

Ročník XIII.

newslab

časopis laboratórnej medicíny



2022

Vyšetrenie expresie MMR proteínov v nádoroch endometria imunohistochemicky je vhodný spôsob primárnej selekcie potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom

Using immunohistochemistry to examine MMR protein expression in endometrial tumours is a suitable method for the primary selection of potential cases with Lynch syndrome

Metabolomika: potenciálny nástroj individuálneho prístupu k depresívnym ochoreniam

Metabolomics: a potential tool for an individual approach to depressive diseases

The role of epigenetics in endometrial cancer

Úloha epigenetiky pri rakovine endometria

Slabé miesta vakcín: dokážeme im predchádzať?

– prípadová štúdia SARS-CoV-2

Vaccine vulnerabilities: can we prevent them?

– SARS-CoV-2 case study

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 trinásť 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.

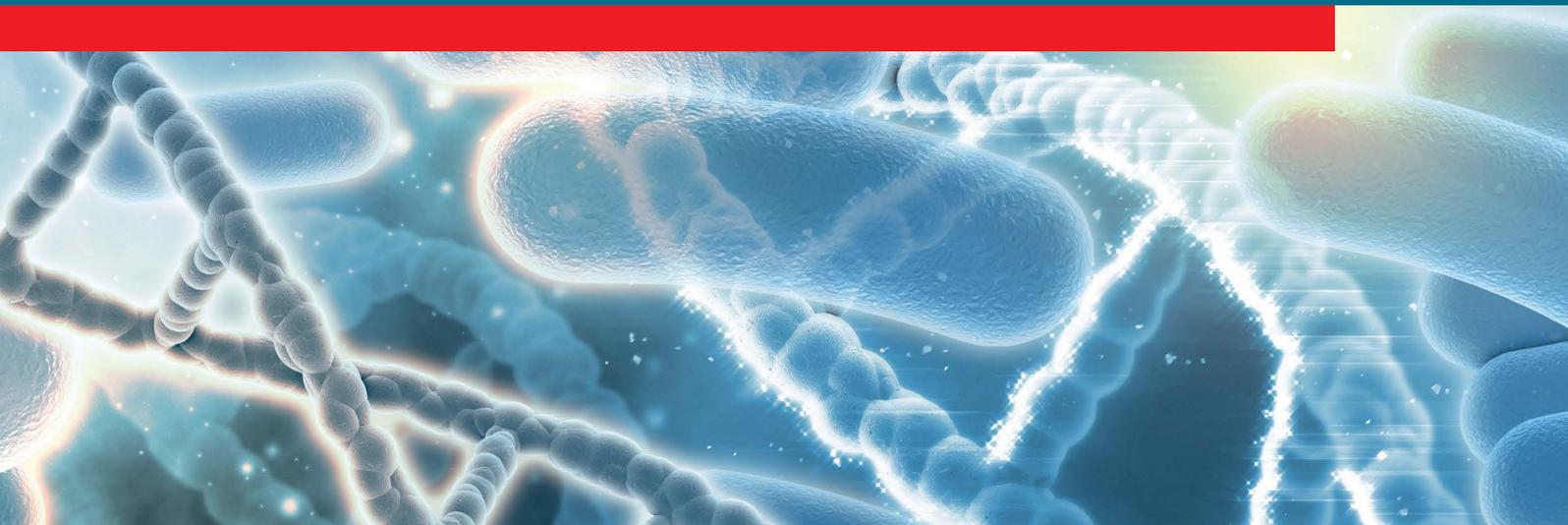
Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

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.



Milí čitatelia,

posledné roky sa niesli v znamení pandémie, ktorá zásadne zasiahla do našich životov, súkromných aj pracovných. Keď sa obzrieme späť, vidíme, že toto obdobie zanechalo našu spoločnosť nesúdržnú a rozdelenú. Príčiny tohto stavu sú a budú predmetom mnohých štúdií v blízkej aj vo vzdialenejšej budúcnosti. Dovolím si však spomenúť aspoň jednu z nich, ktorá sa nás, vedcov, týka najviac: dôvera vo vedu, jej postupy a poznatky, ktoré našej spoločnosti ponúka. Sociologické výskumy v tejto oblasti ukázali pozitívnu koreláciu medzi dôverou vo vedecké inštitúcie a ochotou dať sa zaočkovať. Inými slovami, nedostatok dôvery v spoločnosti viedol k mnohým zbytočným predčasným úmrtiam.

Pandémia sa v súčasnosti dostáva do fázy, v ktorej sme sa s ňou naučili žiť. Dá sa predpokladať, že vďaka rastúcej kolektívnej imunite získanej očkovaním a/alebo prekonaním ochorenia budú jej celospoločenské následky minimálne a manažovateľné. Aké poučenie však z tohto obdobia vyplýva? Čo je potrebné urobiť, aby sa situácia pri ďalšej globálnej pandémii nezopakovala? V zmysle uvedeného by mnohí mohli mať jednoduchú odpoveď. Je potrebné znovu vrátiť vedeckým inštitúciám ich stratenú dôveru. Je to však v moci týchto inštitúcií samotných? Uvedomme si, že vedci a zdravotníci odvedli v boji proti pandémie vynikajúcu prácu. Účinné a bezpečné vakcíny boli pripravené v extrémne krátkom čase. Ich unikátny nastavitel'ny dizajn dáva veľkú nádej na úspešný boj proti budúcim, zatiaľ neopísaným patogénom. Vedci trpezlivo komunikovali aktuálne vedecké poznatky týkajúce sa vírusu, epidemiológie, vakcín a ich účinkov. Z povahy vecí však vyplýva, že sme boli neustále v defenzíve, pretože formulácia vedeckých argumentov musí byť presná, aj na úkor jej komunikačnej atraktivity, inak prestáva byť vedeckou. Mnohé užitočné informácie tak mohli zaniknúť v kakofónii informačného chaosu, ktorý vládne vo virtuálnom priestore. Mohli teda robiť vedci a zdravotníci niečo inak, lepšie? Osobne sa mi na to hľadá odpoveď veľmi ťažko. Možno ňou bude ešte intenzívnejšia, trpezlivejšia a systematickejšia práca pri popularizácii vedy, pri vzdelávaní študentov, pri odovzdávaní poznatkov svojim kolegom alebo pri publikácii výsledkov nášho výskumu. Tak, ako to robí časopis, ktorý práve držíte v rukách.

Obsahuje práce z histológie, imunológie, genetiky aj metabolomiky, ktorých spoločným znakom je výskum s cieľom dosiahnuť rýchlu a presnú diagnostiku rôznych ochorení pomocou biomarkerov. Dočítate sa v ňom napríklad aj o využití mitochondriálnej DNA pri diagnostike nádorových ochorení. Práve pomocou sekvenácie reziduálnych molekúl mtDNA objavil aktuálny nositeľ Nobelovej ceny za fyziológiu a medicínu Svante Pääbo nového hominida, Denisovana.

Prajem vám príjemné čítanie spojené s radosťou z poznávania.



Mgr. Peter Baráth, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Pôvodné práce

- Výšetrenie expresie MMR proteínov v nádoroch endometria imunohistochemicky je vhodný spôsob primárnej selekcie potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom** 5
K. Mikuš Kuracinová, V. Marková, V. Poorová, M. Sekerešová
- Protinádorová imunita v nádoroch štítnej žľazy** 9
Barbora Šajbidorová, Pavol Janega
- Narušená reparácia tkanív je sprievodným znakom diabetes mellitus (patofyziologický pohľad a prípadová štúdia)** 14
Andrea Janegová, Pavol Janega
- Whole genome sequencing as a tool for characterization of neonatal meningitis Escherichia coli** 19
Michal Andrežál, Lukáš Pazderka, Tomáš Szemes, Hana Drahovská

Prehľadové práce

- Metabolomika: potenciálny nástroj individuálneho prístupu k depresívnym ochoreniam** 23
Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Terézia Kisková
- The role of epigenetics in endometrial cancer** 26
Dominik Kodada, Nikola Nyariova, Gabriel Minarik, Vanda Repiska
- Extracelulárna mitochondriálna DNA ako neinvazívny biomarker nádorových ochorení** 31
Silvia Bokorová
- Whole-genome sequencing methods for CNV detection** 37
Zuzana Klinovská, Marcel Kucharík, Jaroslav Budiš, Tomáš Szemes
- Slabé miesta vakcín: dokážeme im predchádzať?** 42
Michaela Hýblová

Ročník 13, 2022, číslo 1
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: október 2022

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. RNDr. Ján Turňa, CSc.
Ing. Pavol Sulo, CSc.
Dr. Bálint Nagy, PhD.
Dr. Branislav Zagrapan, PhD.
Dr. Tomas Kovacic
Dr. Gabriela Gubo
Dr. Štefan Lukáč
Mgr. Peter Baráth, PhD.
RNDr. Ján Radvánszky, PhD.
Dr. Jaroslav Bojňanský
Dr. Katarína Vlniešková

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.
Novozámocká 1/67, 949 05 Nitra
redakcia@newslab.sk, www.newslab.sk
IČO: 37 98 68 05

Výkonná redaktorka:

Mgr. Martina Šoltéssová

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Ing. Lukrécia Schiller

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.

Vyšetrenie expresie MMR proteínov v nádoroch endometria imunohistochemicky je vhodný spôsob primárnej selekcie potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom

Kristína Mikuš Kuracinová^{1,2}, Veronika Mihál³, Veronika Poorová⁴, Monika Sekerešová⁴

¹Ústav patologickej anatómie LFUK a UNB

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

³Neurológia, Klinikum Passau, Nemecko

⁴Oddelenie patológie, FN Nitra

Lynchov syndróm (LS) alebo hereditárny nonpolypózny kolorektálny karcinóm (HNPCC) predstavuje autozomálne dominantné ochorenie, pri ktorom dochádza k mutácii génov pre MMR proteíny zodpovedných za reparáciu DNA pri replikácii. Pacienti s Lynchovým syndrómom majú vysokú pravdepodobnosť rozvoja kolorektálneho karcinómu u oboch pohlaví, u žien s pridaným rizikom vzniku karcinómu endometria. Diagnóza Lynchovho syndrómu je stanovená na základe identifikácie zárodočného heterozygotného patogénneho variantu v MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 alebo delécie génu pre EPCAM pri molekulárnom genetickom testovaní. Imunohistochemická analýza MMR proteínov je všeobecne akceptovanou metódou rutinného skríningu s relatívne vysokou citlivosťou a špecifickosťou. V našom súbore sme analyzovali expresiu MMR proteínov na tkanivách s karcinómom endometria. Analýza preukázala v 24 % prípadov stratu jedného alebo viacerých MMR proteínov. Imunohistochemia je relatívne lacná, jednoduchá a dostupná metóda primárnej selekcie potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom. Ak by sa rutinné testovanie expresie MMR proteínov každého bioptického tkaniva z maternice stalo štandardom tak, ako je to pri kolorektálnom karcinóme, prispelo by to ku skoršiemu zachyteniu pacientok s Lynchovým syndrómom.

Kľúčové slová: Lynchov syndróm, endometrium, imunohistochemia

Using immunohistochemistry to examine MMR protein expression in endometrial tumours is a suitable method for the primary selection of potential cases with Lynch syndrome

Lynch syndrome (LS), or hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), is an autosomal dominant disease in which mutations occur in genes for MMR proteins responsible for DNA repair during replication. Patients with Lynch syndrome are likely to develop colorectal cancer in both sexes, with an added risk of endometrial cancer in females. Diagnosis of Lynch syndrome is based on identifying a germline heterozygous pathogenic variant in MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, or deletion of the EPCAM gene in molecular genetic testing. Immunohistochemical analysis of MMR proteins is a widely accepted routine screening method with relatively high sensitivity and specificity. In our series, we analyzed the expression of MMR proteins on endometrial cancer tissues. The analysis showed a loss of one or more MMR proteins was present in 24% of cases. Immunohistochemistry is a relatively inexpensive, simple and accessible method for the primary selection of potential cases with Lynch syndrome. If routine MMR protein expression testing of every biopsy tissue from the uterus were to become standard, as it is for colorectal cancer, it would contribute to earlier detection of patients with Lynch syndrome.

Keywords: Lynch syndrome, endometrium, immunohistochemistry

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 5 – 8

Úvod

Lynchov syndróm, hereditárne ochorenie s autozomálne dominantným typom dedičnosti, vzniká ako dôsledok zárodočnej mutácie v DNA mismatch repair genoch (MMR)⁽¹⁾. LS sa spája s 30 – 75 % rizikom vzniku karcinómu hrubého čreva u mužov, u ženy je pravdepodobnosť vzniku kolorektálneho karcinómu 25 – 50 %⁽¹⁾. Poruchy zárodočnej línie v MMR DNA boli zistené u 1,8 % až 2,1 % pacientok s neselektovaným karcinómom endometria a až 9 % pacientok s karcinómom endometria mladších ako 50 rokov⁽²⁾. Ďalšie malígne tumory asociované s HNPCC s extrakolonickou lokalitou majú prav-

depodobnosť vzniku menej ako 15 %⁽³⁾. LS spôsobí ročne približne 4 000 kolorektálnych karcinómov a 1 800 karcinómov endometria (Centers for Disease Control and Prevention).

Karcinóm endometria ako súčasť Lynchovho syndrómu

Karcinóm endometria je najčastejším malígnym nádorom u žien v západných častiach sveta. Celosvetovo narastá incidencia karcinómu endometria, najvyšší výskyt je v Severnej Amerike a západnej Európe⁽⁴⁾. Karcinóm endometria sa vyskytuje u starších žien, priemerne okolo 70. roku života,

u žien mladších ako 40 rokov je tento karcinóm zriedkavý. Výskyt premalígných a malígných porúch endometria sa zvyšuje v postmenopauzálnom období. Morfológicky ide o rôznorodú skupinu nádorov s odlišnou patogenézou, správaním a prognózou. Na základe klinickopatologických rysov boli tieto tumory triedené do dvoch skupín ako I. typ a II. typ. Typickým morfológickým predstaviteľom I. typu karcinómov endometria je endometrioidný karcinóm, serózný karcinóm pri II. type.

Pacientky, ktoré majú endometriálny karcinóm ako súčasť LS, sú mladšie – medián predstavuje 48. rok života⁽⁵⁾. Karcinóm endometria býva asociovaný s I. typom⁽⁶⁾, avšak relatívna frekvencia nonendometrioidných subtypov, ako je serózný a svetlobunkový karcinóm, majú vyšší výskyt práve u pacientok s LS⁽⁵⁾. U žien s LS je počiatočná diagnóza karcinómu endometria minimálne taká pravdepodobná, ako je riziko vzniku kolorektálneho karcinómu. Uvádza sa, že až u 26 % žien, ktoré prežili kolorektálny karcinóm ako súčasť LS, sa rozvinie karcinóm endometria do 10 rokov od počiatočnej diagnózy⁽⁷⁾. Pacientky s mutáciou MSH6 alebo MSH2 majú vyššie riziko vzniku karcinómu endometria s celoživotným rizikom až 44 %⁽⁷⁾.

Genetické zmeny pri Lynchovom syndróme

Genetickým podkladom pre vznik Lynchovho syndrómu je mutácia niektorého z MMR proteínov. Medzi gény, kódujúce tieto proteíny patrí MSH2, MSH6, MLH1 a PMS2⁽⁸⁾ alebo zárodočná delécia 3' konca EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), ktorej dôsledkom je epigenetický silencing MSH2 génu⁽⁹⁾. Štyri z proteínov MMR tvoria dva funkčné kľúče heterodiméry pozostávajúce z MSH2/MSH6 a MLH1/PMS2. Mutácia MSH2 a MSH6 sa nachádza na chromozóme 2p16, MLH1 na chromozóme 3p21, PMS2 na chromozóme 7p22⁽⁸⁾.

Počas replikácie DNA vznikajú chyby, ktoré sú za normálnych okolností následne enzýmom DNA polymerázou opravené. Proteínové produkty spomínaných génov sú súčasťou autoreparačných mechanizmov v bunke. Tieto gény udržiavajú stabilitu genómu najmä korekciou nesprávne spárovaných báz, ktoré sa generujú počas replikácie DNA. Za fyziologických okolností vznikajú z MMR génov multiproteínové komplexy, ktoré majú schopnosť rozlíšiť a opraviť replikačné chyby – tzv. mismatch, ktoré vznikli pri narušenej syntéze nového vlákna DNA. Poruchy MMR génov môžeme pozorovať práve v mikrosatelitných repetitívnych sekvenciách DNA. Mikrosatelity sú krátke repetitívne sekvencie mono-, di-, tri- a tetranukleotidov voľne distribuované v ľudskom genóme a práve poruchy v génoch „mismatch“ reparačného systému vedú k zmenám v počte opakovaní týchto sekvencií. Výsledkom chybného opravy je zmena v počte opakovaní mikrosatelitov, keď hovoríme o mikrosatelitnej nestabilite (MSI)⁽¹⁰⁾. MSI je často sprievodným javom tumorov asociovaných s LS.

Ak sú zmutované dve alebo viac z piatich mikrosatelitných sekvencií v nádorovej DNA, daný tumor sa označuje ako MSI-high (MSI-H). Ak bola zmutovaná iba jedna z piatich mikrosatelitných sekvencií v nádorovej DNA, tak sa tumor označuje ako MSI low (MSI-L). Ak nie je zmutovaná žiadna z piatich mikrosatelitných sekvencií v nádorovej DNA, daný tumor sa nazýva mikrosatelitno stabilný (MSS)⁽¹¹⁾. Pacienti s LS sú zvyčajne nositeľmi zárodočnej mutácie v jednej alele génu MMR,

druhá alela je následne inaktivovaná mutáciou, stratou heterozygoty alebo epigenetickým silencingom.

Diagnostika Lynchovho syndrómu

Pre jednoduchšiu diagnostiku LS boli sformulované Amsterdamské kritériá, ktoré však nezahŕňali všetky potrebné aspekty vzhľadom na dokázanú extrakolonickú propagáciu LS, čo viedlo k úprave v roku 1998⁽¹²⁾. Neskôr boli vypracované Bethesda kritériá zohľadňujúce stav mikrosatelitnej instability v danom nádorovom tkanive⁽⁸⁾. Diagnóza LS je stanovená na základe identifikácie zárodočného heterozygotného patogénneho variantu v MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 alebo delécie EPCAM pri molekulárnom genetickom testovaní⁽¹³⁾.

Testovanie mikrosatelitnej instability je senzitívna vyšetrovacia metóda, ktorá je schopná s vysokou pravdepodobnosťou odhaliť poruchu mismatch repair systému. Mikrosatelitná instabilita sa deteguje prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), kde sa vyšetrí DNA z buniek zdravého tkaniva a nádorového tkaniva pacienta, u ktorého je suspektný LS. Pacienti, u ktorých bola v nádore zistená mikrosatelitná instabilita v najmenej dvoch mikrosatelitných sekvenciách, sú klasifikovaní ako MSI-H a sú považovaní za vysokorizikové osoby pre rozvoj Lynchovho syndrómu⁽¹⁴⁾. Treba spomenúť, že mikrosatelitná instabilita (MSI) je hypermutovateľný fenotyp, ktorý obvykle vzniká buď zárodočnou mutáciou v zložkách MMR u pacientov s LS, alebo ako somatická hypermetylácia promotora MLH1 pri sporadických karcinómoch⁽¹⁵⁾.

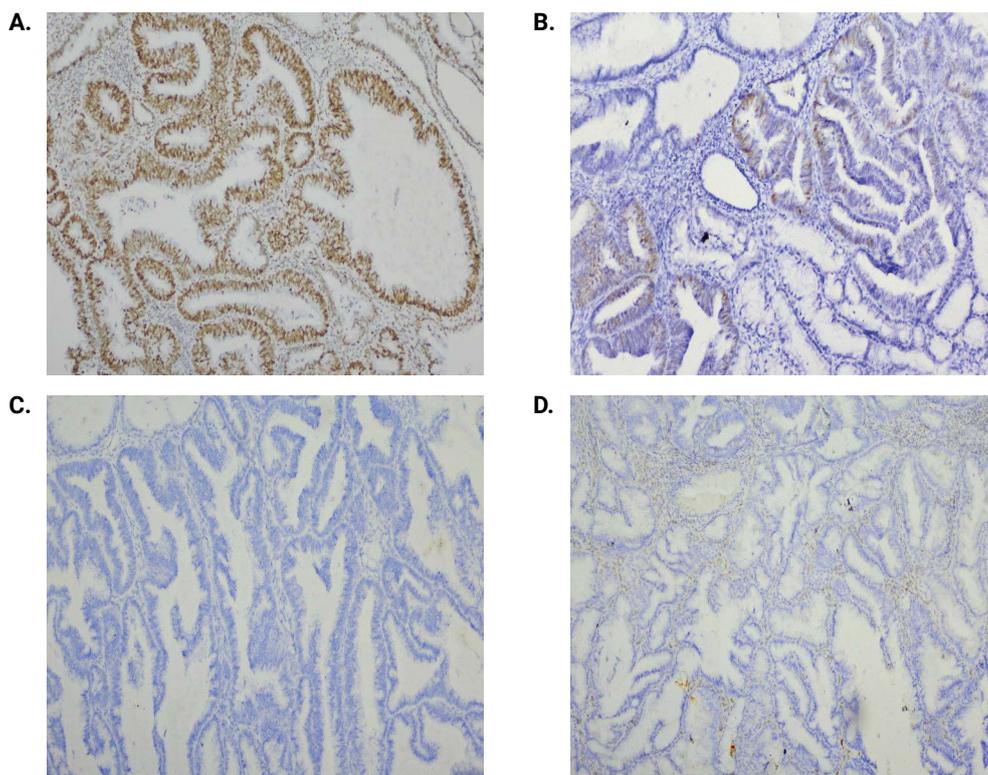
Imunohistochemia v primárnej selekcii potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom

Testovanie MSI a imunohistochemia (IHC) sú komplementárne vyšetrenia. Strata expresie MMR proteínu IHC sa preukázala ako vysoko zhodná s testovaním mikrosatelitnej instability na báze DNA, pričom senzitivita je viac ako 90 % a špecificita je 100 %⁽¹⁴⁾. Najčastejšie sa vyšetruje strata expresie MLH1, MSH6, MSH2 a PMS2 mismatch repair proteínov. Podľa imunohistochemického hodnotenia sa pri neprítomnej expresii MLH1 a PMS2 nedá spoľahlivo určiť diagnóza LS. Pri absencii MSH2 a MSH6 proteínov alebo len absencii MSH6, prípadne PMS2 proteínu je veľmi pravdepodobné, že pacient má Lynchov syndróm. Ak sú, naopak, prítomné proteíny všetkých 4 génov, t. j. MLH1, PMS2, MSH6 a MSH2, diagnóza LS je vylúčená. Nádory vykazujúce stratu expresie MLH1 a PMS2 by mali byť ďalej skúmané na mutačný stav génu BRAF a zmeny promotora génu MLH1 na vylúčenie sporadických prípadov. Ak je v nádore dokázaná MSI a zároveň prítomnosť mutácie v géne BRAF alebo metylácie promotora MLH1, ide s vysokou pravdepodobnosťou o sporadický typ karcinómu⁽¹¹⁾.

Pri podozrení na Lynchov syndróm a dostupnosti nádorového tkaniva sa diagnostika začína imunohistochemickým vyšetrením MLH1, MSH6, MSH2 a PMS2 proteínov v nádorovom tkanive a súčasne sa vykonáva analýza mikrosatelitnej instability z DNA, ktorá bola izolovaná z nádorového tkaniva pacienta.

Napriek známej asociácii nádorov endometria s LS nie sú všetky prípady nádorov endometria doposiaľ štandardne geneticky testované. Diagnostika LS je ekonomicky a časovo náročná, preto sa hľadajú postupy na jej zjednodušenie. Sek-

Obrázok 1. Imunohistochemické zobrazenie MMR proteínu v karcinóme endometria: A. MSH6 pozitivita; B. MSH2 pozitivita; C. MLH1 negativita; D. PMS2 negativita.



venovanie zárodočných mutácií sa považuje za zlatý štandard v diagnostike LS, v súčasnosti však stále táto metóda nie je všeobecne dostupná tak, aby mohla byť využitá ako primárny skriningový nástroj⁽¹⁶⁾. V kontraste s tým je imunohistochemické testovanie jednoduché, univerzálne a lacné, s 83 % senzitivitou a 89 % špecificitou, a to bez ohľadu na to, o ktorý gén MMR ide⁽¹⁶⁾.

Metodika

S cieľom overiť výskyt straty expresie MMR proteínov sme hodnotili náhodne vybraný bioptický materiál z rokov 2016 – 2019 z oddelenia patológie Fakultnej nemocnice Nitra. Bioptický materiál pozostával z tkanív získaných kyretážou pre neprimerané krvácanie s nálezom endometrioidnej intraepitelovej neoplázie (EIN) alebo hysterektómiou pre nádorové ochorenie maternice. Skúmané vzorky pochádzali od 46 pacientok, ktorým bol diagnostikovaný karcinóm maternice v rôznom štádiu vývoja. Prípady zahŕňali:

- 14 pacientok s EIN
- 8 pacientok s EIN s prechodom do adenokarcinómu
- 15 pacientok s diagnostikovaným endometrioidným adenokarcinómom G1
- 9 pacientok s diagnostikovaným endometrioidným adenokarcinómom G2

Všetky hodnotené tkanivá boli v úvodnej fáze spracované štandardným postupom, následne fixované 4 % formaldehydom počas 24 hodín, zaliate do parafínu a narezané na 5 µm hrubé rezy. Následne sme materiál pripravili na imunohistochemickú analýzu. Imunohistochemické farbenie na hodnotený marker MSH6, MSH2, MLH1 a PMS2 prebiehalo

v aparátúre Imuno Autostainer (DAKO, Carpinteria, USA) podľa nasledovného protokolu: tkanivá boli prepláchnuté pufróm dodaným výrobcom aparátúry, revitalizované v zásaditom pufrí počas 20 minút, primárna protilátka (MSH6, MSH2, MLH1 a PMS2 monoklonálna protilátka) bola inkubovaná 60 minút, po prepláchnutí pufróm boli preparáty inkubované sekundárnou protilátkou (Histofine anti-mouse, anti-rabbit) počas 30 minút. Po opätovnom prepláchnutí pufróm použijeme na vizualizáciu systém diaminobenzidínu (DAKO, Carpinteria, USA) a nakoniec boli tkanivá dofarbené hematoxylnóm.

Imunohistochemicky pozitívne farbenie je definované ako jednoznačná nukleárna expresia v nádorových bunkách (**obrázok 1**).

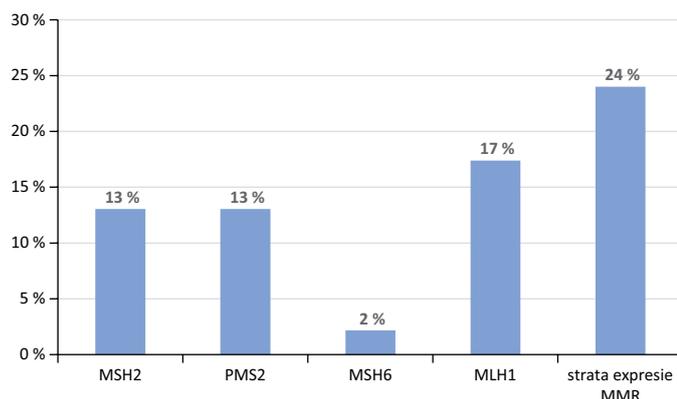
Výsledky

Na základe uvedených diagnostických kritérií a imunohistochemickej analýzy bola strata expresie niektorého MMR proteínu prítomná u 23,91 % zo skúmaného súboru pacientok (**graf 1**). Dominovala najmä strata expresie MLH1 (v 17 % prípadov), expresia MSH2 a PMS2 nebola prítomná v 13 % prípadov. Až na jednu vzorku všetky prípady exprimovali MSH6 proteín (**graf 1**). Viacnásobná strata expresie bola zachytená u 8 pacientok, čo tvorí 17,39 % pacientok. Strata expresie MMR proteínu nekorelovala s typom diagnózy.

Diskusia

V našej analýze expresie MMR proteínov imunohistochemicky sa v 24 % prípadov vyskytovala strata jedného alebo viacerých MMR proteínov. Strata expresie proteínu je definovaná ako úplná absencia jadrového zafarbenia v nádorových bunkách. V prípade absencie expresie PMS2 a MLH1 prote-

Graf 1. Strata expresie jednotlivých MMR proteínov z celkového počtu vzoriek a strata expresie z celkového počtu prípadov.



ínov test nevie s presnosťou určiť, resp. vylúčiť diagnózy LS a je potrebné vykonať genetickú analýzu. Prevažná väčšina diagnóz LS je dôsledkom mutácie MLH1 alebo MSH2, pretože oba tieto gény sú esenciálne pre tvorbu heteroduplexných dimérov. Ak bola výsledkom imunohistochemie strata expresie len u jedného markera, vždy je potrebné vyšetriť aj metylačný status na vylúčenie diagnózy LS.

Imunohistochemia je relatívne lacná, jednoduchá metóda a má lepšiu dostupnosť a rýchlejší čas spracovania v porovnaní s genetickou analýzou. Ak by bola táto metóda využívaná ako rutinné vyšetrenie tkaniva maternice, tak by sa mohol zvýšiť záchyt pacientok, ktoré majú mutáciu MMR génov, ešte pred rozvojom malígneho ochorenia. Pacientky s LS ma-

jú podobnú pravdepodobnosť rozvoja prvej malignity v endometriu aj v hrubom čreve. Bolo by zaujímavým zistením, či sa u niektorých z našich sledovaných pacientok rozvinul aj kolorektálny karcinóm.

Skorá identifikácia pacientov s LS je rozhodujúca pre klinický manažment a prognózu vrátane skríningu najbližších členov rodiny. Viaceré štúdie preukázali, že imunoterapia môže mať prínos v liečbe pacientov s MMR mutáciami bez ohľadu na základnú zárodočnú mutáciu.

