

newslab

časopis laboratórnej medicíny

Ročník XIII.

2
2022

**Histopatologické nálezy v obličke
u pacientov s COVID-19**

Histopathological findings in the kidney
of patients with COVID-19

**Vyhodnotenie početnosti a pozitivity
SARS-CoV-2 testovania na Slovensku v čase
pandémie COVID-19 – výsledky laboratórií
Medirex a.s.**

Evaluation of the frequency and positivity
of SARS-CoV-2 testing in Slovakia during
the COVID-19 pandemic – results
of Medirex a.s. laboratories

**Instabilita krátkych tandemových repetícií
v onkológii: potenciál tekutej biopsie**

Instability of short tandem repeats
in oncology: the potential of liquid biopsy

**The role of nitric oxide in endometrial
carcinoma**

Úloha oxidu dusnatého pri karcinóme
endometria

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

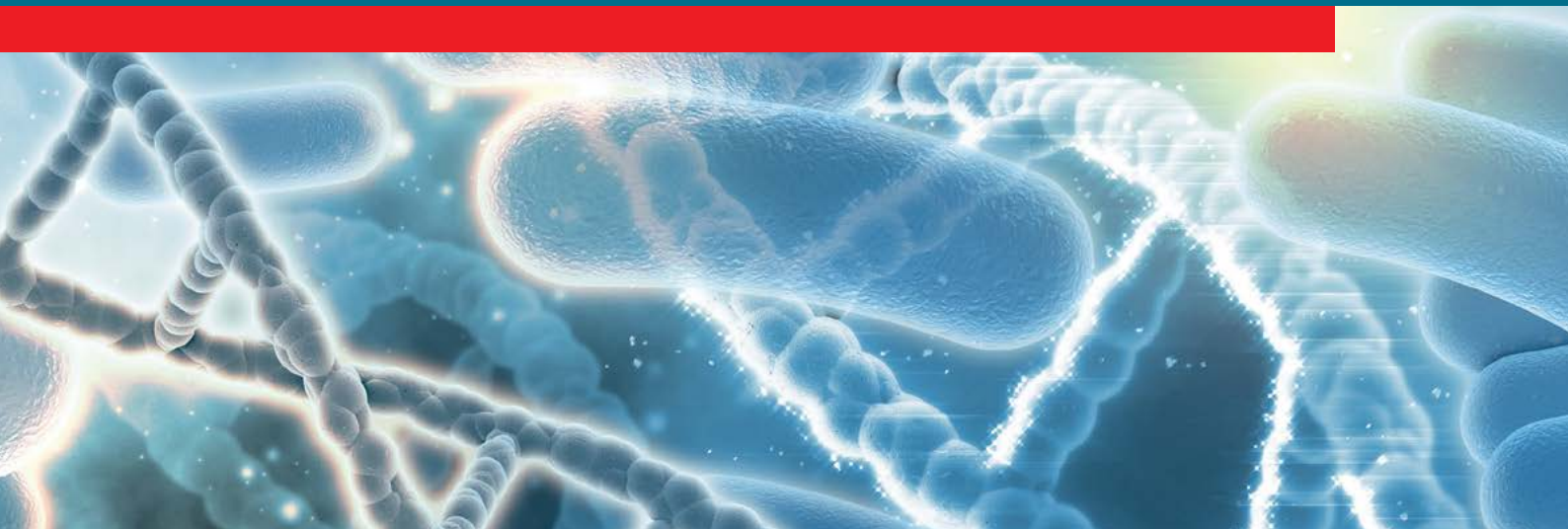
Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

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,

slovo, ktoré asi najvýraznejšie charakterizuje posledné pandemické obdobie, je spolupráca. Vďaka spolupráci sme dokázali za veľmi krátke obdobie dostať novodobú pandémiu pod kontrolu, zachrániť veľké množstvo ľudských životov a zmierniť socio-ekonomické následky v rôznych kútoch našej planéty. Tento úspech ešte viac potvrdil dôležitosť spolupráce vo vede, ale aj v zdravotníctve. Pandémia akcelerovala spájanie oblastí vedy, ktoré sme si v minulom desaťročí vedeli predstaviť len veľmi stroho.

Akým smerom sa budeme vo vede a verejnom zdravotníctve posúvať v najbližších rokoch? Túto odpoveď naznačujú najnovšie projektové výzvy na poli výskumu a inovácií v oblasti zdravia. Program Horizont Európa kladie veľký dôraz na spoluprácu, najmä medzi štátmi Európskej únie. Program má vyplniť rozdiely vo výskume a inováciách medzi centrálnou, východnou a západnou Európou. Hlavným nástrojom majú byť dáta, ich dostatočná kvantita a kvalita, ale najmä dostupnosť. Výsledkom projektov má byť posun v personalizovanej medicíne a cieľom má byť pacient ako jednotlivec.

Vo všeobecnosti vidíme čoraz väčší prienik IT a zdravotníctva. Kombináciou digitalizácie, umelej inteligencie a klinických dát vieme dosiahnuť kvalitnejšie zdravotníctvo pre každého pacienta. Kým v minulých rokoch bolo najdôležitejšou komoditou samotné množstvo klinických analýz, v súčasnosti sú to konečné dáta, ich množstvo a potenciálne využitie. Spoločnosti, ktoré disponujú takýmito dátami, sa vyznačujú veľkou mierou flexibility a kooperácie a sú čoraz častejšie lídrom v riešení medzinárodných projektov v oblasti výskumu a vývoja. Novovznikajúce programy Európskej komisie na podporu digitalizácie v zdravotníctve dokážu spájať potenciálnych partnerov prostredníctvom aktívnej online komunity, vytvárať zdravú konkurenciu a akcelerovať vývoj nových technológií.

Nemenej dôležité sú výzvy v oblasti boja proti civilizačným chorobám či zabezpečenie prístupu k inovatívnej, udržateľnej a vysokokvalitnej zdravotnej starostlivosti pre rizikové skupiny populácie, ako aj kvalitné vzdelanie pre mladú generáciu. Podpora vzdelávania je ďalším pilierom európskych grantových programov. Dáva šancu vzniku novým startupom, malým aj veľkým inovačným firmám. Sústreď sa na vznik vedeckých inkubátorov či konferencií. Spolupráca a vzdelávanie majú byť najsilnejším prostriedkom európskych štátov vo vede na globálnej úrovni a najväčšou výzvou bude schopnosť vytvárať nové partnerstvá nielen na národnej, ale aj na medzinárodnej úrovni. Preto verím, že sa inšpirujete našimi súčasnými vedeckými výsledkami, ktoré boli kvalitne spracované do aktuálneho vydania a v budúcnosti nájdeme spoločné témy do plánovaných výziev grantových schém.

Prajem vám príjemné čítanie.



RNDr. Andrej Minich, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Pôvodné práce

Histopatologické nálezy v obličke u pacientov s COVID-19 53

Vanessa Katharina Seibert, Pavol Janega,
Lucia Krivošíková, Kristína Mikuš-Kuracinová,
Andrea Janegová, Pavel Babál

Zavedenie a automatizácia vyšetrenia SARS-CoV-2 v Spadia Lab a.s. 58

Zuzana Dindová, Ondřej Kwašný

Vyhodnotenie početnosti a pozitivity SARS-CoV-2 testovania na Slovensku v čase pandémie COVID-19 – výsledky laboratórií Medirex a.s. 62

Nikola Janoštiaková, Andrej Gnip, Dominik Kodada,
Gabriela Bľandová, Vanda Repiská, Gabriel Minárik

Prehľadové práce

Myeloproliferatívne neoplázie a s nimi súvisiace mutácie 68

Miroslava Eckertová, Renata Lukačková, Ľubica Majerová

Genetická analýza reprodukčných strát 72

Katarína Tóthová, Dagmar Landlová, Ľubica Majerová,
Renata Lukačková

Metaplastické zmeny epitelu vybraných lokalít v gastrointestinálnom trakte 76

Kristína Mikuš Kuracinová

Instabilita krátkych tandemových repetícií v onkológii: potenciál tekutej biopsie 83

Jakub Styk, Matej Hrnčiar, Ondrej Pös, Silvia Bokorová,
Daniela Klimová, Vanda Repiská, Ján Radvánszky,
Tomáš Szemes

The role of nitric oxide in endometrial carcinoma 87

Katarína Krajčírová, Pavol Janega, Martina Cebová

Oxid dusnatý a jeho význam pri poškodení tkaniva a v reparácii 92

Ľubica Bernátová, Pavol Janega

Biopsia dychu: potenciálny zdroj DNA pre biomedicínske aplikácie 96

Ondrej Pös, Monika Kubáňová, Jakub Styk,
Silvia Bokorová, Werner Krampfl, Tatiana Sedláčková,
Vanda Repiská, Bálint Nagy, Tomáš Szemes

Kazuistiky

Patologická fraktúra progredujúca do subkompletnej osteodeštrukcie humeru 99

Samuel Horák, Mária Potočárová, Pavol Janega

Ročník 13, 2022, číslo 2
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: december 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.

Histopatologické nálezy v obličke u pacientov s COVID-19

Vanessa Katharina Seibert¹, Pavol Janega^{1,2,3}, Lucia Krivošíková¹,
Kristína Mikuš-Kuracinová^{1,2}, Andrea Janegová¹, Pavel Babál^{1,2}

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

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

³Centrum experimentálnej medicíny, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Pandémia spôsobená infekciou vírusom SARS-CoV-2 spôsobila ochorenie COVID-19, ktoré postihlo milióny ľudí. Dominantný klinický prejav súvisí s postihnutím pľúcneho tkaniva, ale môže dôjsť k narušeniu viacerých ďalších orgánových systémov. Patologické zmeny v tkanivách sú spôsobené priamou vírusovou infekciou, reakciou imunitného systému a aplikovanými terapeutickými zásahmi. Cieľom práce je zhodnotiť morfológické zmeny v obličkovom tkanive pacientov s COVID-19 vo vzťahu ku klinickým údajom. Vzorky obličkového tkaniva od 42 pacientov, ktorí zomreli v dôsledku COVID-19 v 1. a 2. vlně na Slovensku v období od marca 2020 do februára 2021, boli histopatologicky vyhodnotené svetelnou mikroskopiou. Morfológické zmeny boli korelované s klinickými údajmi (diabetes mellitus, artériová hypertenzia, akútne a chronické ochorenie obličiek), ako aj s laboratornými údajmi, ako sú hladiny kreatinínu a dĺžka hospitalizácie. Súvislosti sa hodnotili analýzou rozptylu. Skupinu tvorilo 42 pacientov (priemerný vek 74,4 roka; 22 žien; 20 mužov). Morfológické zmeny, ktoré možno spájať s klinickými údajmi, sa týkajú nekrózy kanálikov a intervalu medzi smrťou a pitvou ($p < 0,01$), artériosklerózy veľkých ciev a maximálnej hladiny kreatinínu ($p < 0,01$), intersticiálneho zápalového infiltrátu a maximálnej hladiny kreatinínu ($p < 0,05$). Akútnu aj chronickú renálnu insuficienciu možno spájať s glomerulosklerózou ($p < 0,05$), obezitu s kanálikovou nekrosou epitelu ($p < 0,05$). Pacienti s diabetom mellitom (DM) mali arteriosklerózu ($p < 0,05$), zhrubnutie mezangia ($p < 0,05$) a intersticiálny zápalový infiltrát ($p < 0,01$). Existuje významná korelácia patologických zmien v obličkovom tkanive so systémovými ochoreniami a niektorými klinickými údajmi zomrelých pacientov s COVID-19.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2, obličky, histopatológia, kanalikulárny epitel, pitva

Histopathological findings in the kidney of patients with COVID-19

Pandemic infection with SARS-CoV-2 caused COVID-19 disease affecting millions of people. The dominant clinical manifestation is related to pulmonary tissue affection, but several other organ systems can be disturbed. Pathological changes in tissues are caused by a direct viral infection, the immune system reaction and the applied therapeutic interventions. The presented research aims to evaluate morphological changes in the renal tissue of COVID-19 patients concerning clinical data. Kidney tissue samples from 42 patients who died due to COVID-19 in Slovakia's 1st and 2nd wave between March 2020 and February 2021 have been histopathologically evaluated by light microscopy. The morphological changes were correlated with clinical data (diabetes mellitus, arterial hypertension, acute and chronic renal disease) and laboratory data such as creatinine levels and hospitalization period. Associations were evaluated by analysis of variance. Among 42 patients (mean age 74.4; 22 females; 20 males), morphological changes which can be associated with clinical data refer to canalicular necrosis and death – autopsy interval ($p < 0,01$), arteriosclerosis of large vessels and maximum creatinine levels ($p < 0,01$), interstitial inflammatory infiltrate and maximum creatinine levels ($p < 0,05$). Both acute and chronic renal insufficiency can be linked to glomerulosclerosis ($p < 0,05$) and obesity with necrosis of canalicular epithelium ($p < 0,05$). Patients with Diabetes mellitus relate to arteriosclerosis ($p < 0,05$), mesangial thickening ($p < 0,05$) and interstitial inflammatory infiltrate ($p < 0,01$). There is a significant correlation between pathological changes in renal tissue with systemic diseases and some clinical data of deceased COVID-19 patients.

Keywords: SARS-CoV-2, kidney, histopathology, tubular epithelium, autopsy

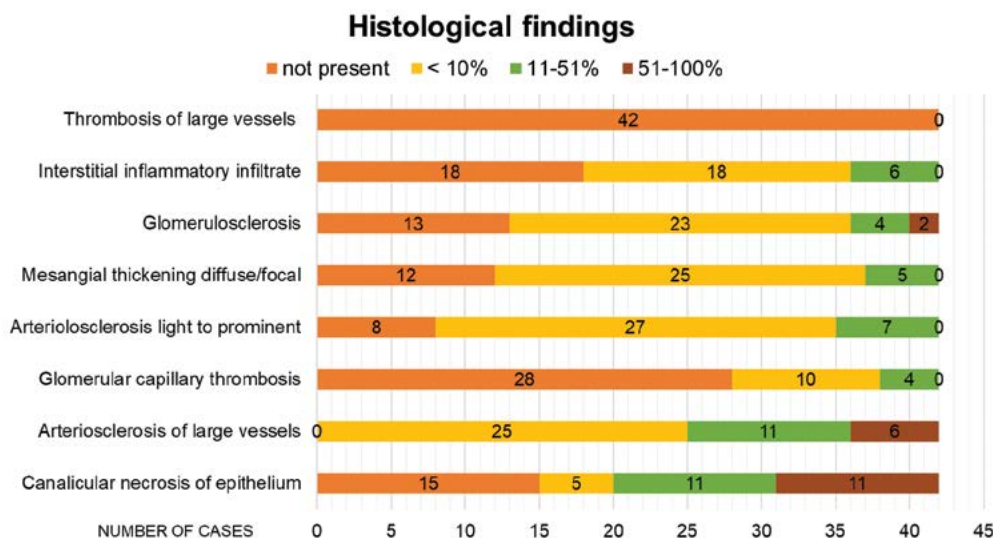
NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 53 – 57

Úvod

Pandémia ochorenia COVID-19 sa dotkla každého. Na jej začiatku koncom r. 2019, málokto predpokladal celosvetový dosah tejto vírusovej infekcie. SARS-CoV-2 vírusová infekcia

postihuje predovšetkým dýchaciu sústavu. Vyvoláva aj systémové reakcie, ktoré poškodzujú rôzne orgánové systémy. Navyše po prekonaní akútnej infekcie môže viesť k rozvoju „long COVID“ syndrómu^(1,2).

Obrázok 1. Sumárne zhrnutie histologických zmien vo vyhodnocovaných vzorkách tkaniva obličky u pacientov s COVID-19.



V priebehu pandémie sa postupne hromadili poznatky o patogenéze a klinickej symptomatológii COVID-19, viaceré otázky však zostávajú aj v súčasnosti nezodpovedané. Dominantné je postihnutie respiračného systému s poškodením pľúcneho tkaniva, ktoré v mnohých prípadoch vedie až k smrti^(3,4). Trombembolizmus je častým sprievodným prejavom SARS-CoV-2 infekcie⁽⁵⁾. Systémové prejavy ochorenia často zahŕňajú poškodenie rôznych orgánov, osobitne obličiek, na ktorých patológii sa podieľajú viaceré faktory vrátane globálnej ischémie, ako aj vírusová infekcia kanalikulárneho epitelu⁽⁶⁾.

V predkladanej práci vyhodnocujeme morfológické zmeny v tkanive obličiek u pacientov, ktorí zomreli na následky ochorenia COVID-19. Osobitnú pozornosť venujeme pacientom s niektorými komorbiditami, ako je diabetes mellitus, hypertenzná choroba a preexistujúce renálne choroby.

Materiál a metódy

Vyšetrili sme nekroptické vzorky tkaniva obličiek odobraté pacientom, ktorí zomreli v období od apríla 2020 do februára 2021 so základnou príčinou smrti stanovenou COVID-19. Infekcia SARS-CoV-2 bola potvrdená PCR testom výteru nošlana.

Súbor 42 pacientov tvorilo 22 žien a 20 mužov s priemerným vekom 74,4 r. Vzorky tkaniva odobraté pri pitve boli rutinne spracované formol-parafínovou technológiou, zaliate do parafínových bločkov, narezané na 5 µm hrubé rezy a zafarbené hematoxylínom a eozínom. Preparáty sme vyhodnotili vo svetelnom mikroskope (Leica DM2000, Wetzlar, Germany).

