesto Salzburg, ktoré sa stalo v roku 2019 hosťovským mestom konferencie, je štvrté najväčšie mesto v Rakúsku a nachádza sa na hraniciach s Nemeckom. Prvá prechádzka smerom ku kongresovej hale Salzburg Congress, kde sa konali prednáškové bloky, nám odhalila vskutku nádherné mesto plné budov v rôznom štýle, čo zo Salzburgu robí skutočne pozoruhodné a zachovalé barokové mesto. Práve stará časť mesta je chránená svojím štatútom svetového dedičstva UNESCO a pýši sa dlhou históriou kultúrnej tradície.

Obrázok 2. Panoráma mesta Salzburg



Obrázok 3. Rodný dom Wolfganga Amadea Mozarta



Po našej návšteve môžeme tvrdiť, že Salzburg je omnoho viac než mesto slávneho hudobného skladateľa Wolfganga Amadea Mozarta. Na turistických atrakciách možno nielen zažiť bohatú históriu Salzburgu na vlastnej koži, ale aj obdivovať jeho krásy v podobe zaujímavých pamiatok. Panoráme

Obrázok 4. Kongresová hala Salzburg Congress



mesta dominuje pevnosť Hohensalzburg, ktorá je najväčšia v Európe, ale aj múzeá Mozarta a Getreidegasse, ktoré sa považujú za srdce starého mesta vďaka rodnému domu Mozarta aj Mirabelliným záhradám a palácu Hellbrunn.

Na tohtoročnom, v poradí XXII. kongrese bola opäť vysoká účasť s množstvom zaujímavých prednáškových blokov a posterov vystavených počas celého kongresu. Začiatok konferencie sa niesol v duchu nedávnych pokrokov v oblasti cytogenomiky alebo toho, čo sa udialo za 50-ročnú éru pruhovania chromozómov v súvislosti s napredovaním v oblasti cytogenomiky. Niektoré prednášky sa zaoberali technickým pokrokom v rôznych oblastiach cytogenomiky, iné rozšírili naše chápanie biologických procesov v klinickej oblasti, ale aj v nehumánnej oblasti u zvierat a pri rastlinách. Bloky prednášok nám taktiež poskytli najaktuálnejšie prehľady zo širokého spektra cytogenetiky vrátane chromozómových prestavieb, nerovnováh a segmentových duplikácií. Veľkú škálu tvorila najmä tumorová cytogenomika, kde spomínali sekvenovanie novej generácie ako nový prístup v detekcii balansovaných a nebalansovaných štruktúrnych variantov, ale aj prenatálna cytogenomika alebo ľudská neplodnosť.

Keďže program bol nesmierne rozsiahly, do pozornosti by som dala zaujímavú prednášku Dr. Felixa Mitelmana z Inštitútu laboratórnej medicíny v meste Lund vo Švédsku, ktorý vystúpil s prednáškou s názvom Chromosome Banding: the End of the Dark Ages, kde poukazoval na zavedenie prvej techniky pruhovania chromozómov (Q-pruhovanie), ktoré pred 50 rokmi spôsobilo revolúciu v cytogenetike. Spomínal, že dnes je paradoxne veľmi ťažké posúdiť hodnotu príspevku o pruhovaní chromozómov vo vzťahu k úsiliu o sekvenovanie ľudského genómu.

Konferencia bola pre nás veľkým prínosom a keďže sa organizuje každé dva roky, už teraz sa tešíme, čo nám ponúkne v roku 2021.



Mgr. Alexandra Oravcová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: alexandra.oravcova@medirex.sk



TRISOMYtest
Complete

ZDRAVIE
PLODU NIE JE
HÁDANKA

KOMPLEXNÝ

Nový variant TRISOMY testu dokáže cielene identifikovať chromozómové poruchy na úrovni všetkých 46 chromozómov.

SPOĽAHLIVÝ

Ide o technologicky najpokročilejší TRISOMY test s výsledkom spravidla už do 5 pracovných dní.

NEINVAZÍVNY

Vyšetruje sa už od 11. týždňa gravidity z krvi budúcej mamičky.

S OVERENÍM

Súčasťou TRISOMY testu Complete je bezplatné overenie pozitívneho nálezu diagnostickým vyšetrením zo vzorky plodovej vody metódou GenomeScreen prenatal.

www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