Ak by sa rutinné testovanie na prítomnosť LS každého bioptického tkaniva z maternice stalo zlatým štandardom tak, ako je to pri kolorektálnom karcinóme, prispelo by to ku skoršiemu zachyteniu pacientok s LS. Zároveň by bolo prínosné presné zisťovanie a identifikácia genetických mutácií na lepšie porozumenie celkovej problematiky Lynchovho syndrómu.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428 a Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom spolufinancovaný zo zdrojov, kód ITMS: 313011V578 spolufinancovaných z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

LITERATÚRA

- Hunter, J.E., et al. Universal screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer: patient perspectives on screening and sharing results with at-risk relatives. *Familial Cancer*, 2017. 16(3): p. 377-387.
- Mills, A.M., et al. Lynch Syndrome Screening Should Be Considered for All Patients With Newly Diagnosed Endometrial Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*, 2014. 38(11): p. 1501-1509.
- Lier, M. GF Van, Wagner, A., Leerdam, M.E. Van, et al. A review on the molecular diagnostics of Lynch syndrome: a central role for the pathology laboratory. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2010. 14(1-2): p. 181-197.
- Yoon, G., et al. Stromal p16 expression is significantly increased in endometrial carcinoma. *Oncotarget*, 2017. 8(3): p. 4826-4836.
- Hanley, K.Z., G.G. Birdsong, and M.B. Mosunjac, Recent Developments in Surgical Pathology of the Uterine Corpus. *Arch Pathol Lab Med*, 2017. 141(4): p. 528-541.
- Niskakoski, A., et al. Converging endometrial and ovarian tumorigenesis in Lynch syndrome: Shared origin of synchronous carcinomas. *Gynecologic Oncology*, 2018. 150(1): p. 92-98.
- Cohen, S.A. and A. Leininger, The genetic basis of Lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet*, 2014. 7: p. 147-58.
- Duraturio, F., et al. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncol Lett*, 2019. 17(3): p. 3048-3054.
- Pai, R.K., et al., DNA mismatch repair protein deficient non-neoplastic colonic crypts: a novel indicator of Lynch syndrome. *Modern Pathology*, 2018. 31(10): p. 1608-1618.
- Sehgal, R., et al. Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel)*, 2014. 5(3): p. 497-507.
- Umar, A., et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(4): p. 261-8.
- Vasen, H.F.A., et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group n HNPCC. *Gastroenterology*, 1999. 116(6): p. 1453-1456.
- Idos, G. and L. Valle, Lynch Syndrome, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al. Editors. 1993: Seattle (WA).
- Kawakami, H., MSI testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 2015. 16(7): p. 30.
- Remo, A., M. Fassan, and G. Lanza, Immunohistochemical evaluation of mismatch repair proteins in colorectal carcinoma: the AIFEG/GIPAD proposal. *Pathologica*, 2016. 108(3): p. 104-109.
- Wang, A., et al. The practice of universal screening for Lynch syndrome in newly diagnosed endometrial carcinoma. *Health Sci Rep*, 2018. 1(7): p. e43.

MUDr. Kristína Mikuš Kuracinová, MGA
 Ústav patologickej anatómie LFUK a UNB
 Sasinkova 4, 81108 Bratislava
 e-mail: kristina.kuracinova@gmail.com

Protinádorová imunita v nádoroch štítnej žľazy

Barbora Šajbidorová¹, Pavol Janega^{2,3}

¹Euromedix, a. s., Bratislava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

³MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

Vznik nádorov je sprevádzaný aktiváciou protinádorovej imunity, ktorá má potenciál ovplyvňovať biologické správanie vzniknutého tumoru. Cieľom predloženej práce bolo opísať imunitnú odpoveď v nádorovo transformovanom tkanive štítnej žľazy. Hodnotili sme 40 histologických vzoriek rôznych typov folikulárnych lézií štítnej žľazy zahrňujúcich vzorky benígnych folikulárnych adenómov, malígnych folikulárnych karcinómov, ako aj nenádorových folikulárnych strúm. V práci sme sa zamerali na imunofenotypizáciu jednotlivých zložiek imunitnej odpovede. Ukazuje sa, že protinádorová imunitná odpoveď vo folikulárnych léziách štítnej žľazy je len slabá a nevýrazná. V nádoroch štítnej žľazy sme pozorovali zmiešanú chronickú zápalovú infiltráciu s dominanciou histiocytov a B-lymfocytov s nižším podielom T-lymfocytov, a to najmä v benígnych adenómoch. Napriek celkovo nízkemu podielu T-lymfocytov výsledky realizovanej štúdie ukázali signifikantný vzostup infiltrácie tkaniva malígneho folikulárneho karcinómu CD4+ pomocnými T-lymfocytmi v porovnaní s benígnym adenómom a kontrolnou skupinou. Ukazuje sa, že protinádorová imunitná odpoveď vo folikulárnych léziách štítnej žľazy je len slabá a nevýrazná. Rozšírenie znalostí o úlohe jednotlivých buniek imunity môže predstavovať dôležitú cestu výskumu v pochopení nádorových procesov v tkanive štítnej žľazy.

Kľúčové slová: štítna žľaza, nádory štítnej žľazy, protinádorová imunita

Antitumour immunity in tumours of the thyroid gland

Tumour genesis is accompanied by the activation of antitumour immunity, which has the potential to influence the biological behaviour of the tumour. The present study aimed to describe the immune response in transformed thyroid tissue. We evaluated 40 histological samples of different thyroid follicular lesions, including benign follicular adenomas, malignant follicular carcinomas, and non-neoplastic follicular goitre. The study focused on immunophenotyping of the various components of the immune response. It appears that the antitumor immune response in follicular thyroid lesions is only weak and insignificant. The mixed chronic inflammatory infiltration in thyroid tumours with a predominance of histiocytes and B-lymphocytes were observed. T lymphocytes were less prominently represented. The study showed a significant increase in tissue infiltration by CD4+ helper T-lymphocytes in malignant follicular carcinomas compared to benign adenomas and control goitres. Expanding the knowledge of the role of individual immune cells may represent an important perspective of research in understanding neoplastic transformation in thyroid tissue.

Keywords: thyroid, thyroid tumours, anti-tumour immunity

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 9 – 13

Úvod

Nádory štítnej žľazy patria medzi závažné onkologické choroby endokrinného systému. Postihujú najmä ženskú populáciu. Zahrňujú široké spektrum nádorov, kde skorá diagnostika má význam pre prognózu pacientov. Problém predstavujú pacienti s neskoro diagnostikovanou chorobou so vzdialenými orgánovými metastázami, prípadne diagnostikovaní v inoperabilnom štádiu. Z histologického pohľadu je problematická najmä diferenciálna diagnostika benígnych a malígnych nádorov s folikulárnou diferenciáciou⁽¹⁾.

Nádorové mikroprostredie významnou mierou ovplyvňuje biologické vlastnosti nádoru. Dôležitou súčasťou nádorového mikroprostredia je aj protinádorová imunita. Prítomnosť lymfocytov infiltrujúcich tumor (TIL) sa ukazuje ako potenciálne zaujímavý prognostický a prediktívny marker inváziv-

neho správania mnohých nádorov. Pochopenie úlohy imunitnej odpovede na progresiu malignity môže mať významný klinický dosah. Tieto znalosti sú stavebným kameňom imunomodulačnej terapie a potenciálnej prevencie invázivného rastu nádorov. Ovplyvnenie vzájomného pôsobenia medzi nádorom a imunitou jedinca predstavuje sľubnú oblasť výskumu onkologickej terapie⁽²⁾.

Dôležité efektorové bunky imunitného systému zasahujúce priamo nádorové bunky predstavujú najmä skupiny NK buniek (NK) a cytotoxických T-lymfocytov. Svoju úlohu zohráva aj nešpecifická imunita, zahrňujúca skupiny makrofágov, dendritických buniek a polymorfonukleárov. Tá predstavuje prvú obrannú líniu v boji proti transformovaným bunkám⁽³⁾. Je dôležitá aj pri iniciácii a nasmerovaní adaptívnej imunitnej odpovede sprostredkovanou lymfocytmi. Klinické štúdie

ukazujú, že schopnosť malígnych buniek uniknúť pred imunitným systémom a tumorom vyvolaná imunosupresia predstavujú vážnu prekážku úspešnej terapie. Prostredníctvom tzv. krycích mechanizmov sú nádorové bunky schopné spoľahlivo uniknúť imunitnej odpovedi.

Cieľom práce bolo posúdiť aktiváciu protinádorovej imunitnej odpovede vo folikulárnych tumoroch štítnej žľazy. Práve folikulárne tumory predstavujú zaujímavý model nádorovej transformácie zahrňujúce spektrum histologicky a fenotypicky podobných chorobných zmien, s benígnym ako aj malígnym správaním. Práca bola parciálnou súčasťou diplomovej práce „Chorobné zmeny štítnej žľazy, úloha sialyzácie a imunity v nádoroch štítnej žľazy“ obhájenej na Lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave v roku 2021⁽⁴⁾.

Metodika

Základný súbor pre analýzu imunoprofilu buniek protinádorovej imunity v nádoroch štítnej žľazy tvorili prípady folikulárnych adenómov a folikulárnych karcinómov. Ako kontrola boli hodnotené vzorky parenchymatóznej folikulárnej strumy. Súbor zahrňoval 12 prípadov benígnych folikulárnych adenómov, 18 prípadov malígnych folikulárnych karcinómov a 10 prípadov folikulárnych strúm bez nádorovej transformácie hodnotených ako kontrolná skupina.

Preparáty sme farbili imunohistochemicky na prítomnosť CD4+ pomocných a CD8+ cytotoxických T-lymfocytov, CD20+ B-lymfocytov a CD68+ histiocytov. Odparafínované rezy boli opláchnuté 3x 5 minút v PBS (fosfátmi pufovanom fyziologickom roztoku, 0,005 % Tween s pH 7,2) a revitalizované s použitím Dako PT Link (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) pri pH 8.0. Preparáty boli následne inkubované 1 hodinu s roztokom primárnej protilátky pri izbovej teplote.

Použili sme:

- CD4 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use
- CD8 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use
- CD20 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use
- CD68 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) ready to use

Po prepláchnutí 3x 5 minút v PBS boli preparáty inkubované 20 minút so sekundárnou protilátkou tvorenou polymérom proti králičím a myšacím proteínom konjugovaným s chrenovou peroxidázou Envision (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) a po prepláchnutí 3x 5 minút v PBS farbené 5 minút roztokom diaminobenzidínu. Preparáty boli následne dofarené 40 sekúnd v roztoku hematoxylínu.

Infiltrácia tkaniva príslušnými bunkami bola vyjadrená počtom buniek na 1 zorné pole (200x zväčšenie), rátané v 5 zorných poliach. Výsledky boli normalizované voči priemernému počtu zápalových buniek v kontrolnej parenchymatóznej strume.

Výsledky boli vyhodnotené štatisticky pomocou Graph Pad Prism (ver. 9.0). Výsledky boli analyzované použitím Kruskal-Wallisovho neparametrického testu s následným Dunnovým posttestom a vyjadrené ako priemer \pm SEM. Hodnoty $p < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

Výsledky

V nádoroch štítnej žľazy sme pozorovali zmiešanú chronickú zápalovú infiltráciu s dominanciou najmä CD68+ histiocytov a následne CD20+ B-lymfocytov. CD4+ a CD8+ T-lymfocyty boli zastúpené menej nápadne.

Hodnotenie zastúpenia CD8+ cytotoxických T-lymfocytov preukázalo slabú a ložiskovú infiltráciu vo vzorkách benígneho folikulárneho adenómu a kontrolnej parenchymatóznej strumy. Nižší stupeň infiltrácie tkaniva CD8+ lymfocytmi prítomný vo vzorkách folikulárneho karcinómu, kde boli zachytené len nepočtetné CD8+ cytotoxické T-lymfocyty, nebol štatisticky významný.

Vo vzorkách kontrolnej parenchymatóznej strumy a benígneho folikulárneho adenómu boli pozorované len nepočtetné CD4+ pomocné T-lymfocyty. Signifikantne významnejšiu infiltráciu pomocných T-lymfocytov, a to najmä s vnútronádorovou lokalizáciou, sme zachytili v prípadoch malígneho folikulárneho karcinómu.

Hodnotenie zastúpenia CD20+ B-lymfocytov nepreukázalo významné rozdiely medzi skupinami, CD20+ lymfocyty boli prítomné len ojedinele, fokálne sme zachytili konglomeráty CD20+ B-lymfocytov, lokalizované najmä perivaskulárne.

Tkanivo štítnej žľazy bolo najvýraznejšie infiltrované CD68+ histiocytmi, ktoré vykazovali difúznú pozitivitu. Vo vzorkách folikulárneho adenómu bola badateľná pravidelná a stredne silná infiltrácia histiocytmi, a to najmä v okolí ciev. Nepozorovali sme rozdiely medzi hodnotenými skupinami.

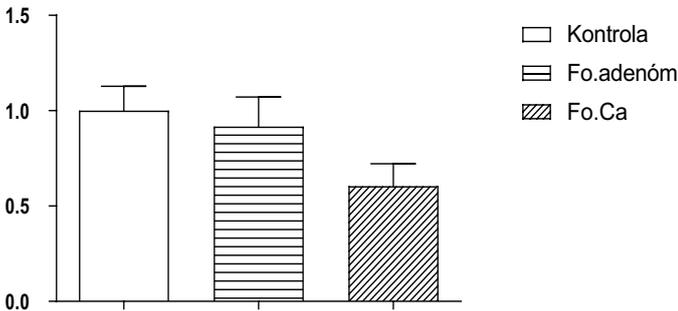
Diskusia

Viaceré vedecké štúdie už v minulosti preukázali, že nádorová transformácia vedie k vzniku nových proteínov, ktoré nie sú vlastné samotnému organizmu. Organizmus ich vníma ako cudzorodé a dochádza k aktivácii imunitného systému. Pochopenie princípov protinádorovej imunity sa v súčasnosti stáva výzvou pre vedecký výskum a otvára nové možnosti terapie nádorových chorôb. Realizovaná práca mala za cieľ posúdiť protinádorové imunitné mikroprostredie v rôznych nádoroch štítnej žľazy. Výhodou práce boli poznatky o zmenách sialyzácie bunkových glykokonjugátov počas patologických zmien v tkanive štítnej žľazy^(1,5), keďže práve povrchová sialyzácia výraznou mierou ovplyvňuje schopnosť imunitného systému rozpoznávať antigény.

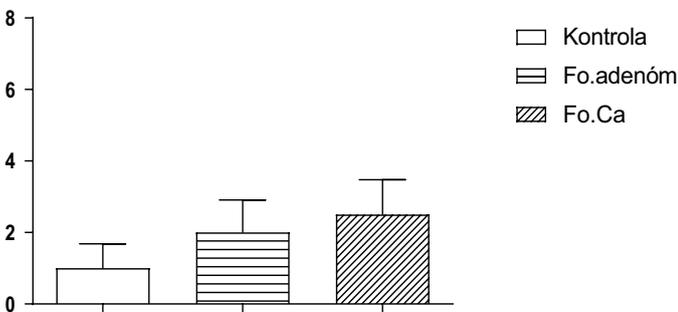
Infiltrácia štítnej žľazy zápalovými bunkami je známy fenomén sprevádzajúci pomerne časté autoimunitné zápaly štítnej žľazy. Imunitný systém zohráva úlohu aj v patogenéze nádorových chorôb. Pomalá progresia nádorového procesu pri diferencovaných karcinómoch môže byť sčasti vysvetlená podielom imunitnej odpovede, ktorá limituje rast tumoru a proces metastázovania⁽⁶⁾. V našej štúdii sme však ukázali, že protinádorová imunitná odpoveď vo folikulárnych léziách štítnej žľazy je len slabá a nevýrazná.

Pri hodnotení zastúpenia buniek imunity pri nádoroch štítnej žľazy sme pozorovali klesajúci trend infiltrácie tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi v závislosti od nádorovej transformácie. Prípady folikulárneho karcinómu vykazovali len veľmi slabú a nepravidelnú infiltráciu. Rozdiel síce nebol štatisticky významný, ide však o zaujímavý nález, ktorý môže mať význam pri regulácii imunitnej odpovede v organizme. Jednou z príčin môže byť práve vzostup sialyzácie bunkových glyko-

Obrázok 1. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmí. CD8+ cytotoxické T-lymfocyty boli prítomné v tkanive len ojedinele. Nepozorovali sme významný rozdiel v infiltrácii medzi jednotlivými skupinami.



Obrázok 3. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD20+ B-lymfocytmí. Nepozorovala som významné rozdiely v infiltrácii tkaniva CD20+ B-lymfocytov medzi jednotlivými skupinami.

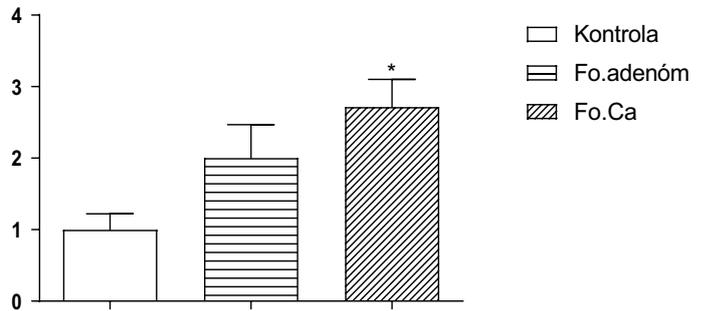


konjugátov v malígnych nádoroch štítnej žľazy, ktorá dokáže maskovať ich rozpoznávacie miesta⁽¹⁾.

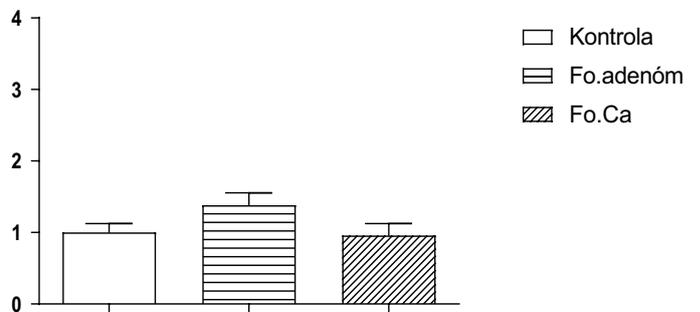
Infiltrácia tumorov štítnej žľazy bunkami protinádorovej imunity je podľa realizovaných výskumov asociovaná s lepším prežívaním pacientov^(7,8). CD8+, CD4+ T-lymfocyty ako aj infiltrácia B-lymfocytmí sa dáva do spojitosti s menšími rozmermi nádorovej masy⁽⁸⁾. Uvažuje sa, že by nižšia infiltrácia tkaniva lymfocytmí pri karcinómoch mohla byť asociovaná s horšou prognózou prežívania ako aj väčšími nádorovými léziami z dôvodu deprivácie protinádorovej imunity. Na druhej strane však predstavuje prítomnosť CD8+ T-lymfocytov nezávislý rizikový faktor recidívy choroby⁽⁹⁾. Autori uvažujú že práve ich vysoký podiel vedie k tomu, že sa stávajú nereaktívnymi proti nádorovému antigénu a neparticipujú na deštrukcii nádorových buniek. Z toho hľadiska nemusí nami pozorovaný trend poklesu infiltrácie tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmí naznačovať nevyhnutne schopnosť malígnych buniek unikať pred rozpoznávacou schopnosťou imunitných mechanizmov jedinca a môže skôr poukazovať na zmenenú reguláciu protinádorovej imunity v tkanive.

Opačný nález ako pri CD8+ cytotoxických T-lymfocytov sme pozorovali pri analýze CD4+ pomocných T-lymfocytov, kde infiltrácia tkaniva bola, naopak, významne vyššia v prípade folikulárneho karcinómu v kontraste s nízkymi hodnotami v prípade folikulárneho adenómu a nenádorovej parenchymatóznej strumy. Práve CD4+ T-bunky sú ústrednou zložkou v riadení imunitnej odpovede. Naivné CD4+ T-bunky majú schopnosť di-

Obrázok 2. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD4+ pomocnými T-lymfocytmí. Vo vzorkách folikulárneho karcinómu sme pozorovali významne vyššiu infiltráciu tkaniva v porovnaní s kontrolnou parenchymatóznou folikulárnou strumou.



Obrázok 4. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy CD68+ histiocytmí. Nepozorovala som významné rozdiely v infiltrácii tkaniva CD68+ histiocytmí medzi jednotlivými skupinami.



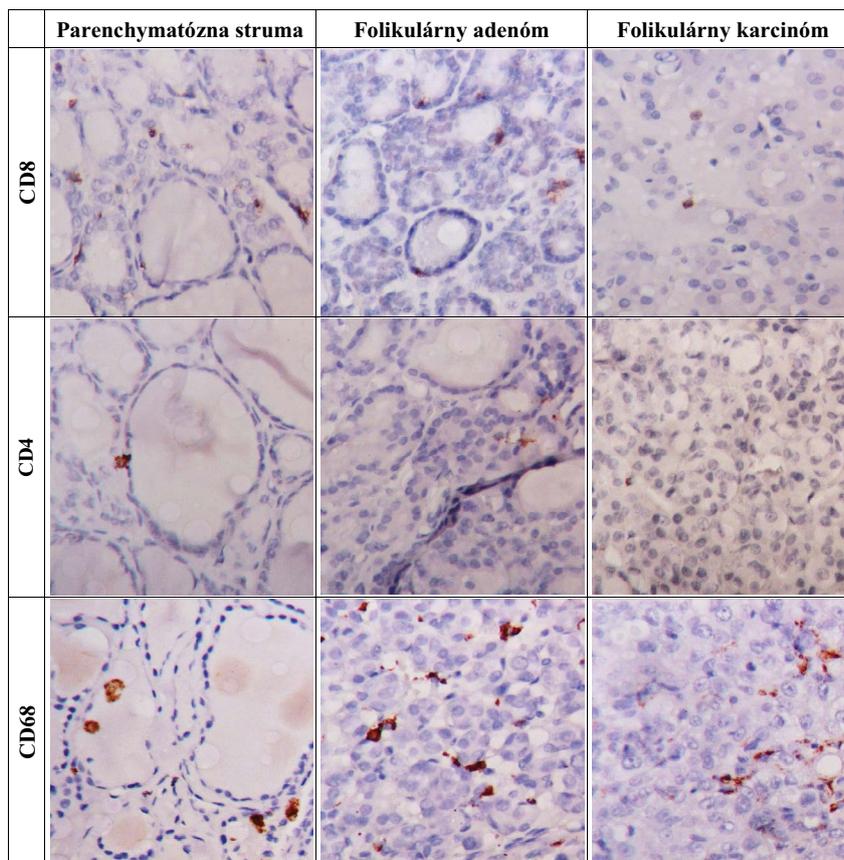
ferenciácie na jednu zo 4 odlišných funkčných skupín. Th1 diferenciácia je dôležitá najmä pre podporu cytotoxickej odpovede sprostredkovej CD8+ T-lymfocytmí. Navyše produktom týchto buniek je IFN- γ , ktorý významne ovplyvňuje imunogenézu nádorových buniek, a teda je významný pri rozpoznávaní a eliminácii malígne transformovaných buniek⁽¹⁰⁾.

Práve CD4+ T-lymfocyty sa ukazujú dominantné aj v malígnom papilárnom karcinóme. Vysoké zastúpenie CD4+ T-lymfocytov bol pozorovaný najmä v tumoroch väčších rozmerov⁽¹¹⁾. Tieto poznatky by mohli podporovať aj vyšší podiel CD4+ T-lymfocytov v prípade malígneho folikulárneho karcinómu opísaného v našej štúdií.

CD20+ B-lymfocyty ani CD68+ histiocyty nejavili nápadnejšie rozdiely pri porovnaní sledovaných skupín a prevažne vykazovali len ojedinelú ložiskovú pozitivitu lokalizovanú najmä perivaskulárne, menšie zastúpenie som pozorovala v prípade parenchymatóznej folikulárnej strumy a v prípade folikulárneho karcinómu bolo základnou spoločnou črtou vzoriek zhlukovanie histiocytov.

Bychkov a spol. poukázali na rozdiely v percentuálnom zastúpení membránovej expresie CD20+ v prípade malígneho papilárneho karcinómu (8,4 %) a v prípade benígneho folikulárneho adenómu, v ktorom uviedli kompletnú absenciu imunoreaktivity⁽¹²⁾. V našom prípade hodnotenie zastúpenia CD20+ B-lymfocytov nepreukázalo významné rozdiely medzi skupinami, CD20+ lymfocyty boli prítomné ložiskovo a v minimálnych intenzitách.

Obrázok 5. Infiltrácia tkaniva štítnej žľazy imunitnými bunkami. Vo folikulárnych léziách štítnej žľazy sme pozorovali len slabú a nepravidelnú infiltráciu CD8+ cytotoxickými a CD4+ pomocnými T-lymfocytmí. V tkanive dominovala najmä prítomnosť CD68+ histiocytov. IHC -Px, 200x



Publikované vedecké práce zdôrazňujú prevahu infiltrácie tkaniva CD68+ histiocytmi v malígnych nádoroch. Opísaná bola významne výraznejšia pozitivita aj v prípadoch malígneho folikulárneho karcinómu v porovnaní s benigným folikulárnym adenómom. Otázna zostáva miera dôležitosti týchto buniek v procese progresie a invázie tumoru⁽¹³⁾. V našom súbore sme takéto zmeny nepotvrdili.

Bližšie pochopenie imunitného mikroprostredia je žiaduce najmä z hľadiska možnosti využitia týchto poznatkov v rám-

ci diagnostického a terapeutického plánu. Je dokázané, že rôzne bunky imunity hrajú významnú úlohu v procese tumorigenézy a ovplyvňujú prognózu prežívania pacientov. Aj keď naša práca nepreukázala výraznú aktiváciu protinádorovej imunity vo folikulárnych léziách štítnej žľazy, ponúka nový pohľad na imunitné procesy pri nádorovej transformácii. Tieto poznatky majú význam pre výskum nových metód cielej imunoterapie pri onkologických léziách štítnej žľazy v budúcnosti.

LITERATÚRA

1. Babal P, Janega P, Cerna A, et al. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem* 2006; 108(2): 133-40.
2. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 991-8.
3. Liu Y, Zeng G. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J Immunother* 2012; 35(4): 299-308.
4. Sajbidorova B. Chorobné zmeny štítnej žľazy, úloha sialyzácie a imunity v nádoroch štítnej žľazy. In *Institute of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine*. 2021; Comenius University: Bratislava.
5. Janega P, Cerna A, Kholova I, et al. Sialic acid expression in autoimmune thyroiditis. *Acta Histochem* 2002; 104(4): 343-7.
6. French JD, Haugen BR. Thyroid-Specific T Cells in Patients With Differentiated Thyroid Cancer: Implications for Immune-Based Therapies? *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102(7): 2131-2132.
7. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331(6024): 1565-70.
8. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77(6): 918-25.
9. Cunha LL, Marcello MA, Nonogaki S, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and COX2 expression may predict relapse in differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 83(2): 246-53.
10. Dighe AS, Richards E, Old LJ, et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994; 1(6): 447-56.
11. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, et al. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(5): 2325-33.

12. Bychkov A, Jung CK. Aberrant expression of CD20 in thyroid cancer and its clinicopathologic significance. *Hum Pathol* 2018; 71: 74-83.

13. Proietti A, Ugolini C, Melillo RM, et al. Higher intratumoral expression of CD1a, tryptase, and CD68 in a follicular variant of papillary thyroid carcinoma compared to adenomas: correlation with clinical and pathological parameters. *Thyroid* 2011; 21(11): 1209-15.

MUDr. Barbora Šajbidorová

Plickova 5, 831 06 Bratislava

e-mail: barb.sajbidorova@gmail.com

Narušená reparácia tkanív je sprievodným znakom diabetu mellitu (patofyziologický pohľad a prípadová štúdia)

Andrea Janegová^{1,3}, Pavol Janega^{1,2,4}

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

³Patologickoanatomické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trnava

⁴Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Diabetes mellitus so svojimi komplikáciami patrí k vážnym chronickým chorobám s rastúcim výskytom v populácii. K častým komplikáciám zle kompenzovaného diabetu patrí aj diabetická noha. Veľmi dobre je opísaný podiel neuropatie a vaskulopatie na vzniku diabetického nohy. Súčasné výskumy však poukazujú na skutočnosť, že diabetes mellitus vstupuje do regulácie procesov hojenia, ovplyvňuje vlastnosti ciev a ich funkčnosť, dochádza k zníženej biodostupnosti NO a k zvýšenej tvorbe ROS. Narušená tvorba rastových faktorov ovplyvňuje zloženie extracelulárnej hmoty, čo spomaľuje procesy reparácie a regenerácie. Lepšie chápanie patofyziologických dejov v procese hojenia rán pri diabete mellite môže v budúcnosti pomôcť efektívne ovplyvniť liečbu.

Kľúčové slová: diabetes mellitus, diabetická noha, regenerácia, reparácia

Impaired tissue repair is a concomitant feature of diabetes mellitus (pathophysiological study and case report)

Diabetes mellitus, with its complications, is one of the serious chronic diseases with an increasing prevalence in the population. Common complications of poorly compensated diabetes include diabetic foot. The contribution of neuropathy and vasculopathy to the development of diabetic foot is well described. However, current research points to the fact that diabetes mellitus enters into the regulation of healing processes, affecting vascular properties and functionality, resulting in decreased NO bioavailability and increased ROS generation. Disturbed production of growth factors affects the composition of the extracellular matrix, which slows down repair and regeneration processes. A better understanding of the pathophysiological events in the wound healing processes in diabetes mellitus may help to influence treatment more effectively in the future.