Jednotlivé časti nefrónu boli hodnotené so zameraním na nasledovných 8 charakteristík: semikvantitatívne sme vyhodnocovali prítomnosť glomerulosklerózy, glomerulovú kapilárnu trombózu, trombózu veľkých ciev, nekrózu kanalikovej epitelovej výstelky a intersticiálny zápalový infiltrát. Prítomná artérioskleróza, arterioskleróza a zhrubnutie mezangia boli hodnotené ako mierne, stredne ťažké, až závažné. Rozsah postihnutia bol mierny (do 10 %), stredný (do 50 %) a závažný (nad 50 %). Nálezy boli zaznamenané v tabuľke a podrobené analýze.

Základné klinické dáta pacientov zahŕňali vek, pohlavie, komorbidity. Osobitnú pozornosť sme venovali artériovej hypertenzii, obezite, diabetu mellitu, preexistujúcim obličkovým chorobám ako akútna a chronická renálna insuficiencia.

Ďalej sme zaznamenávali údaje o dĺžke hospitalizácie, intervale medzi smrťou a patologickoanatomickou pitvou. Z laboratórnych dát sme zaznamenávali úroveň kreatinínu a odhad GFR použitím rovnice s CKD-EPI.

Zozbierané dáta boli následne štatisticky vyhodnotené metódou analýzy variácií.

Výsledky

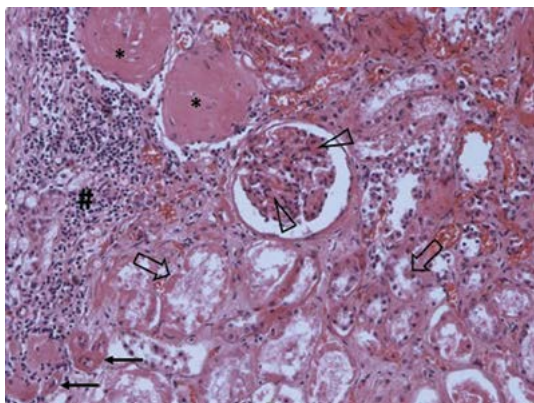
Priemerná dĺžka hospitalizácie vyšetovaných pacientov až po úmrtie bola 9 dní. Interval medzi úmrtím a pitvou bol priemerne 31,2 hodiny.

Výskyt komorbidít bol nasledovný: 73,8 % pacientov malo artériovú hypertenziu, 33,3 % malo diabetes mellitus (DM) a 30,9 % bolo obéznych. Akútnu renálnu insuficienciu mala jedna tretina (33,3 %) a chronické renálne zlyhanie bolo uvedené u 30,9 % pacientov. U 4 pacientov z vyšetovaného súboru nebola v klinickej dokumentácii žiadna z spomenutých chorôb.

Histologické vyšetrenie odhalilo artériosklerózu veľkých artérií u všetkých pacientov, v 6 prípadoch hodnotenú ako závažnú. Arterioskleróza bola v 80,9 % prípadov, glomeruloskleróza v 76,2 % a zhrubnutie mezangia v 71,4 % pacientov. V 7 prípadoch bola arterioskleróza stredne závažného stupňa. Glomeruloskleróza bola v 4 prípadoch stredného a u 2 pacientov závažného rozsahu. Zhrubnutie mezangia bolo v 5 prípadoch stredného rozsahu. Nálezy sú zhrnuté v grafickej forme na **obrázku 1**.

Nekrózu kanalikulárneho epitelu sme zistili u 27 pacientov (64,3 %), z toho u 11 stredného a u 11 závažného rozsahu. U týchto 11 pacientov sme vo všetkých prípadoch zistili artériosklerózu veľkých ciev a u 7 aj arteriosklerózu. Zhrubnutie mezangia, glomeruloskleróza a intersticiálny zápalový infiltrát boli v 45,5 % týchto prípadov (**obrázok 2**). U 10 z týchto 11 prípadov s rozsiahlou tubulárnou nekrózou bola artériová

Obrázok 2. Tkanivo obličky u pacienta s COVID-19 a klinicky diagnostikovanou hypertenznou chorobou a diabetom mellitom. Mikroskopický nález odhalil arteriolosklerózu so zhrubnutím stien arteriol (šípka) a zhrubnutím mezangia (hrot šípky), početné glomeruly boli fibrotické (*), ložiskovo boli prítomné lymfocytové intersticiálne infiltráty (#). Epitelová výstelka proximálnych tubulov niekde obsahovala zachované jadrá (otvorená šípka vpravo), väčšina buniek bola nekrotická bez identifikovateľných jadier (otvorená šípka vľavo).



hypertenzia, u 3 diabetes mellitus, dvaja pacienti mali akútne a traja chronické renálne zlyhanie.

Štatistická analýza variácií ukázala veľmi významnú asociáciu nálezu kanalikulárnej nekrózy s dĺžkou intervalu od smrti po pitvu, s nálezom artériosklerózy veľkých ciev a hladiny kreatinínu. Akútna aj chronická renálna insuficiencia boli asociované s glomerulosklerózou, obezita s kanalikulárnou nekrózou, nálezy arteriolosklerózy a zhrubnutého mezangia s diabetom mellitom. Hranične významne korelovali nálezy arteriolosklerózy s artériovou hypertenziou, glomeruloskleróza s úrovňou GFR a diagnóza diabetes mellitus s nálezmi kanalikulárnej nekrózy, arteriolosklerózy a sklerózy veľkých ciev. Korelácie sú prehľadne zhrnuté v **tabuľke 1**.

Diskusia

Post mortem štúdie predstavujú nenahraditeľný zdroj poznatkov o dôsledkoch SARS-CoV-2 vírusovej infekcie. Väčšina štúdií je zameraných na zmeny v pľúcach, tkanivá iných

orgánov však môžu tiež byť značne poškodené a prispievajú k nepriaznivému koncu ochorenia. Predkladaná štúdia vychádza z pitevných nálezov 42 pacientov, ktorí zomreli na COVID-19 v priebehu rokov 2020 a 2021. Nekroptické nálezy v obličkovom tkanive koreluje s klinickými údajmi a komorbiditami pacientov. Výsledky štúdie môžu poskytnúť dôležité informácie pre ďalší výskum ochorenia COVID-19 a sprievodného poškodenia obličiek.

Jedným zo závažných nálezov je silný súvis nekrózy kanalikulárneho epitelu s dĺžkou intervalu medzi úmrtím a pitvou. Táto významná korelácia sa dá vysvetliť iba čiastočne ako dôsledok autolýzy. Vzhľadom na podobné histomorfologické črty akútnej tubulárnej nekrózy rozlíšenie medzi nimi je ťažké. Túto skutočnosť uvádzajú aj Santoriello a spol.⁽⁷⁾ v štúdiu s posmrtným intervalom priemerne 21,8 hod. a nálezom, že akútne tubulárne poškodenie je prekryté posmrtnou autolýzou. Podobný nález akútneho tubulárneho poškodenia však ukazuje aj čínska štúdia, v ktorej interval medzi smrťou a pitvou bol 1 – 6 hod., a teda spojenie nálezu tubulárnej nekrózy s posmrtnou autolýzou je nepravdepodobné⁽⁸⁾. Aj výsledky ďalšej retrospektívnej analýzy s posmrtným intervalom do 24 hod. ukazujú poškodenie tubulárneho epitelu ako najzávažnejší nález⁽⁹⁾. Je teda zrejme, že autolýza sa podieľa na histologickom obraze tubulárnej nekrózy, ale základnou príčinou je poškodenie základným ochorením COVID-19.

Viaceré štúdie dokumentujú rozšírené mezangium, artériosklerózu artérií stredného kalibru a fokálnu segmentálnu glomerulosklerózu. Častý je nález glomerulových a peritubulárnych oklúzií erytrocytmi bez doštičiek alebo trombov. Štúdia Su a spol.⁽⁸⁾ s pacientmi s vekovým priemerom 69 rokov je podobná nášmu súboru, kde 11 z 26 vyšetrených prípadov bolo s diagnostikovaným diabetom mellitom, artériovou hypertenziou alebo obidvoma chorobami a aj nálezy v obličkách boli podobné tým v našej štúdiu.

Maximálne hladiny kreatinínu v našej štúdiu zodpovedali miere intersticiálneho zápalového infiltrátu, ako aj artérioskleróze veľkých artérií. V jednej práci zo Slovinska bola taktiež potvrdená asociácia hladiny sérového kreatinínu so stupňom artériosklerózy koronárnych artérií. Práca takisto odhalila, že zvýšené hladiny sérového kreatinínu môžu byť spojené so stenózou renálnych artérií⁽¹⁰⁾. Ich závery, že kre-

Tabuľka 1. Korelácia morfológických nálezov v obličkách s vybratými sledovanými klinickými údajmi. Úroveň glomerulovej filtrácie bola hodnotená ako pomer CKD-EPI

Morfológické nálezy	Asociované klinické údaje	Štatistická významnosť
Nekróza kanalikulárneho epitelu	Interval úmrtie – pitva	$p < 0,01$
Artérioskleróza veľkých ciev	max. hladina kreatinínu	$p < 0,01$
Intersticiálny zápalový infiltrát	Max. hladina kreatinínu	$p < 0,05$
Glomeruloskleróza	Akútna renálna insuficiencia	$p < 0,05$
Glomeruloskleróza	Chron. renálna insuficiencia	$p < 0,05$
Intersticiálny zápalový infiltrát	Diabetes mellitus	$p < 0,01$
Zhrubnutie mezangia	Diabetes mellitus	$p < 0,05$
Arterioloskleróza	Diabetes mellitus	$p < 0,05$
Nekróza kanalikulárneho epitelu	Obezita	$p < 0,05$
Arterioloskleróza	Hypertenzná choroba	$p = 0,083$
Nekróza kanalikulárneho epitelu	Diabetes mellitus	$p = 0,063$
Artérioskleróza veľkých ciev	Diabetes mellitus	$p = 0,057$
Glomeruloskleróza	max. CKD-EPI	$p = 0,1$

atinín môže byť znakom nefrovaskulopatie so štrukturálnymi zmenami tkaniva obličky, súhlasia aj s našimi zisteniami.

V našom súbore sa potvrdilo, že pacienti s diabetom mellitom majú často chronickú intersticiálnu zápalovú infiltráciu, ako aj artériosklerózu a zhrubnuté mezangium glomerulov. Tieto nálezy súhlasia s nálezmi v predchádzajúcich štúdiách, v ktorých väčšina glomerulov mala štrukturálne zmeny u pacientov s komorbiditami ako diabetes mellitus a dlhodobú hypertenznú chorobu⁽¹¹⁾. Naš nález intersticiálnych zápalových infiltrátov iné štúdie neprezentovali.

Naša práca poukázala na súvislosť medzi obezitou a nekrozou kanalikulárneho epitelu, ktorá nebola dosiaľ uvedená v iných prácach. Viacerí uviedli, že obezita je jedným zo závažných faktorov rozvoja chronického postihnutia obličiek, osobitne glomerulopatií a nefrolitiázy⁽¹²⁾. Vzhľadom na skutočnosť, že obezita je príčinne spojená s rozvojom kardiovaskulárnych chorôb a úzko súvisí s diabetom mellitom, náš nález korelácie obezity s morfológickým obrazom akútneho renálneho zlyhania s nekrozou kanalikulárneho epitelu nie je neočakávaný⁽¹³⁾.

Predkladané výsledky je treba interpretovať s určitou opatrnosťou. Počet 42 vyšetřovaných prípadov COVID-19 relatívne nie je rozsiahly, ale v porovnaní s inými štúdiami dostatočne reprezentatívny. Vzhľadom na skutočnosť, že prípady pochádzajú z rôznych centier na Slovensku, klinické dáta COVID-19 infikovaných pacientov možno zovšeobecniť.

Je potrebné pamätať aj na rôzne typy liekov, ktoré pacienti dostávajú počas liečenia v nemocnici vzhľadom na ich nefrotoxicitu a možnosť participácie na rozvoji opísaných morfológických zmien. Nielen medikamentózna liečba, ale aj dialýza sa mohla podieľať na osude pacienta. Tieto faktory je potrebné vziať do úvahy pri určení terapeutických prostriedkov, osobitne pri zvážení ich možného dosahu na funkčné a morfológické postihnutie obličiek.

Záver

Pandémia, ktorá vznikla koncom r. 2019, sa stala výzvou pre celosvetovú populáciu. Osobitne sektor zdravotníctva bol

výrazne zasiahnutý. SARS-CoV-2 infekcia nepredstavuje iba respiračné ochorenie, ale postihuje aj oné orgány a tkanivá. Vzhľadom na zvýšenú úmrtnosť na túto infekciu choroba COVID-19 sa stala najčastejšou príčinou smrti v mnohých krajinách, osobitne v USA⁽¹⁴⁾. Viaceré štúdie poukázali na dôležitosť celkového zdravotného stavu a komorbidít, ktoré predstavujú závažné rizikové faktory nepriaznivého vývoja infekcie. U pacientov so závažnými zdravotnými problémami je potreba hospitalizácie šesťnásobná v porovnaní s bežnou populáciou⁽¹⁵⁾. Osobitne postihnutie obličiek pri infekcii SARS-CoV-2 je časté⁽¹⁶⁾. Dokumentované nálezy post mortem často uvádzajú epitelovú nekrozu a akútne tubulárne poškodenie^(11,17).

Naša práca dokumentuje morfológické zmeny renálneho tkaniva u pacientov, ktorí umreli na následky COVID-19. Preukázala priamy vzťah vírusovej infekcie a špecifických zmien v obličkovom tkanive. Navyše poukázala na úlohu komorbidít a klinických nálezov, ktoré treba vziať do úvahy.

Najzávažnejším nálezom sa ukázala korelácia kanalikulárnej nekrózy a intervalu medzi pitvou a úmrtím. Napriek faktoru autolýzy sa potvrdila akútna tubulárna nekroza ako jeden z kľúčových nálezov pri COVID-19. Zvýšený sérový kreatinín je súčasťou artériosklerotického postihnutia renálnych ciev. Potvrdil sa súvis nálezov zhrubnutého mezangia a artériosklerózy s ochorením diabetu mellitu. Navyše, preukázala sa súvislosť medzi obezitou a nekrozou kanalikulárneho epitelu. Keďže obezita sa spája s diabetom mellitom ako nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárnych chorôb, má svoj podiel aj na rozvoji kanalikulárnej nekrózy.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj biomodelov pre zlepšenie hodnotenia účinnosti liekov a látok, ktoré majú potenciál pri liečbe COVID-19 (COVID-19), kód ITMS: 313010AVG3, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Wang J, Jiang M, Chen X, et al. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol* 2020; 108(1): 17-41.
2. Carfi A, Bernabei R, Landi F, et al. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA* 2020; 324(6): 603-605.
3. Krivosíková L, Horák S, Mikuš-Kuracinová K, et al. Príspevok imunohistochemie k histomorfologickej diagnostike COVID-19 pneumónie. *NewsLab* 2021; 12(1): 12-16.
4. Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19(3): 141-154.
5. Gavriatopoulou M, Ntanas-Stathopoulos I, Korompoki E, et al. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clin Exp Med* 2021; 21(2): 167-179.
6. Babal P, Krivosikova L, Sarvaicova L, et al. Intrauterine Fetal Demise After Uncomplicated COVID-19: What Can We Learn from the Case? *Virus* 2021; 13(12).
7. Santoriello D, Khairallah P, Bombach AS, et al. Postmortem Kidney Pathology Findings in Patients with COVID-19. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31(9): 2158-2167.

8. Su H, Yang M, Wan C, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int* 2020; 98(1): 219-227.
9. Diao B, Wang C, Wang R, et al. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Nat Commun* 2021; 12(1): 2506.
10. Cerne D, Kaplan-Pavlovic S, Kranjec I, et al. Mildly elevated serum creatinine concentration correlates with the extent of coronary atherosclerosis. *Ren Fail* 2000; 22(6): 799-808.
11. Golmai P, Larsen CP, DeVita MV, et al. Histopathologic and Ultrastructural Findings in Postmortem Kidney Biopsy Material in 12 Patients with AKI and COVID-19. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31(9): 1944-1947.
12. Silva Junior GB, Bentes AC, Daher EF, et al. Obesity and kidney disease. *J Bras Nefrol* 2017; 39(1): 65-69.
13. Garcia-Carro C, Vergara A, Bermejo S, et al. A Nephrologist Perspective on Obesity: From Kidney Injury to Clinical Management. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 655871.
14. Ahmad FB, Cisewski JA, Minino A, et al. Provisional Mortality Data – United States, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021; 70(14): 519-522.

15. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance – United States, January 22–May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020; 69(24): 759-765.

16. Smarz-Widelska I, Grywalska E, Morawska I, et al. Pathophysiology and Clinical Manifestations of COVID-19-Related Acute Kidney Injury-The Current State of Knowledge and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2021; 22(13).

17. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology* 2020; 77(2): 198-209.

prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.

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

Zavedenie a automatizácia vyšetrenia SARS-CoV-2 v Spadia Lab, a. s.