Keywords: Diabetes mellitus – diabetic foot – regeneration – repair

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 14 – 18

Úvod

Diabetes mellitus so svojimi komplikáciami patrí k vážnym chronickým chorobám, ktoré zaťažujú pacientov. Jeho výskyt v populácii stále rastie. Za posledných 30 rokov prevalencia diabetu mellitu (bez ohľadu na typ) stúpila dvojnásobne. Jeho závažnosť zdôrazňuje aj vyššia prevalencia v Slovenskej republike v porovnaní s priemerom v Európskej únii a rast počtu nových prípadov⁽¹⁾. Problémové sú práve komplikácie diabetu mellitu súvisiace s cievnyimi zmenami, neuropatiou a celkovými zmenami metabolizmu. Vhodná diagnóza a liečba môžu zabrániť rozsiahlemu poškodeniu dolnej končatiny s vysokými nákladmi na liečbu (**obrázok 1 a 2**).

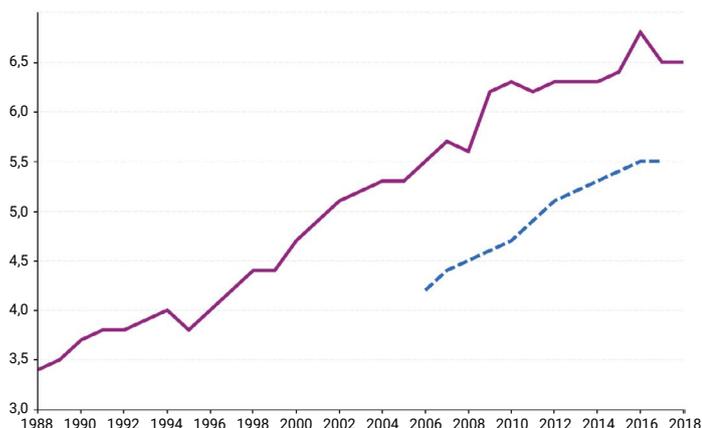
Diabetická noha, ako aj iné ťažko sa hojace vtedy asociované s diabetom mellitom, ktoré nezriedka progredujú do gangrény, patria k častým komplikáciám zle kompenzovaného diabetu mellitu a vážnym spôsobom zdravotne zaťažujú pacienta a jeho rodinu. Môžu viesť k stratám postihnutých končatín a invalidizovať pacienta.

Vznik diabetického nohy súvisí s kombináciou zmien vyvolaných diabetom mellitom, primárne s neuropatiou a s ňou súvisiacim vyšším rizikom vzniku drobných rán, so zmeneným mikrobiómom kože⁽²⁾ so sekundárnou infekciou rán, s narušenou imunitnou reakciou organizmu a celkovým ischemic-

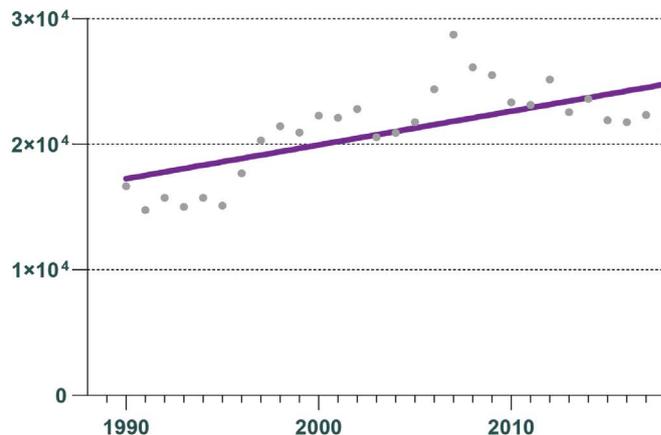
kým prostredím v dôsledku arteriálnej okluzívnej choroby. Práve opakované traumy pri chôdzi spolu so zníženou citlivosťou pri neuropatii predisponujú na poranenie kože a spôsobujú úbytok a dislokáciu ochranných tukových vankúšikov. To pri nedostatočnej ochrane kože alebo nevhodnej obuvi vedie k vzniku vredov a k infekciám^(3,4).

Veľmi dobre je opísaný podiel neuropatie a vaskulopatie na vzniku diabetického nohy. Diabetická neuropatia vedie k postihnutiu motorických, sensorických aj autonómnych nervových vlákien. Často bývajú primárne postihnuté najdlhšie periférne nervy. Strata reflexu Achillovej šľachy je najskorším príznakom týchto zmien. Denervácia, resp. poškodená inervácia spôsobuje atrofiu interoseálnych svalov nohy, čo sa podieľa na anatomických zmenách klenby nohy, vzniku osteoartropatie (Charcotova noha) a deformáciách prstov. Neuropatické zmeny na chodidle sú bežné, diagnóza je často oneskorená. Kritické je aj narušenie sensorických nervových vlákien so stratou propriocepce, zmenou schopnosti vnímania tlaku, vibrácií aj bolestivých podnetov^(3,5). Metabolické zmeny pri diabete, sprevádzané hyperglykémiou a oxidačným voľnoradikálovým preťažením organizmu vedú k endotelovej dysfunkcii. Tá v kombinácii s hyperlipidémiou a so zmenami aktivácie trombocytov⁽⁶⁾ akceleruje aterosklerotické

Obrázok 1. Prevalencia diabetu mellitu. Prevalencia diabetu mellitu (bez ohľadu na typ) stúpala za posledných 30 rokov dvojnásobne a v SR (fialová farba) je výrazne vyššia ako je priemer v EÚ (modrá prerušovaná čiara)⁽¹⁾.



Obrázok 2. Počet nových prípadov diabetu mellitu v SR. Diabetes mellitus (bez ohľadu na typ) predstavuje závažný zdravotný problém v populácii s neustále rastúcim počtom nových diagnostikovaných prípadov⁽¹⁾.



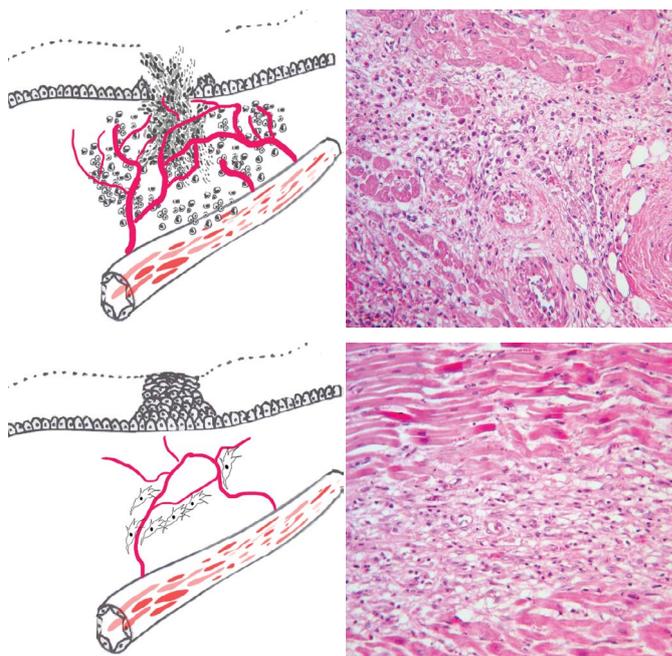
ké zmeny u pacientov. Distribúcia aterosklerotického ochorenia dolných končatín u diabetikov sa líši od tej nediabetikov. Prednostne postihuje distálne artérie dolných končatín (tibiálne artérie) s menej častým postihnutím femoropopliteálneho systému. Ischemizácia nohy sa podieľa na vzniku ischemického vredu a v prípade závažných komplikácií aj gangréne^(3,7,8).

Napriek adekvátnej liečbe je hojenie diabetického vredu pomerne komplikované a nie vždy úspešné. Nie vždy to možno vysvetliť pretrvávajúcou ischemizáciou, veľká skupina neuropatických diabetických vredov nezriedka progreduje aj v prípadoch, keď sú zachované dostatočné prietoky cievami a napriek adekvátnej terapii.

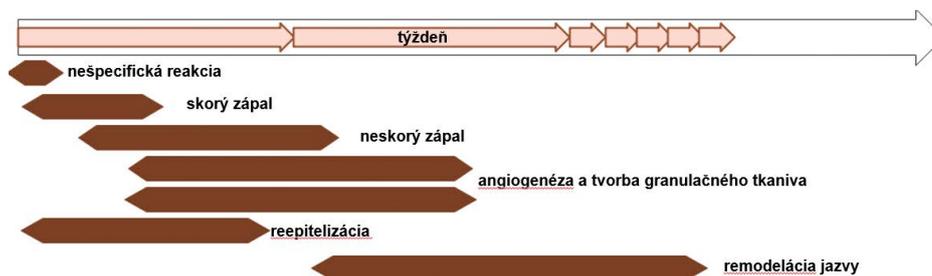
Hojenie je za fyziologických okolností pomerne presne definovaný konzervatívny proces. Poškodenie vedie k nekróze tkaniva a bakteriálnej kolonizácii sprevádzanej akútnym zápalom. Práve zápalová reakcia je dôležitá nielen na potlačenie bakteriálneho rastu, vedie však aj k aktivácii tvorby cytokínov, ktoré sa podieľajú na neoangiogenéze, tvorbe nových ciev a ich rekanalizácii, migrácii myofibroblastov a tvorbe väzivovej jazvy.

Celý tento dej je pod kontrolou lokálnych cytokínov a rastových faktorov, ktoré ovplyvňujú aktivitu fibroblastov, schopnosť regenerácie epitelu aj endotelových buniek (IGF1), ovplyvňujú chemotaxiu zápalových buniek, ale aj myofibro-

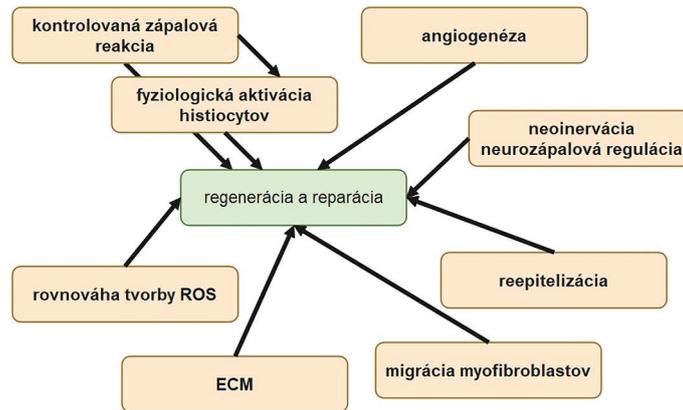
Obrázok 3. Hojenie rany. Proces hojenia nastupuje krátko po poškodení tkaniva, je sprevádzaný zápalovou obrannou reakciou, ktorá sa podieľa na aktivácii neoangiogenézy v poškodenom tkanive, tvorbe granulačného tkaniva a následnej jazvy.



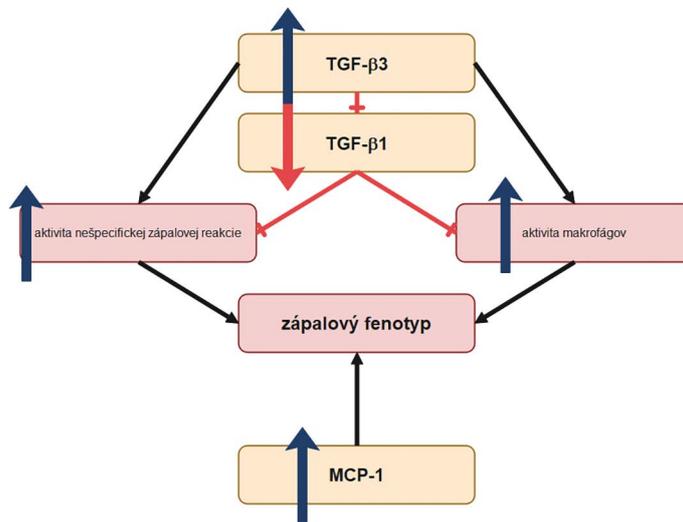
Obrázok 4. Reakcia organizmu na poškodenie. Hojenie rany je postupný proces, kde ako následok poškodenia a nekrózy tkaniva sa aktivuje obranná zápalová reakcia sprevádzaná neoangiogenézou, tvorbou granulačného tkaniva, povrchovou reepitelizáciou rany a vznikom väzivovej jazvy, ktorá je postupne remodelovaná so vzostupom obsahu kolagénu a poklesom prítomnosti ciev.



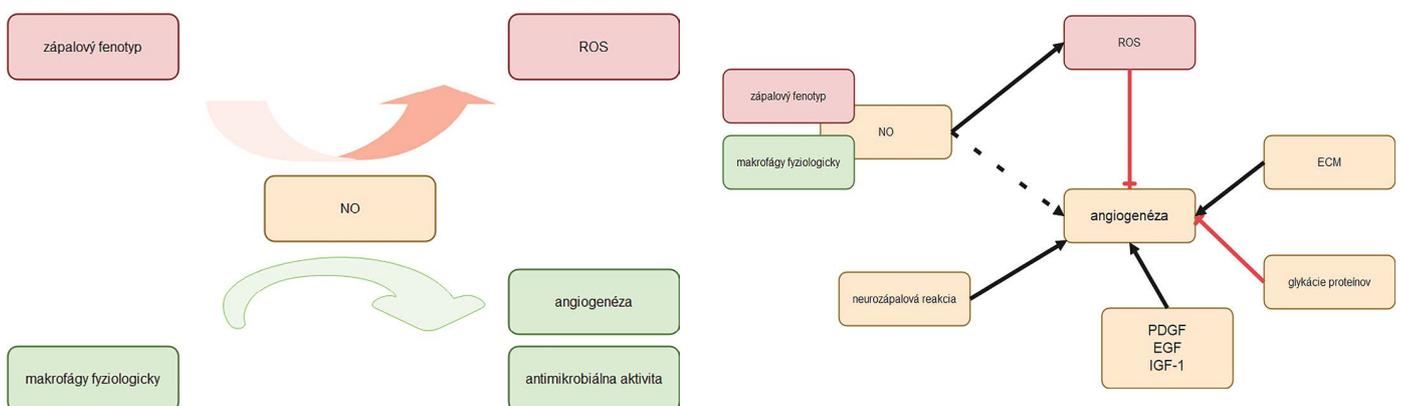
Obrázok 5. Diabetes mellitus zásadným spôsobom vstupuje do regulácie procesov hojenia.



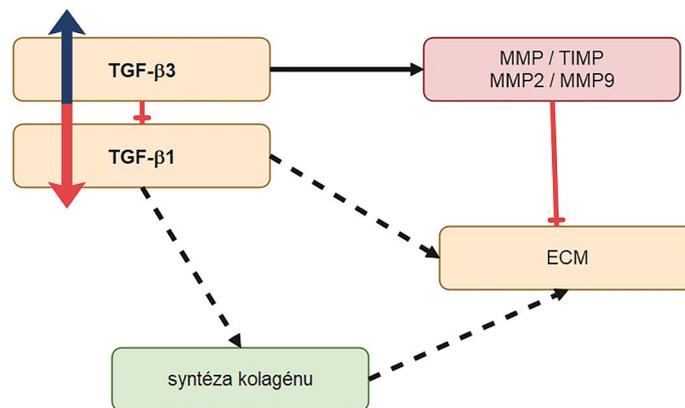
Obrázok 6. Diabetes mellitus ovplyvňuje tvorbu rastových faktorov. Diabetes mellitus ovplyvňuje rovnováhu medzi TGF-β1 a TGF-β3 v prospech prozápalovej aktivity s vytvorením zápalového fenotypu v hojacej sa rane.



Obrázok 7. Význam NO v procesoch hojenia. Zápalová aktivácia za fyziologických okolností vedie k aktivácii NOS2 a k tvorbe NO, ktorý má význam pre angiogenézu. U pacientov s diabetom mellitom dochádza k zníženej biodostupnosti NO, ktorá narušuje rovnováhu, zvýšená tvorba ROS spomaľuje procesy reparácie a regenerácie.



Obrázok 8. Remodelácia tkaniva ovplyvnená diabetom mellitom. Narušená tvorba rastových faktorov ovplyvňuje zloženie extracelulárnej hmoty znížením syntézy kolagénu, ako aj ovplyvnením syntézy matrixových metaloproteináz.



lastov, ich aktiváciu a diferenciaciu i zloženie extracelulárneho matrixu (TGF-b1, PDGF, zložky aktivovaného komplementu). Kontrolovaná zápalová reakcia je kľúčová pre správnu reparáciu poškodeného tkaniva, tvorbu granulačného tkaniva aj pre regeneráciu povrchového epitelu a reepitelizáciu rany (**obrázok 3 až 5**)^(9,10).

Diabetes mellitus ovplyvňuje expresiu a aktivitu rastových faktorov. Je známe, že u pacientov s diabetom dochádza k zníženej aktivácii TGF-b1 a, naopak, zvýšenej aktivácii TGF-b3. V dôsledku toho rastie aktivita nešpecifickej zápalovej reakcie a aktivita makrofágov. Diabetes mellitus je charakteristický nápadným zápalovým fenotypom odpovede (**obrázok 6**)⁽¹¹⁾.

Dôležitú úlohu v týchto dejoch zohráva aj tvorba oxidu dusnatého. Kým za fyziologických okolností je NO tvorený prevažne indukčnou NO syntázou NOS2 v kontrolovanom množstve a má priamy účinok na angiogénu a antimikrobiálnu aktivitu, u pacientov s diabetom mellitom dochádza v dôsledku nekontrolovanej zápalovej reakcie k premene NO, jeho zníženej biodostupnosti a k zvýšeniu tvorby reaktívnych voľných radikálov (**obrázok 7**). Zvýšená tvorba ROS inhibuje angiogénu a spomaľuje procesy preparácie a regenerácie⁽¹²⁻¹⁵⁾.

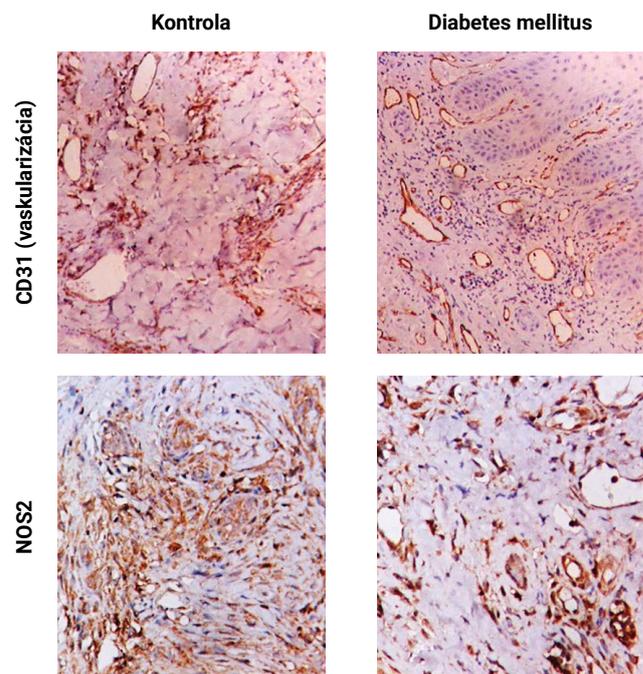
V dôsledku zníženej aktivácie TGF-β1 a zvýšenej aktivácie TGF-β3 dochádza aj k zmenám remodelácie extracelulárnej hmoty u pacientov s diabetom mellitom. Znížená produkcia kolagénu a, naopak, jeho zvýšené odbúravanie ako následok porušenej rovnováhy matrixových metaloproteináz spomaľuje tvorbu jazvy a spôsobuje zmenu jej funkčných charakteristík⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ (**obrázok 8**).

Prípadová štúdia

Prezentujeme prípadovú štúdiu 5 pacientov s diagnózou diabetes mellitus 2. typu a s diabetickou ulceráciou. U pacientov boli bioptické vzorky ulcerácie odobraté pred začiatkom liečby. Pacienti boli následne liečení štandardnými liečebnými postupmi používanými v terapii chronických vredov, a to odľahčením končatín, chirurgickým vyčistením rany a lokálnou a celkovou antibiotickou liečbou. Ako kontrolné boli analyzované vzorky ulcerácií dolných končatín u 2 pacientov s neuropatickými vredmi, bez diagnózy diabetes mellitus.

Vo všetkých vybraných prípadoch sme pozorovali vaskularizované granulačné tkanivo so zmiešanou zápalovou in-

Obrázok 9. Histologické zmeny pri hojení. V histologických vzorkách u pacientov s diabetickou nohou sme pozorovali menšiu denzitu ciev a zvýšenú pozitivitu NOS2 v porovnaní s pacientmi s neuropatickými vredmi bez diagnózy diabetes mellitus.



filtráciou. Vybraté boli prípady v podobnom štádiu hojenia, charakteristické zodpovedajúcim podielom kolagénu vo vyzrievajúcom granulačnom tkanive. V histologických vzorkách u pacientov s diabetickou nohou bola prítomná narušená angiogéza, charakteristická menšou denzitou ciev, a zvýšená expresia NOS2.

Záver

Diabetes mellitus je komplexná metabolická choroba majúca vplyv na regulácie procesov regenerácie a reparácie v tkanive. Diabetická noha predstavuje chorobu, ktorá vzniká v dôsledku poruchy regulácií, a to nielen v dôsledku diabetického neuropatie a vaskulopatie, ale aj v súvislosti s narušenou mikrobiálnou kožnou flórou a porušeným procesom

hojenia. Vedie k poruchám regulácie tvorby rastových faktorov spomaľujúcich rast granulačného tkaniva, jeho vyzrievania a reepitelizácie povrchového kožného krytu. Spôsobuje vznik nekontrolovaného zápalového fenotypu a uvoľňovanie enzýmov poškodzujúcich tkanivo, ako aj nekontrolovateľnú produkciu ROS. Podieľa sa na poruchách angiogenézy, zmenách neurozápalovej regulácie a poruchách tvorby a remodelácie extracelulárnej hmoty.

LITERATÚRA

1. European health for all database (HFA-DB). 2018; WHO Regional Office for Europe, Division of Information, Evidence, Research and Innovation: Copenhagen, Denmark.
2. Kajsik M, Janega P. Mikrobiálne spoločenstvá a ich vplyv na liečbu diabetickej nohy. *NewsLab* 2021; 12(2): 79-82.
3. Bandyk DF. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Semin Vasc Surg* 2018; 31(2-4): 43-48.
4. Boulton AJ, Kirsner RS, Vileikyte L. Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. *N Engl J Med* 2004; 351(1): 48-55.
5. Trieb K. The Charcot foot: pathophysiology, diagnosis and classification. *Bone Joint J* 2016; 98-B (9): 1155-9.
6. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17(1): 121.
7. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes* 2017; 9(5): 434-449.
8. Guzman RJ, Bian A, Shintani A, et al. Association of foot ulcer with tibial artery calcification is independent of peripheral occlusive disease in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 99(3): 281-6.
9. Bitar MS, Labbad ZN. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *J Surg Res* 1996; 61(1): 113-9.
10. Rosenberg CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurs Clin North Am* 1990; 25(1): 247-61.
11. El Gzaerly H, Elbardisey DM, Eltokhy HM, et al. Effect of transforming growth factor Beta 1 on wound healing in induced diabetic rats. *Int J Health Sci (Qassim)* 2013; 7(2): 160-72.
12. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol* 2019; 14(1): 50-59.
13. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, et al. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14(3): 241-9.
14. Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, et al. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery* 1997; 121(5): 513-9.
15. M PK, Cook E, Hannon J, et al. Investigative Study on Nitric Oxide Production in Human Dermal Fibroblast Cells under Normal and High Glucose Conditions. *Med Sci (Basel)* 2018; 6(4).
16. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes* 1988; 37(4): 371-6.
17. Black E, Vibe-Petersen J, Jorgensen LN, et al. Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Arch Surg* 2003; 138(1): 34-40.
18. Tsioufis C, Bafakis I, Kasiakogias A, et al. The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem* 2012; 12(10): 1159-65.

Podakovanie

Štúdia bola realizovaná s podporou projektu AP-VV-17-0526 „Využitie mezenchymálnych kmeňových buniek v kombinácii s ďalšími podpornými biologickými postupmi v liečbe chronického diabetickeho vredu“.

MUDr. Andrea Janegová, PhD.

Ústav patologickej anatómie
Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
e-mail:andrea.janegova@fmed.uniba.sk

Whole Genome Sequencing as a Tool for Characterization of Neonatal Meningitis *Escherichia coli*

Michal Andrezál¹, Lukáš Pazderka², Tomáš Szemes^{1,3}, Hana Drahovská^{1,3}

¹Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Slovakia

²AnalytX s.r.o., Department of Clinical Microbiology Trnava, Slovakia

³Science Park, Comenius University in Bratislava, Slovakia

Neonatal meningitis is a life-threatening disease with high mortality rate and possible neurological sequelae with neonatal meningitis *E. coli* strains (NMEC) being of the primary gram-negative pathogen causing the disease. NMEC are often equipped with various virulence factors which help them to evade immune system of the host and translocate through the blood-brain barrier. In this study, we use whole genome sequencing for analysis of NMEC strains isolated from two patients together with one isolate sampled in hospital environment. All strains were characterised as sequence type 95, possessing O45:H7:K1 or O1:H7:K1 serotypes which are among the most prevalent serotypes worldwide. The patient strains were genetically very similar but differed from the environmental isolate. This proved that the environmental strain was not the source of infection. The strains contained several virulence factors specific for NMEC.

Keywords: neonatal meningitis, NMEC, genotyping, MLST, genome sequencing

Celogenómové sekvenovanie ako nástroj na charakterizáciu kmeňov *Escherichia coli* spôsobujúcich neonatálnu meningitídu

Neonatálna meningitída je závažné, život ohrozujúce ochorenie, ktoré je v mnohých prípadoch spôsobené kmeňmi *E. coli*. Kmene *E. coli* vyvolávajúce meningitídu (NMEC) sú pre patogénny proces vybavené množstvom virulencných faktorov. V tejto práci sme stanovili celogenómovú sekvenciu kmeňov NMEC izolovaných z dvoch pacientov s meningitídou a jedného kmeňa izolovaného z povrchového steru v novorodeneckom oddelení. Všetky kmene boli zaradené do svetovo rozšíreného sekvenčného typu 95 a sérotypov O45:H7:K1 a O1:H7:K1. Kmene izolované od pacientov boli navzájom geneticky veľmi podobné, avšak líšili sa od kmeňa izolovaného z prostredia, vďaka čomu môžeme predpokladať, že tento kmeň nebol príčinou vzniku epidémie. V kmeňoch sme detegovali množstvo virulencných faktorov špecifických pre kmene NMEC.

Kľúčové slová: neonatálna meningitída, NMEC, genotypizácia, MLST, celogenómové sekvenovanie

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 19 – 21

Introduction

Meningitis is one of the major causes of mortality and morbidity in neonates. Together with group B streptococci, neonatal meningitis-causing *Escherichia coli* (NMEC) is the leading cause of this disease worldwide⁽¹⁾. Mortality rates can reach up to 40%, while survivors often suffer with severe neurological sequelae and may develop serious neurological disorders⁽²⁾. Pathogenesis of NMEC meningitis is complex, encompassing the need for bacterial translocation to the bloodstream, and crossing of the blood-brain barrier⁽¹⁾. To accomplish this, the NMEC are equipped with a wide variety of virulence traits such as adhesins, iron acquisition systems, invasins, toxins, and serum resistance genes. These factors can be encoded by bacterial chromosome or are carried via plasmids^(1,3). One of the most common virulence factors in NMEC strains is K1 antigen. It is a homopolymer of N-acetylneuraminic (sialic) acid and functions as a molecular mimicry⁽⁴⁾.

The aim of this study was molecular typing of four NMEC isolates. Three strains were isolated from two diseased neonates and one isolate originated from the surface in the neonatal unit of the same hospital.

Materials and Methods

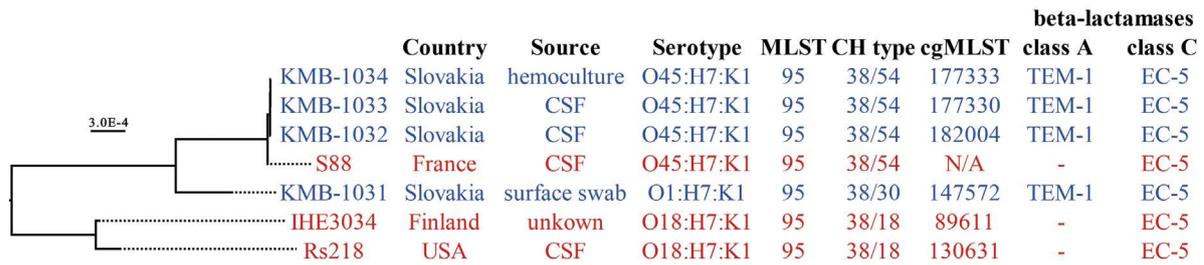
Isolation and cultivation of bacterial strains

Strains used in this study were isolated in the Neonatal Department of Trnava University Hospital (Slovakia). KMB-1033 and KMB-1034 were isolated from Patient 1, KMB-1032 was isolated from Patient 2., and KMB-1031 strain was isolated from the surface swab of the hospital environment. Strains were grown on Columbia agar 5% Sheep Blood or in Luria-Bertani (LB) medium.

DNA isolation and NGS library preparation

Nucleic acid isolation was performed by Higher Purity™ Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (CanvaxBiotech). DNA

Figure 1. Phylogenetic tree of four isolates analysed in this study (KMB-1031 – KMB-1034, blue) and three reference NMEC strains (red). The tree was generated by PATRIC, an online tool with program set-up to compare 1000 genes across selected genomes. Bootstrap values were not lower than 98. The origin of the strains: S88 France – acc. no. NC_011742; IHE3034 Finland – acc. no. NC_017628; Rs218 USA – acc. no. NZ_JWZW0000000, CSF – cerebrospinal fluid



concentration was measured by Qubit (Invitrogen). Genomic libraries for sequencing were prepared by Nextera XT DNA Prep Kit (Illumina), purified on AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter Life Sciences) and reviewed by chip electrophoresis. Sequencing was performed on NextSeq 500™ platform using 2x150bp read lengths (Illumina) at the Comenius University Science Park.

Bioinformatics and genome analysis

Raw data was assembled into contigs by SPAdes. Assembled genomes were annotated and analysed using the PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>), RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) and CGE (<https://www.genomicepidemiology.org/>) online platforms.

Results and discussion

All four tested strains were identified as *Escherichia coli* based on biochemical Enterotest 24 + latex agglutination of liquor, which is positive in *E. coli* K1 samples, and verified by PCR and MALDI-TOF methods.

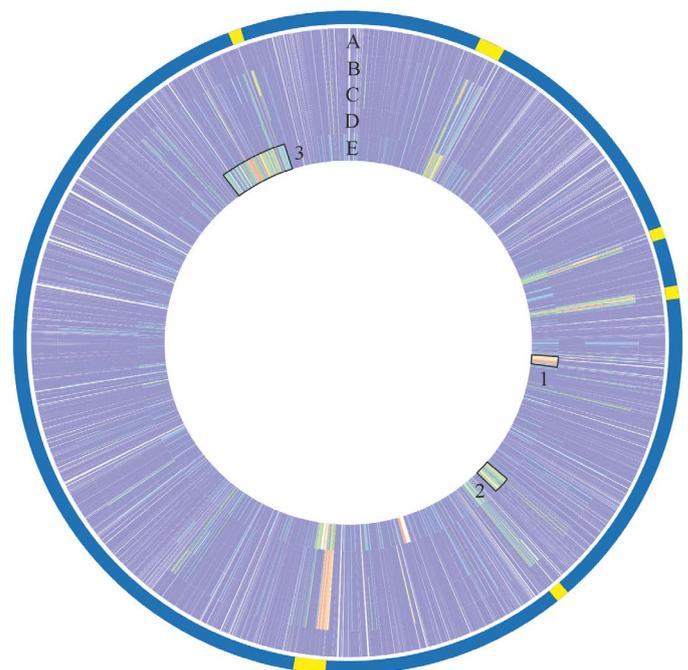
Using whole genome sequencing, we obtained the average of 86 contigs with 76 times coverage per genome. All four strains were positive for K1 capsule and belonged to the MLST sequence type ST-95 which is very common among NMEC strains^(5,6). They were distinguishable only by cgMLST. Furthermore, the KMB-1031 strain isolated from environmental swab also showed difference in serotype and *fimH* fimbrial adhesin (Figure 1). To further distinguish the highly similar genomes, whole genome SNP analysis was applied, which confirmed strain separation into two clusters. Strains isolated from patients differed from each other in 111 to 128 SNPs. However, the environmental KMB-1031 strain was less relative to the other strains and differed in 2830 to 2865 SNPs. Our isolates were further compared with three reference NMEC genomes and we found out that the clinical strains were highly relative to *E. coli* S88 (Figure 1). This strain is a typical representative of the O45:H7:K1 serotype, frequently found in NMEC in Spain and reported to account for one-third of all *E. coli* neonatal meningitis cases in France in 2009^(6,7). The O1:H7:K1 serotype, seen in the strain isolated from the surface swab (KMB-1031), was the most prevalent NMEC clonal group in France between 2001 and 2013 and in the USA⁽⁵⁾ as well.

We compared proteomes of all four strains with S88 as the reference and observed high similarity between S88 and

KMB-1032, KMB-1033 and KMB-1034 strains, while lower similarity to KMB-1031, which was anticipated based on previous analyses (Figure 2). Main differences were seen in regions encoding for prophages, amino-acid biosynthesis, colanic acid biosynthesis, formate and nitrate metabolism, type 1 fimbriae as well as hypothetical proteins. These differences suggest that the strain isolated from the surface swab was not the cause of the meningitis outbreak in the neonatal department.

Based on the CARD database, TEM-1 and EC-5 genes which confer resistance to penicillins and cephalosporins

Figure 2. Proteome comparison of the reference *E. coli* S88 (A) and the KMB-1032 (B), KMB-1033 (C), KMB-1034 (D), and KMB-1031 (E) strains. Yellow rectangles highlight the areas of difference in encoding for phage proteins. Black rectangles show differences between KMB-1031 and the rest of our strains. These areas encode proteins involved in formate and nitrate metabolism (1), biosynthesis of colanic acid and some amino-acids (2), type 1 fimbriae (3), as well as many other genes, hypothetical genes and genes with unknown function. Dissimilarities in genes involved in synthesis of type 1 fimbriae was anticipated because of different *fimH* allele detected in this strain.



were detected in all four strains⁽⁸⁾. This was consistent with the ampicillin resistance (>32 mg/l) detected in KMB-1031, KMB-1033 and KMB-1034 strains. Furthermore, *E. coli* KMB-1031 showed resistance against ampicillin + sulbactam (>32 mg/l) which may be caused by the fact that sulbactam is a relatively weak inhibitor of TEM-1, or possibly a result of TEM-1 hyperproduction⁽⁹⁾.

Presence of plasmids was detected by selection of con-tigs with higher coverage. In all four strains, we detected a large (~135 kb) plasmid similar to previously published pRK100 and pCERC5 plasmids belonging to the ColV group with RepFIB and RepFII origins⁽¹⁰⁾. We observed similarity in the whole plasmid sequence with the only difference that unlike pRK100 and pCERC5, plasmids from our strains did not harbour the *tetA* gene (data not shown). We observed presence of twelve virulence genes (*cia*, *cvaC*, *iroN*, *iss*, *mchF*, *traT*, *etsC*, *hlyF*, *ompT*, *iucC*, *sitA* and *iutA*) on the pRK100-like plasmid found in our strains. No differences in the presence of virulence factors localised on the pRK100-like plasmids were detected between the patient and environmental strains. The IncFIB plasmids are very prominent among ExPEC strains and other studies^(11,12) have also described an association between these plasmids and genes encoding for siderophores and serum survival determinants in NMEC.

REFERENCES

1. Logue CM, Doetkott C, Mangiamale P, Wannemuehler YM, et al. Genotypic and Phenotypic Traits That Distinguish Neonatal Meningitis-Associated *Escherichia coli* from Fecal *E. coli* Isolates of Healthy Human Hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78(16): 5824-5830.
2. Croxen MA, Finley BB. Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8(1): 26-38.
3. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2009; 73(4): 750-774.
4. Steenbergen SM, Lee YC, Vann WF, et al. Separate Pathways for O Acetylation of Polymeric and Monomeric Sialic Acids and Identification of Sialyl O-Acetyl Esterase in *Escherichia coli* K1. *Journal of Bacteriology* 2006; 188(17): 6195-6206.
5. Geslain G, Birgy A, Adiba S, et al. Genome Sequencing of Strains of the Most Prevalent Clonal Group of O1:K1:H7 *Escherichia coli* That Causes Neonatal Meningitis in France. *Microbiology* 2019; 19(17): 1-8.
6. Mora A, Viso S, López C, et al. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology* 2013; 167(3-4): 506-512.
7. Peigne Ch, Bidet P, Messai FM, et al. The Plasmid of *Escherichia coli* Strain S88 (O45:H7:K1) That Causes Neonatal Meningitis Is Closely Related to Avian Pathogenic *E. coli* Plasmids and Is Associated with High-Lev-

Conclusion

This paper describes an analysis of three clinical NMEC strains and one environmental swab isolate. All four strains were characterised as ST-95 possessing O45:H7:K1 and O1:H7:K1 serotypes which both belong to widely spread NMEC types in many countries. Virulence factors found in these strains could help identify specific set of genes for distinguishing NMEC from other ExPEC. Furthermore, this paper contributed to the monitoring of transmission of epidemics in a neonatal medical facility.

Acknowledgement

This paper was supported by the Research and Development Operational Programme, funded by the ERDF (SmartFarm, ITMS 313011W112).

Podakovanie

Tento príspevok je výsledkom realizácie projektu Smart-Farm (ITMS 313011W112) financovaného z Operačného programu Výskum a vývoj Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

el Bacteremia in a Neonatal Rat Meningitis Model. *Infection and Immunity* 2009; 77(6): 2272-2284.

8. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*; 48(D1): D517-D525.

9. Waltner-Toews RI, Paterson DL, Qureshi ZA, et al. Clinical Characteristics of Bloodstream Infections Due to Ampicillin-Sulbactam-Resistant, Non-Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and the Role of TEM-1 Hyperproduction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55(2): 495-501.

10. Starčič-Erjavec M, Jeseničnik K, Elam L, et al. Complete sequence of classic F-type plasmid pRK100 shows unique conservation over time and geographic location. *Plasmid* 2022; 119-120.

11. Weissman S, Hansen N, Zaterka-Baxter K, et al. Emergence of antibiotic resistance-associated clones among *Escherichia coli* recovered from newborns with early-onset sepsis and meningitis in the United States, 2008-2009. *Journal of Pediatric Infectious Diseases Society* 2016; 5(3): 269-276.

12. Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, et al. Associations Between Multidrug Resistance, Plasmid Content, and Virulence Potential Among Extraintestinal Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* from Humans and Poultry. *Foodborne Pathogens and Disease* 2012; 9(1): 37-46.

doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.

Department of Molecular Biology

Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava

Ilkovičova 6, 841 04 Bratislava, Slovakia

e-mail: hana.drahovska@uniba.sk



TRISOMYtest
Complete

ZDRAVIE
PLODU NIE JE
HÁDANKA

KOMPLEXNÝ

Nový variant TRISOMY testu dokáže cielene identifikovať chromozómové poruchy na úrovni všetkých 23 párov chromozómov.

SPOL' AHLIVÝ

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.



člen
MEDIREX GROUP
všetko pre vaše zdravie

www.medirex.sk

0800 003 030

Metabolomika: potenciálny nástroj individuálneho prístupu k depresívnym ochoreniam

Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Terézia Kisková

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied Košice

Depresia každoročne prispieva k celosvetovej záťaži chorôb. Počas krízy COVID-19 sa výskyt porúch nálad či dokonca depresie výrazne zvýšil. Napriek pribúdajúcim informáciám presné základné mechanizmy depresívnych porúch nie sú stále známe. Metabolomika je vhodný a výkonný nástroj na pochopenie skorých mechanizmov spojených s patológiou depresívnych stavov. Deteguje poruchy v metabolizme, ktoré odrážajú zmeny v biologickom organizme. Využitie metabolomiky by teda mohlo pomôcť pri identifikácii biomarkerov, monitorovaní terapeutickú odpovede organizmu a odhaľovaní progresie ochorenia. V tejto práci poskytujeme základný prehľad o metabolických zmenách, ktoré nastávajú pri depresívnym ochoreniach.

Kľúčové slová: depresia, metabolomika, lipidový metabolizmus

Metabolomics: a potential tool for an individual approach to depressive diseases

With a high annual and lifetime prevalence, depression is becoming a significant contributor to the global disease burden. During the COVID-19 crisis, mood disorders or even depression increased significantly. Despite increasing information, the underlying mechanisms of depressive disorders are still unknown. Metabolomics is a convenient and powerful tool for understanding the early mechanisms associated with the pathology of depressive disorders. It detects metabolic disorders that reflect changes in the biological organism. Metabolomics could help identify biomarkers, monitor the body's therapeutic response, and help detect disease progression. This work provides a basic overview of metabolic changes occurring during depressive disorders.

Keywords: depression, metabolomics, lipid metabolism

Newslab, 2022; roč. 13 (1): 23 – 25

Depresia

Depresia je závažné, neuropsychiatrické ochorenie, ktoré v súčasnosti postihuje až 350 miliónov ľudí na celom svete. Depresia je jednou z najviac invalidizujúcich chorôb a spôsobuje značnú záťaž pre jednotlivca aj pre spoločnosť⁽¹⁾. Počas pandemickej krízy COVID-19 sa celosvetovo zvýšil výskyt príznakov úzkosti, depresie, posttraumatického stresu či psychických ťažkostí, čo naznačuje sedemnásobné zvýšenie prevalencie v porovnaní s rokom 2017⁽²⁾. Medzi kľúčové príznaky depresie patrí zlá nálada, strata záujmu a potešenia, deficit koncentrácie, pocity bezcennosti, chudnutie a nespavosť. Depresia môže byť často vyvolaná psychickým stresom a je spojená s dysfunkciou osi hypotalamus – hypofýza – nadobličky. Dysfunkcia tohto systému je potom závažným rizikovým faktorom vzniku a progresie kardiovaskulárnych a iných ochorení. Okrem toho vykazujú pacienti s výraznou depresiou zvýšenie sérových hladín prozápalových cytokínov⁽³⁾.

Je známe, že depresia je veľmi heterogénne ochorenie, ktorého príznaky, stupeň ťažkosti aj odpoveď na liečbu sú veľmi individuálne, preto sa depresia stáva iba čiastočne predpovedateľnou klinickými profilmi príznakov. Úsilie o lepšie analyzovanie tejto heterogenity zahŕňa molekulárne, fyziologické, zobrazovacie a neuropsychologické opatrenia kombinované s klinickými údajmi s cieľom uľahčiť personalizovanú starostlivosť o pacienta⁽⁴⁾.

Bohužiaľ, súčasný stav pochopenia depresie je do veľkej miery obmedzený⁽⁵⁾. Vzhľadom na jej vysokú prevalenciu je znepokojujúce, že antidepresíva vykazujú iba miernu účinnosť pri jej liečbe⁽⁶⁾. Rovnako nemôžeme predpovedať, ako môže individuálny pacient reagovať na zvolenú terapiu⁽⁵⁾. Mimoriadne vysoká osobná a spoločenská záťaž zdôrazňuje potrebu overených biomarkerov, ktoré by pomohli zodpovedne určiť diagnózu, usmerniť výber liekov a spoľahlivo predpovedať odpoveď na liečbu. Existujú však molekulárne mechanizmy, ktoré môžu pomôcť odhaliť patológiu depresie, a tak prispieť k jej diagnostike a liečbe s ohľadom na individualitu pacienta⁽⁷⁾.

Metabolomika

Vývoj a validácia genetických, proteomických a metabolických metód môže byť nevyhnutná pri identifikácii patofyziológie, expresie, ako aj medikamentózneho liečby. Metabolomika sa v súčasnosti objavila ako obzvlášť hodnotná oblasť výskumu v psychiatrii, pretože na rozdiel od genomiky zachytáva dynamický charakter choroby a na rozdiel od proteomiky meria konečné produkty komplexných interakcií medzi mnohými proteínmi, signalizačnými kaskádami a bunčným prostredím⁽⁸⁾.

Metabolomika je vhodný prostriedok na pochopenie biologických systémov chorôb identifikáciou metabolických substrátov a produktov biochemického systému. Umožňuje

odhaliť stav daných buniek, tkanív a organizmov⁽⁹⁾. Je to najnovší spôsob prístupu „omics“, ktorý slúži na definovanie porúch metabolických dráh a sietí počas choroby. Okrem toho prispieva k objavu a vývoju liečiv tým, že poskytuje podrobné biochemické údaje o liekoch, ich mechanizme účinku, terapeutickom potenciáli a vedľajších účinkoch⁽⁹⁾.

Je známe, že počas depresie dochádza k poruchám energetického metabolizmu, ako aj k významným zmenám v metabolizme aminokyselín a lipidov⁽¹⁰⁾. Depresia je jednou z najzávažnejších chorôb, pretože spôsobuje veľké bremeno pre jednotlivca i pre celú spoločnosť. Okrem toho výskyt depresie je zásadným spôsobom spojený s výskytom iných chorôb⁽¹⁾. Prítomnosť, príznaky aj trvanie depresívnej fázy sa medzi jednotlivcami líšia. Presná identifikácia depresie je nevyhnutným prvým krokom v liečbe a starostlivosti o ľudí trpiacich týmito ochoreniami a je obzvlášť dôležitá pre ľudí s chronickými zdravotnými problémami, u ktorých sa zdá, že majú vyššiu prevalenciu depresie ako bežná populácia⁽¹¹⁾. Metabolity priamo reprezentujú stav buniek, ktorý odráža celkový fyziologický fenotyp. Zmeny metabolickej aktivity úzko súvisia s mnohými chorobami vrátane depresie. Preto metabolický fenotyping pomáha pri včasnej diagnostike, štúdiu, a subtypovaní chorôb na molekulárnej úrovni. Na kvantifikáciu širokého spektra metabolitov v komplexných biologických vzorkách sa hmotnostná spektrometria stáva jednou z metód efektívnej voľby. Bežným diagnostickým metódam chýba citlivosť a špecifickosť⁽⁸⁾.

Teória vzniku depresívnych porúch

Monoamínová teória vykresľuje verziu, že riziko rozvoja depresie je v úzkej korelácii so zníženými hladinami centrálnych dostupných monoamínov. Ide najmä o katecholamíny, a to noradrenalín, indoleamín a sérotonín⁽¹²⁾. Neurogénna alebo hipokampálna teória zasa hovorí o narušenej neurogéneze u dospelých jedincov počas depresie, keďže v hipokampe sa u každého dospelého jedinca tvorí približne 700 nových granulovaných buniek denne⁽¹³⁾. Pacienti trpiaci depresiou majú vo všeobecnosti menší hipokampus a vyššie hladiny glukokortikoidov, ktoré môžu narušiť proces neurogenézy a tak podporiť vznik depresie⁽¹³⁾. Inflamačnou teóriou vzniku depresie sa vedci zaoberali posledných 14 rokov. Prišli s názorom, že fyzický, ale aj psychologický (emocionálny) stres zvyšuje riziko rozvoja mentálnych ochorení v dôsledku sledu hormonálnych, biochemických a epigenetických mechanizmov, ku ktorým patrí kynurenínová dráha, inflamačné enzýmy, oxidačný, nitrozačný stres, proinflamačné a antiinflamačné cytokíny, hypotalamo-hypofýzová os alebo somatické komorbidity⁽¹⁴⁾.

LITERATÚRA

1. Sobocki P, Jönsson B, Angst J, Rehnberg C. Cost of depression in Europe. The Journal of mental health policy and economics. Jun 2006; 9(2): 87-98.
2. Bueno-Notivol J, Gracia-García P, Olaya B, Lasheras I, López-Antón R, Santabárbara J. Prevalence of depression during the COVID-19 outbreak: A meta-analysis of community-based studies. International journal of clinical and health psychology : IJCHP. Jan-Apr 2021; 21(1): 100196.
3. Smith KJ, Au B, Ollis L, Schmitz N. The association between C-reactive protein, Interleukin-6 and depression among older adults in the community: A systematic review and meta-analysis. Experimental gerontology. Feb 2018; 102: 109-132.

Lipidový metabolizmus pri depresii

S depresiou sa významne spája metabolizmus lipidov, pretože mozog je po tukovom tkanive druhou najväčšou zásobárňou tukov⁽¹⁵⁾. Z toho dôvodu lipidomika, odvetvie metabolomiky zamerané na sledovanie a objasňovanie lipidových dráh, získala v posledných rokoch významnú pozornosť a považuje sa za nevyhnutný nástroj na skúmanie mnohých neurodegeneratívnych chorôb, nielen depresie. Hypotéza polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) v poslednom čase naznačuje, že metabolizmus fosfo- a sfingolipidov zahŕňa potenciálne dráhy ochorenia⁽¹⁵⁾. Posledný výskum zdôraznil potenciálnu úlohu monitorovania periférnych PUFA a cholesterolu pri predikcii, stratifikácii a riadení depresívnych ochorení. Najdôležitejšie však bude objasniť, či také zmeny metabolizmu lipidov sú patofyziológiou hnacej sily depresie alebo dôsledkom choroby⁽¹⁶⁾. Klavins (2015) hlásil aj zmeny hladín fosfatidylcholínov (PC) a lyzofosfatidylcholínov (LysoPC) u stresovaných ľudí⁽¹⁷⁾. Znížené hladiny PC môžu byť spojené s aberantnou aktivitou fosfolipázy A2 (PLA2). PLA2 sú enzýmy, ktoré katalyzujú štiepenie mastných kyselín z pozície sn-2 a produkujú voľné mastné kyseliny a lysoPC⁽¹⁸⁾. Ďalšou, významnou skupinou lipidov, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v patofyziológii depresie, sú sfingomyelíny. Sfingolipidy v membránach neurónov hrajú dôležitú úlohu pri transdukcii signálu, buď moduláciou lokalizácie a aktivácie membránových receptorov, alebo pôsobením ako prekursorov bioaktívnych lipidových mediátorov⁽¹⁹⁾. Aktivácia receptorov cytokínových a neurotrofických faktorov viazaných na sfingomyelinázy vedie k tvorbe ceramidov a gangliozidov, ktoré zasa modifikujú štruktúrnu a funkčnú plasticitu neurónov. V starnúcich a neurodegeneratívnych podmienkach nastáva nadmerná produkcia a akumulácia ceramidov a zvýšený oxidačný stres spojený s membránou, ktoré následne modifikujú štruktúrnu a funkčnú plasticitu neurónov, čo následne vyúsťuje do zápalových procesov, pri ktorých dochádza k degradácii neurónov. Štúdie vzoriek mozgového tkaniva ľudí a experimentálnych zvierat naznačujú, že porucha metabolizmu sfingomyelínov je kľúčovou udalosťou pri dysfunkcii a degenerácii neurónov, ku ktorej dochádza pri depresii^(10,20).

Podakovanie

Táto práca bola podporená vedeckou grantovou agentúrou VEGA (1/0658/20).

4. Rush AJ, Ibrahim HM. Speculations on the Future of Psychiatric Diagnosis. The Journal of nervous and mental disease. Jun 2018; 206(6): 481-487.
5. Weiden PJ, Buckley PF. Reducing the burden of side effects during long-term antipsychotic therapy: the role of "switching" medications. The Journal of clinical psychiatry. 2007; 68 Suppl 6: 14-23.
6. DiMatteo MR, Lepper HS, Croghan TW. Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence. Archives of internal medicine. Jul 24 2000; 160(14): 2101-2107.

7. Martins-de-Souza D. Comprehending depression through proteomics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2012; 15(10): 1373-1374.
8. Czysz AH, South C, Gadad BS, et al. Can targeted metabolomics predict depression recovery? Results from the CO-MED trial. *Translational Psychiatry*. 2019/01/16 2019; 9(1): 11.
9. Kaddurah-Daouk R, Krishnan KR. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. Jan 2009; 34(1): 173-186.
10. Leskanicova A, Babincak M, Mochnacky F, et al. Sex-dependent differences in stress-induced depression in Wistar rats are accompanied predominantly by changes in phosphatidylcholines and sphingomyelins. *Journal of physiology and pharmacology* : an official journal of the Polish Physiological Society. Aug 2021; 72(4).
11. National Collaborating Centre for Mental H. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Depression in Adults with a Chronic Physical Health Problem: Treatment and Management. Leicester (UK): British Psychological Society The British Psychological Society & The Royal College of Psychiatrists.; 2010.
12. Mulinari S. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. *Journal of the history of the neurosciences*. 2012; 21(4): 366-392.
13. Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, et al. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tri-carboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *The Journal of nutrition*. Jun 2009; 139(6): 1073-1081.
14. Galecki P, Talarowska M. Inflammatory theory of depression. *Psychiatria Polska*. 06/30 2018; 52: 437-447.
15. Demirkan A, Isaacs A, Ugozsa P, et al. Plasma phosphatidylcholine and sphingomyelin concentrations are associated with depression and anxiety symptoms in a Dutch family-based lipidomics study. *Journal of psychiatric research*. Mar 2013; 47(3): 357-362.
16. Parekh A, Smeeth D, Milner Y, Thure S. The Role of Lipid Biomarkers in Major Depression. *Healthcare (Basel)*. 2017; 5(1): 5.
17. Klavins K, Koal T, Dallmann G, Marksteiner J, Kemmler G, Humpel C. The ratio of phosphatidylcholines to lysophosphatidylcholines in plasma differentiates healthy controls from patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)*. Sep 2 2015; 1(3): 295-302.
18. Hicks JB, Lai Y, Sheng W, et al. Amyloid-beta peptide induces temporal membrane biphasic changes in astrocytes through cytosolic phospholipase A2. *Biochimica et biophysica acta*. Nov 2008; 1778(11): 2512-2519.
19. Executive B. Global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social workers at the country level. Geneva: World Health Organization; 2012.
20. Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, Mattson MP. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. Aug 2010; 1801(8): 878-886.

RNDr. Andrea Leškaničová

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Prírodovedecká fakulta,
Ústav biologických a ekologických vied
Šrobárova 2, 040 01 Košice
e-mail: andrea.leskanicova@student.upjs.sk

The role of epigenetics in endometrial cancer

Dominik Kodada¹, Nikola Nyarivova¹, Gabriel Minarik², Vanda Repiska¹

¹Comenius University in Bratislava Faculty of Medicine, Department of clinical biology, genetics and clinical genetics, Bratislava

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

Endometrial adenocarcinoma, often referred as the endometrial cancer, is the most common kind of uterine cancer. It's incidence is rising in last decades and each year tens of thousands of women worldwide are diagnosed with one of two types of endometrial cancer. It is observed that relatively higher incidence is in the developed world countries, in North America and central Europe. These unfortunate statistics are also an opportunity for these regions to study its forming process and possible ways how this malignancy emerges on the cellular level. As it is with such multifactorial diseases, it undergoes a complex development during which affected cells undergo many changes in their genetic information as well as in their epigenetic modifications. Not all of them should be considered the oncological drivers, but passengers of the rapid changes in adenocarcinoma tissues may also affect its staging. Therefore, the studies of the mutations, DNA epimutations, changes in histone code or micro-RNA molecules and disturbed hormone signalling pathways may be crucial for understanding of carcinogenesis process. The passengers with significant correlation rates, even though they are not crucial for potential therapy, may have their role in the development of new diagnostic tools. In this article, we provide a review of epigenetic changes affecting endometrial cancer types.

Keywords: Endometrial cancer development, epigenetics, type 2 endometrial cancer, DNA methylation, OncomiRs

Úloha epigenetiky pri rakovine endometria

Endometriálny adenokarcinóm, uvádzaný často aj ako rakovina endometria, je najčastejším druhom rakoviny maternice. V posledných desaťročiach možno sledovať nárast jeho výskytu a každoročne sú desiatitisíce žien na celom svete diagnostikované jedným z dvoch typov rakoviny endometria. Známe je, že relatívne vyšší výskyt pozorujeme vo vyspelých krajinách sveta, najmä v štátoch Severnej Ameriky a strednej Európy. Táto nepríjemná štatistika je však tiež možnou príležitosťou pre tieto regióny študovať karcinogézu a možné spôsoby, aké sú príčiny a dôsledky tejto malignity na bunkovej úrovni. Ako to býva pri multifaktoriálnych ochoreniach, postihnuté bunky prechádzajú nielen mnohými zmenami genetickej informácie, ale aj epigenetickými modifikáciami. Nie všetky by sa mali považovať za kritické pre onkologický proces, no aj sprievodné modifikácie v tkanivách adenokarcinómu môžu ovplyvniť vývoj malignity. Preto môže byť štúdium mutácií, epigenetických zmien v DNA, zmien v histónovom kóde alebo molekulách mikroRNA, prípadne narušených hormonálnych signálnych dráhach kľúčové pre pochopenie procesu karcinogézy. Sprievodné zmeny s významnou mierou korelácie, aj keď nie sú rozhodujúce pre potenciálnu terapiu, môžu mať svoju úlohu pri vývoji nových klinicky relevantných nástrojov. V tomto článku podávame prehľad epigenetických zmien ovplyvňujúcich oba typy rakoviny endometria.

Kľúčové slová: karcinogéza rakoviny endometria, epigenetika, rakovina endometria 2. typu, DNA metylácia, OncomiRs

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 26 – 30

Introduction

Endometrial cancer (EC) is the second most common gynecologic cancer (after breast cancer) and seventh most common cancer worldwide among females^(1,2). Regions of Central and eastern Europe had the second highest cumulative risk in both incidence (2,48%) and mortality (0,47%) in 2020. In estimated age-standardized incidence rates of all ages, Slovakia is ranked 15th of all countries (Table 1)⁽²⁾.

The full mechanisms of EC development remain unclear but there is growing number of molecules (hormones, proteins and RNAs) reported to have a role in carcinogenic process. Mutations in coding regions of functional molecules same as their regulation is crucial for EC development. In last

decades, the research is getting more focused on epigenetic changes, such as hypermethylation, deacetylation of histones or RNA interference^(1,3,4). The epigenetic modifications seems to be more frequent in EC than genetic changes, therefore they could potentially serve as a diagnostic tool⁽⁴⁾.

Types of endometrial cancer and their differences

There are two types of EC differing in the body estrogen excess and the rate of spreading. Type 1 is more common (80% of cases), growing slower and linked to excess of estrogen. It occurs mostly among premenopausal and perimenopausal women. Type 2, on the other hand, is faster growing one, without apparent multistage pro-

Table 1. The list of countries with highest rate of endometrial cancer in 2020. Both age-standardized rates cumulative risk were estimated for all ages⁽²⁸⁾.