Zuzana Dindová^{1,2}, Ondřej Kwašný^{1,2}

¹SPADIA LAB, a. s., oddelenie molekulárnobiologických metód, Laboratórium klinickej mikrobiológie, Ostrava, Česká republika

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

S útlmom pandémie COVID-19 v Európe sa rutinná detekcia infikovaných SARS-CoV-2 vírusom dostáva do úzadia. Nie je to však tak dávno, keď boli na diagnostické laboratória kladené extrémne nároky v požiadavkách na zvyšovanie ich denného výkonu, pričom v ideálnom prípade bolo potrebné kompletne vybudovať nové alebo významnou mierou upraviť existujúce laboratória a zabezpečiť aspoň čiastočnú mieru automatizácie laboratórných procesov. Keďže na vývoj automatizovaných riešení bol len minimálny čas, bolo nevyhnutné prepojiť výskumné a rutinné klinické pracovné skupiny, ktoré spoločnými silami dokázali vzniknuté požiadavky riešiť v expresnom režime, a to aj v medzinárodnom meradle.

Cieľom projektu bolo zaviesť a realizovať laboratórne analýzy s cieľom detegovať infikovaných SARS-CoV-2 v rutinnom laboratórnom prostredí v režime laboratórií s ultravysokým výkonom. Súčasťou bol výber, optimalizácia a rutinná prevádzka do čo najväčšej miery automatizovaného laboratórneho systému spracovania klinických vzoriek získaných od suspektných jedincov prostredníctvom nazofaryngálneho výteru, prípadne odberu slín. Z praktických dôvodov bol tento projekt realizovaný v spoločnosti SPADIA LAB, a. s., v Českej republike, ktorá bola jedným z najväčších laboratórií poskytujúcich SARS-CoV-2 testovanie v stredoeurópskom regióne.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2, COVID-19 testovanie, automatizácia

Implementation and automation of SARS-CoV-2 examination in Spadia Lab a.s.

With the attenuation of the COVID-19 pandemic in Europe, the routine detection of those infected with the SARS-CoV-2 virus is taking a back seat. However, it was not so long ago that extreme demands were placed on diagnostic laboratories to increase their daily throughput. At the same time, ideally, it was necessary to build entirely new or significantly modify existing laboratories and ensure at least a partial degree of automation of laboratory processes. Since there was only minimal time for the development of automated solutions, it was necessary to link research and routine clinical working groups, which together managed to solve the resulting requests in an express mode, even on an international scale.

The project aimed to introduce and implement laboratory analyses to detect infected SARS-CoV-2 in a routine laboratory environment and perform testing in an ultrahigh throughput regime. It included the selection, optimization and routine operation of an automated laboratory system to the greatest extent possible for processing clinical samples obtained from suspected individuals through nasopharyngeal swabs or saliva collection. For practical reasons, this project was implemented in the company SPADIA LAB, a.s. in the Czech Republic, which was one of the largest laboratories providing SARS-CoV-2 testing in the Central European region.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19 testing, automation

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 58 – 61

Úvod

Diagnostika extrahumánneho genómu vrátane SARS-CoV-2 prebieha v SPADIA LAB, a. s., na oddelení molekulárnobiologických metód (OMBM), ktoré patrí pod Laboratórium klinickej mikrobiológie v Ostrave. Oddelenie ponúka široké spektrum PCR vyšetrení, napr. stanovenie prítomnosti nukleových kyselín (NK) herpetických vírusov, hepatitíd, pôvodcov sexuálne prenosných ochorení, respiračných infekcií a ďalšie.

Pandémia COVID-19 a začiatok laboratórneho testovania SARS-CoV-2

Pandémia COVID-19 so sebou priniesla bezprecedentnú situáciu na poli rutinného laboratórneho testovania infekč-

ných ochorení, keď bolo potrebné na lokálnej úrovni analyzovať vzorky v populačnej škále. Bolo potrebné v krátkom čase vybrať a do rutinného klinického režimu zaviesť vysokosenzitívne a vysokovýkonné metódy pre laboratórnu diagnostiku SARS-CoV-2 suspektných pacientov, a to na pozadí prebiehajúcej krízy s obmedzenou dostupnosťou mnohých predtým bežne dostupných, v tomto testovaní potrebných laboratórných komponentov od odberových súprav až po výkonné laboratórne automaty. V krátkom slede za sebou sa mnohé vedecké tímy po celom svete zaoberali podobnými otázkami, od výberu typu odberového materiálu cez identifikáciu v rutine použiteľných laboratórných metód detekcie vírusovej nukleovej kyseliny až po možnosti automatizácie laboratórných procesov⁽¹⁻³⁾.

Pred vypuknutím COVID-19 sme v rámci rutinej diagnostiky mali v našich laboratóriách k dispozícii len jeden automatický izolátor NK, ktorý je v jednom behu schopný izolovať maximálne 16 vzoriek v priebehu asi 1 hodiny. Vzorky sa štandardne spracovávali manuálne pomocou kolónkových izolačných kitov. S rozhodnutím zaviesť vyšetrenie na SARS-CoV-2 a následným získaním povolenia od Štátneho zdravotného ústavu Praha na vyšetrovanie COVID-19 sa situácia na OMBM začala veľmi rýchlo meniť. Prvé vzorky na vyšetrenie COVID-19 prišli do nášho laboratória 16. marca 2020 v počte 10 kusov. I takýto malý počet vzoriek však v tom čase dokázal preveriť našu pripravenosť. Otázok a problémov okolo spracovania vzoriek neustále pribúdalo a celá pozornosť a energia sa musela sústrediť na ich zodpovedanie a riešenie.

Bolo nutné čo najrýchlejšie vymyslieť efektívny spôsob spracovania SARS-CoV-2 suspektných vzoriek, ktorý by umožnil čo najrýchlejšie sa dopracovať k správne výsledku vyšetrenia, teda čo najviac skrátiť čas potrebný na manipuláciu so vzorkami, spracovanie a vyšetrenie vzoriek aj hodnotenie výsledkov vyšetrení. Spolupráca Charles University Innovations Prague, s. r. o. (prof. Ing. Stanislav Kmoč, CSc.), SPADIA LAB, a. s., GENERI BIOTECH, s. r. o., a ZKV Career, s. r. o. (Ing. Michal Pohludka, PhD. MBA LLM.), dala základ vzniku spoločnosti GeneSpector, s. r. o., vďaka ktorej sa na OMBM postupne zavádzal systém umožňujúci vyšetriť vysoké počty vzoriek v pomerne krátkom čase. Zmeny a úpravy procesov vedúce k vysokopriepustnému laboratórnemu riešeniu boli nevyhnutné v každom z krokov od odberu vzoriek až po vydanie výsledku.

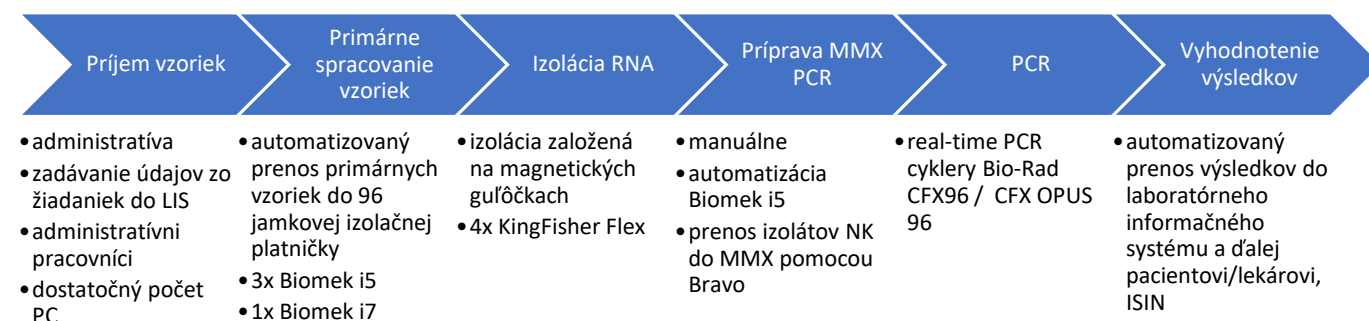
Automatizácia laboratórnych procesov a laboratórne nadväznosti

Prvým krokom bol výber špeciálneho inaktivačného odberového média, čo pomohlo odstrániť problém so skladovaním vzoriek v chladenom režime a s balením vzoriek do trojobalu, čím sa pri manipulácii a vybalovaní vzoriek ušetrilo množstvo času. Zároveň v dôsledku inaktívacie vírusových častíc to umožnilo jednoduchší režim v laboratóriu, keďže nebolo nevyhnutné celý proces prvej manipulácie so vzorkami po extrakciu RNA (alikvotovanie, poolovanie) realizovať v prostredí pracovných boxov s laminárnym prúdením v režime BSL-2. Vybrané médium zároveň muselo byť dostupné prakticky v neobmedzenom množstve a ideálne vyrábané lokálne z dôvodu celosvetového akútneho nedostatku a obmedzení týkajúcich sa exportu všetkých komponentov pou-

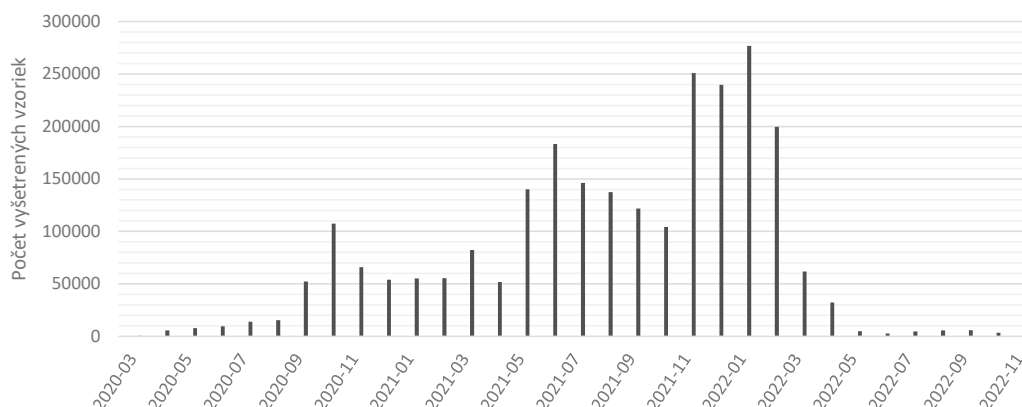
žívaných v diagnostickom reťazci pri tomto type klinického testovania. Vybrané bolo preto médium od lokálneho výrobcu umožňujúce inaktíváciu vírusov bez narušenia genetickej informácie. Navyše vybraný typ média udrží vzorku v stave použiteľnom pre testovanie, pri izbovej teplote a bezpečne neutralizovanú počas 6 dní (viRNAtrap, GeneSpector, s. r. o.), na rozdiel od iných komerčne dostupných médií, ktoré vyžadujú skladovanie pri -20°C alebo pri $2 - 8^{\circ}\text{C}$ a vírus po odbere v týchto médiách ostáva aktívny. Unifikácia procesov sa realizovala aj pri označovaní vzoriek, keď sa už na odberových miestach zaviedlo označovanie vzoriek čiarovými kódmi, čo eliminovalo čas potrebný na práce párovanie vzoriek v laboratóriu. Zároveň nezávisle od laboratórneho spracovania vzoriek prebiehalo nahrávanie patientskych informácií do laboratórneho informačného systému (LIS).

Aby sa urýchlil i samotný priechod vzorky laboratóriom, bolo potrebné všetky kroky, pri ktorých to bolo možné, automatizovať. Vzorky sa po príchode do laboratória najskôr preformátovali z odberových skúmaviek do 96-jamkových platničiek, kde sa spracovávali v platničkách po 94 vzoriek (posledné dve pozície v platničke boli určené pre negatívnu a pozitívnu kontrolu). Vzorky sa v prvej verzii automatizácie do platničiek pipetovali pomocou pipetora Evolis (Bio-Rad) – 20 minút/1 platničku, neskôr pomocou rýchlejších Biomek i5 (Beckman Coulter) platforiem – 5 minút/1 platničku. Najdôležitejšie bolo, že obidva pipetory boli schopné skenovať čiarové kódy na skúmavkách a následne vytvoriť zoznam vzoriek spolu s pozíciou vzoriek v platničke. Vytvorený zoznam vzoriek sa následne použil na krížovú identifikáciu vzoriek v DNA extrakčnej a RT-qPCR reakčnej platničke a tiež na následné spojenie výsledku analýz s patientskym záznamom v LIS. Druhým krokom automatizovaného laboratórneho spracovania bola izolácia nukleových kyselín (NK), ktorá prebiehala prostredníctvom kitov využívajúcich magnetické guľôčky v izolátoroch KingFisher Flex (Thermo Scientific). Platničky s roztokmi potrebné na izoláciu NK sa pripravovali pomocou systému Biomek i7 (Beckman Coulter), ktorý dokázal v jednom pracovnom cykle predpripraviť až 6 platničiek (napr. lyzačný roztok, magnetické guľôčky, premývací roztok, etanol, elučný roztok, RT-qPCR mastermix). V poslednom kroku laboratórneho spracovania sa na prenášanie izolátov NK do RT-qPCR mastermixu (MMX) použilo automatické pipetovacie zariadenie Bravo (Agilent Technologies), ktoré dokáže preniesť 96 izolátov NK do mastermixu naraz a za pár sekúnd. Po skončení amplifikácie v cykloch a násled-

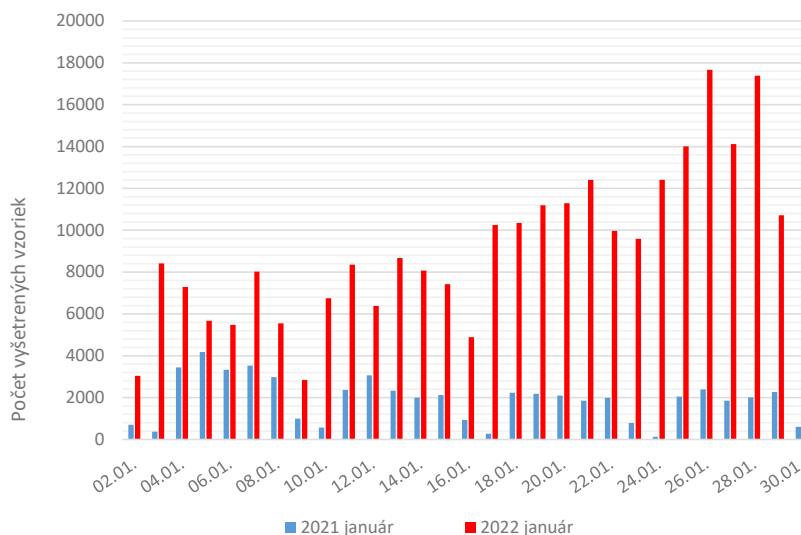
Obrázok 1. Priebeh spracovania vzoriek SARS-CoV-2.



Obrázok 2. Mesačné počty vyšetrených vzoriek SARS-CoV-2 v SPADIA LAB, a. s. marec 2020 – november 2022.



Obrázok 3. Denné počty vyšetrených vzoriek v januári 2021 a 2022.



nom zhodnotení dát bolo potrebné výsledky vyšetrení preniesť do laboratórneho informačného systému a priradiť ich k patientskym záznamom.

Aby takto nastavený proces vyšetrenia vzoriek mohol fungovať, musel sa nastaviť i prenos dát medzi jednotlivými zariadeniami. Prenos dát z rôznych pipetorov, izolátorov až k cyklerom z cyklerov do LIS a z LIS do databázy ISIN (Informačný systém infekčných nemocí) nastavili kolegovia z IT oddelenia a významne tým prispeli k urýchleniu celého procesu.

Priechod vzoriek laboratóriom je schematicky znázornený na **obrázku 1**.

Kapacita laboratória po zavedení automatizácie

Kapacita laboratória sa s pribúdajúcim počtom zariadení a s prechodom na dvojzmenný režim postupne zvyšovala. Zvyšovanie počtu zariadení – pipetorov, izolátorov a cyklov si časom vyžadovalo nové priestorové usporiadanie laboratória.

Na **obrázku 2** sú uvedené počty vyšetrených vzoriek za jednotlivé mesiace od začiatku pandémie SARS-CoV-2 po súčasnosť. Počty vzoriek sa v jednotlivých mesiacoch postupne zvyšovali. Súvisí to so zvyšujúcou sa kapacitou od-

delenia a s rastúcim počtom spracovávaných odberových miest. Maximálnu kapacitu naše laboratórium dosiahlo v období november 2021 až január 2022, keď sme mesačne vyšetřili okolo 250 000 vzoriek, teda priemerne každý deň asi 11 900 vzoriek.

Obrázok 3 porovnáva počty vyšetrených vzoriek v jednotlivých dňoch s odstupom jedného roku v januári 2021 a 2022. Maximálny dosiahnutý počet vykonaných RT-qPCR testov počas 24-hodinovej zmeny bol 17 672 testov v januári 2022 (26. 1. 2022).