Rank	Country	Age-standardized incidence (per 100 000)	Cumulative risk (%)
1.	Poland	26.2	4.57
2.	Lithuania	25.4	4.41
3.	Samoa	24.7	3.42
4.	Belarus	23.6	3.59
5.	Jamaica	22.3	5.43
6.	Ukraine	22.1	3.38
7.	North Macedonia	21.8	3.22
8.	Bahamas	21.8	5.55
9.	United States of America	21.4	3.74
10.	Trinidad and Tobago	20.5	4.19
11.	Barbados	20.4	4.38
12.	Cuba	20.1	3.98
13.	Ireland	20.0	3.80
14.	Russian Federation	19.7	3.26
15.	Slovakia	19.7	3.69
16.	Slovenia	19.6	3.82
17.	Greece	19.2	3.34
18.	Canada	18.6	3.32
19.	Bulgaria	18.3	3.08
20.	Czechia	18.0	3.65
21.	Serbia	17.9	3.04
22.	New Zealand	17.7	3.05
23.	Latvia	17.6	3.10
24.	Croatia	16.8	3.16
25.	United Kingdom	16.7	3.42
26.	Singapore	16.4	2.49
27.	Norway	16.0	3.53
28.	Hungary	15.5	2.96
29.	Estonia	15.4	2.86
30.	Malta	15.2	3.32

cess. It is not linked to excess estrogen in the body, mostly developing among postmenopausal women^(5,6). Typical for type 1 EC is sequence of changes from normal endometrium, through hyperplasia, to precancerous lesion

(Figure 1). The transition from stage-to-stage is believed to be accompanied with accumulation of mutations in oncogenes, tumor suppressor genes DNA maintenance genes and their regulators⁽⁶⁾.

Molecular characterization of endometrioid tumors

One of the latest classifications is subtyping the endometrial tumors based on their molecular DNA background. Even though these molecular subgroups has not been implemented in clinical routine so far, studies confirm their prognostic relevance^(7,8).

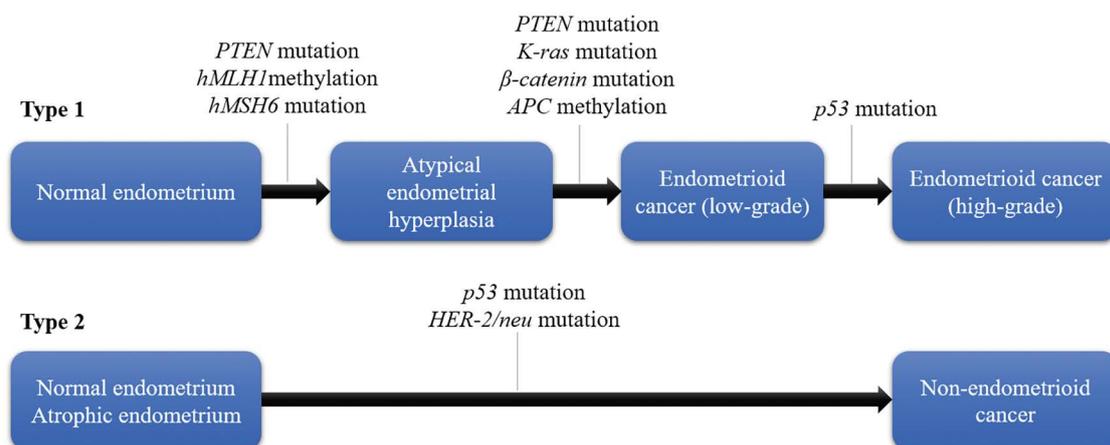
These four groups of carcinomas, independent on histological subtype, are POLE ultramutated (group 1), microsatellite instability (group 2), low-copy-number alterations (group 3), and high-copy-number alterations and TP53 mutations (group 4)^(9,10).

The POLE mutated EC is characterised by pathogenic variants in the DNA polymerase-epsilon (POLE) exonuclease domain mostly in one of the five hot-spots: P286R, V411L, S297F, A456P and S459F. This group presents itself at the younger age of patient and has excellent prognosis^(7,10). The second group is typically mismatch repair (MMR) deficient and the prognostic level is intermediate. The p53 mutant EC, in accordance with Type 2 classification, presents itself at late stage which correlates with its poor prognosis. The MMR-proficient, POLE and p53 wildtype group, often referred as NSMP EC (no specific molecular profile) has intermediate to excellent prognosis and is associated with higher body mass index⁽¹⁰⁾.

The role of epigenetics - promotor methylation

The regulation of EC stage-to-stage transition could be provided by activity of DNA methyltransferases, particularly *de novo* DNA methyltransferases. Their modification of CpG rich regions (often found in promoter regions, first exons or terminal parts of genes coding untranslated regions) has a crucial role for gene expression. Changed methylation of the *hMLH1* gene is considered one of the earliest steps in multi-stage endometrial carcinogenesis and is found in ~30 – 40% of cases^(11,12). This gene encodes the homolog of bacterial DNA mismatch repair protein and the malfunctional expres-

Figure 1. Stages of carcinogenesis in both endometrial cancer types^{(derived from (6) and modified)}.



sion of the gene (caused by hypermethylation) is associated with other cancer kinds⁽¹³⁻¹⁵⁾. Kawaguchi *et al.*⁽¹⁶⁾ reported that abnormalities in the mismatch repair genes (including *hMLH1*) leads to microsatellite instability which cascades into further mutations and increase in gene instability of other cancer related genes. Therefore, it has been recently proposed, in conformity with the recent group 1 – 4 subtyping, the MMR proteins and loss of MLH1 should be tested for promoter hypermethylation to evaluate its epigenetic mechanism. Subsequent POLE and p53 studies are also encouraged⁽⁶⁾.

There is also strong correlation between estrogen levels and expression of *hMLH1*. MMR activity was increased in high estrogen conditions for *in vitro* cultivated endometrial epithelial cells. High estrogen levels could therefore protect from EC development⁽¹²⁾. Cyclic production of estrogen and progesterone in menstruation cycle as well as decline of sex steroid hormone after menopause have direct effect on proliferation and morphology of endometrial tissue⁽³⁾. Methylation of the estrogen and progesterone receptor genes were therefore studied in EC cells. They both contain a CpG region in the first exon, but its methylation level have been variable in recent studies, thus its effect is not yet fully understood⁽³⁾.

During the atypical endometrial hyperplasia, the next stage of EC development, hypermethylation of *APC* promotor is likely to happen, since it is not methylated in normal endometrium, frequently hypermethylated in early cancer stages, but the methylation level is decreasing with an increase in the clinical stage⁽¹⁷⁾. E-cadherin is tumor suppressor encoded by *CDH1* gene, which promoter is also susceptible to hypermethylation. Decrease of its expression is not only sign of EC development but has an unfortunate 5-year clinical survival rate⁽¹⁸⁾. Most known affected gene in type 1 EC is *PTEN*. It functions as tumor suppressor gene, regulating proliferation and apoptosis. Its mutation occurs in 26 – 80% of EC, either at development of atypical endometrial hyperplasia or at low grade endometrioid cancer, quite possibly as a consequence of MMR dysfunction^(3,6). There is a possibility, that this gene may be downregulated by hypermethylation, as well⁽¹⁹⁾, although, its analysis of the methylation status is quite challenging, since it is 98% identical to *PTEN* pseudogene (*psiPTEN*)⁽²⁰⁾. The other methylation affected genes in EC development are regulators of proliferation (*HOXA11*, *TGF-βRII*), apoptosis (*CASP8*), hormone metabolism (*COMT*) or other tumor suppressors (*RSK4*, *P73*, *RASSF1A*). For specifics about their involvement in EC, see⁽¹⁾.

The type 2 EC have distinct methylation patterns. The promoters of many genes mentioned above (*hMLH1*, *APC*, *PTEN*, *RASSF1A*, progesterone receptor coding gene) are detected more frequently in type 1 tumors. Such findings indicates that the process of DNA methylation is predominant in type 1 EC and in type 2 it may have less significant role^(3,21,22).

The role of epigenetics - microRNAs

Another way of epigenetic regulation in EC is via microRNA (miRNA) molecules. They may contribute via

RNA-associated silencing, but their genes are also under epigenetic regulation. miRNAs are short (19 – 25 nt), noncoding, single-stranded RNA molecules produced by RNA polymerase II or III usually cleaved from primary transcripts by RNase III^(4,23). Targeting of specific miRNA is not trivial since it is potentially able to regulate hundreds of genes and each transcript may be regulated by several miRNAs⁽²⁴⁾.

The epigenetic regulation of miRNA is occurring on several levels since their production is also regulated by methylation level CpG-rich domains. Favier *et al.*⁽⁴⁾ have recently published a complex review for miRNAs with increased (n=140), decreased (n=148) and miRNAs with discordant expression (n=22) in EC from over 100 articles. Additionally, the complex review reports about miRNAs with changed methylation level, six hypomethylated miRNAs and nine hypermethylated ones. Unsurprisingly, the majority of hypermethylated miRNAs (miR-638, miR-137, miR-633, miR-34b, miR-124a-2, miR-124a-3, miR-152, miR-129-2)^(4,25-31) are tumor suppressors and the hypomethylated (miR-182, miR-200b, miR-130a/b, miR-625, miR-222, miR-208a)^(4,29,32,33) are OncomiRs, the miRNAs associated with the cancer development. Particularly interesting are two miRNAs directly involved in DNA methylation of specific loci. miR-30d is responsible for methylation of CpG region in *H19 noncoding RNA* gene and miR191 downregulates the TET1 expression, the enzyme responsible for methylation removal in promoters of tumor suppressors (E.g., *APC*)^(34,35).

From vast list of miRNAs that are associated with EC and could serve as diagnostic markers, most known are miR-182, miR-183, miR-200 and miR-205^(4,36). miR-182 targets the CUL5 protein, ubiquitin ligase, which has altered expression in several types of cancers. CUL5 overexpression in EC model cell line resulted in decreased cell proliferation⁽³²⁾. CPEB1 mRNA is targeted, and its expression is downregulated by miR-183, which promotes cell proliferation, migration, invasion, and *in vivo* tumorigenesis in EC⁽³⁷⁾. The miR-200 family affects the PI3K/AKT/mTOR by downregulation of PTEN, tumor suppressor protein⁽⁴⁾. Since miR-205 is overexpressed not only in EC⁽³⁶⁾, but also in other types of cancer^(38,39), Favier *et al.*⁽⁴⁾ do not find it suitable for diagnosis of EC but considers it as potential prognostic biomarker.

Conclusion

Although, the high number of factors responsible for development of EC, either environmental, hormonal, genetic or epigenetic, we still need many pieces of complex mosaic, to finish the whole picture of this carcinogenic process. Such discoveries might serve as a useful prognostic and diagnostic tool. Because of high rate of EC in regions of Central and Easter Europe (see **Table 1**), we suggest investigating the methylation status Slovak endometrial cancer samples to compare found gene inactivation with known data. Thus, it might be possible to adjust diagnosis in our region.

Acknowledgements

This article was created with the support of the OP Integrated Infrastructure for the project: Center for biomedical research – BIOMEDIRES – II. phase, ITMS: 313011W428, co-financed by the European Regional Development Fund.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

REFERENCES

- Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Susumu N, Aoki D. Epigenetics and genetics in endometrial cancer: new carcinogenic mechanisms and relationship with clinical practice. *Epigenomics*. 2012 Apr; 4(2): 147-62. doi: 10.2217/epi.12.13.
- Global Cancer Observatory, gco.iarc.fr, (28. September 2021).
- Tao MH, Freudenheim JL. DNA methylation in endometrial cancer. *Epigenetics*. 2010 Aug 16; 5(6): 491-8. doi: 10.4161/epi.5.6.12431. Epub 2010 Aug 16.
- Favier A, Rocher G, Larsen AK, Delangle R, Uzan C, Sabbah M, Caste-la M, Duval A, Mehats C, Canlorbe G. MicroRNA as Epigenetic Modifiers in Endometrial Cancer: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 6; 13(5): 1137. doi: 10.3390/cancers13051137.
- Cancer Research UK, cancerresearchuk.org/about-cancer/womb-cancer/types-grades, (26. September 2021).
- Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and epigenetics. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2014 Aug; 40(8): 1957-67. doi: 10.1111/jog.12442.
- Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology*. 2020 Jan; 76(1): 52-63. doi: 10.1111/his.14015.
- Goulder A, Gaillard SL. Molecular classification of endometrial cancer: entering an era of precision medicine. *Journal of Gynecologic Oncology*, 2022 May; 33(3): e47. doi: 10.3802/jgo.2022.33.e47.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 May 2; 497(7447): 67-73. doi: 10.1038/nature12113.
- Kim KR, Lax SF, Lazar AJ, Longacre TA, Malpica A, Matias-Guiu X, Nucci M, Oliva E. Tumours of the Uterine Corpus in WHO Classification of Female Genital Tumours, 5th ed.; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2020; Volume 4.
- Muraki Y, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kawaguchi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. Epigenetic DNA hypermethylation: clinical applications in endometrial cancer (Review). *Oncol Rep*. 2009 Nov; 22(5): 967-72. doi: 10.3892/or_00000523.
- Miyamoto T, Shiozawa T, Kashima H, Feng YZ, Suzuki A, Kurai M, Nikaido T, Konishi I. Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. *Endocrinology*. 2006 Oct; 147(10): 4863-70. doi: 10.1210/en.2006-0632. Epub 2006 Jul 6.
- Endoh Y, Tamura G, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Frequent hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in differentiated-type tumors of the stomach with the gastric foveolar phenotype. *Am J Pathol*. 2000 Sep; 157(3): 717-22. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64584-1.
- Truninger K, Menigatti M, Luz J, Russell A, Haider R, Gebbers JO, Bannwart F, Yurtsever H, Neuweiler J, Riehle HM, Cattaruzza MS, Heinemann K, Schär P, Jiricny J, Marra G. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005 May; 128(5): 1160-71. doi: 10.1053/j.gastro.2005.01.056.
- Chang Z, Zhang W, Chang Z, Song M, Qin Y, Chang F, Guo H, Wei Q. Expression characteristics of FHIT, p53, BRCA2 and MLH1 in families with a history of oesophageal cancer in a region with a high incidence of oesophageal cancer. *Oncol Lett*. 2015 Jan; 9(1): 430-436. doi: 10.3892/ol.2014.2682. Epub 2014 Nov 7.
- Kawaguchi M, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kishimi A, Ogawa S, Kisu I, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. Analysis of candidate target genes for mononucleotide repeat mutation in microsatellite instability-high (MSI-H) endometrial cancer. *Int J Oncol*. 2009 Nov; 35(5): 977-82. doi: 10.3892/ijo_00000411.
- Ignatov A, Bischoff J, Ignatov T, Schwarzenau C, Krebs T, Kuester D, Costa SD, Roessner A, Semczuk A, Schneider-Stock R. APC promoter hypermethylation is an early event in endometrial tumorigenesis. *Cancer Sci*. 2010 Feb; 101(2): 321-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01397.x. Epub 2009 Oct 12.
- Yi TZ, Guo J, Zhou L, Chen X, Mi RR, Qu QX, Zheng JH, Zhai L. Prognostic value of E-cadherin expression and CDH1 promoter methylation in patients with endometrial carcinoma. *Cancer Invest*. 2011 Jan; 29(1): 86-92. doi: 10.3109/07357907.2010.512603. Epub 2010 Sep 27.
- Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, Gruber P, MacDonald ND, Ryan A, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *Int J Oncol*. 2004 Dec; 25(6): 1615-23.
- Zysman MA, Chapman WB, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol*. 2002 Mar; 160(3): 795-800. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64902-4. Erratum in: *Am J Pathol* 2002 Jun; 160(6): 2311.
- Risinger JI, Maxwell GL, Berchuck A, Barrett JC. Promoter hypermethylation as an epigenetic component in Type I and Type II endometrial cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Mar; 983: 208-12. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb05975.x.
- Liao X, Siu MK, Chan KY, Wong ES, Ngan HY, Chan QK, Li AS, Khoo US, Cheung AN. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2008 Jul 15; 123(2): 296-302. doi: 10.1002/ijc.23494.
- Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*. 2014 Sep-Oct; 64(5): 311-36. doi: 10.3322/caac.21244. Epub 2014 Aug 7.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan; 36(Database issue): D149-53. doi: 10.1093/nar/gkm995. Epub 2007 Dec 23.
- Ni J, Liang S, Shan B, Tian W, Wang H, Ren Y. Methylation-associated silencing of miR-638 promotes endometrial carcinoma progression by targeting MEF2C. *Int J Mol Med*. 2020 Jun; 45(6): 1753-1770. doi: 10.3892/ijmm.2020.4540. Epub 2020 Mar 16.
- Zhang W, Chen JH, Shan T, Aguilera-Barrantes I, Wang LS, Huang TH, Rader JS, Sheng X, Huang YW. miR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation. *Lab Invest*. 2018 Nov; 98(11): 1397-1407. doi: 10.1038/s41374-018-0092-x. Epub 2018 Jun 28.
- Yanokura M, Banno K, Adachi M, Aoki D, Abe K. Genome-wide DNA methylation sequencing reveals miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer. *Int J Oncol*. 2017 Jun; 50(6): 1934-1946. doi: 10.3892/ijo.2017.3966. Epub 2017 Apr 19.
- Hiroki E, Suzuki F, Akahira J, Nagase S, Ito K, Sugawara J, Miki Y, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. MicroRNA-34 b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2012 Aug 15; 131(4): E395-404. doi: 10.1002/ijc.27345. Epub 2012 Feb 28.
- Pavicic W, Perkiö E, Kaur S, Peltomäki P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med*. 2011; 17(7-8): 726-35. doi: 10.2119/molmed.2010.00239. Epub 2011 Feb 9.
- Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2011 Oct 15; 71(20): 6450-62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0364. Epub 2011 Aug 25.

- 31.** Huang YW, Liu JC, Deatherage DE, Luo J, Mutch DG, Goodfellow PJ, Miller DS, Huang TH. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer Res.* 2009 Dec 1; 69(23): 9038-46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1499. Epub 2009 Nov 3.
- 32.** Devor EJ, Schickling BM, Reyes HD, Warriar A, Lindsay B, Goodheart MJ, Santillan DA, Leslie KK. Cullin-5, a ubiquitin ligase scaffold protein, is significantly underexpressed in endometrial adenocarcinomas and is a target of miR-182. *Oncol Rep.* 2016 Apr; 35(4): 2461-5. doi: 10.3892/or.2016.4605. Epub 2016 Feb 1.
- 33.** Li BL, Lu W, Lu C, Qu JJ, Yang TT, Yan Q, Wan XP. CpG island hypermethylation-associated silencing of microRNAs promotes human endometrial cancer. *Cancer Cell Int.* 2013 May 16; 13(1): 44. doi: 10.1186/1475-2867-13-44.
- 34.** Moreno-Moya JM, Vilella F, Martínez S, Pellicer A, Simón C. The transcriptomic and proteomic effects of ectopic overexpression of miR-30d in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2014 Jun; 20(6): 550-66. doi: 10.1093/molehr/gau010. Epub 2014 Jan 30.
- 35.** Yang C, Ota-Kurogi N, Ikeda K, Okumura T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. MicroRNA-191 regulates endometrial cancer cell growth via TET1-mediated epigenetic modulation of APC. *J Biochem.* 2020 Jul 1; 168(1): 7-14. doi: 10.1093/jb/mvaa014.
- 36.** Donkers H, Bekkers R, Galaal K. Diagnostic value of microRNA panel in endometrial cancer: A systematic review. *Oncotarget.* 2020 May 26; 11(21): 2010-2023. doi: 10.18632/oncotarget.27601.
- 37.** Xiong H, Chen R, Liu S, Lin Q, Chen H, Jiang Q. MicroRNA-183 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes endometrial cancer cell migration and invasion in by targeting CPEB1. *J Cell Biochem.* 2018 Nov; 119(10): 8123-8137. doi: 10.1002/jcb.26763. Epub 2018 Jun 20.
- 38.** Li JH, Sun SS, Li N, Lv P, Xie SY, Wang PY. MiR-205 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Oncotarget.* 2017 Aug 14; 8(54): 91938-91949. doi: 10.18632/oncotarget.20262.
- 39.** Chauhan N, Dhasmana A, Jaggi M, Chauhan SC, Yallapu MM. miR-205: A Potential Biomedicine for Cancer Therapy. *Cells.* 2020 Aug 25; 9(9): 1957. doi: 10.3390/cells9091957.

Mgr. Dominik Kodada

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK

Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

e-mail: dominikkodada@gmail.com

Extracelulárna mitochondriálna DNA ako neinvazívny biomarker nádorových ochorení

Silvia Bokorová^{1,2}, Katarína Suroviaková³, Ondrej Pös^{1,2}, Werner Krampfl^{1,2,3},
Jakub Styk^{1,2,4}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

¹Geneton, s. r. o., Bratislava, Slovensko

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

³Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

⁴Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

Mitochondrie zohrávajú esenciálnu úlohu v energetickom metabolizme bunky a tak ovplyvňujú dôležité bunkové funkcie, ktoré môžu súvisieť s rozvojom nádorových ochorení. Molekuly mitochondriálnej DNA (mtDNA) môžu byť aktívnou alebo pasívnou cestou vylučované z buniek do extracelulárneho priestoru, čím sa z nich stáva cirkulujúca mtDNA (cf-mtDNA). Tento fakt otvára nové možnosti pre včasnú a neinvazívnu analýzu nádorového genetického profilu z tekutých biopsií. Súčasnú metódu umožňujú analyzovať hneď niekoľko parametrov, ako sú tumorovo špecifické mutácie mtDNA, zmena počtu kópií mtDNA alebo rozdielne dĺžky fragmentov cf-mtDNA v cirkulácii. Jednotlivé metódy analýzy cf-mtDNA sa neustále vyvíjajú, a preto by implementácia získaných poznatkov mohla byť základom pre efektívnejšiu prevenciu a celkový manažment nádorových ochorení. Aj keď využiteľnosť cf-mtDNA stále varíruje pri rôznych typoch nádorových ochorení, a jej analýza čelí limitáciám, ako je heteroplasmia, definitívne možno vyhlásiť, že cf-mtDNA má diagnostický a/alebo prognostický potenciál ako neinvazívny biomarker nádorových ochorení.

Kľúčové slová: mitochondria, cf-mtDNA, heteroplasmia, biomarker

Extracellular mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker of cancer

Mitochondria play an essential role in the energy metabolism of cells and thus affect essential cellular functions possibly associated with cancer development. Mitochondrial DNA (mtDNA) molecules can be released from cells into the extracellular space by an active or passive mechanism, making them circulating mtDNA (cf-mtDNA). This fact opens up new possibilities for early and non-invasive analysis of the tumour genetic profile from liquid biopsies. Current methods allow the analysis of several parameters, such as tumour-specific mtDNA mutations, mtDNA copy number changes, or different lengths of cf-mtDNA fragments in circulation. Methods of cf-mtDNA analysis are constantly evolving. Thus, implementing the acquired knowledge could be the basis for more effective prevention and overall management of cancer. Although the utility of cf-mtDNA still varies in various types of cancer, and its analysis faces limitations such as heteroplasmy, it can be declared that cf-mtDNA has diagnostic and/or prognostic potential as a non-invasive biomarker of cancer.

Keywords: mitochondria, cf-mtDNA, heteroplasmy, biomarker

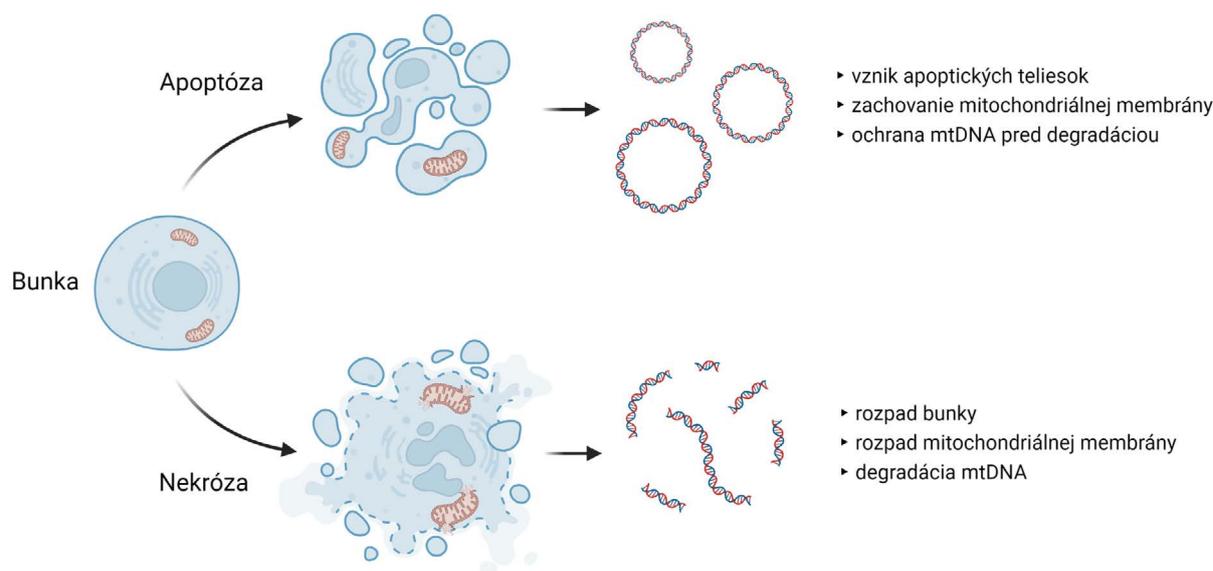
NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 31 – 36

Úvod

Mitochondria ako semiautonómna organela obsahuje vlastný genóm v podobe 100 – 10 000 kópií cirkulárnych molekúl mitochondriálnej DNA (mtDNA) s dĺžkou 16 569 bp, ktorá je organizovaná do nukleoproteínových štruktúr (tzv. nukleoidov). Mitochondriálny genóm je charakteristický tým, že nemá intróny, no obsahuje 37 génov kódujúcich 13 polypeptidov dýchacieho reťazca, 22 tRNA a 2 rRNA. Táto organela sa podieľa na produkcii energetických metabolitov a molekúl, prostredníctvom ktorých ovplyvňuje dôležité bunkové funkcie vrátane aktivity enzýmov, epigenetických modifikácií či apoptózy. Je zrejmé, že efektívnosť týchto procesov varíruje pre genetické zmeny v mtDNA, v dôsledku čoho môžu vznik-

núť rôzne ochorenia, ktoré zvyčajne postihujú tkanivá s vysokými energetickými požiadavkami, ako sú mozog, srdce alebo svaly^(1,2). Dysfunkcie mitochondrií sú časté aj pri ochoreniach, ako je rakovina. Aberácie mtDNA boli identifikované takmer v každom type nádoru a predpokladá sa, že by mohli prispievať k rozvoju rakovinového fenotypu. Zároveň však nemožno vylúčiť, že tieto aberácie vznikajú práve v dôsledku rakovinových zmien, ktoré prebiehajú v nádorových bunkách⁽³⁾. Na objasnenie úlohy týchto mutácií v karcinogéze bude potrebné podrobnejšie štúdium, no ukazuje sa, že ich detekcia by mohla byť potenciálnym markerom pre skorú diagnostiku nádorových ochorení.

Obrázok 1. Fragmentácia cf-mtDNA v závislosti od typu bunkovej smrti. Apoptóza je kontrolovaný proces, pri ktorom si mitochondrie zachovávajú membránu a mtDNA je tak chránená pred degradáciou. Rakovinové bunky však bežne podliehajú nekróze, keď dochádza k aktívnej degradácii mtDNA (Created with BioRender.com).



Je známe, že nádorové bunky uvoľňujú svoje nukleové kyseliny do extracelulárneho prostredia. K tomuto javu dochádza pri bunkovej smrti, ale taktiež prostredníctvom iných biologických mechanizmov, ktoré boli podrobnejšie opísané v predchádzajúcich prácach⁽⁴⁾. Výsledkom je zmes rôznych typov extracelulárnych nukleových kyselín vrátane mtDNA v telových tekutinách, ktoré vykazujú genetické črty pôvodných, teda aj rakovinových buniek. Analýza týchto molekúl, ktoré možno extrahovať napríklad z krvnej plazmy, má preto potenciál ako neinvazívny prístup pre diagnostiku, sledovanie progresie ochorenia či monitorovanie liečby daného ochorenia⁽⁵⁾.

Pri analýze cirkulujúcej mtDNA (cf-mtDNA) by sa však mali zohľadňovať štruktúrne rozdiely medzi mitochondriálnou a jadrovou DNA. Keďže mtDNA je malá molekula a nie je chránená histónmi ako jadrová DNA, tak aj fragmenty cf-mtDNA sú odlišné⁽⁶⁾. Veľkosť fragmentov cf-mtDNA v biologických tekutinách sa pohybuje väčšinou v rozsahu 20 až 80 bp, no bola opísaná aj existencia celých intaktných molekúl cf-mtDNA v ľudskej plazme. Na základe zistených poznatkov sa predpokladá, že cirkulárny tvar mtDNA má protektívny charakter⁽⁷⁾. Podobne ako jadrová DNA aj mtDNA môže byť transportovaná pomocou extracelulárnych membránových vezikúl (EMV)⁽⁸⁾. Tieto vezikuly môžu obsahovať aj celý mitochondriálny genóm, ktorý dokážu preniesť do buniek s poškodeným metabolizmom, a tak obnoviť ich metabolickú aktivitu. Na druhej strane takýto horizontálny transfer mtDNA pomocou EMV môže prebudiť dormantné nádorové bunky a vyvolať ich rezistenciu proti terapii⁽⁹⁾.

Fragmentácia cf-mtDNA

Molekuly cf-mtDNA môžu byť do cirkulácie uvoľňované aktívne zo živých buniek napr. prostredníctvom exozómov alebo pasívne prostredníctvom bunkovej smrti. Pri apoptóze buniek nedochádza k porušeniu mitochondriálnej membrány, v dôsledku čoho ostáva mtDNA intaktná. Zatiaľ čo

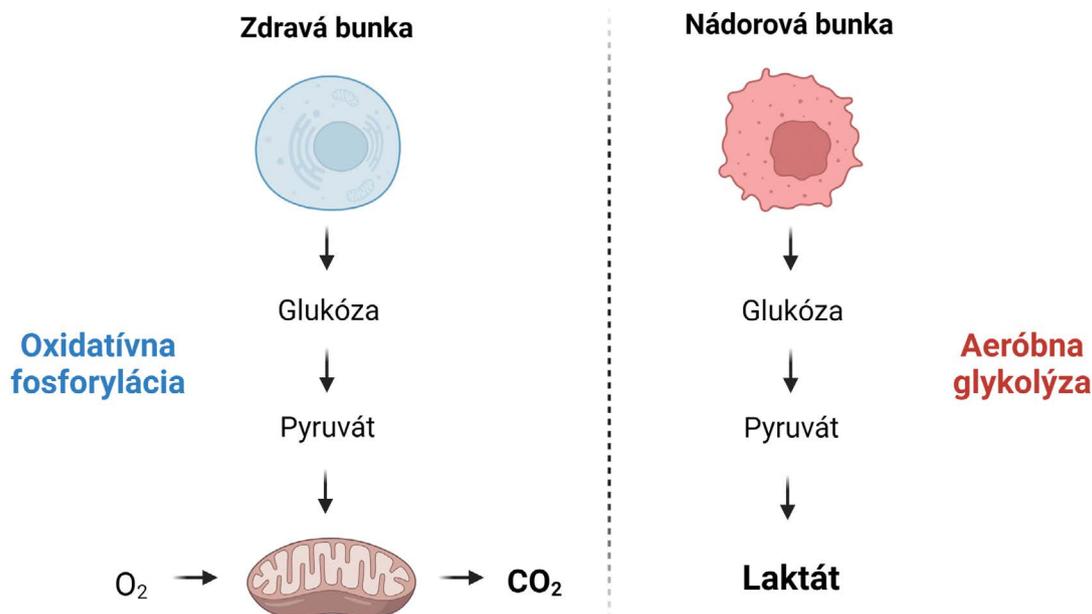
apoptická forma bunkovej smrti je bežná v normálnych bunkách, tak pre nádorové bunky je charakteristická nekróza. Počas nekrózy dochádza k rozrušeniu mitochondrií, uvoľneniu mtDNA a následne k jej degradácii na kratšie fragmenty (**obrázok 1**). Preto pacienti s rakovinou vykazujú kratšiu dĺžku cf-mtDNA (109,15 bp) v porovnaní so zdravými jedincami (142,62 bp), pričom dĺžka fragmentov navyše koreluje s nádorovou záťažou a relapsom ochorenia. Analýza dĺžkového profilu cf-mtDNA by preto mohla slúžiť ako ukazovateľ na sledovanie nádorovej záťaže a progresie rakoviny⁽¹⁰⁾.

Spolu s nárastom objemu nádorovej masy sa zvyšuje úroveň nekrózy v nádore⁽¹¹⁾, čo vedie k zvýšeniu zastúpenia cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) a zároveň poklesu dĺžky fragmentov cf-mtDNA. Fragmentačný profil cf-mtDNA predstavuje užitočný parameter na vyhodnotenie nádorovej záťaže na základe inverznej korelácie medzi objemom nádorovej masy a koncentráciou ctDNA. Využitie fragmentačného profilu na analýzu nádorovej záťaže sa potvrdilo aj v prípade pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Priemerná dĺžka cf-mtDNA fragmentov z krvi pacientov (162,41 bp) bola kratšia ako v kontrolných vzorkách (173,25 bp). Navyše fragmenty cf-mtDNA pacientov s percentuálnym zastúpením ctDNA viac ako 5 % vykazovali priemernú dĺžku 153,62 bp na rozdiel od pacientov so zastúpením ctDNA menej ako 5 % s priemernou dĺžkou fragmentov cf-mtDNA 164,36 bp⁽¹⁰⁾. Podobne to bolo v ďalšej štúdii, kde sa vedci zamerali na pacientov s karcinómom obličiek. Zistili, že koncentrácia cf-mtDNA v plazme mala vyššie hodnoty u pacientov s metastatickou formou ochorenia oproti pacientom bez metastáz a zdravým jedincem, a zároveň u nich pozorovali pokles indexu integrity (pomer dlhých a krátkych fragmentov)⁽¹²⁾.

Mutácie v mtDNA

Pri zmenách energetického a biosyntetického metabolizmu nádorových buniek zohrávajú centrálnu úlohu mitochondrie. Jednou z typických zmien je tzv. Warburgov efekt

Obrázok 2. Rozdiel v metabolizme glukózy medzi zdravými a nádorovými bunkami. V prítomnosti kyslíka prebieha v zdravých bunkách OXPPOS, pričom sa produkuje oxid uhličitý. Za rovnakých podmienok rakovinové bunky využívajú proces glykolýzy, keď namiesto oxidácie pyruvátu v mitochondriách, dochádza k jeho fermentácii v cytosole, pričom sa produkuje kyselina mliečna (Created with BioRender.com).



(obrázok 2), keď rakovinové bunky namiesto oxidatívnej fosforylácie (OXPHOS) uprednostňujú pri získavaní energie anaeróbnú glykolýzu, a to aj v podmienkach s dostatočným množstvom kyslíka⁽¹³⁾. Gény, kódované v mtDNA sú nevyhnutné pre správny priebeh OXPPOS, a preto mutácie v nich môžu prispieť k rozvoju rakovinového fenotypu buniek. Tieto mutácie môžu spadať do dvoch hlavných tried: (1) závažné mutácie (tumorigénne), ktoré inhibujú OXPPOS, zvyšujú produkciu reaktívnych foriem kyslíka a podporujú proliferáciu nádorových buniek, a (2) miernejšie mutácie (adaptívne), ktoré umožňujú nádorom prispôbiť sa novému prostrediu⁽¹⁴⁾.

Zatiaľ, čo v každej bunke existuje iba jedna kópia gDNA, v prípade mtDNA ich môže existovať viacero. V závislosti od úrovne metabolickej aktivity môže mať bunka stovky mitochondrií, z ktorých každá má 1 až 10 kópií mtDNA. Ak má bunka všetky kópie mtDNA identické, hovoríme o tzv. homoplazmii⁽¹⁵⁾. Pôsobením zvýšeného oxidačného stresu spojeným so starnutím dochádza k poškodeniu mtDNA. Nedostatočné reparačné mechanizmy napokon vedú ku kumulácii mutácií mtDNA v bunke⁽¹⁶⁾. Keď je v jednej bunke zmes mutovanej mtDNA spolu s nemutovanou, nastáva heteroplazmia⁽¹⁷⁾. Počas bunkového delenia dochádza k náhodnej distribúcii heteroplazmatickej mtDNA do dcérskych buniek. Bunky môžu tolerovať iba určitú úroveň heteroplazmie, kým sa neobjaví aberantný fenotyp⁽¹⁵⁾, ktorý závisí od pomeru týchto molekúl mtDNA⁽¹⁸⁾. Patogénne mutácie v mtDNA sa môžu vyskytovať v rôznych pomeroch a klinické dôsledky mutovanej mtDNA sa prejavujú až po prekročení prahovej hodnoty⁽¹⁹⁾. Ukázalo sa, že heteroplazmia komplikuje detekciu tumorovo špecifických mutácií v cf-mtDNA^(20,21). Preto ju treba zohľadňovať na intracelulárnej aj medzibunkovej úrovni⁽²²⁾. Ak sa zdá, že mutácia detegovaná v cf-mtDNA je heteroplazmatická, v skutočnosti môže byť výsledkom kontaminácie

mtDNA z rôznych buniek (medzibunková heteroplazmia). To vysvetľuje, prečo aj zdanlivo nízka úroveň heteroplazmatickej mutácie môže hrať funkčnú úlohu vo vývoji alebo progresii nádoru na lokálnej úrovni⁽²⁰⁾.

Napriek týmto limitáciám sa ukazuje, že mutácie v cf-mtDNA majú potenciál ako neinvazívny biomarker, ktorý možno využiť pri predikcii, diagnostike a monitorovaní nádorových ochorení. Jeden z príkladov môže predstavovať detekcia mutácií v cf-mtDNA v oblasti D-slučky z plazmy pacientov so skvamóznym karcinómom hlavy. Ukázalo sa, že detekcia somatických mutácií umožňuje skoré zavedenie preventívnych opatrení, preto by cf-mtDNA mohla predstavovať biomarker včasnej detekcie ochorenia⁽²³⁾. Liu et al. 2021 predstavil optimalizovaný prístup na báze NGS pre detekciu nádorovo špecifických mutácií v cf-mtDNA z plazmy pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Na druhej strane sa mu týmto prístupom nepodarilo detegovať mutácie u pacientov s kolorektálnym karcinómom, čo naznačuje že existujú rakovinovo špecifické rozdiely v množstve nádorovej mtDNA, ktorá sa uvoľňuje do plazmy pacientov⁽²⁴⁾. Výsledky porovnávacích NGS analýz mtDNA sú limitované schopnosťou sledovať tumorovo špecifické varianty v cf-mtDNA. Väčšina variantov, ktoré boli identifikované v nádorovom tkanive, nebola detegovateľná v plazme príslušného pacienta, pričom zhoda medzi variantmi bola iba na úrovni 17 %⁽²¹⁾ až 25 %⁽²⁵⁾. V súčasnosti stále nie je jasné, prečo je detekcia variantov z plazmatickej cf-mtDNA taká náročná, preto zostáva jednou z hlavných výziev v aplikáciách tekutej biopsie.

Počet kópií mtDNA

Jedinečné vlastnosti mitochondriálneho genómu, ako jeho krátka dĺžka, jednoduchá molekulárna štruktúra a vysoký počet kópií, z neho robia vhodný nástroj na včasnú detekciu

Tabuľka 1. Porovnanie zmien v počte kópií mtDNA, v príkladoch rôznych typov nádorových ochorení. Referencie (Ref.)

Typ rakoviny	Materiál	Vzorka	Lokus	Počet kópií	Senzitivita (%)	Špecificita (%)	Ref.
rakovina vaječníkov	plazma	cf-mtDNA	MT-ATP8	↑	63 – 79	62 – 67	33
rakovina vaječníkov (neskoré štádium)	plazma	exozómy	ND1, ND5	↑	–	–	34
rakovina semenníkov	sérum	cf-mtDNA	mtDNA-79	↑	59,5	94,3	35
		cf-mtDNA	mtDNA-220	↑	70,2	77,1	
rakovina prostaty	plazma	cf-mtDNA	16S rRNA	↑	80	58	36
non-Hodgkinov lymfóm	plná krv	mtDNA	MT-ND1	↑	–	–	37
rakovina hlavy a krku	sliny	mtDNA	MT-CO1/ MT-CO2	↑	–	–	38
urologické malignity	sérum	cf-mtDNA	16S rRNA	↑	84	97	39
rakovina žalúdka	mononukleárne bunky periférnej krvi	mtDNA	12S rRNA	↑	47	80	40
skvamózny karcinóm hltana	krv, tkanivo	mtDNA	D-slučka	↑	–	–	30
rakovina pľúc	plazma	cf-mtDNA	16S rRNA	↑	–	–	41
hepatocelulárny karcinóm	plazma	cf-mtDNA	–	↑	80	94	42
rakovina prsníka	plazma	cf-mtDNA	MT-ATP8	↓	53	87	43
	plná krv	mtDNA	MT-ATP8	↓	–	–	44
	plná krv	mtDNA	MT-ATP8	↓	73	78	45
hepatocelulárny karcinóm	sérum	cf-mtDNA	MT-ND1	↓	–	–	46
karcinóm obličky	plná krv	mtDNA	MT-ND1	↓	–	–	47
Ewingov sarkóm	sérum	cf-mtDNA	16S rRNA	↓	76,1	68,4	48

↑ – zvýšený/↓ – znížený počet kópií mtDNA

nádorových ochorení⁽²⁶⁾. Počet kópií mtDNA je v bunkách rôznych tkanív odlišný a je významne ovplyvnený aj rozdielnymi podmienkami vnútorného a vonkajšieho mikroprostredia⁽²⁷⁾. Na rozdiel od jadrovej DNA je mtDNA extrémne náchylná na oxidačné a iné genotoxické poškodenia pre nedostatok ochranných histónov a účinných mechanizmov opravy DNA⁽²⁸⁾. Zmeny v počte kópií mtDNA boli asociované s rozvojom rôznych typov nádorových ochorení vrátane rakoviny hrubého čreva, konečníka, prsníka a pľúc, pričom tieto zmeny možno detegovať pomocou analýzy cf-mtDNA⁽⁶⁾. Existuje predpoklad, že počet kópií mtDNA v organizme jedinca je ovplyvnený špecifickým miestom na mitochondriálnom génome, v ktorom vznikla mutácia asociovaná s konkrétnym nádorovým ochorením. Mutácie v oblasti D-slučky zodpovednej za reguláciu replikácie mtDNA by podľa tohto predpokladu mali spôsobiť zníženie počtu kópií mtDNA v bunke. Naopak, zvýšený počet kópií mtDNA na bunku môže byť dôsledkom mutácie v génoch pre proteíny podieľajúce sa na oxidačnej fosforylácii. V tom prípade by mohlo ísť o kompenzačný mechanizmus, čiže reakciu na mitochondriálnu dysfunkciu⁽²⁹⁾. Na druhej strane existujú aj štúdie, ktoré upozorňujú na to, že somatické mutácie v oblasti D-slučky môžu zapríčiniť nárast počtu kópií mtDNA, čo by mohlo byť spôsobené zvýšením replikácie v dôsledku mutácie v tejto oblasti⁽³⁰⁾. Mechanizmus, prostredníctvom ktorého môže byť znížený počet kópií mtDNA spojený s karcinogenezou, nie je úplne jasný, no predpokladá sa, že nízka hladina fyzickej aktivity u mladých jedincov vedie k zníženiu počtu kópií mtDNA a zníženej produkcii ATP, výsledkom čoho sa zvyšuje riziko rakoviny⁽³¹⁾. Tieto výsledky naznačujú, že abnormálny počet kópií mtDNA by mohol slúžiť ako potenciálny marker pre poškodenia DNA a dysfunkciu mitochondrií, ktoré pravdepodobne prispievajú ku karcinogéze.

Zmeny v počte kópií cf-mtDNA boli opísané pri rôznych typoch nádorových ochorení (**tabuľka 1**), preto by kvantifikácia cf-mtDNA vo vzorkách telových tekutín mohla poslúžiť na rozlíšenie pacientov s nádorovým ochorením od zdravých jedincov alebo ako marker na monitorovanie progresie nádoru či predikciu reakcie pacienta na liečbu⁽³²⁾.

Zmeny v počte kópií mtDNA sa obvyčajne počítajú ako relatívny pomer množstva konkrétneho génu kódovaného mitochondriálnym génom k množstvu génu kódovanému jadrovou DNA. Presnosť a efektivita tejto metódy môžu byť obmedzené, čo sa môže odradiť na dôveryhodnosti výsledkov⁽²⁶⁾. Variácie v počte kópií cf-mtDNA sa môžu výrazne líšiť pri rôznych typoch nádorových ochorení. Na overenie presnosti informácií o priebehu ochorenia je preto potrebné výsledky získané z analýzy cf-mtDNA vyhodnocovať spolu s výsledkami už osvedčených biomarkerov⁽⁴⁹⁾.

Rozsiahle delécie mtDNA

V porovnaní s bodovými mutáciami sú rozsiahle delécie v rámci mtDNA menej časté, zato však výraznejšie prispievajú k rozvoju mitochondriálnych ochorení, rakoviny alebo k stárnutiu⁽⁵⁰⁾. Ich vplyv na karcinogézu nie je dostatočne objasnený a jeho prediktívny a prognostický potenciál je stále predmetom štúdia. S viacerými typmi nádorových ochorení je často spájaná delécia mtDNA 4 977 bp medzi nukleotidmi 8 470 až 13 447, ktorá postihuje dôležité gény zodpovedné za správnu funkciu OXPHOS⁽⁵¹⁾. Štúdia Nie et al. ukázala, že miera týchto delécií bola významne vyššia v krvi pacientov s karcinómom prsníka v porovnaní s benígnym ochorením, príslušným tkanivom, aj so zdravými kontrolami, čo poukazuje na potenciál delécie mtDNA 4 977 ako neinvazívneho biomarkera pre detekciu rakoviny prsníka⁽⁵²⁾. Známa je tiež delécia mtDNA 4 576 bp, ktorá bola opísaná ako potenciál-

ny biomarker pre skrining rakoviny prsníka, a to dokonca vo vzorkách telových tekutín⁽⁵³⁾. Vhodným príkladom je aj delécia 3397 bp (3.4kbΔ) v pozícii 10 743 až 14 125, ktorá je užitočným biomarkerom pre diagnostiku rakoviny prostaty⁽⁵⁴⁾. Okrem tkanív bol preskúmaný potenciál tejto delécie v moči a sére, no napriek sľubným výsledkom je potrebné overiť využiteľnosť tekutých biopsií na analýzu 3.4kbΔ na rozsiahlejších štúdiách⁽⁵⁵⁾.

Mikrosatelitová instabilita mtDNA

Mitochondriálna mikrosatelitová instabilita (mtMSI) je definovaná ako zmena dĺžky v rámci krátkych tandemových repetícií (mikrosatelitov) veľkosti 1 - 6 bp, pozorovaná medzi nádorovým a zdravým tkanivom. Časté variácie v týchto lokusoch (delécie/inzercie) vznikajú v dôsledku neefektívneho mitochondriálneho systému opravy replikačných chýb. Mechanizmy zodpovedné za opravu mtDNA však doposiaľ nie sú príliš známe⁽⁵⁶⁾. Častý výskyt mtMSI bol opísaný v súvislosti s viacerými typmi nádorových ochorení vrátane rakoviny prsníka, ovárií, endometria či kolorektálneho karcinómu (CRC)⁽⁵⁷⁾. Výskum mtMSI v spojitosti s možnými klinickými dôsledkami preukázal, že pacienti s CRC v III. štádiu s mutáciami v regióne D-slučky sa vyznačujú zlou prognózou a rezistenciou proti adjuvantnej chemoterapii na báze 5-fluorouracilu⁽⁵⁸⁾. Práve vysoko polymorfné oblasti v rámci D-slučky, akými sú D310 (poly(C)) a D16184 (poly(C) prerušené T) sú najčastejšími regiónmi, ktoré sa spájajú s mtMSI⁽⁵⁶⁾. Napriek sľubným výsledkom pri nádorových ochoreniach, mtMSI nebola dostatočne preskúmaná v telových tekutinách.

Epigenetické modifikácie mtDNA

Podobne ako jadrová tak aj mtDNA je vystavená rôznym epigenetickým modifikáciám, ktoré ovplyvňujú dôležité procesy ako replikácia a transkripcia mtDNA. Dong et al. podrobne opísal viaceré modifikácie, medzi ktoré patria metylácie a hydroxymetylácie, posttranslačné modifikácie proteínov v mitochondriálnych nukleoidoch a tiež posttranskripcné modifikácie mitochondriálnych RNA (mtRNA). Boli opísané aj nekódujúce RNA odvodené od mtDNA, ktoré hrajú dôleži-

tú úlohu pri regulácii translácie a funkcie mitochondriálnych génov⁽⁵⁹⁾. V tejto spojitosti vznikol koncept mitoepiggenetiky, ktorá študuje mitochondriálne modifikácie ovplyvňujúce dedičný fenotyp bez zmeny samotnej sekvencie mtDNA. Keďže dysfunkcie mitochondrií ako dôsledok epigenetických zmien môžu prispievať ku karcinogéze⁽⁶⁰⁾, ich analýza má potenciál pre klinické aplikácie v onkológii. Mohd Khair et al. zhrnuli rôzne typy nádorových ochorení, ktoré boli študované v spojitosti s epigenetickými modifikáciami na úrovni bunkovej mtDNA a mtRNA⁽⁵⁶⁾, avšak potenciál extracelulárnych biomarkerov zatiaľ nebol u onkologických pacientov dostatočne preskúmaný.

Záver

Použitie kvantitatívnych a kvalitatívnych charakteristík cf-mtDNA pre diagnostiku nádorových ochorení sa v posledných rokoch stalo cieľom záujmu mnohých výskumov. Je to najmä vďaka možnosti minimálne invazívneho zákroku odobratia vzorky z telových tekutín a výhodám, ktoré ponúka kompaktný mitochondriálny genóm. Moderné prístupy umožňujú analýzu rôznych parametrov, ako je detekcia mutácií, počet kópií mtDNA či fragmentačný profil cf-mtDNA, ktoré je navyše možné kombinovať s cieľom vytvoriť robustnejší nástroj pre diagnostiku ochorenia. Molekuly cf-mtDNA preukázali diagnostickú a/alebo prognostickú hodnotu pre viaceré nádorové ochorenia, no ich využiteľnosť stále varíruje pri rôznych typoch rakoviny. Aby mohla byť zavedená do rutínnej praxe, je ešte potrebné pochopiť jej úlohu pri rozvoji nádorového fenotypu a zrealizovať rozsiahlejšie štúdie v kombinácii so zavedenými biomarkermi, ktoré sa používajú pri manažmente onkopacientov v súčasnosti.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty: ITMS: 313011V446 (40 %); ITMS: 313011V578 (40 %) a ITMS: 313011ATL7 (20 %) spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. F C Lopes A. Mitochondrial metabolism and DNA methylation: a review of the interaction between two genomes. *Clin Epigenetics*. 2020; 12(1): 182.
2. Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017; 1858(8): 602-614.
3. Lund M, Melbye M, Diaz LJ, Duno M, Wohlfahrt J, Vissing J. Mitochondrial dysfunction and risk of cancer. *Br J Cancer*. 2015; 112(6): 1134-1140.
4. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet*. 2018; 26(7): 937-945.
5. Szilágyi M, Pös O, Márton É, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18). doi: 10.3390/ijms21186827
6. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35(3): 347-376.
7. Newell C, Hume S, Greenway SC, Podemski L, Shearer J, Khan A. Plasma-derived cell-free mitochondrial DNA: A novel non-invasive methodology to identify mitochondrial DNA haplogroups in humans. *Mol Genet Metab*. 2018; 125(4): 332-337.

8. Soltész B, Buglyó G, Németh N, et al. The Role of Exosomes in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2021; 23(1). doi: 10.3390/ijms23010008
9. Sansone P, Savini C, Kurelac I, et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(43): E9066-E9075.
10. An Q, Hu Y, Li Q, et al. The size of cell-free mitochondrial DNA in blood is inversely correlated with tumor burden in cancer patients. *Precis Clin Med*. 2019; 2(3): 131-139.
11. Milross CG, Tucker SL, Mason KA, Hunter NR, Peters LJ, Milas L. The effect of tumor size on necrosis and polarographically measured pO₂. *Acta Oncol*. 1997; 36(2): 183-189.
12. Lu H, Busch J, Jung M, et al. Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients. *Clin Chim Acta*. 2016; 452: 109-119.
13. Lytovchenko O, Kunji ERS. Expression and putative role of mitochondrial transport proteins in cancer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017; 1858(8): 641-654.
14. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 2006; 25(34): 4647-4662.

15. Atilano SR, Udar N, Satalich TA, Udar V, Chwa M, Kenney MC. Low frequency mitochondrial DNA heteroplasmy SNPs in blood, retina, and [RPE+choroid] of age-related macular degeneration subjects. *PLoS One*. 2021; 16(1): e0246114.
16. Bua E, Johnson J, Herbst A, et al. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet*. 2006; 79(3): 469-480.
17. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet*. 1997; 13(11): 450-455.
18. Patananan AN, Wu TH, Chiou PY, Teitell MA. Modifying the Mitochondrial Genome. *Cell Metab*. 2016; 23(5): 785-796.
19. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003; 370(Pt 3): 751-762.
20. Triska P, Kaneva K, Merkurjev D, et al. Landscape of Germline and Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Pediatric Malignancies. *Cancer Res*. 2019; 79(7): 1318-1330.
21. Weerts MJA, Timmermans EC, van de Stolpe A, et al. Tumor-Specific Mitochondrial DNA Variants Are Rarely Detected in Cell-Free DNA. *Neoplasia*. 2018; 20(7): 687-696.
22. Aryaman J, Johnston IG, Jones NS. Mitochondrial Heterogeneity. *Front Genet*. 2018; 9: 718.
23. Kumar M, Srivastava S, Singh SA, et al. Cell-free mitochondrial DNA copy number variation in head and neck squamous cell carcinoma: A study of non-invasive biomarker from Northeast India. *Tumor Biology*. 2017; 39(10): 101042831773664. doi: 10.1177/1010428317736643
24. Liu Y, Zhou K, Guo S, et al. NGS-based accurate and efficient detection of circulating cell-free mitochondrial DNA in cancer patients. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021; 23: 657-666.
25. Haupts A, Vogel A, Foersch S, et al. Comparative analysis of nuclear and mitochondrial DNA from tissue and liquid biopsies of colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 16745.
26. Yu M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA*. 2012; 23(5): 329-332.
27. Clay Montier LL, Deng JJ, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*. 2009; 36(3): 125-131.
28. Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1807(6): 620-625.
29. Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer. *Curr Mol Med*. 2007; 7(1): 121-131.
30. Guo W, Yang D, Xu H, et al. Mutations in the D-loop region and increased copy number of mitochondrial DNA in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2013; 40(1): 13-20.
31. Melkonian SC, Wang X, Gu J, et al. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes and the risk of clear cell renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2015; 36(2): 249-255.
32. Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci*. 2011; 89(3-4): 65-71.
33. Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol*. 2008; 112(4): 843-850.
34. Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer. *J Biotechnol*. 2019; 298: 76-81.
35. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int*. 2009; 104(1): 48-52.
36. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (2 Pt 1): 421-426.
37. Lan Q, Lim U, Liu CS, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008; 112(10): 4247-4249.
38. Jiang WW. Increased Mitochondrial DNA Content in Saliva Associated with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(7): 2486-2491.
39. Ellinger J, Müller DC, Müller SC, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol*. 2012; 30(4): 509-515.
40. Fernandes J, Michel V, Camorlinga-Ponce M, et al. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014; 23(11): 2430-2438.
41. Bulgakova O, Kausbekova A, Kussainova A, Kalibekov N, Serikbauly D, Bersimbaev R. Involvement of Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA and Proinflammatory Cytokines in Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021; 22(6): 1927-1933.
42. Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(11): E1317-E1325.
43. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*. 2009; 8: 105.
44. Iqbal S, Raina V, Balani S, et al. Higher Mitochondrial DNA Content in Peripheral Blood of Stage III Breast Cancer Patients. *Austin Oncol*. 2017; 2(1): 1014.
45. Xia P, An HX, Dang CX, et al. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*. 2009; 9(1). doi: 10.1186/1471-2407-9-454
46. Li L, Hann HW, Wan S, et al. Cell-free circulating mitochondrial DNA content and risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection. *Sci Rep*. 2016; 6(1): 69.
47. Xing J, Chen M, Wood CG, et al. Mitochondrial DNA content: its genetic heritability and association with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(15): 1104-1112.
48. Yu M, Wan YF, Zou QH. Cell-free circulating mitochondrial DNA in the serum: a potential non-invasive biomarker for Ewing's sarcoma. *Arch Med Res*. 2012; 43(5): 389-394.
49. Afrifa J, Zhao T, Yu J. Circulating mitochondria DNA, a non-invasive cancer diagnostic biomarker candidate. *Mitochondrion*. 2019; 47: 238-243.
50. Chen T, He J, Huang Y, Zhao W. The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *J Hum Genet*. 2011; 56(10): 689-694.
51. Yusoff AAM, Abdullah WSW, Khair SZNM, Radzak SMA. A comprehensive overview of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in cancer studies. *Oncol Rev*. 2019; 13(1): 409.
52. Nie H, Chen G, He J, et al. Mitochondrial common deletion is elevated in blood of breast cancer patients mediated by oxidative stress. *Mitochondrion*. 2016; 26: 104-112.
53. Zhu W, Qin W, Sauter ER. Large-scale mitochondrial DNA deletion mutations and nuclear genome instability in human breast cancer. *Cancer Detect Prev*. 2004; 28(2): 119-126.
54. 瑞安·帕尔, 罗伯特·塞耶, 加百利·道库博, et al. 3.4 kb mitochondrial DNA deletion for use in the detection of cancer. *Patent*. Published online October 27, 2010. Accessed August 8, 2022. <https://patentimages.storage.googleapis.com/c5/66/26/b443d5e5fe30e6/CN101874119A.pdf>
55. Maragh S, Veltri RW, Lund SP, et al. Evaluation of two mitochondrial DNA biomarkers for prostate cancer detection. *Cancer Biomark*. 2015; 15(6): 763-773.
56. Mohd Khair SZN, Abd Radzak SM, Mohamed Yusoff AA. The Uprising of Mitochondrial DNA Biomarker in Cancer. *Dis Markers*. 2021; 2021: 7675269.
57. Venderbosch S, van Vliet S, Craenmehr MHC, et al. Mitochondrial microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2015; 466(5): 495-502.
58. Lièvre A, Chapusot C, Bouvier AM, et al. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(15): 3517-3525.
59. Dong Z, Pu L, Cui H. Mitoepigenetics and Its Emerging Roles in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 4.
60. Sharma N, Pasala MS, Prakash A. Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environ Mol Mutagen*. 2019; 60(8): 668-682.

Mgr. Silvia Bokorová

Geneton, s. r. o.

Ilkovičová 8, 841 04 Bratislava

e-mail: silvia.bokorova@geneton.sk

Whole-genome sequencing methods for CNV detection

Zuzana Klinovská¹, Marcel Kucharík^{1,2}, Jaroslav Budiš^{1,2,3}, Tomáš Szemes^{1,2,4}

¹Geneton Ltd, Bratislava, Slovakia

²Comenius University Science Park, Bratislava, Slovakia

³Slovak Centre of Scientific and Technical Information, Bratislava, Slovakia

⁴Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava

The importance of copy number variants (CNVs) in reference to human health is rising continuously. They are linked to various types of disorders, syndromes and recent studies showed they can be used as a biomarker for cancer screening. Next-generation based technologies enabled faster and more cost-effective ways for CNV detection, which could be applicable in practical use. In this article, we describe the general approach of CNV detection tools, which are based on next-generation technologies and where data was obtained by whole-genome-sequencing in particular. We provide a general overview of the whole process of detection of a CNV, provide historical context and briefly describe the individual steps of the process.