Alternatívne metódy zvyšovania kapacity SARS-CoV-2 testovania

Jednou z možností, ako ďalej zvýšiť kapacity laboratória, bolo spracovávať vzorky spájaním, resp. poolovaním. Znamená to, že sa pripraví pool zmiešaním viacerých pôvodných vzoriek, ktorý sa následne vyšetří ako jedna vzorka a v prípade detekcie pozitivity sa takýto pool vzoriek testuje opakovane, ale už každú vzorku v samostatnej analýze. Viaceré štúdie publikované v odborných časopisoch označujú poolovanie ako veľmi účinný nástroj zvýšenia testovacích kapacít a zároveň vyvracajú obavu z falošne negatívnych výsledkov

analýz poolu v dôsledku zriadenia pozitívnych vzoriek⁽⁴⁻⁷⁾. Táto metóda spracovania vzoriek sa však dá použiť len v situácii, keď je prevažná väčšina vzoriek negatívnych, teda najmä pri testovaní oddelene žijúcich skupín osôb, napr. v školách. Pri vyššom percente pozitívnych vzoriek hrozí, že sa bude zvyšovať i počet pozitívnych poolov, ktoré je nutné roztestovať.

Ďalšou alternatívou je zabezpečenie špeciálnych jednouchcelových (tzv. uzavretých) automatizovaných laboratórnych systémov. Príkladom je platforma od spoločnosti LGC (Biosearch Technologies' SARS-CoV-2 testing system)⁽⁸⁾, ktorá umožňuje realizáciu až 150 000 testov v rámci jedného dňa s minimalizáciou potrebných manuálnych úkonov. Samostatnou kapitolou je možnosť vybudovať špeciálne mobilné jednouchcelové laboratóriá (Huo-Yan Air Laboratory), ktoré sa pri testovaní na SARS-CoV-2 úspešne využívali v čínskych veľkomestách⁽⁹⁾. Ich kapacita presahovala 10 000 vzoriek

denne a veľkou výhodou je možnosť vybudovať ich v podstate na „zelenej lúke“ a v expresnom čase (24 hodín). Využitie takýchto systémov a laboratórií v regionálnom meradle je však limitované a v prípade, že sa skokovo znížia počty vzoriek, ktoré je potrebné v krátkom čase analyzovať, je ich prevádzka extrémne neflexibilná a ekonomicky nerentabilná.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Dall'Agnol J, Schwartz E, Lise F. ABCS Health Sci. 2021; 46: e021302.
2. Guoguang R, et al. Reference Module in Biomedical Sciences. 2021: B978-0-12-822548-6.00080-7
3. Jonguitud-Borrego N, et al. Front Med Technol. 2022 Sep 15; 4: 969203.
4. Barak N, et al. Sci Transl Med. 2021 Apr 14; 13(589): eabf2823.
5. Sawicki R, et al. Sci Rep. 2021; 11: 3122.
6. Deka A and Kalita D, J Lab Physicians. 2020 Dec; 12(3): 212–218.
7. Christoff AP, et al. PLoS One. 2021; 16(2): e0246544.
8. <https://www.biosearchtech.com/ultra-high-throughput-pcr-testing-system-for-sars-cov-2-detection>
9. <https://en.genomics.cn/huoyan/index.aspx>

MVDr. Zuzana Dindová

SPADIA LAB, a. s.,

Dr. Slabihoudka 6232/11, 708 00 Ostrava-Poruba, ČR

e-mail: zuzana.dindova@spadia.cz

Vyhodnotenie početnosti a pozitivity SARS-CoV-2 testovania na Slovensku v čase pandémie COVID-19 – výsledky laboratórií Medirex, a. s.

Nikola Janoštiaková^{1,2}, Andrej Gnip², Dominik Kodada^{1,2}, Gabriela Bľandová¹, Emília Miková², Elena Tibenská², Vanda Repiská¹, Gabriel Minárik³

¹Univerzita Komenského v Bratislave Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Bratislava

²Medirex, a. s., Bratislava

³MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Nitra

Pandémia ochorenia COVID-19 trvala na Slovensku od marca 2020, pričom trvá dodnes, ale intenzívne laboratórne testovanie sa ukončilo v októbri 2022, keď počty testov významne poklesli. Za celé toto obdobie bolo len v laboratóriách spoločnosti Medirex, a. s., ktoré vykonávali významnú časť diagnostických laboratórnych testov na Slovensku, spravených viac ako 1,3 milióna testov. Ich distribúcia z pohľadu počtu realizovaných testov, ako aj podiel pozitívnych prípadov sa líšil v závislosti od konkrétneho regiónu, pričom vieme, že počas pandémie sa lokálne ložiská správali z pohľadu premorenosti odlišne a práve s cieľom čo najpresnejšej identifikácie pozitívnych prípadov sa v danom regióne v danom čase zintenzívnilo testovanie. Práve charakterizácia a vizualizácia regionálnych rozdielov v týchto dvoch parametroch vychádzajúcich z testovania je náplňou tejto práce.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2, COVID-19, pandémia, Slovensko, regionálna charakterizácia

Evaluation of the frequency and positivity of SARS-CoV-2 testing in Slovakia during the COVID-19 pandemic - results of Medirex a.s. laboratories

The COVID-19 pandemic lasted in Slovakia from March 2020 and continues to these days, but intensive laboratory testing ended in October 2022, when the number of tests dropped significantly. During this entire period, more than 1.3 million tests were performed only in the laboratories of Medirex a.s., which performed a significant part of diagnostic laboratory tests in Slovakia. Their distribution in terms of the number of tests carried out, and the proportion of positive cases differed depending on the specific region. At the same time, we know that local foci behaved differently during the pandemic from the point of view of disease spread. As a consequence of the increase in the positiveness of tests, the number of tested samples also increased. The characterization and visualization of regional differences in these two parameters of testing is the aim of this work.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, pandemic, Slovakia, regional differences

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 62 – 67

Úvod

Pandémia ochorenia COVID-19 zapríčinená vírusom SARS-CoV-2 vyústila do celosvetovej zdravotníckej krízy v dôsledku vysokej chorobnosti a úmrtnosti infikovaných. Súčasťou každodenného života obyvateľov Slovenska sa stala formálne 6. marca 2020, keď bol potvrdený prvý prípad infekcie SARS-CoV-2 u slovenského občana s cestovateľskou anamnézou⁽¹⁾, pričom prvé protipandemické opatrenia boli prijaté takisto v tento deň⁽²⁾.

Prísne pravidlá a opatrenia prijaté na Slovensku na začiatku pandémie udržiavali počet nakazených relatívne pod kontrolou, letné mesiace dokonca priniesli aj dni s nulovým počtom PCR pozitívnych testov. Ďalšia vlna pandémie počas zimy 2020/2021 však priniesla výrazné zhoršenie situácie⁽³⁾. Toto zhoršenie bolo z veľkej miery zapríčinené aj rozšírením nového variantu alfa (B.1.1.7) do slovenskej populácie a dokonca presiahlo očakávania odborníkov krízového štábu⁽⁴⁾. Ako je však známe, koronavírusy majú vo všeobecnos-

ti schopnosť vysokej frekvencie rekombinácie genómu vedúcej k nepredvídateľným zmenám ich virulencie⁽⁵⁾.

O variante alfa, ktorý bol prvýkrát detegovaný v Spojenom kráľovstve na jeseň v roku 2020, sa zistilo, že je o 43 – 90 % viac infekčný ako predtým existujúce varianty⁽⁶⁾. Zo 17 mutácií aminokyselín detegovaných v alfa variante sa predpokladalo, že mutácia N501Y môže urýchľovať prenos vírusu, pretože v doméne viažucej receptor *spike* proteínu zvyšuje väzbu na ľudské receptory enzýmu konvertujúceho angiotenzín 2⁽⁷⁾. Toto je tiež bežná mutácia nájdená v beta⁽⁸⁾ a gama variante⁽⁹⁾. Na druhej strane, delta variant obsahuje mutáciu P681R v mieste štiepenia furínu v *spike* proteíne a mutáciu R203M v nukleokapsidovom proteíne, čo ďalej zvyšuje infekčnosť vírusu⁽¹⁰⁾. Delta variant je tiež spojený so zvýšenou závažnosťou ochorenia a s dlhšou prítomnosťou vírusu v organizme pacienta⁽¹¹⁾.

Na Slovensku aj vo svete je diagnostika ochorenia COVID-19 najčastejšie vykonávaná detekciou nukleovej kyse-

liny SARS-CoV-2 vo vzorkách z nazofaryngeálnych výterov pomocou reverzne transkriptázovej kvantitatívnej polymérázovej reťazovej reakcie (RT-qPCR)⁽¹²⁾. RT-qPCR zabezpečí prepis vírusovej RNA do cDNA a kvantifikuje sledovaný úsek z genómu vírusu v reálnom čase. Monitorovanie amplifikácie je založené na princípe fluorescencie pomocou sond, resp. prôb (označovaných fluorescenčnými látkami), ktoré sa špecificky alebo nešpecificky viažu na amplifikovanú DNA. Pre každú vyšetrenú vzorku je na základe nameňovaných zmien fluorescenčných signálov vytvorená amplifikačná krivka⁽¹³⁾. Pre každú amplifikačnú krivku sa potom určí prahový cyklus, označovaný ako Ct (*threshold cycle*), čo je priesečník medzi amplifikačnou krivkou a hraničnou hodnotou, a určuje pozitivitu testu. Hodnota Ct predstavuje počet cyklov PCR potrebných na to, aby fluorescenčný signál generovaný inkorporáciou fluorescenčne označovaných sond do PCR produktu prekročil úroveň fluorescencie pozadia v kontexte s hraničnou hodnotou⁽¹⁴⁾. I keď je hodnota Ct relatívna veličina, jej nízke hodnoty naznačujú vysokú vírusovú záťaž a potenciálne vysokú úroveň infekčnosti jedince. Vysoké hodnoty Ct naznačujú veľmi skoré alebo neskoré štádium infekcie, a teda potenciálne nízku úroveň infekčnosti jedince⁽¹⁵⁾.

Neschopnosť predpovedať mieru zmeny infekčnosti SARS-CoV-2 bráni schopnosti efektívne reagovať na krízu nielen na Slovensku, ale aj vo svete. Pre efektívnejšie a udržateľnejšie riadenie pandémie je potrebné predvídať zlepšenie/zhoršenie epidemiologickej situácie a predchádzať jej zhoršeniu sledovaním súboru epidemiologických kritérií na regionálnej, národnej, ale aj medzinárodnej úrovni, aby boli opatrenia sprísňované a uvoľňované na základe objektívnych kritérií⁽¹⁶⁾. Cieľom práce bolo sumarizovať výsledky SARS-CoV-2 diagnostického testovania na Slovensku na regionálnej úrovni s rozsahom definovaným mierou realizovaných testov v laboratóriách Medirex, a. s., a s väzbou na priebeh pandémie hodnotenej na národnej úrovni.

Metódy

Štúdia analyzovala dáta poskytnuté akreditovaným laboratóriom Medirex. Údaje predstavujú výsledky RT-qPCR testov vzoriek pacientov a bežnej populácie vyhodnotených od marca 2020 do októbra 2022 v Centrálnom laboratóriu Bratislava, Košice a Nitra. Počas tohto obdobia laboratória zanalyzovali 1 384 368 testov. Vzorky boli prijaté zo 74 (93,7 %) okresov Slovenska. Sledovanie vývoja množstva a positivity testovaných vzoriek v jednotlivých regiónoch Slovenska si vyžadovalo určitú početnosť vzoriek, preto by použitie kategórií podľa okresov nebolo výpovedné, keďže v niektorých bol vyšetrený príliš malý počet vzoriek. Rozdelenie na kraje by však neukázalo územnú variabilitu v tých miestach, kde bol počet vzoriek dostatočný aj na sledovanie rozdielov medzi menšími územnými celkami. Preto boli na účel štatistiky vytvorené regióny pozostávajúce z rôznych počtov okresov podľa hustoty testovania, aby na území s väčšou hustotou mohli byť sledované aj rozdiely medzi menšími územnými celkami a zároveň aby na území s nízkou hustotou nevznikli regióny s extrémne nízkymi počtami vyšetrených vzoriek. Analyzované vzorky boli preto rozdelené do 17 regiónov a obdobie bolo rozdelené do 19 časových úsekov v 7-týždňových intervaloch.

Prítomnosť SARS-CoV-2 bola stanovená z nazofaryngeálnych a slinných výterov. Automatizovaná izolácia nukleovej kyseliny (RNA) na magnetických časticiach sa uskutočnila pomocou súprav Sera-Xtracta Virus/Pathogen Kit (Cytiva) a Zybion Nucleic Acid Extraction Kit (Zybion) s použitím systému KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific)/Zybion EXM 3000 Nucleic Acid Isolation System/Zybion EXM 6000 Nucleic Acid Isolation System (Zybion). Testovanie sa uskutočnilo metódou RT-qPCR s použitím súprav CO-VID-19 Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Labsystems Diagnostics)/SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit (Zybion)/Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver) pomocou qPCR platformy ABI 7500 (Fast) Real-Time PCR System (Applied Biosystems)/QuantStudio 5/QuantStudio 6 Real-Time PCR System (ThermoFisher). Údaje získané pre každý test zahŕňali denné číslo vzorky, dátum odberu, ID pacienta, vek, pohlavie, miesto odberu vzorky, výsledok testu a v prípade pozitívneho výsledku aj hodnotu Ct vírusového génu E – hraničná hodnota do 40 (pre kit SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit (Zybion))/41 (pre kity Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Labsystems Diagnostics), Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver)) – t. j. sekvencia nukleovej kyseliny bola identifikovaná v čase, keď PCR prešla 39/40 cyklami.

Výsledky

Zaradenie okresných miest do 17 regiónov Slovenska je znázornené v **tabuľke 1**.

Grafické zobrazenie meniaceho sa počtu vykonaných testov v regiónoch Slovenska (regióny 1 – 17) v 7-týždňových intervaloch od marca 2020 do októbra 2022 (časové intervaly 1 – 19) je znázornené na **obrázku 1**. Najpočetnejšie zastúpenie vyhodnotených RT-qPCR testov mal počas celého analyzovaného obdobia región 1 (okresy Bratislava, Pezinok, Senec), a to 622 089 vyhodnotených RT-qPCR testov. Najvyšší počet testov bolo vyhodnotených v časovom intervale 03-02-2022 – 23-03-2022, a to 201 618 testov spolu vo všetkých 17 regiónoch Slovenska.

Podobné mapy s hodnotami positivity v regiónoch Slovenska (regióny 1 – 17) v 7-týždňových intervaloch od marca 2020 do októbra 2022 (časové intervaly 1 – 19) sú zobrazené na **obrázku 2**, farebná škála determinuje pozitivitu od 0 do 75 %. Najviac pozitívne vyhodnotených RT-qPCR testov mal počas celého analyzovaného obdobia región 1 (okresy Bratislava, Pezinok, Senec), a to 112 493 pozitívnych RT-qPCR testov, čo predstavuje viac ako 18 % pozitivitu zo všetkých vykonaných testov v regióne 1 počas analyzovaného obdobia. Najvyšší počet pozitívnych testov bolo zaznamenaných v časovom intervale 03-02-2022 – 23-03-2022, a to 122 282 testov spolu vo všetkých 17 regiónoch Slovenska, čo predstavuje pozitivitu takmer 35 % pre daný dátumový interval.

Diskusia

Vzorky pochádzajúce zo 74 okresných miest Slovenska boli na účely štúdie zlúčené a zaradené do 17 regiónov Slovenska z dôvodu čo najefektívnejšieho odseparovania okresov s extrémne nízkym počtom vykonaných RT-qPCR testov. Vďaka vytvoreniu 19 časových intervalov sme takisto predišli nízkemu zastúpeniu testov v určitých týždňoch nami skúmaného obdobia, a to najmä v mesiacoch prvého polroka od

vypuknutia pandémie predstavujúcich prvú fázu zavádzania rutinného testovania, ktorá bola obdobím zefektívňovania procesov⁽¹⁷⁾.

Početnosť RT-qPCR testov vykonaných na Slovensku vo veľkej miere ovplyvňuje aj preplácanie testov poisťovňami. Veľká zmena nastala od mája 2022, odkedy na bezplatné vykonanie RT-qPCR testu nestačí, aby mal pacient príznaky ochorenia COVID-19, no je potrebné aj odporúčanie od lekára (všeobecného alebo špecialistu). Výnimkou sú pacienti nad 60 rokov, ktorí sa môžu aj naďalej hlásiť na testovanie prostredníctvom štátneho portálu pri príznakoch ochorenia⁽¹⁸⁾. Nižšia početnosť testov v regiónoch Slovenska v časovom intervale zahŕňajúcom prelom apríl/máj 2022 (**obrázok 1P**) je detegovaná aj v našej štúdii. Výrazne znížená početnosť testov je následne detegovaná od polovice mája 2022 až do konečného dátumu zanalyzovaných dát štúdie (**obrázok 1R, 1S, 1T**).