Key words: CNV, whole genome sequencing, Detekction of CNV, NIPT

Detekcia CNV metódou celegonómového sekvenovania

Význam CNV v súvislosti s ľudským zdravím neustále rastie. Tieto varianty sa spájajú s rôznymi syndrómami a poruchami a dokonca môžu slúžiť ako biologický označovač pre prítomnosť rakoviny. Technológie NGS umožňujú rýchlejšie a lacnejšie detegovanie týchto variantov, čo zjednodušuje ich použiteľnosť v praktickej medicíne. V našom článku opisujeme všeobecný prístup strojov pre detekciu CNV založených na technológii NGS. Špeciálne sa zameriavame na získavanie dát metódou celogenómovej sekvencie. Poskytujeme všeobecný prehľad celého procesu, históriu vývoja rôznych metód pre detegovanie CNV a tiež sa bližšie vyjadrujeme k jednotlivým krokom samotného detegovania CNV.

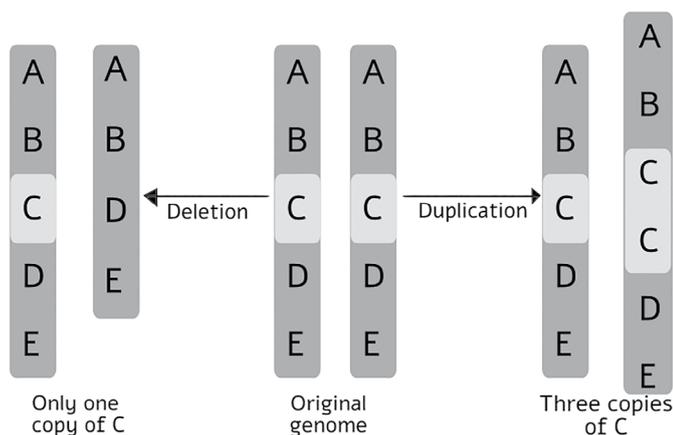
Kľúčové slová: CNV, celegonómové sekvenovanie, detekcia CNV, NIPT

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 37 – 41

Introduction to sequencing

The bioinformatic field is mainly interested in the development of methods and software tools that contribute to the understanding of biological data. This interdisciplinary field intervenes with various biological disciplines, especially with genomics, which focuses on the structure, function, evolu-

Figure 1. The picture shows an illustration of CNV on a genome. The right side shows a duplication, left side shows a deletion event.



tion, mapping, and editing of genomes. Knowledge from bioinformatic studies and research can then be used in practice to treat various diseases and abnormalities, furthermore, it can also help us understand evolution and our origin.

To obtain biological data, DNA has to be firstly sequenced in order to determine the order of nucleotides. Four nucleotide acids cytosine [C], guanine [G], adenine [A], and thymine [T] make up the whole DNA molecule, computer programs store them in short as A, C, T, G letters. Sequencing itself underwent rapid development throughout the years. The first human genome was sequenced in 2001 and the work took thirteen years⁽¹⁾. However, with faster technologies and significantly lower sequencing costs, new genome analyses are produced⁽²⁾. Nowadays it takes only a day in a well-equipped laboratory⁽³⁾.

Copy number variations

Copy number variations fall into the category of structural variants. These are mutations in DNA, which may have beneficial, neutral, or negative effects on the organism. It is a change in an organism's chromosome, involving a DNA fragment that is approximately 1 kb or larger, therefore we consider it a larger mutation event⁽⁴⁾. Even though they can be beneficial in the process of evolution, they can cause various syndromes and disorders. Variants are further divided into

translocations, insertions, inversions and finally CNVs. These variants are visualized on **Figure 1.** (CNVs) and **Figure 2.** (translocation, insertion, inversion). Whereas CNVs change the amount of a certain genomic range, it can be detected via low-coverage sequencing, mapping, and read counting. On the other hand, translocations and inversions do not add or remove any genomic material (only shuffle it), thus to detect them, we need to find the precise breaking points. This is possible only with a deep-coverage (>30x) sequencing and even then it does not have great accuracy^(5,6). Insertions bring new genomic material (usually small), which does not have a copy previously on the genome, thus the breaking points and the whole inserted sequence need to be found by deep sequencing. Thus, this article will focus only on CNVs and on methods for their detection.

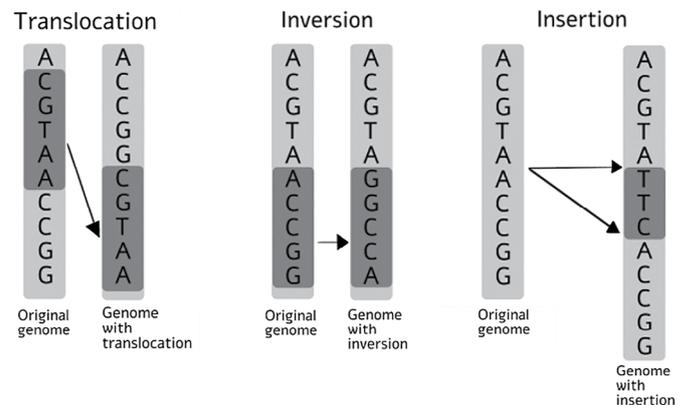
CNV or Copy Number Variant is a phenomenon that represents a significant source of genetic diversity among different species including humans. For instance, it was discovered Higher *AMY1* copy numbers improve the digestion of starchy foods and as a result this gene is related with a history of diet-related selection pressures⁽⁷⁾. However, CNVs are associated with various syndromes and diseases as well⁽⁸⁾. CNVs, particularly common and frequently found in healthy populations, contribute to the inception of cancer as well. For instance, researchers have found that a small deletion in *Mtus1* gene is associated with a decreased risk of familial breast cancer⁽⁹⁾. Another cancer-associated CNV was found in the gene *MLL4* which seems to be linked with the Li-Fraumeni cancer predisposition disorder⁽¹⁰⁾. They are associated with schizophrenia, autism, or susceptibility to HIV infection⁽¹¹⁾. Moreover, CNVs can cover part of a gene, whole gene, or even several genes and therefore they are likely to have a role in the alternation of human physiological functions, which are essential processes such as metabolism, movements, reproduction, etc.^(8,12). There have been various methods developed with an aim to detect these mutations and even successful pioneer attempts to remedy them, for example the medication Zolgensma⁽¹³⁾ which reverts the CNV loss of gene *SMN1* or its dysfunction by inserting a new working copy to the genome of an infant. Although this medication is still in its early stages, does not work perfectly, and costs \$2.1million for a single treatment, it paves the way for the targeted one-time gene therapy in the field of personalized medicine.

Methods for the detection of CNVs

First generation of sequencing

Over the years many different methods have been developed for CNV detection. The first methods were cytogenetic techniques such as comparative genomic hybridization (CGH), fluorescence in situ hybridization (FISH) and others, which sometimes required visual inspection of chromosomes. Only anomalies of whole chromosomes or variations expanding over a few Mb in size were detected visually, therefore there was a need for a method that would provide a higher resolution than cytogenetics⁽¹⁴⁾. However, it is important to mention that the development of cytogenetic techniques is a continuous process. For instance, copy number changes have been detected that are as low as 1 Kb⁽¹⁵⁾.

Figure 2. The image displays illustrations (from left to right) of translocation, inversion and insertion. Left part displays an original genome, the right part shows the same genome with an illustrated structural variant.



Smaller mid-sized CNVs between 5–500 kb could be detected by a molecular biology method called Southern-blotting⁽¹⁴⁾. However, this approach proved to be a laborious and time-consuming method that requires large amounts of high-quality DNA. Finally, with the arrival of amplification-based PCR methods, an analytical resolution to single nucleotides was available⁽¹⁶⁾.

Next-generation-based CNV detection methods

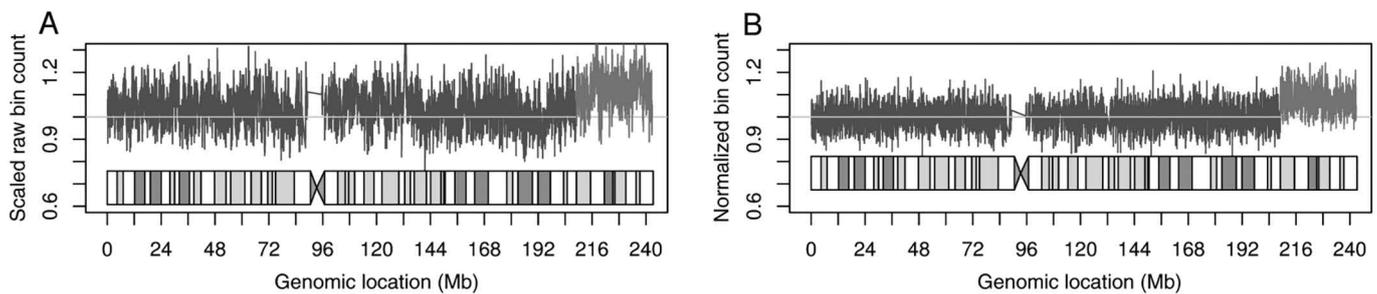
All of the above-mentioned methods were part of the first generation of sequencing and they were considered a golden standard in DNA diagnostics, yet detection of CNVs showed to be challenging with these methods. Fortunately, the next-generation-based CNV analyses managed to overcome some of the mentioned limitations. This new technology brought valuable tools for clinical diagnostics of genomic variations, including CNVs.

Nowadays, next-generation sequencing (NGS) represents a valuable tool for clinical diagnostics and provides a sensitive and accurate approach for the detection of the major types of genomic variations, including CNVs. Three main strategies for CNV analyses based on NGS technologies are whole-genome, whole-exome, and targeted sequencing. Whole-genome sequencing analyses the genome, whereas whole-exome only exomes, which take up roughly one percent of the genome⁽¹⁷⁾. Targeted sequencing, as the name suggests, analyses only selected sets of genes or genomic regions. Due to the smaller sequenced part of the genome, targeted and whole-exome sequencing usually provide deep-coverage data, whereas whole-genome approaches often rely on shallow sequencing to keep the processing costs low. Thus, the tools for structural variation detection greatly differ for these two kinds of strategies (deep-coverage, small part of genome vs shallow-coverage, whole-genome).

Detection of CNVs using shallow whole-genome sequencing

Whole-genome sequencing (WGS) is the analysis of the entire genomic DNA sequence of an organism at a single time. WGS analysis runs under the support of next-generation sequencing technologies. This technology reduced the

Figure 3. Bin counts of a particular chromosome before and after normalization. The x-axis shows the coordinate of each bin in Mb. The y-axis in picture A is scaled bin count and in picture B it stands for normalized bin count. The two lighter sections in both pictures display a place where CNV occurred. As can be seen, after normalization the mentioned region is more accentuated.



expenses for the WGS method and thus it became a comprehensive method for analyzing entire genomes. Shallow whole-genome sequencing is a specific method that obtains genomic data using low-coverage most frequently between 0.1x and 0.5x (coverage of 1x means that every base is read once in average). It is an even more cost-effective approach, it provides more data, greater statistical power and new rare variant discovery capabilities, while its accuracy is very reasonable⁽¹⁸⁾. CNV is a type of structural variant that can be detected using this method of sequencing even though the coverage can be quite low.

Overall, detection of any CNV is limited by these factors⁽¹⁹⁾: the size of the particular CNV, coverage, biological and technical variability of the event region. Naturally, it depends on the type of analysis that is being performed. Some detections are done on more challenging data, for example non-invasive prenatal testing, where other factors such as the percentage of fetal fraction plays a crucial role in the successful detection of a CNV.

Results from data with higher coverage are more precise and sensitive, however, lower coverage is overall cheaper and faster. In contrast to the length of the CNV, this factor can be directly changed to obtain more accurate results, but with higher production costs. Yet, shallow WGS works with very small coverages and still manages to obtain reliable data^(16,20). Because of this, it proposes various clinical applications from the detection of CNVs that cause development issues to variations causing malignancy and mental retardation^(21,22).

Biological and technical variability of the event region refers to the fact that some sectors can be more variable than others. It can be caused by various factors such as repetitive elements, mapping ability and so on. As a result, these regions are harder to detect and are usually filtered out from the analyses.

General approach for the detection of CNVs

Naturally, various CNVs detection tools have been developed over the years⁽²³⁻²⁶⁾. Each has its own advantages such as fast computation time, accuracy, lucid results, or easy use. However, this depends on the data that they are given, for instance some are designed for low-coverage data and others require at least certain coverage to work properly. However, most of them share some similarities in their approaches.

Usually, they require mapped reads to begin with and then they follow four main steps. The mapped reads are separated into smaller sections called bins. Subsequently, normalization and noise correction techniques are applied and finally, the normalized signal is segmented and scanned for CNVs. The whole process is often referred to as CNV-calling.

Binning is a process where a CNV detection tool partitions reads into bins according to their mapped position. Bin-size is the size of a bin or the number of bases inside the bin. Although this parameter can be often adjusted by the user, some tools propose a method to determine the optimal bin-size. The final resolution strongly depends on the bin-size. Larger bin-size results in worse resolution and faster computational time, however, the sensitivity for smaller aberrations decreases. Term bin-count is the number of reads that belong to a particular bin. This number varies between different genomic regions due to different mappability and biological reasons. Thus, it needs to be normalized to obtain bin-count purified from these biological biases.

One of the most important steps is normalization. In this process, the program adjusts measured values to a hypothetical common scale. Normalization reduces noise and biases commonly seen in samples and therefore can considerably change final sensitivity and specificity. The drawback of this step is that a normalization usually needs a lot of genetically healthy samples for training. The effect of normalization can be seen in **Figure 3**⁽¹⁹⁾.

Another major step in CNV prediction is segmentation. The aim is to gather read depth signals with similar intensity and thus "smoothing" out the noisy bin-count signal into levels. Circular binary segmentation (CBS) is a popular method used for segmentation and the majority of the CNV detection tools use it.

Following this, the segments that deviate from the average read-depth signal are considered to be variant regions. However, read depth signals are noisy due to different aspects such as different mapping abilities of the tested sample and reference genome. As a result, variant regions may be falsely identified. The crucial process in this step is distinguishing the spurious variants from the true copy variants or assigning some confidence to the called CNVs. High-confidence CNVs are usually long, have an expected level of signal intensity for a single gain or loss, and are not in the badly mappable regions of the genome.

Biases arising from WGS detection methods

Many systematic biases arise from whole-genome next-generation sequencing data, which are susceptible to create noise in sequencing data. The most commonly seen bias that arises from sequencing is called GC bias⁽²⁷⁾. This bias is caused by proportionally different sequencing of regions with different proportions of guanine and cytosine bases (GC content) across the genome; it is one of the known platform's technical limitations. The presence of regions with poor or rich GC content leads to uneven coverage of reads across the genome. Local regression or local polynomial regression (LOESS) is commonly used to deal with GC bias⁽²⁸⁾. LOESS regression merges together bins with similar GC content in a certain interval. This correction is applied to every bin-count, or to individual bins as their weights. The GC bias is different for each sequenced sample and thus needs to be corrected within the sample.

The mappability bias is another systematic bias that affects the results of any CNV detection tool. Mappability of a region is the chance that read will be sequenced and mapped successfully to the region. However, particular regions are very hard to sequence and some regions (e.g. repeating regions) are challenging to map thus these regions will have a very low mappability. Regions with mappability under a certain threshold are usually excluded from the CNV prediction. Bins within regions with better mappability are then normalized to the same level of mappability to correct for the mappability bias within them (see Figure 3).

The DNA structure can differ between populations and subpopulations. This relation is called population stratification and it is a source of another bias that can affect the detection. Principal component analysis (PCA) normalization is sometimes used to remove this kind of bias. The aim of this method is to reduce the noise commonly seen across populations while still preserving information directly linked to the sample^(19,29). The disadvantage is the need for a high amount of healthy samples for training. Moreover, the used laboratory protocol affects the parameters of noise, thus it usually needs to be retrained for other laboratory protocols and/or sample tissues.

It is important to mention another aspect of CNV detection and that is linked to the significance of individual variations. The controversy revolves around the fact that many microdeletions and microduplications are either hard to

detect with satisfiable accuracy or that their impact on the fetus is not yet fully known. Therefore women who choose NIPT, especially for microdeletion/microduplication detection, should be well informed about the accuracy, reliability, false positive and false negative rates, and the limited ability to predict future intellectual development⁽³⁰⁾.

Conclusion

The development of new methods for CNV detection is continuous and ongoing. The importance of CNV detection is growing since they are essential to better understand the plasticity of our genome and to elucidate its possible connections to various diseases. The smaller CNVs are often innocuous, however larger ones (500 kb and more) can be linked to the development of disorders and cancer⁽³¹⁾. Methods that have been developed helped to reveal these consequences and enabled us to prepare for the right treatment. Moreover, technologies of next-generation sequencing sped up the detection process due to their ability to compute large amounts of data. Thus the whole-genome sequencing could be done more effectively, which led to new methods and approaches. New convenient tools are being designed for storing, searching, annotating, and evaluating CNV-related data. Resolution of such tools is increasing and subsequently, new variants are discovered. This rapid development leaves a challenge for numerous genetic institutions, researchers, laboratory diagnosticians, and other related corporations in the form of correct interpretation of CNVs evolutionary significance and especially their clinical impact on humans.

Acknowledgment

This article was created with the support of the OP Integrated Infrastructure for the projects: ITMS: 313011V578 and 313011V446, both co-financed by the European Regional Development Fund.

Pod'akovanie

Tento článok vznikol za pomoci OP Integrovanej Infraštruktúry pre projekty: ITMS: 313011V578 a 313011V446, spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

REFERENCES

- Venter JC, Smith HO, Adams MD. The Sequence of the Human Genome. *Clin Chem.* 2015;61: 1207–1208.
- Consortium IHGS, International Human Genome Sequencing Consortium. Correction: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001. pp. 565–566. doi:10.1038/35087627
- Samuelsson T. *The Human Genome in Health and Disease: A Story of Four Letters.* Garland Science; 2019.
- Bruno A, Aury J-M, Engelen S. BoardION: real-time monitoring of Oxford Nanopore Technologies devices. doi:10.1101/2020.06.09.142273
- Park D, Park S-H, Ban YW, Kim YS, Park K-C, Kim N-S, et al. A bioinformatics approach for identifying transgene insertion sites using whole genome sequencing data. *BMC Biotechnol.* 2017;17: 1–8.
- Dong Z, Jiang L, Yang C, Hu H, Wang X, Chen H, et al. A robust approach for blind detection of balanced chromosomal rearrangements with whole-genome low-coverage sequencing. *Hum Mutat.* 2014;35: 625–636.
- Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, et al. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet.* 2007;39: 1256–1260.
- Zhang F, Gu W, Hurler ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10: 451–481.
- Frank B, Bermejo JL, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Meindl A, et al. Copy number variant in the candidate tumor suppressor gene MTUS1 and familial breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2007;28: 1442–1445.
- Shlien A, Tabori U, Marshall CR, Pienkowska M, Feuk L, Novokmet A, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 11264–11269.
- Liu S, Yao L, Ding D, Zhu H. CCL3L1 Copy Number Variation and Susceptibility to HIV-1 Infection: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0015778

12. Sanchis-Juan A, Stephens J, French CE, Gleadall N, Mégy K, Penkett C, et al. Complex structural variants in Mendelian disorders: identification and breakpoint resolution using short- and long-read genome sequencing. *Genome Medicine*. 2018. doi:10.1186/s13073-018-0606-6
13. Zolgensma - one-time gene therapy for spinal muscular atrophy. *Med Lett Drugs Ther*. 2019;61: 113–114.
14. Pös O, Radvanszky J, Styk J, Pös Z, Buglyó G, Kajsik M, et al. Copy Number Variation: Methods and Clinical Applications. *NATO Adv Sci Inst Ser E Appl Sci*. 2021;11: 819.
15. Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, et al. Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature. *Biomed Res Int*. 2013;2013: 346762.
16. Kucharik M, Gnip A, Hyblova M, Budis J, Strieskova L, Harsanyova M, et al. Non-invasive prenatal testing (NIPT) by low coverage genomic sequencing: Detection limits of screened chromosomal microdeletions. *PLoS One*. 2020;15: e0238245.
17. Website. Available: <https://www.mlo-online.com/molecular/dna-rna/article/13017563/wes-vs-wgs-why-the-exome-isnt-the-whole-story-and-sometimes-when-its-better>.
18. Shallow Whole Genome Sequencing. [cited 29 Oct 2021]. Available: <https://www.cd-genomics.com/shallow-whole-genome-sequencing.html>
19. Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar J-S, et al. Detection of Fetal Subchromosomal Abnormalities by Sequencing Circulating Cell-Free DNA from Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*. 2015. pp. 608–616. doi:10.1373/clinchem.2014.233312
20. Scheinin I, Sie D, Bengtsson H, van de Wiel MA, Olshen AB, van Thuijl HF, et al. DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly. *Genome Res*. 2014;24: 2022–2032.
21. Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilissen C, et al. Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. *PLoS Comput Biol*. 2010;6: e1000752.
22. Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. *Genome Med*. 2009;1: 62.
23. Straver R, Siermans EA, Reinders MJT. Introducing WISECONDOR for noninvasive prenatal diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014;14: 513–515.
24. Raman L, Dheedene A, De Smet M, Van Dorpe J, Menten B. WisecondorX: improved copy number detection for routine shallow whole-genome sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2019;47: 1605–1614.
25. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput Biol*. 2016;12: e1004873.
26. Dharanipragada P, Vogeti S, Parekh N. iCopyDAV: Integrated platform for copy number variations-Detection, annotation and visualization. *PLoS One*. 2018;13: e0195334.
27. Chen Y-C, Liu T, Yu C-H, Chiang T-Y, Hwang C-C. Effects of GC Bias in Next-Generation-Sequencing Data on De Novo Genome Assembly. *PLoS ONE*. 2013. p. e62856. doi:10.1371/journal.pone.0062856
28. Alkan C, Kidd JM, Marques-Bonet T, Aksay G, Antonacci F, Hormozdizari F, et al. Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. *Nature Genetics*. 2009. pp. 1061–1067. doi:10.1038/ng.437
29. Principal Component Analysis and Factor Analysis. *Principal Component Analysis*. pp. 150–166. doi:10.1007/0-387-22440-8_7
30. Rose NC, Benn P, Milunsky A. Current controversies in prenatal diagnosis 1: should NIPT routinely include microdeletions/microduplications? *Prenat Diagn*. 2016;36: 10–14.
31. Valsesia A, Mace A, Jacquemont S, Beckmann JS, Kutalik Z. The Growing Importance of CNVs: New Insights for Detection and Clinical Interpretation. *Front Genet*. 2013;0. doi:10.3389/fgene.2013.00092

Zuzana Klinovská

Za Valy 473/2

957 01 Bánovce nad Bebravou

e-mail: z.klinovska@gmail.com

Slabé miesta vakcín: dokážeme im predchádzať? – prípadová štúdia SARS-CoV-2

Michaela Hýblová, Patrik Krumpolec, Klaudia Babišová, Gabriel Minárik
MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Bratislava

Objav antibiotík Alexandrom Flemingom a zavedenie vakcinácie patria nepochybne k najväčším míľnikom v medicíne v moderných dejinách ľudstva. Aj v minulosti sa ľudstvu podarilo vyrovnáť sa s obrovskými pandémiami moru, pravých kiahní a cholery, ale za cenu vymretia tretiny Európy. V súčasnosti čelíme viac ako dva roky globálnej pandémie koronavírusu SARS-CoV-2 s bezprecedentným rozsahom v novodobých dejinách, ktorý si vyžiadal viac ako 6 miliónov úmrtí a ekonomické škody v biliónoch dolárov. Na rozdiel od minulosti však vďaka vedecko-technickému pokroku a znalostiam v biologických vedách čelíme aj úplne iným výzvam. Jednou z nich sú nežiaduce účinky vakcinácie vyplývajúce z charakteru vakcín a individuálnych špecifik našej imunity, ktoré zároveň odrádza od očkovania nezanedbateľnú časť verejnosti, čo spomaľuje proces získavania kolektívnej imunity. Pochopenie procesov ako náš imunitný systém reaguje na vírus alebo prečo a za akých okolností reaguje neadekvátne pri prirodzenej infekcii alebo očkovaní môže pomôcť individualizovať podávanie vakcín rôznym skupinám ľudí alebo tiež nasmerovať vývoj nových vakcín optimálnym smerom. Okrem bežných reakcií tela na vakcínu, ktoré sú očakávateľné a v podstate benigne, existujú všeobecne zriedkavé nežiaduce prejavy, ktoré môžu po očkovaní nastať.

Kľúčové slová: mRNA vakcíny, COVID-19, zosilnenie vírusovej infekcie závislé od protilátok – ADE, vakcínou indukovaná trombotická trombocytopenia – VITT

Vaccine vulnerabilities: can we prevent them? - SARS-CoV-2 case study

The discovery of antibiotics by Alexander Fleming and the introduction of vaccination are undoubtedly among the most remarkable medical milestones in modern human history. In the past, humankind has managed to cope with vast pandemics of plague, smallpox and cholera, however, at the cost of the extinction of a third of Europe. We have now been facing a global SARS-CoV-2 coronavirus pandemic for more than two years, unprecedentedly in modern history, resulting in more than 6 million deaths and trillions of dollars in economic damage. However, unlike in the past, we also face different challenges, thanks to scientific and technological advances and knowledge in the life sciences. One of these is the adverse effects of vaccination arising from the nature of vaccines and the individual specificities of our immunity, which also discourages a significant proportion of the public from being vaccinated, slowing down the process of acquiring collective immunity. Understanding how our immune system responds to a virus or why and under what circumstances it responds inadequately during natural infection or vaccination can help to individualise the administration of vaccines to different groups of people or steer the development of new vaccines in an optimal direction. In addition to the body's normal reactions to a vaccine, which are expected and essentially benign, there are generally rare adverse reactions that can occur after vaccination.

Keywords: mRNA vaccines; COVID 19, antibody-dependent enhancement-ADE, vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia-VITT

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 42 – 46

V súčasnosti v odbornej, ale aj laickej verejnosti rezonujú informácie o aktuálne známych typoch vakcín, pričom ako prvé sa stali dostupnými tie na báze mRNA (Pfizer BioNTech, Moderna), v súčasnosti sú už dostupné aj adenovírusové (AstraZeneca, Sputnik, Johnson Johnson), inaktivované (Sinopharm) alebo peptidové vakcíny (Sinovac). Existujú pomerne presné dáta o ich efektívnej ochrane, u mnohých z nich presahujúc viac ako 90 % (proti pôvodnému wuchanskému kmeňu SARS-CoV-2), čo je výrazne viac ako minimálnych 50 %, aby vakcína mohla byť registrovaná regulačnými autoritami ako EMA (European Medicines Agency) v Európe

alebo FDA (Food and Drug Administration) v USA. Od vypuknutia pandémie v závere roka 2019 sme sa dočkali objavenia nových variantov vírusu – alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351), delta (B.1.617.2) až po súčasnú pandémiu najinfekčnejšieho variantu SARS-CoV-2 omikron (BA.1 a BA.2). Vakcíny, ktoré sa začali pôvodne vyvíjať, vychádzali z genetickej informácie pôvodného kmeňa, ktorý sa rozšíril do sveta z čínskeho Wu-chanu. Medzitým sme mali na konci roku 2020 dominantne rozšírený „anglický“ variant alfa, o pol roka sme stáli pred pandemiou delta variantu, ktorý sa rozšíril z Indie a posledných pár mesiacov suverénne dominuje najinfekčnejší

omikron. Obrovský selekčný tlak, dlhodobá cirkulácia medzi neočkovanými ľuďmi, ale aj dlhý čas, počas ktorého interaguje s našim imunitným systémom, spôsobuje, že sa môžu objavovať nové infekčnejšie varianty a sila týchto vakcín bude „slabnúť“. Už aj dnes existujú dáta, že prvé úspešné vakcíny Pfizer BioNTech účinkujú na nový variant omikron už len na 70 %⁽¹⁾. Z dlhodobého hľadiska sa preto nevyhneme výraznej aktualizácii vakcín alebo aj kompletnému prekopaniu stratégie, na čo má samotná vakcína cieľ. Často a dlhodobo je práve skloňovaná a možno až preceňovaná tvorba protilátok proti SARS-CoV-2 ako hlavný cieľ vakcinácie proti kovidu, a to napriek všeobecne známemu faktu, že dominantné postavenie pri boji s akoukoľvek vírusovou infekciou má správne fungujúca bunková imunita. Tvorba protilátok je nepochybne dôležitá pri eliminácii akéhokoľvek infekčného ochorenia, ale efektívnosť získanej imunity by sa mala viac zameriavať na posilnenie bunkovej imunity ako protilátkovej, ktorá je „zraniteľnejšia“ práve pri rýchlo sa meniacich heterológnych RNA vírusoch. Molekulárna detekcia protilátok je pomerne jednoduchý proces, pretože protilátky sa viažu priamo na antigény. Naproti tomu T-bunky rozpoznávajú a viažu sa na procesované antigény, ktoré sú vystavené na povrchu buniek známych ako bunky prezentujúce antigén (APC) prostredníctvom molekúl hlavného histokompatibilného komplexu (MHC). Vzhľadom na vysokú inter- aj intradruhovou variabilitu molekúl peptid-MHC je meranie reakcie epitopovo špecifických T-buniek veľmi náročné.