Pri detekcii regionálnej pozitivity sú na mapách v určitých časových intervaloch zobrazené aj sivé regióny, resp. regióny bez priradenej škály pozitivity – týmto spôsobom sú odseparované nereprezentatívne regióny s nízkym počtom vykonaných testov pre daný časový interval (menej ako 50 testov) (**obrázok 2**). Najvyššie percentuálne zastúpenie pozitivity bolo zaznamenané v regióne 8 (okresy Nové Mesto nad Váhom, Trenčín, Ilava, Púchov) v časovom intervale 30-06-2022 – 17-08-2022, a to 75 % (**obrázok 2S**). Tento údaj je však zrejme nereprezentatívny, pretože v danom časovom intervale bol vyhodnotený nízky počet vzoriek (80 testov) a susedné regióny s vyšším počtom vykonaných testov podobnú pozitívitu nezaznamenali. Zároveň môže byť dôvodom stratégia testovania, keď sa v laboratóriách analyzovali prioritne vzorky zo zdravotníckych zariadení, prípadne zo zariadení sociálnych služieb, ak vzniklo podozrenie na lokálne šírenie v komunite, a v kombinácii s nízkym počtom testov získaných

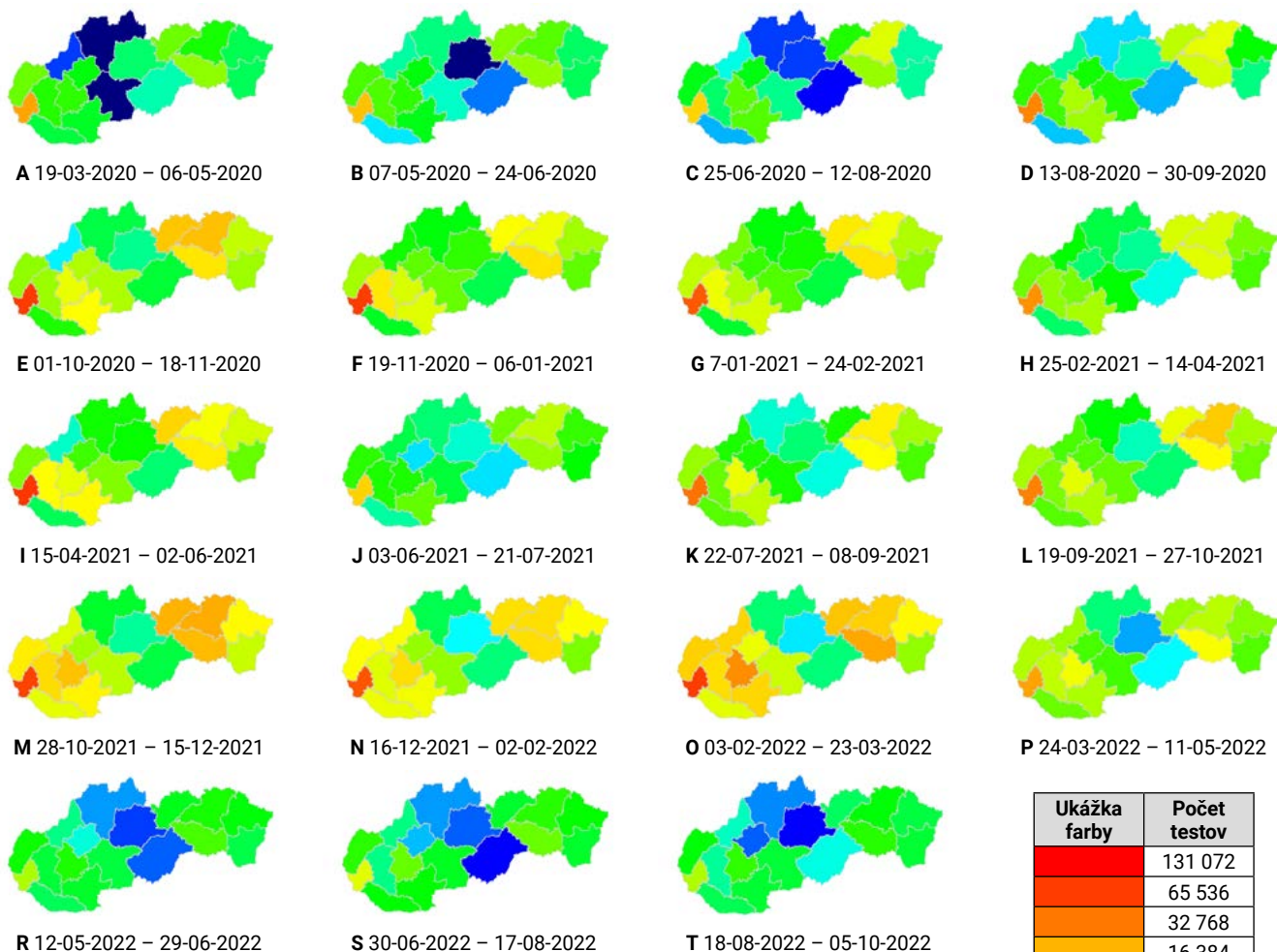
v danom regióne v danom časovom rozsahu to mohlo spôsobiť výskyt extrémnych hodnôt pozitivity.

Reprezentatívnym obdobím by však mohol byť časový interval 03-02-2022 – 23-03-2022, 7-týždňový interval s najvyšším počtom vyhodnotených testov, počas ktorého bola v regióne 4 (okresy Nové Zámky, Levice) detegovaná takmer 70 % pozitívita, pričom pozitívita všetkých susedných regiónov dosahovala takisto asi 65 % (**obrázok 2O**). Predpoveď šírenia pandémie na okresnej úrovni bola čiastočne riešená po zavedení tzv. COVID automatu – systému na monitorovanie vývoja epidémie a prijímania protiepidemických opatrení v závislosti od intenzity šírenia SARS-CoV-2 na Slovensku, ktorý nadobudol platnosť 8. februára 2021⁽¹⁹⁾. COVID automat zohľadňuje dynamiku ochorenia na území okresu. Zahŕňa viacero ukazovateľov a disponuje špecifickým algoritmom pre výpočet tzv. okresného skóre, na základe ktorého je okresu priradená farba (zelená predstavujúca monitoring – čierna predstavujúca 3. stupeň ohrozenia). S narastajúcim skóre vzrastá stupeň rizika a aplikované sú prísnejšie opatrenia. Susedné okresy sa nemôžu líšiť o viac ako 1 stupeň (farbu), okolité okresy konvergujú k farbe rizikovejšieho okresu, aby rozdiel medzi nimi bol maximálne 1 stupeň oproti kalkulovanej úrovni rizika. COVID automat sa zapína, keď Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) vyhlási pandémiu. Naopak, keď WHO vyhlási pandémiu za ukončenú, resp. keď ÚVZ vyhlási epidémiu na Slovensku za ukončenú, COVID automat sa vypne⁽²⁰⁾. Štátny portál informuje o pozastavení COVID automatu ku dňu 25. 11. 2021, s odôvodnením priaznivej epidemiologickej situácie v čase jeho pozastavenia⁽²¹⁾. Naše dáta však preukazujú stúpajúci trend pozitivity v regiónoch Slovenska práve v časových intervaloch, keď bol COVID automat pozastavený a po jeho pozastavení. Pre budúcnosť by bolo možné práve dáta z výsledkov tejto našej práce zohľadniť pri tvorbe aktualizovanej podoby COVID automatu, ak by takáto potreba vznikla.

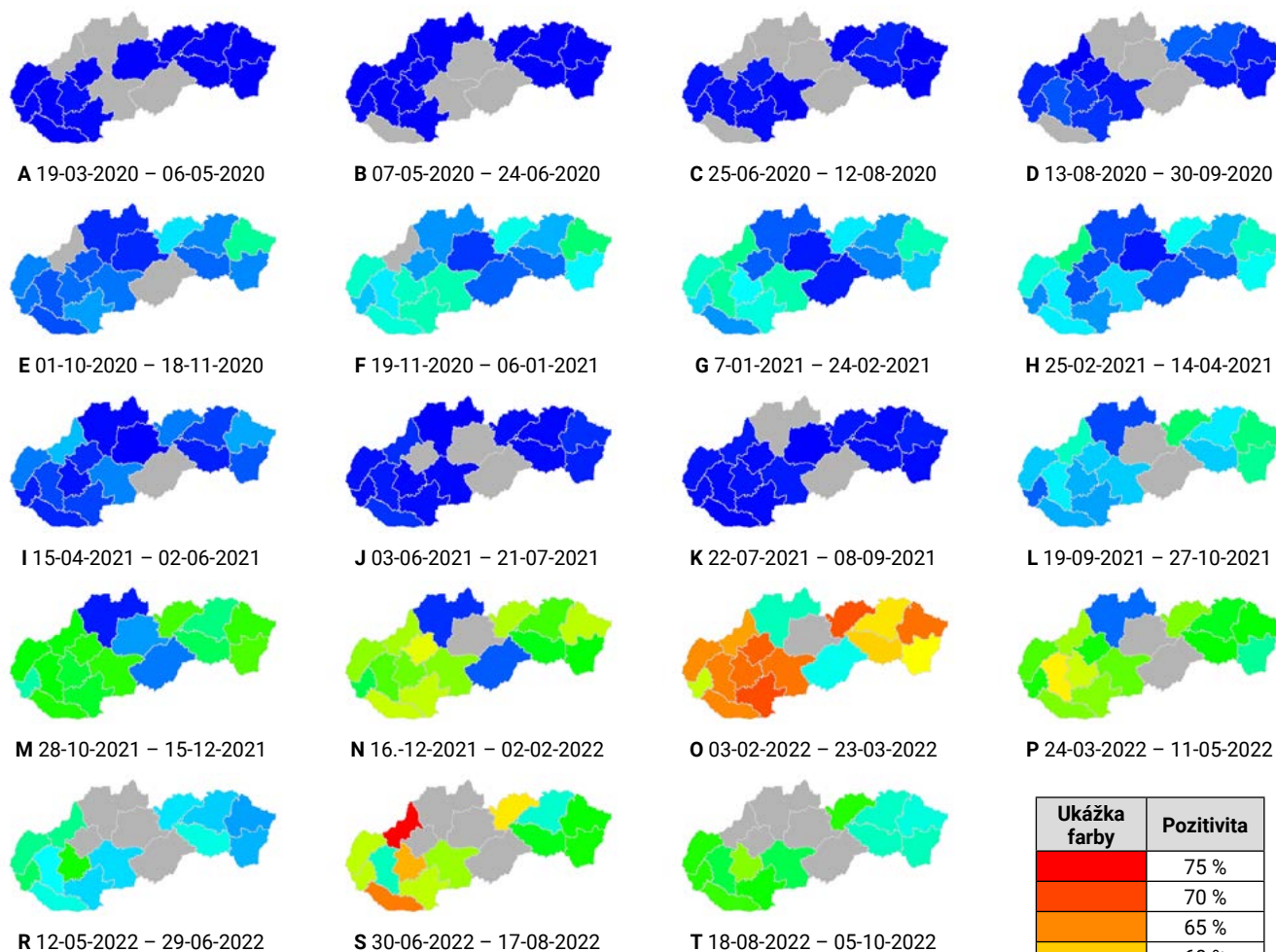
Tabuľka 1. Zaradenie jednotlivých okresných miest do regiónov 1 – 17.

Región 1	Región 2	Región 3	Región 4	Región 5	Región 6
Bratislava Pezinok Senec	Malacky Senica Skalica Myjava	Dunajská Streda Komárno	Nové Zámky Levice	Trnava Piešťany Hlohovec Galanta Šaľa	Nitra Topoľčany Zlaté Moravce
Región 7	Región 8	Región 9	Región 10	Región 11	Región 12
Prievidza Partizánske Bánovce nad Bebravou	Nové Mesto nad Váhom Trenčín Ilava Púchov	Považská Bystrica Bytča Žilina Kysucké Nové Mesto Čadca Turčianske Teplice Martin Dolný Kubín Námestovo Tvrdošín	Liptovský Mikuláš Ružomberok Banská Bystrica Brezno	Žarnovica Žiar nad Hronom Zvolen Banská Štiavnica Krupina Veľký Krtíš Detva	Rožňava Revúca Rimavská Sobota Poltár Lučenec
Región 13	Región 14	Región 15	Región 16	Región 17	
Poprad Kežmarok Stará Ľubovňa	Košice Košice-okolie Gelnica Spišská Nová Ves	Levoča Prešov Sabinov Bardejov Svidník	Stropkov Medzilaborce Vranov nad Topľou Humenné Snina	Sobrance Michalovce Trebišov	

Obrázok 1. Početnosť vykonaných RT-qPCR testov v regiónoch Slovenska meníaca sa v čase. Na mape Slovenska má každý región farebné zobrazenie zodpovedajúce počtu vykonaných testov v danom časovom intervale. Regióny s 0 vykonanými testami sú zobrazené tmavomodrou farbou, červená farba predstavuje región s najvyšším počtom vyhodnotených testov.



Obrázok 2. Percentuálne zastúpenie pozitívnych RT-qPCR testov v regiónoch Slovenska meniace sa v čase. Na mape Slovenska má každý región farebné zobrazenie zodpovedajúce percentu pozitívnych testov zo všetkých vykonaných RT-qPCR testov danom časovom intervale. Regióny s 0 % pozitivitou sú zobrazené tmavomodrou farbou, červená farba predstavuje región so 75 % pozitivitou. Sivá farba predstavuje región s menej ako 50 vykonanými testami.



Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a s podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. PP-COVID-20-0056.

Doplnkové informácie

Tabuľka so všetkými vzorkami zahrnutými do analýzy je dostupná v podobe .xls súboru (ST – Supplementary table) na vyžiadanie od autora.

LITERATÚRA

1. <http://s://www.health.gov.sk/Clanok?koronavirus-pripad-prvy-opatrenia>, dostupné dňa 23. 11. 2022
2. <https://www.health.gov.sk/Clanok?koronavirus-krizovy-stab-opatrenia>, dostupné dňa 23. 11. 2022
3. <https://mapa.covid.chat/>, dostupné dňa 23. 11. 2022
4. https://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=4590:britska-mutacia-bola-na-slovensku-u-v-novembri-v-tre-nine-mohla-pred-sviatkami-dominova&catid=250:koronavirus-2019-nc-ov&Itemid=153, dostupné dňa 23. 11. 2022
5. Srivastava S, Banu S, Singh P, et al. SARS-CoV-2 genomics: An Indian perspective on sequencing viral variants. *Journal of Biosciences* 2021; 46(1): 22.
6. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 2021; 372(6538): eabg3055.
7. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell* 2020; 182(5): 1295-1310. e20.
8. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 2021; 592(7854): 438-443.
9. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 2021; 372(6544): 815-821.
10. Syed AM, Taha TY, Tabata T, et al. Rapid assessment of SARS-CoV-2-evolved variants using virus-like particles. *Science* 2021; 374(6575): 1626-1632.
11. Ong SWX, Chiew CJ, Ang LW, et al. Clinical and Virological Features of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variants of Concern: A Retrospective Cohort Study Comparing B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), and B.1.617.2 (Delta). *Clin Infect Dis* 2022; 75(1): e1128-e1136.
12. Xu Y, Cheng M, Chen X, et al. Current approaches in laboratory testing for SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis* 2020; 100: 7-9.
13. Mackay I. Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. Norfolk, England: Caister Academic Press 2007: 440.
14. Rao SN, Manissero D, Steele VR, et al. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther* 2020; 9(3): 573-586.
15. Tom MR, Mina MJ. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clin Infect Dis* 2020; 71(16): 2252-2254.
16. https://korona.gov.sk/wp-content/uploads/2021/11/covid_automat_signalizacny_system_4v3.pdf, dostupné dňa 19.12.2022
17. <https://www.medirexgroupacademy.sk/wp-content/uploads/2021/06/Zavedenie-a-vyvoj-molekuloveho-testovania-SARS-CoV-2.pdf>, dostupné dňa 19.12.2022
18. <https://www.dovera.sk/aktuality/4897-na-pcr-test-uz-treba-vymen-ny-listok>, dostupné dňa 19.12.2022
19. <https://www.vlada.gov.sk/od-pondelka-zacne-platit-covid-automat/>, dostupné dňa 19.12.2022
20. https://korona.gov.sk/wp-content/uploads/2021/08/covid-automat_signalizacny-system_4v1.pdf, dostupné dňa 19.12.2022
21. <https://korona.gov.sk/covid-automat-na-slovensku/>, dostupné dňa 19.12.2022

Mgr. Nikola Janoštiaková

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, LF UK Bratislava
 Špitálska 24, 811 08 Bratislava
 e-mail: n.janostiakova@gmail.com

Myeloproliferatívne neoplázie a s nimi súvisiace mutácie

Miroslava Eckertová^{1,2}, Renata Lukačková^{1,2}, Ľubica Majerová^{1,2}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY n.o., Nitra

²Medirex, a.s., Oddelenie lekárskej genetiky, Bratislava

Myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú skupinou ochorení hematopoetickej kmeňovej bunky, pre ktoré je charakteristická zvýšená proliferácia jedného alebo viacerých vývojových radov krviniek a tendencia leukemickej transformácie. Na základe klasifikácie Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2016 sa medzi MPN bez prítomnosti Philadelphia (Ph) chromozómu a jeho produktu, t. j. fúzneho génu *BCR-ABL1*, zaraďuje polycytémia vera (PV), esenciálna trombocytemia (ET) a primárna myelofibróza (PMF). Mutácia v jednom z troch génov – *JAK2* (mutácia génu pre Janus kinázu 2), *MPL* (mutácia v géne pre trombopoetínový receptor) a *CALR* (mutácia v géne pre kalretikulín) je prítomná vo veľkej väčšine pacientov s klasickou Ph-MPN. Tieto kľúčové somatické mutácie sú zodpovedné za fenotypový prejav ochorenia a ich spoločnou črtou je nadmerná aktivácia JAK/STAT signálnej dráhy, a to aj vrátane „triple“ negatívnych pacientov, u ktorých nie je dokázaná žiadna z uvedených somatických mutácií.

Kľúčové slová: myeloproliferatívne neoplázie, polycytémia vera, esenciálna trombocytemia, primárna myelofibróza, molekulárna diagnostika

Myeloproliferative neoplasms and detection of calreticulin detection

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal haematological disorders that lead to the overproduction of one or more myeloid lineages and contribute to disease progression to leukemic transformation. The World Health Organization (2016) includes in Philadelphia – chromosome (Ph) negative MPN diagnosis of polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Mutations of *JAK2* (gene for Janus Kinase 2), *MPL* (gene for Thrombopoietin Receptor) and *CALR* (gene for Calreticulin) are related to MPN in the majority of patients with classical Ph-MPN. These driver somatic mutations are responsible for disease phenotype and constitutive activation of the JAK/STAT signalling pathway as „triple“ negative patients were termed MPN patients lacking driver mutations, although the JAK/STAT signalling cascade is preserved.

Keywords: myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis, molecular diagnostics

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 68 – 71

Úvod

Ph (*BCR-ABL1*) negatívne myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú podskupinou ochorení hematopoetickej kmeňovej bunky, pre ktoré je charakteristická následná proliferácia erytrocytovej, granulocytovej alebo megakaryocytovej línie a zvýšená tendencia leukemickej transformácie. S hyperproliferáciou kostnej drene koreluje myeloproliferácia v periférnej krvi a/alebo v slezine. Pre Ph-MPN sú typické zložité molekulárne zmeny, ktoré spôsobujú klinicky rôznorodý priebeh ochorenia s nepriaznivým vplyvom na kvalitu a dĺžku života.

Najčastejšie, tzv. klasické Ph-MPN tvorí polycytémia vera (PV), esenciálna trombocytemia (ET) a primárna myelofibróza (PMF). Sú známe arteriálnymi a venóznymi trombózami, cytopéniou, výraznou splenomegáliou a najmä rizikom prechodu do akútnej leukémie. Somatické mutácie vyskytujúce sa vo väčšine týchto MPN, zahŕňajú *JAK2* mutáciu, *MPL* mutáciu a mutáciu v géne pre *CALR*. Špecifickú skupinu tvoria pacienti, ktorí nevykazujú žiadnu z kľúčových mutácií, na základe čoho sa v literatúre radia k „triple“ negatívnym. Napriek tejto skutočnosti je u nich rovnako ako v prípade MPN pacientov s riadiacimi mutáciami stimulovaná JAK/STAT sig-

nálna kaskáda. Vďaka významným objavom týkajúcim sa mutačných zmien a ovplyvnení JAK/STAT dráhy sa v posledných desaťročiach výrazne zlepšila diferenciálna diagnostika a teda aj samotná liečba pacientov s MPN.

Ako výsledok objavenia mutácií v exóne 9 génu pre kalretikulín, je diagnostika na molekulárnej úrovni schopná odhaliť približne 75 – 90 % klonálnych MPN. Zaradenie skríningu *CALR* mutácií do rutínnej praxe sa stáva esenciálnym z hľadiska diferenciálnej diagnostiky *JAK2* negatívnych MPN a prispieva k odhaleniu fenotypových charakteristík spojených s mutáciami typu 1 a typu 2 génu pre *CALR*.

Diagnostické kritériá MPN

Kritériá pre diagnostiku MPN boli vytvorené a zosumari-zované WHO v roku 2016 a rozdelené na veľké „major“ a malé „minor“ kritériá (tabuľka 1). Pre diagnostikovanie PV musia mať pacienti splnené všetky tri body veľkých kritérií alebo prvé dva z veľkých a malé kritérium. Pre ET musia platiť všetky štyri hlavné kritériá alebo prvé tri z hlavných kritérií a malé kritérium. Pre skupinu pacientov s PMF musia byť v platnosti všetky veľké kritériá a minimálne jedno malé kritérium⁽¹⁾.

Tabuľka 1. Diagnostické kritériá pre MPN podľa WHO.

Polycytémia vera	
Veľké „major“ kritériá	
1. HGB > 16,5 g/dl (muži), > 16 g/dl (ženy) alebo HGB > 49 % (muži) a > 48 % (ženy), alebo zvýšený počet erytrocytov	
2. hypercelularita KD, zvýšená proliferácia erytrocytového, granulocytového radu a maturovaných megakaryocytov	
3. prítomnosť JAK2 ^{V617F} alebo JAK2 exón 12 mutácie	
Malé „minor“ kritériá	
• nefyziologická hladina EPO	
Esenciálna trombocytmia	
Veľké „major“ kritériá	
1. počet trombocytov $\geq 450 \times 10^9/l$	
2. v KD prevažuje proliferácia megakaryocytového radu, veľmi raritne sa môže vyskytnúť retikulínová fibróza ^a	
3. nesplnené WHO kritériá pre iné myeloidné neoplázie	
4. prítomnosť JAK2 ^{V617F} , CALR alebo MPL mutácie	
Malé „minor“ kritériá	
• prítomnosť klonálneho markera ^b alebo absencia trombocytózy	
Primárna myelofibróza	
Veľké „major“ kritériá	
1. prítomnosť megakaryocytvej proliferácie sprevádzaná retikulínovou fibrózou ^a 2. alebo 3. stupňa	
2. nesplnené WHO kritériá pre iné myeloidné neoplázie	
3. prítomnosť JAK2 ^{V617F} , CALR alebo MPL mutácie alebo v prípade ich absencie, prítomnosť iného klonálneho markera ^b , alebo neprítomnosť retikulínovej fibrózy ^a v KD	
Malé „minor“ kritériá	
• anémia bez súvislosti s komorbiditami	
• leukocytóza $\geq 11 \times 10^9/l$	
• palpačný nález splenomegálie	
• zvýšená hodnota LDH	

Vysvetlivky: ^aretikulínová fibróza – sieť retikulínových vlákien s prekríženiami (stupne retikulínovej fibrózy: 1. 2. a 3. stupeň), ^bklonálny marker – mutácie ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1

Skratky: HGB – hemoglobín, KD – kostná dreň, EPO – erytropoetín, LDH – laktátdehydrogenáza

Mutácie sprevádzajúce myeloproliferatívne neoplázie

Mutácie sprevádzajúce MPN sa rozdeľujú na kľúčové alebo riadiace (označované v literatúre aj ako „driver“ mutácie) a na prídavné mutácie.

Kľúčové (riadiace) mutácie myeloproliferatívnych neoplázií

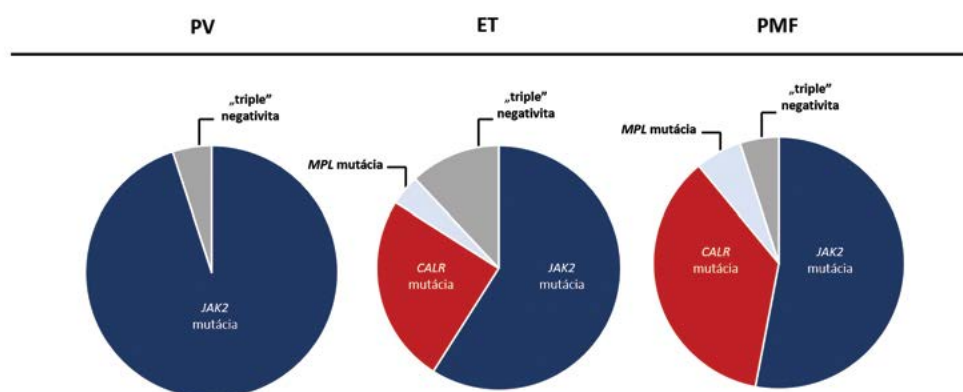
Kľúčové mutácie sú prítomné vo veľkej väčšine pacientov s klasickou Ph-MPN. Somatické mutácie v jednom z 3 génov, t. j. JAK2 (mutácia v géne pre Janus kinázu 2), MPL (mutácia v géne pre trombopoetínový receptor) a CALR (mutácia v géne pre kalretikulín), sú zodpovedné za špecifický fenotyp ochorenia. Nadmerne aktivovaná signálna dráha JAK/STAT je spoločnou patogenetickou črtou Ph-MPN, a to aj vrátane „triple“ negatívnych pacientov, u ktorých nie je dokázaná žiadna z uvedených somatických mutácií⁽²⁾.

Somatická bodová mutácia JAK2 génu sa predpokladá takmer u všetkých pacientov s PV a v 50 – 60 % pacientov s ET a PMF. Približne 25 % pacientov s ET a 36 % pacientov s PMF má pozitívnu mutáciu v géne pre CALR. Mutácia v géne MPL bola zistená v 4 % pacientov s ET a v 6 % pacientov s PMF, zatiaľ čo „triple“ negatívnych pacientov je asi 5 % pri diagnózach PV a PMF a 12 % pri ET (obrázok 1)⁽³⁾.

JAK2 (Janus kináza 2)

Janus kinázy (JAK) patria do rodiny nerekceptorových tyrozínkináz, ktoré asociujú so širokou škálou cytokínových receptorov zahrnutých v bunkovom raste, hematopoéze a imunitnej odpovedi. Za fyziologických podmienok, t. j. za stavu, keď nie je prítomná mutácia, JAK kináza asociuje s receptorovými monomérmi, ktoré po naviazaní ligandu dimerizujú a vedú k fosforylácii a aktivácii JAK kináz. Tie následne fosforylujú špecifické tyrozínové zvyšky cytokínových receptorov, čo má za následok fosforyláciu ďalších signálnych molekúl vrátane STAT (signálny transduktor a aktivátor transkripcie), fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K), proteínkinázy B (známej tiež ako AKT) a MAPK (proteínkináza aktivovaná mitogénom)⁽⁴⁾. JAK2 kináza je zapojená do signálnej dráhy receptorov hematopoetických rastových faktorov, ako je napr. trombopoetínový receptor, receptor pre erytropoetín a mnohé ďalšie. Tyrozínkináza JAK2 je aktivovaná celou škálou špecifických cytokínov a pôsobí ako aktivátor JAK/STAT signálnej dráhy, ktorá následne reguluje bunkovú proliferáciu a diferenciáciu najmä hematopoetických a imunitných buniek⁽⁵⁾.

V patogenéze myeloproliferatívnych neoplázií sa najčastejšie vyskytuje somatická mutácia JAK2 génu vedúca k zmene bázy G za T na nukleotide 1849 v exóne 14 pseudokinázovej domény JH2, čo predstavuje zámenu aminokyseliny valín za fenylalanín v kodóne 617 (JAK2^{V617F})^(6,7). Mutácia ve-

Obrázok 1. Zastúpenie JAK2, MPL a CALR mutácií v Ph-myeloproliferatívnych neopláziách⁽³⁾.


die ku konštitutívnej aktivácii JAK2 s následnou hypersenzitivitou na cytokíny a k aktivácii cytokínových receptorov nezávisle od väzby ligandu, a teda k nekontrolovanej hematopoetickej transformácii a proliferácii⁽⁶⁾.

Na báze mutácie JAK2^{V617F} a deregulácie JAK/STAT kaskády je objasnených približne 60 % BCR-ABL negatívnych MPN⁽⁷⁾. Frekvencia homozygotných mutácií JAK2 varíruje medzi 25 – 30 % v prípade PV a PMF, zatiaľ čo pri ET je zastúpenie homozygotných mutácií raritné a predstavuje približne 2-4 % všetkých prípadov ET. Prítomnosť homozygotných mutácií pri PV a ET je asociovaná s vyšším rizikom progresie do myelofibrózy⁽⁸⁾.

MPL

Napriek tomu, že v myeloproliferatívnych neopláziách dominuje mutácia JAK2^{V617F}, s nižšou frekvenciou sa vyskytujú aj mutácie iných génov spriahnutých s myeloproliferáciami. Jednou z nich je mutácia v géne MPL, ktorý kóduje trombopoetínový receptor (MPL) viažuci na seba trombopoetín (TPO). Ich väzba vedie k homodimerizácii receptora, aktivácii JAK2, fosforylácii MPL a stimulácii signálnej kaskády JAK/STAT, regulujúcej proliferáciu a diferenciáciu buniek⁽⁹⁾.

Doposiaľ bolo identifikovaných viacero mutácií MPL génu, pričom dve najčastejšie, t. j. mutácia v kodóne 515, označovaná ako MPL^{W515L} (zámena tryptofánu za leucín) a MPL^{W515K} (zámena tryptofánu za lyzín), sa vyskytujú v exóne 10. Výsledným efektom MPL mutácií je aktivácia trombopoetínového receptora bez prítomnosti ligandu. Výsledkom je mobilizácia tyrozínkináz a stimulácia JAK/STAT signálnej cesty⁽¹⁰⁾. Mutácie sú väčšinou v heterozygotnom stave, homozygotný stav sa spája s progresiou ochorenia a fibrózou kostnej drene⁽¹¹⁾.

Prítomnosť MPL mutácií súvisí s ET a PMF, preto sa diagnostika daných mutácií odporúča u pacientov s negatívnou mutáciou JAK2^{V617F}. V raritných prípadoch bola preukázaná prítomnosť oboch typov, t. j. MPL i JAK2^{V617F} mutácií⁽¹²⁾.

Kalretikulín

V roku 2013 bol identifikovaný gén kódujúci kalretikulín (CALR), ktorého mutácie boli zistené u pacientov s myeloproliferatívnymi neopláziami, vykazujúcich JAK2 negativitu, v 25 % u pacientov s ET a v 36 % s PMF^(13,14). V súčasnosti je známych približne 50 typov mutácií CALR, hoci až 80 % zo všetkých predstavujú dve najčastejšie, t. j. delécia 52bp (del52; c.1092_1143del; L367fs*46) a inzercia 5bp (ins5; c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47), označované aj ako typ 1 a typ 2.

Predpokladá sa, že mutácie CALR zohrávajú kľúčovú úlohu vo vývoji MPN aktiváciou MPL cez JAK/STAT signálnu cestu⁽¹⁵⁾. Mutácie CALR typu 1 sa vyskytujú častejšie v PMF a sú spojené s priaznivejšou prognózou, predĺženým celkovým prežívaním v porovnaní s inými formami PMF, pri ktorých nie je prítomná mutácia CALR. Naopak, mutácie typu 2 sú viac zastúpené pri ET a fenotypovo sú porovnateľné s JAK2^{V617F} mutáciou⁽¹⁶⁾. Pacienti s ET a mutáciou CALR typu 2 majú vyššie množstvo trombocytov. Riziko progresie ET do myelofibrózy je zvýšené pri mutáciách typu 1⁽¹⁶⁾.

Prídavné mutácie myeloproliferatívnych neoplázií

Ako prídavné mutácie sa označujú tie, ktoré nespádajú do kategórie kľúčových mutácií sprevádzajúcich ochorenie MPN, teda mutácie iné než v génoch JAK2, MPL ale

Tabuľka 2. Frekvencia kľúčových a prídavných mutácií v myeloproliferatívnych neopláziách a ich vplyv na leukemickú transformáciu⁽¹⁹⁾.

Mutačná skupina	Gén	PV	ET	PMF	LT
„Driver“ mutácie	JAK2	98 %	52 %	62 %	60 %
	CALR	0 %	26 %	22 %	21 %
	MPL	0 %	4 %	5 %	13 %
Metylácia DNA	TET2	22 %	16 %	15 %	19 %
	DNMT3A	2 %	6 %	9 %	3 %
	IDH1	0 %	0 %	2 %	12 %
	IDH2	2 %	1 %	-	7 %
Modifikácia chromatinu	ASXL1	12 %	11 %	48 %	47 %
	EZH2	0 %	3 %	6 %	15 %
Spliceozómový komplex	SRSF2	3 %	2 %	14 %	13 %
	U2AF1	0 %	1 %	17 %	5 %
	SF3B1	3 %	5 %	13 %	7 %
Tumorsupresory	TP53	1 %	2 %	6 %	16 %
Regulátory transkripcie	RUNX1	2 %	2 %	3 %	17 %

Skratky: PV – polycytémia vera, ET – esenciálna trombocytémia, PMF – primárna myelofibróza, LT – leukemická transformácia

bo CALR⁽¹⁷⁾. Mutácie boli roztriedené do kategórií podľa ich hlavnej funkcie, t. j. na modifikátory chromatinu, komponenty spliceozómového komplexu, modifikátory DNA metylácie, tumorsupresory a regulátory transkripcie. Tieto mutácie majú jednoznačne patogénny charakter, zapájajú sa do progresie ochorenia, leukemickej transformácie, vo zvýšenej miere sú exprimované v blastovej fáze MPN a negatívne ovplyvňujú prežívanie pacientov s MPN⁽¹⁸⁾. Frekvencia a zastúpenie mutácií sú znázornené v tabuľke 2.