Infekcia bunky vírusom SARS-CoV-2

Vírusová infekcia sa začína prichytením vírusovej častice k cytoplazmatickej membráne bunky. Vírusový povrchový proteín S (spike) SARS-CoV-2 vírusu sa viaže na špecifický ACE2 (enzým 2 konvertujúci angiotenzín) receptor. Expresia a distribúcia ACE2 receptorov v tkanivách následne ovplyvňujú vírusový tropizmus a jeho patogenitu. Hostiteľská membránová serínová proteáza (TMPRSS2) pomáha fúzii nukleokapsidu vírusu s membránou bunky, jeho vstupu do bunky a následnému obnaženiu genomickej RNA. ACE2 a TMPRSS2 sú exprimované hlavne v dýchacom trakte. Genóm vírusu tvorí výrazne dlhá genomická RNA pozitívnej polarita, ktorá je ohraničená 5'- a 3'-neprekľadanými oblasťami s *cis* transaktivujúcimi elementmi dôležitými pre replikáciu. Na 5'-konci sa nachádzajú dva dlhé otvorené čítacie rámce ORF 1 a, b (*open reading frame*), ktoré predstavujú dve tretiny genómu. Tieto ORFs kódujú 15-16 neštruktúrnych proteínov. Tie sú po vstupe do bunky priamo prekladané na hostiteľských ribozómoch z vírusovej genomickej RNA. Vznikajú neštruktúrne proteíny, ktoré formujú replikačný a transkripčný komplex (RTC), obsahujúci všetky enzýmy potrebné na replikáciu, úpravu (*processing*), modifikácie (*modifying*), opravu (*proofreading*) RNA a inhibíciu včasnej hostiteľskej imunitnej reakcie (interferón). RNA replikácia je inicializovaná syntézou RNA vlákna negatívnej polarita, ktorý je matricou pre genomickú ssRNA pozitívnej polarita. Súčasne s produkciou vlákna pozitívnej polarita prebieha diskontinuálna transkripcia z 3'-konca, kde z otvorených čítacích rámcov vznikajú subgenomické mRNA pre štruktúrne proteíny a proteíny s rôznymi doplnkovými funkciami, ktoré dokážu modifikovať hostiteľskú imunitnú odpoveď a determinujú tak vírusovú patogenitu. Funkcie viacerých z týchto doplnkových proteínov

nie sú dosiaľ známe v dôsledku chýbajúcej homológie s inými proteínmi známymi pri iných koronavírusoch. Genomická ssRNA pozitívnej polarita je na konci replikačného cyklu za pomoci Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula vbalovaná do vírusových partikul, ktoré sa exocytózou dostávajú von z bunky. Viaceré z týchto procesov predstavujú potenciálne terapeutické ciele na zabránenie množenia vírusu.

V prvých fázach v boji proti infekcii nastupujú mechanizmy vrodenej imunity. Bunka infikovaná vírusom produkuje interferón gama ako prozápalový cytokín, ktorý atrahuje do miesta infekcie fagocytujúce bunky (makrofágy, dendritické bunky). Počas evolúcie si vírusy vyvinuli mechanizmy, ako túto odpoveď účinne spomaľovať⁽²⁾.

Zosilnenie vírusovej infekcie závislé od protilátok – ADE (*antibody dependent enhancement*)

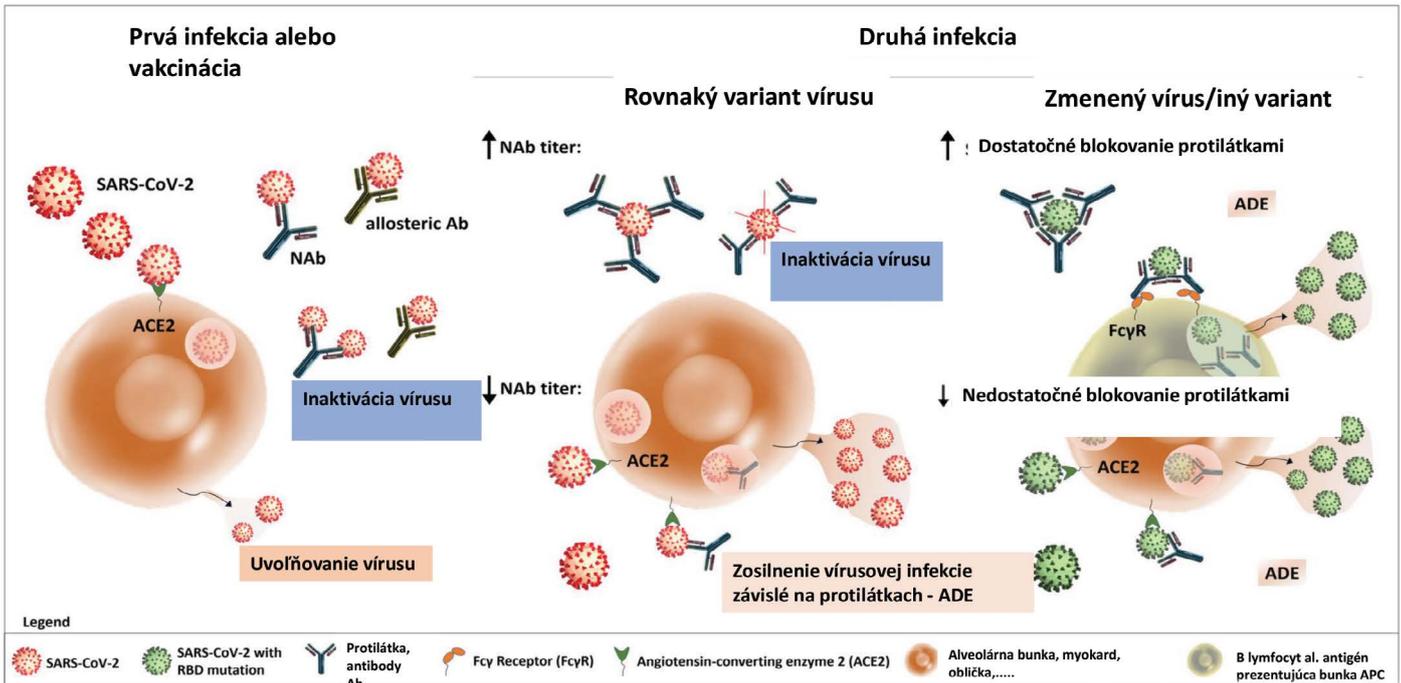
Na začiatku pandémie sa rozprúdila vedecká debata o najlepšom spôsobe výroby vakcín proti COVID-19, aby sa zaisťovala ich účinnosť a bezpečnosť. Niektoré z týchto diskusií sa zameriavali na zriedkavý fenomén, známy ako zosilnenie vírusovej infekcie sprostredkovanou protilátkami – ADE (*antibody dependent enhancement*). ADE je potenciálne smrteľný imunitný jav, ktorý bol pozorovaný pri niektorých vírusových infekciách a vakcínach. Po infekcii človeka jedným sérotypom vírusu štandardne vznikajú protilátky neutralizujúce vírus (viažu sa na vírus a zabraňujú jeho preniknutiu do bunky), ale pri opakovanej infekcii iným sérotypom tohto vírusu však dochádza k vzniku protilátok, ktoré nemusia byť neutralizačné alebo sa nachádzajú v suboptimálnom množstve. Aj keď ADE môže vznikáť rôznymi spôsobmi, asi najznámejšou je cesta „trójskeho koňa“. K tomu dochádza vtedy, keď vznikajú protilátky generované infekciou alebo očkovaním v minulosti, ktoré však nedokážu neutralizovať vírus a po opätovnej expozícii patogénov ho nedokážu neutralizovať. Namiesto toho pôsobia ako brána tým, že umožňujú vírusu získať vstup a replikovať sa v bunkách, ktoré bežne neinfikuje (makrofágy, dendritické bunky). Tieto bunky namiesto toho, aby vírusy eliminovali, načo primárne slúžia, naopak, pohltia vírus, ten sa v nich začne množiť a navyše sa krvou roznáša ďalej do tela. To prispieva k rýchlemu šíreniu infekcie a nežiaducim imunitným reakciám, čo ďalej zhoršuje priebeh ochorenia. ADE sa môže vyskytnúť aj vtedy, ak sú neutralizačné protilátky len v nízkych hladinách, ktoré nechránia pred infekciou. Namiesto toho môžu vytvárať imunitné komplexy s vírusovými časticami, čo následne vedie k zhoršeniu ochorenia⁽³⁾.

Klasický príklad ADE v štýle trójskeho koňa je vírus spôsobujúci horúčku dengue (RNA flavivírus). Tento vírus existuje v štyroch sérotypoch. Tie sú od seba dostatočne odlišné, takže predchádzajúca infekcia jedným z nich nedáva vznik protilátkam neutralizujúcim vírus, ktoré by dostatočne chránili pred iným sérotypom.

V roku 2016 bola vyvinutá vakcína proti horúčke dengue na ochranu pred všetkými štyrmi sérotypmi, ktorá bola podaná 800 000 deťom na Filipínach. Medzi deťmi, ktoré boli očkované a neskôr vystavené horúčke dengue divokého typu, viacero zomrelo, pravdepodobne na závažné následky ADE⁽⁴⁾.

V 60. rokoch minulého storočia sa ADE objavil v súvislosti s inaktivovanými vakcínami proti respiračnému syncytiálnemu vírusu RSV (RNA pneumovírus), pri ktorom sa u detí, ktoré dostali očkovaciu látku vyvinulo závažnejšie ochore-

Obrázok 1. Potenciálne cesty ADE (prevzaté z anglického originálu Ulrich H, Pillat MM, Tárnok A. *Dengue Fever, COVID-19 (SARS-CoV-2), and Antibody-Dependent Enhancement (ADE): A Perspective. Cytometry A. 2020 Jul;97(7):662-667. doi: 10.1002/cyto.a.24047. Epub 2020 Jun 7. PMID: 32506725; PMCID: PMC7300451.*)



nie RSV, keď sa neskôr v komunite stretli s divým kmeňom vírusu. Zomrelo niekoľko detí. Vakcína bola spojená s tvorbou imunokomplexov, ktoré spôsobovali obštrukciu pľúc a zhoršili priebeh ochorenia, čo do značnej miery zastavilo vývoj vakcíny proti RSV. Podobne sa prípady ADE vyskytli aj pri inaktivovanej očkovacej látke proti osýpkam⁽⁵⁾. Doteraz neboli hlásené žiadne prípady ADE v súvislosti s vakcínami proti COVID-19. Obavy sa však opäť začali objavovať s príchodom nových variantov vírusov, kde by pôvodné vakcíny nemuseli účinne pokrývať novšie varianty a, naopak, mohli by ešte potenciovat ADE. Tento mechanizmus sa spomína napríklad v súvislosti s multiorgánovým zápalovým syndrómom u detí, ktoré dostali protilátky od matky. Jednou z výnimiek môže byť aj inaktivovaná celobunková vakcína vyvinutá v Číne (Sinopharm). Táto vakcína tiež používa kamenc ako adjuvans, ktorý bol použitý vo vakcínach proti osýpkam a RSV, ktoré spôsobovali ADE v šesťdesiatych rokoch minulého storočia.

Napriek vážavosti ohľadom relatívnej novosti mRNA a adenovírusových vektorových vakcín majú tieto vakcíny v skutočnosti lepší bezpečnostný profil z hľadiska ADE ako staršie typy vakcín z minulosti.

Vakcínou indukovaná trombotická trombocytopenia (VITT) po podaní vektorovej DNA vakcíny

Imunitná trombotická trombocytopenia (VITT) je závažnou komplikáciou očkovania, ktorú nie je možné predvídať ani jej predchádzať. VITT je charakterizovaný súčasnou prítomnosťou dvoch stavov: trombózy (často na neobvyklých miestach, ako sú mozgové žily alebo splachnické žily) a trombocytopenie. Keď sa u pacienta objaví pretrvávajúca bolesť hlavy, neurologické príznaky, bolesti brucha, dysp-

noe alebo bolesti/otlaky končatín začínajúce sa 5 – 30 dní po očkovaní, musí sa zmerať počet trombocytov, hodnoty D-diméru a vykonať potrebné zobrazovacie vyšetrenie na trombózu⁽⁶⁾.

V súvislosti s podávaním vektorových vakcín (AstraZeneca, Johnson & Johnson) sa objavilo niekoľko prípadov život ohrozujúcich trombembolytických a trombocytopenických príhod väčšinou u mladých žien s mediánom veku 36 rokov (21 – 49) jeden až dva týždne po vakcinácii, čo výrazne prispelo k zníženiu „popularity“ tejto vakcíny a dokonca až k zastaveniu jej podávania vo viacerých krajinách, Slovensko nevyvímajúc. Detailným štúdiom možnej príčiny sa zistilo, že patofyziologický mechanizmus by mohol byť podobný ako pri heparínom indukovanej trombocytopenii (HIT-heparin induced thrombocytopenia). Voľná záporne nabitá DNA vo vakcínach sa viaže na trombocyty, čo môže aktivovať protilátky proti doštičkovému faktoru 4 (PF-4). Takéto protilátky časť ľudí najskôr má (ľudia po operácii srdca, liečba heparínom z rôznych dôvodov), výsledkom čoho môže dôjsť k aktivácii trombocytov a k spusteniu koagulačnej kaskády vedúcej k trombotickej trombocytopenii indukovanej vakcínou analogicky ako pri trombocytopenii indukovanej heparínom (HIT). Komerčné testy ELISA, ktoré detegujú prítomnosť protilátok PF-4 sú široko dostupné a mohli by pomôcť v identifikácii pacientov, pre ktorých nie je tento typ vakcíny vhodný. Z nedávnej správy v časopise *Journals of the American College of Cardiology (JACC)* vyplýva, že trombóza mozgových žíl sa vyskytla u 3,6 na milión ľudí po vakcínach AstraZeneca a u 0,9 na milión ľudí po vakcínach Johnson & Johnson. Na porovnanie, výskyt trombózy mozgových žíl sa odhaduje na 207 prípadov na milión pacientov hospitalizovaných po očkovacej látke proti COVID-19 a 2,4 prípadu na milión pacientov v cel-

kovej populácii. Treba však zdôrazniť, že riziko úmrtia a závažných následkov po COVID-19 (vrátane trombózy) oveľa prevyšuje malé riziko VITT⁽⁷⁾.

Postvakcinačná myokarditída a perikarditída

Niekoľko štúdií zaznamenalo vyšší výskyt myokarditídy (MK) a perikarditídy (PK) po podaní mRNA vakcín (Moderna) alebo BNT162b2 (Pfizer BioNTech) u mladých mužov. Myokarditída a perikarditída sú zápalové ochorenia srdca. Prejavujú sa najmä dýchavičnosťou, bolesťou na hrudníku a prudkým tlkotom srdca, ktorý môže byť nepravidelný. V jednej rozsiahlej štúdií zaznamenali 411 prípadov MK a PK z 15 148 369 ľudí vo veku od 18 do 64 rokov. Medzi mladými mužmi vo veku 18 – 24 rokov bola incidencia komplikácií MK a PK po druhej dávke 1,71 (Pfizer BioNTech) a 2,17 (Moderna) na 100 000 ľudí v danej vekovej skupine, čiže mierne v neprospech vakcíny Moderna, ale nie štatisticky významne. Tieto negatívne prejavy sa dostavili približne týždeň po druhej vakcinácii a nasledovalo ochorenie väčšinou s benigným priebehom a krátkou hospitalizáciou⁽⁸⁾. Iná menšia štúdia potvrdzuje rovnaké závery v prípade podania mRNA vakcín, ale s nezanedbateľným trendom vyššieho výskytu MK a PK u mužov a žien aj vo vyšších vekových skupinách⁽⁹⁾. Na základe týchto vedeckých poznatkov odporučila EMA zaradiť myokarditídu a perikarditídu na zoznam negatívnych vedľajších prejavov po podaní mRNA vakcín. Podľa údajov na stránkach ŠÚKL (Štátny ústav pre kontrolu liečiv) bolo niekoľko prípadov postvakcinčného zápalového ochorenia srdca hlásených aj na Slovensku.

Reaktivácia vírusu kiahní (Varicella zoster, VZV)

Z viacerých krajín boli hlásené sporadické prípady (okolo 100) reaktivácie vírusu Varicella zoster (DNA alfa herpesvírus) približne týždeň po podaní rôznych vakcín proti ochoreniu COVID-19. Približne 13 % z tejto skupiny tvorili pacienti s autoimunitným ochorením, najčastejšie s reumatoidnou artritídou, 10 % boli pacienti užívajúci imunosupresívnu liečbu (prednizón, JAK inhibítory), hypertenzia bola najčastejšia komorbidita u 18 % pacientov a zvyšok skupiny predstavovala imunokompetentná väčšina. Dve tretiny pacientov dostali vakcínu na báze mRNA (Pfizer BioNTech, Moderna) ani jeden prípad nebol opísaný v súvislosti s jednodávkovou vakcínou Janssen od firmy Johnson. Počas trvania klinických štúdií sa neobjavil ani jediný prípad reaktivácie latentného VZV. U viac ako polovice pacientov došlo k reaktivácii po prvej dávke vakcíny. Herpes zoster ako kožné bolestivé ochorenie s bolestivým výsevom vodnatých vyrážok na koži je spôsobené reaktiváciou neurotropeho vírusu VZV (Varicella zoster virus VZV, ľudský herpesvírus 3, HHV3), ktorý pretrváva v latentnej forme v dorzálnych nervových gangliách po prekonaní primoinfekcie varicellou, ľudovo ovčimi kiahňami. K reaktivácii obyčajne dochádza, keď zlyhajú imunologické mechanizmy, hlavne bunková imunita kontrolujúca vírusovú latenciu. Hlavnými rizikovými faktormi je starnutie imunitného systému s pokročilým vekom, imunosupresívna liečba, imunokompromitujúce ochorenie, napr. HIV alebo automimunitné ochorenie. Očkovanie sa doteraz nepovažovalo za potenciujúci faktor, hoci extrémne zriedkavé prípady boli opísané aj pri podaní vakcín proti chrípke, besnote a hepatitíde A. Bunková imunita hrá dôležitú úlohu v prevencii reaktivácie VZV.

Pokles bunkami sprostredkovanej imunity s vekom alebo s poklesom VZV špecifických T-buniek narúša imunitný dohľad a zvyšuje riziko reaktivácie.

Závažný priebeh ochorenia COVID-19, ale aj iného vírusového ochorenia je často spojený s výrazným poklesom T-lymfocytov alebo jednoducho „vyhorením“ T-buniek, špecificky CD4+ a CD8+, čo vedie k stavu označovanému ako lymfopénia, čo môže potenciálne viesť k reaktivácii vírusu⁽¹⁰⁾.

Na druhej strane stimulácia imunitného systému vakcínou by mala, naopak, viesť k silnej T-bunkovej odpovedi, ktorá pretrváva dlhý čas. Pre tento paradox sa objavila presvedčivá hypotéza, ktorá naznačuje, že CD8+ bunky špecifické pre VZV nie sú dočasne schopné kontrolovať latentný VZV po masívnom presune naivných CD8+ buniek v rámci očkovania proti SARS-CoV-2. Ďalším potenciálne vysvetľujúcim mechanizmom môže byť aktivácia vrodenej imunity cez *toll like* receptory (TLR), ktorá sa často podieľa na procese reaktivácie herpetických vírusov ako udržiavacieho mechanizmu v hostiteľovi. Najmä narušenie expresie TLR medzi očkovacími jedincami bolo spojené s výraznou indukciou tvorby interferónu typu I (IFN) a prozápalových cytokínov, ktoré aj keď podporujú T-bunkovú aktiváciu a iniciujú odpoveď pamätových B-buniek na vylučovanie protilátok, môžu zároveň negatívne modulovať expresiu antigénu, pričom potenciálne prispievať k reaktivácii VZV⁽¹¹⁾.

Postvakcinačný Guillainov-Barrého syndróm

V súvislosti s očkovaním vektorovou (AstraZeneca) aj mRNA (vakcínou Pfizer BioNTech) proti kovidu sa začali objavovať sporadické prípady rozvoja Guillainovho-Barrého syndrómu (GBS) v krátkom čase po vakcinácii. GBS je akútna periférna neuropatia spôsobená autoimunitnou odpoveďou jedinca po predchádzajúcej infekcii gastrointestinálneho alebo respiračného traktu. Ochorenie je zriedkavé a objavuje sa približne u 1 až 2 ľudí na 100 000, pričom dve tretiny majú históriu infekčného ochorenia. Doposiaľ bolo ochorenie opísané v súvislosti s infekciou *Campylobacter jejuni*, EBV, CMV, *Mycobacterium pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, vírusom hepatitídy E a zika vírusom⁽¹²⁾. Podľa najnovších informácií sa môže vyvinúť GBS aj u pacientov po prekonaní ochorenia COVID-19, prekvapujúco relatívne častejšie u mužov s miernym priebehom bez známkov pneumónie, dokonca asymptomatických pacientov. K dnešnému dňu bolo opísaných niekoľko desiatok prípadov GBS v súvislosti s očkovaním. Elektrodiagnostická klasifikácia GBS po COVID-19 bola vo väčšine prípadov demyelinizačného typu nasledovaná axonálnym typom GBS⁽¹³⁾.

Pravdepodobný patofyziologický mechanizmus je založený na molekulárnom mimikry, keď protilátky vytvorené proti infekčnému agensu začnú rozpoznávať telu vlastné štruktúry, v tomto prípade myelínový obal nervovej bunky.

Podakovanie:

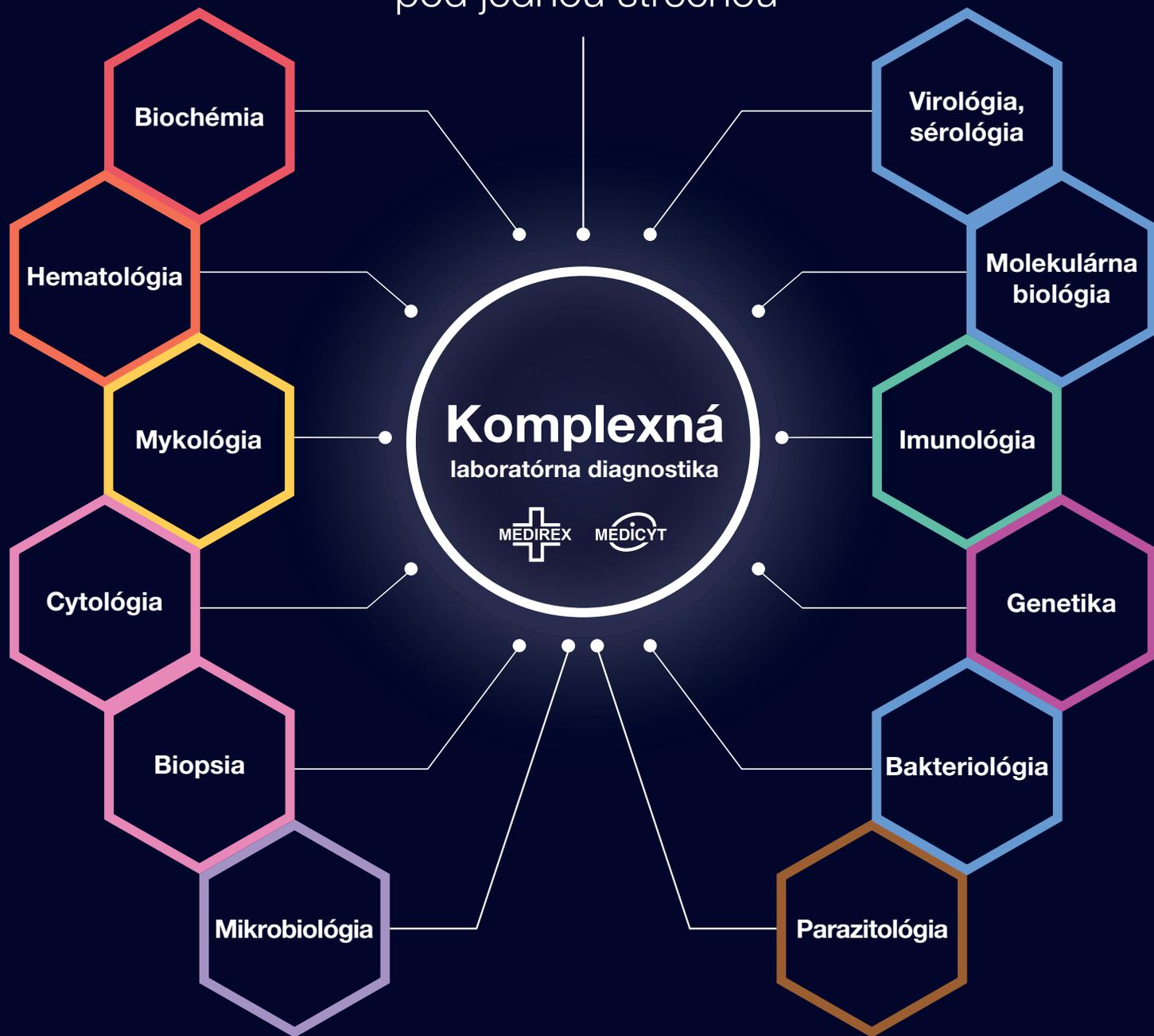
Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Závažné civilizačné ochorenia a COVID-19, kód ITMS: 313011AVH7, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Collie S, Champion J, Moultrie H, Bekker LG, Gray G. Effectiveness of BNT162b2 Vaccine against Omicron Variant in South Africa. *N Engl J Med*. 2022 Feb 3;386(5):494-496. doi: 10.1056/NEJMc2119270. Epub 2021 Dec 29. PMID: 34965358; PMCID: PMC8757569.
2. Bhardwaj A, Sapra L, Saini C, Azam Z, Mishra PK, Verma B, Mishra GC, Srivastava RK. COVID-19: Immunology, Immunopathogenesis and Potential Therapies. *Int Rev Immunol*. 2021 Feb 27;1-36. doi: 10.1080/08830185.2021.1883600. Epub ahead of print. PMID: 33641587; PMCID: PMC7919479.
3. Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, He L, Chen Y, Wu J, Shi Z, Zhou Y, Du L, Li F. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol*. 2020 Feb 14;94(5):e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19. PMID: 31826992; PMCID: PMC7022351.
4. Ulrich H, Pillat MM, Tárnok A. Dengue Fever, COVID-19 (SARS-CoV-2), and Antibody-Dependent Enhancement (ADE): A Perspective. *Cytometry A*. 2020 Jul;97(7):662-667. doi: 10.1002/cyto.a.24047. Epub 2020 Jun 7. PMID: 32506725; PMCID: PMC7300451.
5. Smatti MK, Al Thani AA, Yassine HM. Viral-Induced Enhanced Disease Illness. *Front Microbiol*. 2018 Dec 5;9:2991. doi: 10.3389/fmicb.2018.02991. PMID: 30568643; PMCID: PMC6290032.
6. Iba T, Levy JH, Warkentin TE. Recognizing Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. *Crit Care Med*. 2022 Jan 1;50(1):e80-e86. doi: 10.1097/CCM.0000000000005211. PMID: 34259661; PMCID: PMC8670081.
7. Bikdeli B, Chatterjee S, Arora S, Monreal M, Jimenez D, Krumholz HM, Goldhaber SZ, Elkind MSV, Piazza G. Cerebral Venous Sinus Thrombosis in the U.S. Population, After Adenovirus-Based SARS-CoV-2 Vaccination, and After COVID-19. *J Am Coll Cardiol*. 2021 Jul 27;78(4):408-411. doi: 10.1016/j.jacc.2021.06.001. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34116145; PMCID: PMC8186447.
8. Wong HL, Hu M, Zhou CK, Lloyd PC, Amend KL, Beachler DC, Secora A, McMahon-Walraven CN, Lu Y, Wu Y, Ogilvie RP, Reich C, Djibo DA, Wan Z, Seeger JD, Akhtar S, Jiao Y, Chillarige Y, Do R, Hornberger J, Obidi J, Forshie R, Shoaibi A, Anderson SA. Risk of myocarditis and pericarditis after the COVID-19 mRNA vaccination in the USA: a cohort study in claims databases. *Lancet*. 2022 Jun 11;399(10342):2191-2199. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00791-7. PMID: 35691322; PMCID: PMC9183215.
9. Le Vu S, Bertrand M, Jabagi MJ, Botton J, Drouin J, Baricault B, Weill A, Dray-Spira R, Zureik M. Age and sex-specific risks of myocarditis and pericarditis following Covid-19 messenger RNA vaccines. *Nat Commun*. 2022 Jun 25;13(1):3633. doi: 10.1038/s41467-022-31401-5. PMID: 35752614; PMCID: PMC9233673.
10. van Dam CS, Lede I, Schaar J, Al-Dulaimy M, Rösken R, Smits M. Herpes zoster after COVID vaccination. *Int J Infect Dis*. 2021 Oct;111:169-171. doi: 10.1016/j.ijid.2021.08.048. Epub 2021 Aug 21. PMID: 34428545; PMCID: PMC8379763.
11. Katsikas Triantafyllidis K, Giannos P, Mian IT, Kyrtsonis G, Kechagias KS. Varicella Zoster Virus Reactivation Following COVID-19 Vaccination: A Systematic Review of Case Reports. *Vaccines (Basel)*. 2021 Sep 11;9(9):1013. doi: 10.3390/vaccines9091013. PMID: 34579250; PMCID: PMC8471236.
12. Rao SJ, Khurana S, Murthy G, Dawson ET, Jazebi N, Haas CJ. A case of Guillain-Barre syndrome following Pfizer COVID-19 vaccine. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2021 Sep 20;11(5):597-600. doi: 10.1080/20009666.2021.1954284. PMID: 34567447; PMCID: PMC8462911.
13. Kim JE, Min YG, Shin JY, Kwon YN, Bae JS, Sung JJ, Hong YH. Guillain-Barré Syndrome and Variants Following COVID-19 Vaccination: Report of 13 Cases. *Front Neurol*. 2022 Jan 27;12:820723. doi: 10.3389/fneur.2021.820723. PMID: 35153993; PMCID: PMC8833101.

RNDr. Michaela Hýblová, PhD,
MEDIREX GROUP ACADEMY, Bratislava
Galvaniho 17/C, 821 04 Ružinov
e-mail: michaela.hyblova@medirex.sk

MEDIREX GROUP:
komplex diagnostických laboratórií
pod jednou strechou



www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