Záver

Vďaka objavom mutačných zmien a ovplyvneniu JAK/STAT signálnej cesty v poslednom desaťročí nastal výrazný pokrok v poznaní patofyziológie a diagnostiky MPN. Hoci v súčasnosti existujú možnosti liečby, ktoré sú schopné do určitej miery kontrolovať priebeh ochorenia, stále absentuje „game changer“, ktorý by bol schopný eliminovať ochorenie u väčšiny pacientov. Leukemická transformácia zostáva naďalej hlavnou komplikáciou MPN. Hoci na jednej strane dokážeme identifikovať riziká transformácie, na strane druhej stále nedokážeme zabrániť prechodu do akútnej leukémie v špecifickej skupine pacientov s MPN. Diferenciálna diagnostika podtypov MPN je kľúčová pre správny monitoring pacientov a znamená úzku spoluprácu klinikov, genetikov a patológov. Pohľad na klinický priebeh ochorenia je významný aj vzhľadom na manažment špeciálnych situácií, ako je predkoncepčná starostlivosť, gravidita či predoperačná starostlivosť.

Podakovanie

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

LITERATÚRA

1. Loscocco GG, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Impact of Mutational Profile on the Management of Myeloproliferative Neoplasms: A Short Review of the Emerging Data. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 12367-12382.
2. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci.* 2014; 111: E5401-5410
3. Prins D, Arias CG, Klampfl T, et al. Mutant Calreticulin in the Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere.* 2020; 4: e333
4. Sandberg EM, Wallace TA, Godeny MD, et al. JAK2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys.* 2004; 41: 207-232
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7: 387-397
6. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005; 365: 1054-1061
7. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1779-1790
8. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617 V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood.* 2007; 110:840-846
9. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017; 129: 667-679
10. Arunachalam AK, Suresh H, Mathews V, et al. Allele specific PCR: a cost effective screening method for MPL mutations in myeloproliferative neoplasms. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2018; 1543-1545
11. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2013; 121: 4388-4395
12. Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson SJ, et al. Detection of MPL mutations by a novel allele-specific PCR-based strategy. *J Mol Diagn.* 2013; 15: 810-818
13. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2379-2390
14. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013; 2391-2405
15. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016; 127: 1307-1316
16. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016; 30: 431-438
17. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014; 123: 2220-2228
18. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2015; 125: 327-335
19. Grabek J, Straube J, Bywater M, et al. The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. *Cells.* 2020; 9: 1901

RNDr. Miroslava Eckertová, PhD.

Lekárska genetika, Medirex, a. s.

Galvaniho17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: miroslava.eckertova@medirex.sk

Genetická analýza abortov

Katarína Tóthová^{1,2}, Dagmar Landlová², Ľubica Majerová^{1,2}, Renata Lukačková^{1,2}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY n.o., Nitra

²Medirex, a.s., Oddelenie lekárskej genetiky, Bratislava

Spontánny potrat je pomerne častý jav a postihuje približne každú 5. ženu v reprodukčnom veku. Spontánnym potratom je ukončených približne 20 % klinicky potvrdených tehotenstiev. Častou príčinou vnútromaternicovej retardácie a následného odumretia plodu či abortu sú genetické príčiny. Polovica spontánnych potratov v prvom trimestri a približne 30 % spontánnych potratov v neskorších týždňoch tehotenstva vzniká následkom chromozómových aberácií, najčastejšie aneuploidií. K abortom môže dôjsť okrem aneuploidií následkom štruktúrnych chromozómových aberácií. Sú to rôzne delécie, duplikácie, inverzie či vyvážené translokácie. Pomocou rôznych genetických metód sa vyšetruje možná príčina spontánneho potratu.

Kľúčové slová: spontánny potrat, genetická analýza, karyotyp, QF-PCR

Genetic analyses of abortions

Miscarriage is a fairly common phenomenon and affects approximately every 5th woman of reproductive age. Approximately 20% of clinically confirmed pregnancies are terminated by spontaneous abortion. Genetic causes are a common cause of intrauterine retardation and subsequent death or miscarriage of the foetus. Roughly half of the miscarriages in the first trimester and roughly 30% of miscarriages in later weeks of pregnancy are caused by chromosomal aberrations, most often by aneuploidies. In addition to aneuploidies, spontaneous abortion can also occur due to structural chromosome aberrations, various deletions, duplications, inversions or balanced translocations. Various genetic methods investigate the possible cause of spontaneous abortion.

Keywords: miscarriages, genetic analysis, karyotype, QF-PCR

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 72 – 75

Úvod

Častými príčinami abnormálneho vývinu plodu sú okrem ne-genetických príčin (infekcie, hematologické príčiny, materské anatomicke a fyziologické anomálie, environmentálne vplyvy) práve genetické príčiny. Väčšie či menšie zmeny v štruktúre chromozómu môžu viesť k narodeniu postihnutého dieťaťa, k odumretiu plodu a spontánnym potratom. Mnohokrát k nim dochádza následkom numerických zmien buď celých chromozómov, alebo ich častí. Rôzne štruktúrne aberácie chromozómov u plodu môžu vzniknúť následkom vyvázenej štruktúrnej chromozómovej aberácie u jedného alebo u oboch rodičov. Fenotypovo bezpríznakoví rodičia sú prenášačmi týchto genetických zmien, ktoré sa v priebehu redukčného delenia môžu premeniť na nebalansovanú aberáciu u plodu. Genetická analýza napomáha detekcie týchto genetických príčin.

Spontánny potrat

Podľa vyhlášky MZSR (Ministerstva zdravotníctva Slovenskej Republiky) č. 22/1988 Zb. ide o samovoľný potrat, ak hmotnosť plodu nedosiahne 500 g a prežívanie plodu je maximálne 24 hodín alebo ak sa plod narodí bez známk života (dýchanie, srdcová činnosť, pohyby svalstva, pulzácia pupočníka) s maximálnou hmotnosťou 1 000 g⁽¹⁾. Spontánne potraty sa podľa týždňa tehotenstva delia na včasné, skoré (do 12. týždňa) a neskoré (medzi 12. – 28. týždňom)⁽²⁾. O izolovanom potrate hovoríme, ak k potratu dôjde náhodne len raz. U žien s tromi alebo viacerými potratmi za sebou pred 20. týždňom tehotenstva hovoríme o habituálnom potratáaní, ktoré postihuje asi 2 – 5 % párov.

Genetické príčiny porúch vnútromaternicového vývoja a abortov

Prenatálny vývoj je obdobie života od oplodnenia až po narodenie. Pri poruche vnútromaternicového vývoja môžu vznikáť rôzne vrodené chyby. Funkčné (metabolické ochorenia) sú diagnostikované väčšinou až po narodení dieťaťa, kým štruktúrne už počas vnútromaternicového vývoja. Existuje celá škála rôznych faktorov vedúcich od poškodenia až po odumretie plodu.

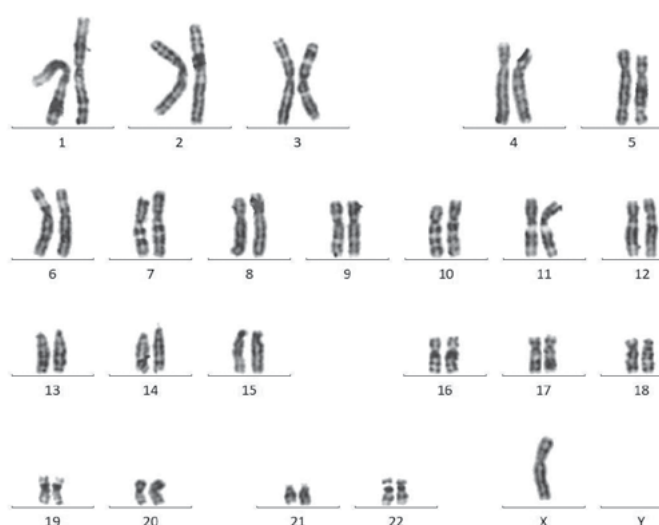
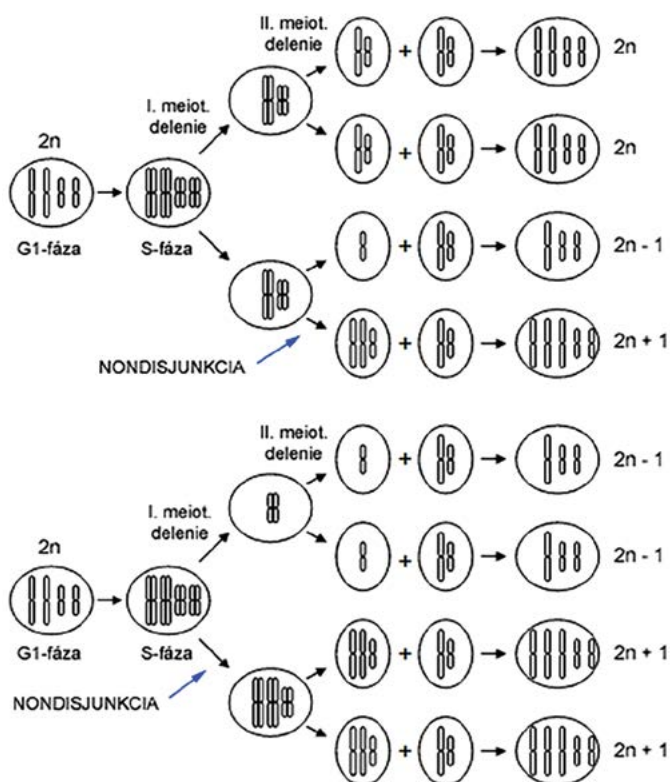
Genetické príčiny vnútromaternicových vývojových porúch majú základ pri tvorbe gamét. Každá bunka obsahuje jadro, v ktorom je uložená genetická informácia v podobe chromozómov. Počas ich mitotického či meiotického delenia môže dochádzať k poruchám v počte alebo štruktúre chromozómov. Mutácie konkrétneho génu alebo súboru génov vznikajú de novo alebo sú zdedené od rodičov⁽³⁾.

Chromozómové aberácie

K abortom dochádza veľakrát následkom chromozómových abnormalít plodu. Vznikajú väčšinou de novo následkom náhodných chýb. K poruchám dochádza v štruktúre alebo v počte už konkrétnych chromozómov či chromozómových úsekov autozómov alebo gonozómov. Rozdeľujeme ich na numerické a štruktúrne.

Numerické chromozómové aberácie sú odchýlky od normálneho diploidného počtu 46 chromozómov. Zmeny v počte jednotlivých chromozómov nazývame aneuploidiami a zmeny celých chromozómových súborov polyploidiami. Polyploidné embryá, najmä triploidné (**obrázok 1**), odu-

Obrázok 1. Triploidia 69,XXY (Medirex, a. s.)

Obrázok 3. Monozómia X chromozómu – 45,X (Medirex, a. s.)

Obrázok 2. Nondisjunkcia počas meiotického delenia, typy vznikajúcich gamét


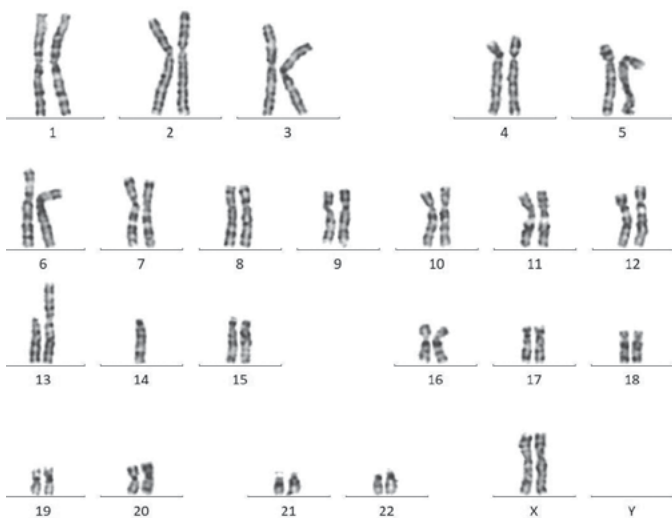
mierajú vo väčšine prípadov hneď v počiatkoch tehotenstva. Numerické aberácie vznikajú najmä nondisjunkciou v priebehu I. alebo II. meiózy (**obrázok 2**). Homologické páry chromozómov sa neoddelia, vznikajú gaméty s prebytočným alebo chýbajúcim chromozómom. Predčasná segregácia sesterských chromatíd (PSSC) rovnako patrí medzi mechanizmy chybného rozdelenia chromatíd. Vznikajú bunky s nadpočetnou alebo chýbajúcou chromatídou⁽⁴⁾.

Aneuploidie sú najčastejšie chromozómové aberácie. Buď chýba jedna kópia chromozómu (monozómia), ale-

bo je prítomný jeden nadpočetný chromozóm (trizómia). K chybnnej segregácii dochádza vo väčšej miere pri malých chromozómoch, najčastejšie 21. chromozómu, 22. chromozómu a Y chromozómu⁽⁵⁾. V prípade intrauterinných rastových a vývojových retardácií či spontánnych abortov je ich výskyt častý. V skorých štádiách tehotenstva (do 10. t. t.), v embryonálnej fáze vnútro maternicového vývoja, je výskyt týchto aberácií vyšší⁽⁶⁾. Z prvotrimestrálnych spontánnych abortov je čistá línia trizómie 16. chromozómu najčastejšia (16 %). Je so životom nezlúčiteľná. Plod s mozaikovou formou trizómie 16. chromozómu sa mnohokrát narodí s minimálnymi následkami a miernymi malformáciami⁽⁷⁾. Detegovanými aberáciami u potratených plodov sú aj trizómie 22. a 9. chromozómu a so životom nezlúčiteľné trizómie 1., 19. a 20. chromozómu. Monozómia X chromozómu (Turnerov syndróm) (**obrázok 3**) a Klinefelterov syndróm (XXY syndróm) patria medzi gonozómové aberácie vedúce k predčasným potratom.

Štruktúrne chromozómové aberácie sú výsledkom chromozómového zlomu a následného nesprávneho opätovného spojenia chromozómových segmentov či výmenou nehomologických chromozómových úsekov (porucha crossing overu). Vyskytujú sa zriedkavejšie ako numerické chromozómové aberácie. Pôvod môžu mať v gamétach, vtedy hovoríme o zárodočných aberáciách. O získaných aberáciách hovoríme, ak majú pôvod v somatických bunkách. Dochádza k strate, získaniu či presunu genetického materiálu v rámci chromozómu alebo medzi chromozómami. Rozdeľujeme ich na vyvážené (balansované), keď nedochádza k strate alebo zisku genetického materiálu, alebo nevyvážené (nebalansované), keď dochádza k zmene množstva genetického materiálu. Štruktúrne balansované (vyvážené) translokácie u rodičov môžu viesť až k opakovaným abortom. U párov s abnormálnym karyotypom sa zvyšuje pravdepodobnosť, že sa im narodí dieťa s genetickou poruchou. Frekvencia ich výskytu u potratených plodov je zhruba 4 %⁽⁸⁾. Medzi ne zaradujeme inverzie, recipročné či Robertsonove translokácie (**obrázok 4**), delécie či duplikácie, izochromozóm či ring chromozóm.

Obrázok 4. Robertsova translokácia – 45,XX,rob(13;14)(q10;q10) (Medirex, a. s.)



Placentárny mozaicizmus

Mozaicizmus je stav, keď v organizme sú prítomné minimálne 2 bunkové línie s odlišnou chromozómovou výbavou. Vzniká genotypová a fenotypová heterogenita medzi rôznymi tkanivami⁽⁹⁾. Mozaiky sa týkajú väčšinou štruktúrnych chromozómových aberácií. Čím je vyššie percento patologickej línie, tým sú klinické prejavy u nositeľa ťažšie. Placentárny mozaicizmus vzniká pri vývoji embrya. Z aneuploidných buniek vznikne placenta, kým z buniek s normálnym karyotypom vznikne plod. Fetálne a placentárne bunky majú odlišné chromozómové zastúpenie. Placenta s aberantnou chromozómovou výbavou svoju funkciu nemusí správne vykonávať, následkom toho plod nie je dostatočne vyživovaný a odumiera⁽¹⁰⁾.

Submikroskopické príčiny spontánnych potratov

Príčina opakovaných potratov dlho nebola objasnená. Skúmaním prípadov idiopatických opakovaných abortov sa prišlo na to, že na vine môžu byť submikroskopické zmeny genetického materiálu. CNV (copy number variant) sú štruktúrne varianty, rôzny počet opakovaní tej istej DNA sekvencie. Ich veľkosť varíruje od 50 bp po Mb⁽¹¹⁾. Ide o bežnú súčasť genetickej informácie, ktorá je základom pre vytvorenie populačnej diverzity. Dôležitú úlohu hrajú aj v evolúcii, rôznych biologických procesoch, ale aj v rozvoji rôznych ochorení⁽¹²⁾. Ide najmä o benígne varianty, ktoré nie sú kauzálne pre žiadne ochorenie, v populácii je ich zastúpenie väčšie ako 1 %. Dedia sa medzi generáciami. CNV zdedené od bezpríznakového rodiča môže pri vývoji embrya viesť k narušeniu génu či viacerých génov. Submikroskopické aberácie sú asociované s kongenitálnymi a neurodegeneratívnymi ochoreniami. Môžu ovplyvniť efekt génovej dávky génov ovplyvňujúcich priebeh skorého tehotenstva, môžu narušiť normálnu segregáciu chromozómov, a tým vznik aneuploidii.

Prenatálna genetická diagnostika abortov

Prenatálna diagnostika je súbor vyšetrovacích metód, ktoré slúžia na skoré odhalenie vývojových a chromozómových porúch plodu. Rozdeľujeme ju na neinvazívnu a invazívnu.

Neinvazívne metódy zaraďujeme medzi vyšetrenia bez instrumentačného zásahu do tela matrice. Neinvazívny genetický test (NIPT – non-invasive prenatal test) skúma voľnú fetálnu DNA (cfDNA – cell-free DNA) pochádzajúcu z krvi matky bez nutnosti odberu plodovej vody⁽¹³⁾. Ide o skriningovú metódu, v prípade pozitivity ju treba potvrdiť invazívnym odberom plodovej vody a následným genetickým vyšetrením.

O **invazívnom genetickom testovaní** hovoríme, ak sa vykonáva zásah do matrice pre zabezpečenie odberu vzorky. Odoberá sa plodová voda v priebehu 2. trimestra (od 16. t. t.), alebo choriónové klky v skorších týždňoch (10. – 13. t. t.) tehotenstva. Zaraďujú sa medzi diagnostické metódy. Indikuje ich lekár genetik po genetickej konzultácii na základe presne určených kritérií opísaných v metodickom liste vydanom Slovenskou spoločnosťou lekárskej genetiky – Indikovanie cytogenetických a molekulárno-cytogenetických vyšetrení (doplnené 05/2021)⁽¹⁴⁾. V prípade vzoriek spontánnych potratov je genetické vyšetrenie indikované, ak sa predpokladá zistenie genetickej príčiny spontánneho potratu alebo úmrtia plodu.

Genetické laboratórne metódy

Metodiky využívané v genetickej diagnostike sa delia na celogenómové a chromozómové špecifické. Medzi celogenómové patrí konvenčná cytogenetika, array-komparatívna genómová hybridizácia (array-CGH) a sekvenovanie novej generácie (NGS). Medzi chromozómové špecifické techniky patrí fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) a kvantitatívna fluorescenčná PCR (QF-PCR). Ich kombinácia je najrozumnejšia voľba pre dosiahnutie najpresnejšieho výsledku. Správny odber vzorky (vzorka samotného plodu) je dôležitý. V prípade potratov v skorých štádiách je toto skoro nemožné, úplné oddelenie vzorky plodu od ostatného tkaniva je náročné. V prípade zamlčaného potratu je vhodný odber choriónových klkov (CVS). Materiál sa ďalej spracováva podľa vyšetrovacej metodiky. Cytogenetické vyšetrenie karyotypu konvenčnou cytogenetikou (karyotypovanie) vyžaduje kultiváciu vzorky tkaniva. Molekulovogenetické metódy vyžadujú izoláciu DNA plodu aj izoláciu DNA z krvi matky pre následné vylúčenie kontaminácie.

Základnou metódou je cytogenetické karyotypovanie. Metodika je založená na G-pruhovaní, pomocou ktorého sa zviditeľnia metafázické chromozómy aj ich väčšie prestavby. Rozlišovacia schopnosť štandardnej cytogenetickej metódy je 5-10 Mb. Deteguje balansované aj nebalansované prestavby chromozómov, a to aj v mozaikovej forme. Zaujímavou alternatívou karyotypovania vďaka svojej spoľahlivosti, citlivosti, nízkym nákladom, rýchlosti je metodika QF-PCR, ktorá rýchlo v jednej reakcii dokáže amplifikovať, detegovať a analyzovať krátke opakujúce sa sekvencie (STR) a konzervatívne sekvencie, ktorých počet a rozloženie v genóme sú veľmi variabilné a polymorfne. Deteguje najčastejšie numerické aberácie – aneuploidie chromozómov 13., 15., 16., 18., 21., 22., X a Y v pomerne krátkom časovom horizonte (24 – 48 h).

Záver

Spontánne potraty patria medzi časté a závažné tehotenské komplikácie. Uvádza sa, že len 30 % z celkového

počtu splodených plodov sa dožije pôrodu. Hlavne v prípade včasných potratov sú ich príčinami rôzne genetické chromozómové aberácie. Práve prenatálna genetická diagnostika, či už invazívna, alebo neinvazívna, slúži na skoré odhalenie týchto aberácií. Genetická diagnostika vzorky potrateného plodu je potrebná z pohľadu manažmentu ďalších tehotenstiev. Ak sa podarí odhaliť príčinu, prehodnotia sa možnosti, ako predísť možným potratom v nasledujúcich graviditách.

Podakovanie

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

LITERATÚRA

1. <https://www.zakonypreludi.sk/zz/1988-22>
2. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins – Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss. Obstet Gynecol.; (2018) 132(5): e197-e207.
3. Choi TY, Lee HM, Park WK, et al. Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases. Obstet. Gynecol. Sci., (2014) 57: 518-525.
4. Wartosch L, Schindler K, Schuh M, et al. Origins and mechanisms leading to aneuploidy in human eggs. Prenatal Diagnosis; (2021) 41: 620-630.
5. Hassold T, Mylor-Hagen H, Wood A. Failure to recombine is a common feature of human oogenesis. Am J Hum Genet.; (2021) 108(1): 16-24.
6. Gu C, Li K, Li R, et al. Chromosomal Aneuploidy Associated With Clinical Characteristics of Pregnancy Loss. Front Genet.; (2021) 12: 667-697.
7. Armstrong AA, Gaw SL, Platt LD. 153 – Mosaic Trisomies 8, 9, and 16. Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care (Second Edition). Elsevier, (2018) 617-620.
8. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic factors as a cause of miscarriage. Curr Med Chem.; (2010) 17(29): 3431-3437.
9. Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. Genome Research, (2014) 24: 733-742.
10. Pašková K, Braxatorisová T, Pagáčová E, a spol. Mozaicizmus v súbore reprodukčných strát. Praktická Gynekológia, (1998) 5(2): 60-63.
11. Lauer S, Gresham D. An Evolving View of Copy Number Variants. Curr. Genet. (2019) 65, 1287-1295.
12. Henkel J, Saif R, Jagannathan V, et al. Selection signatures in goats reveal copy number variants underlying breed-defining coat color phenotypes. PLoS Genet.; (2019) 15(12): e1008536.
13. Harraway J. Non-invasive prenatal testing. Aust Fam Physician.; (2017) 46(10): 735-739.
14. <https://www.sslg.sk/index.php/sk/dokumenty/metodicke-pokyny/119-metodicke-usmernenie-infertilita-a-darcovstvo-pohlavnych-bu-niek-upg1>

RNDr. Katarína Tóthová

Klinická genetika, Medirex, a. s.,
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: katarina.tothova@medirex.sk

Metaplastické zmeny epitelu vybraných lokalít v gastrointestinálnom trakte

Kristína Mikuš Kuracinová^{1,2}

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

²MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Nitra

Metaplastické zmeny patria z pohľadu zmien k adaptačným zmenám, ktorých úlohou je zabezpečenie funkcie jednotlivých tkanív aj pri zmenených vonkajších či vnútorných podmienkach. Sú to zmeny na mikroskopickej úrovni, poväčšine nedetegovateľné zobrazovacími metódami. Ako najčastejší typ metaplázie v GIT sa javí intestinálna metaplázia, za ňou pseudopylorická/pylorická metaplázia. Jednotlivé typy majú svoje mimikry, čo dokáže sťažiť a predĺžiť čas správne stanovenej diagnózy. Vďaka bežne používaným farbiacim metódam a imunohistochemii dokážeme na základe typov mucínu v metaplastických bunkách odlíšiť jednotlivé typy. Táto prehľadová práca zdôrazňuje niektoré morfológické znaky, metaplastické lézie pažeráka, žalúdka a žlčníka, pričom poukazuje na ich diagnostické kritériá a ich ďalší vývoj.

Kľúčové slová: metaplázia, dysplázia, diagnostika, rozdiely

Metaplastic epithelial changes of selected regions in the gastrointestinal tract

Metaplastic changes belong to adaptive changes, whose role is to ensure the function of individual tissues even under altered external or internal conditions. These are changes at the microscopic level, mostly undetectable by imaging methods. The most common type of metaplasia in the GIT appears to be intestinal metaplasia, followed by pseudopyloric/pyloric metaplasia. The different types have their mimicry, which can complicate and prolong the time of a correct diagnosis. With commonly used staining methods and immunohistochemistry, we can distinguish the different types based on the types of mucin in metaplastic cells. This review paper highlights some morphological features of metaplastic lesions of the oesophagus, stomach and gallbladder, pointing out their diagnostic criteria and further evolution.

Keywords: metaplasia, dysplasia, diagnostics, differences

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 76 – 82

Úvod

Z komplexného pohľadu by sa dalo povedať, že ľudský organizmus je dokonale funkčným systémom, kde každá bunka má svoje miesto, svoju funkciu. Stavba steny gastrointestinálneho traktu je z histologického pohľadu predvídateľná, na povrchu prevažne so žľazovým epitelom. A práve tento epitel je vystavovaný veľkému množstvu vonkajších aj vnútorných vplyvov, čo za určitých okolností vedie k reverzibilným zmenám povrchového epitelu, ktoré môžu predstavovať diagnostický problém. Táto prehľadová práca zdôrazňuje niektoré morfológické znaky, metaplastické lézie pažeráka, žalúdka a žlčníka, pričom poukazuje na ich diagnostické kritériá a ich ďalší vývoj.

Pažerák

Ezofág má rovnakú histologickú stavbu steny ako ostatné orgány v gastrointestinálnom trakte, až vnútornú výstelku, ktorú tvorí dlaždicový, viacradový, nerohovatejúci epitel. Napriek tomu, že tento typ epitelu je odolnejší proti vonkajším vplyvom, pri chronickej iritácii dochádza k metaplastickej premene, k vzniku Barrettovho pažeráka (BE). Hlavnou príčinou vzniku je prolongovaná iritácia skvamózneho epitelu žalúdočnými šťavami pri gastroezofágovom refluxe⁽¹⁾. No-

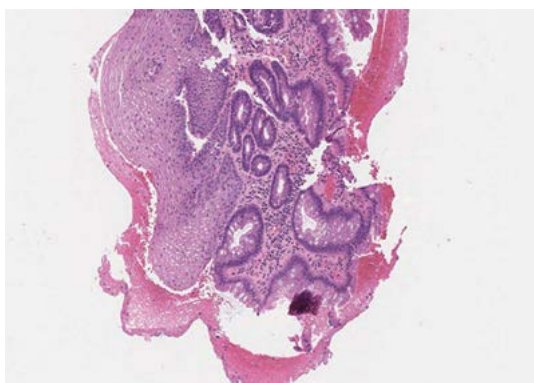
vý metaplastický žľazový epitel je odolnejší proti žalúdočnej kyseline, čím plní v prvom rade ochrannú funkciu.

Barrettov ezofág je považovaný za premalígný stav, ktorý je pod vplyvom pretrvávajúceho zápalu a iritácie ohrozený kumulatívnymi molekulárnymi zmenami, čo sa môže prejavovať ako ťažká dysplázia s prechodom do invazívneho adenokarcinómu⁽²⁾. Diagnóza Barrettovho pažeráka sa stanovuje endoskopicky, avšak konečné slovo má biopsické vyšetrenie. Pri hodnotení biopsií pacientov s BE však patológovia čelia rôznym diagnostickým výzvam, ako sú reparačné zmeny, ktoré môžu napodobňovať alebo maskovať dyspláziu.

Hodnotenie metaplastických zmien

Metaplastické zmeny pažeráka sú v súčasnosti definované Americkou gastroenterologickou asociáciou ako zmena distálneho epitelu pažeráka, pri ktorej pozorujeme sliznicu cylindrického typu v kombinácii s nálezom intestinálnej metaplázie (IM) (obrázok 1)⁽³⁾. V rôznych častiach sveta sa však stretávame s odlišnými názormi týkajúcimi sa definície Barrettovho pažeráka, čo sa týka prítomnosti IM alebo dĺžky poškodenia sliznice. Americká gastroenterologická asociácia (AGA), American College of Gastroenterology (ACG) a Európska spoločnosť gastrointestinálnej endoskopie (ESGE) po-

Obrázok 1. Intestinálna metaplázia pažeráka, HE, 50x (University of Michigan Virtual slide box)



važujú prítomnosť IM za esenciálnu na stanovenie diagnózy BE, zatiaľ čo Britská spoločnosť gastroenterológie (BSG), Ázijsko-pacifická pracovná skupina (APWG) a Benign Barrett's and Cancer Taskforce consensus group (BOB CAT) sa zhodli, že prítomnosť IM nie je pre diagnózu potrebná⁽⁴⁾. Prítomnosť IM v BE je spojená s vyššou frekvenciou mutácií aj s vyšším stupňom rizika premeny na ťažkú dyspláziu až adenokarcinóm^(6,7), avšak retrospektívne štúdie uvádzajú, že pacienti s alebo bez IM mali podobné riziko vzniku neoplázie, navyše výsledky vyšetrení pri včasných resekciách pažeráka ukazujú, že adenokarcinómy sa vyvíjajú aj v teréne BE bez intestinálnej metaplázie^(12,13).

Histologické úskalia Barrettovho ezofágu s intestinálnou metapláziou

IM pri Barrettovom pažeráku je najčastejšie nekompletného typu. Epitel sa skladá hlavne z pohárikovitých buniek rozptýlených medzi intermediárne mucinózne bunky v celej hrúbke sliznice (**obrázok 2**). Zrelé intestinálne bunky s dobre definovaným kefkovým lemom sú zriedkavé. Spolu s charakteristickou intestinálnou sliznicou môžu byť v Barrettovom pažeráku prítomné dva ďalšie typy slizníc, a to typ sliznice kardia a fundu žalúdka, ktorých rozloženie sa javí ako zonálne⁽¹⁸⁾.

Medzi zmeny, ktoré môžu imitovať pohárikovité bunky, patria poškodené foveolárne bunky obsahujúce objemné množstvo cytoplazmatického mucínu, vďaka čomu si vyslúžili pomenovanie *pseudopohárikovité bunky* (**obrázok 3**).

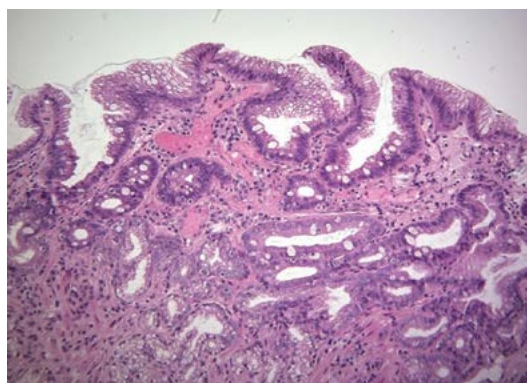
Foveolárne bunky môžu produkovať dostatočne kyslý mucín, ktorý má modrý odtieň ako pohárikovité bunky a stávajú sa *cylindrickými modrými bunkami*. Hlavným rozdielom je ich morfológia – mnohvrstvomý epitel vzhľadom nezrelých skvamózných buniek s povrchovou vrstvou cylindrických modrých buniek.

Mnohvrstvomý *skvamoidný* epitel taktiež môže imitovať pohárikovité bunky.

Všetky tri typy buniek simulujúcich pohárikovité bunky nachádzame difúzne na povrchu epitelu na rozdiel od pohárikovitých buniek, ktoré sú typicky roztrúsené jednotlivo na pozadí foveolárneho epitelu.

Pri odlíšení pravých pohárikovitých od pseudopohárikovitých buniek môže byť nápomocné kombinované farbenie PAS a AM (ALPAS). Kyslý hlien v pravých pohárikovitých bun-

Obrázok 2. Barrettov pažerák s intestinálnou metapláziou a pohárikovitými bunkami. HE 200x, UPA LFUK



kách sa pritom znázorní modrofialovo, kým neutrálny hlien v pseudopohárikovitých bunkách sa farbí ružovo. Imunohistochemia môže v sporných prípadoch taktiež prispieť k odlíšeniu pohárikovitých a pseudopohárikovitých buniek, pričom tie druhé sú negatívne na MUC2 a CDX2 na rozdiel do pohárikovitých buniek⁽⁷⁾.

Pri diagnostike BE je vždy potrebné korelovať nález s miestom odberu biopptickej vzorky. Pri nádoroch v oblasti ezofagogastrickej junkcie (EGJ) alebo v proximálnom žalúdku je pôvod nádoru zriedkavo definovaný⁽¹⁹⁾. AJCC/UICC Cancer Staging Manual uvádza, že všetky nádory s epicentrami do 2 cm od EGJ sa majú klasifikovať ako karcinóm pažeráka, čo v podstate nanovo definuje mnohé kardiálne tumory žalúdka ako nádory pažeráka⁽²⁰⁾.

Vývoj metaplastických zmien pažeráka

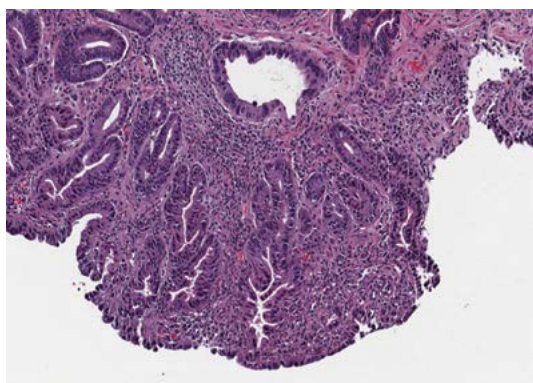
Najzávažnejšou komplikáciou Barrettovho pažeráka je jeho progresia do adenokarcinómu pažeráka, hoci táto komplikácia sa vyskytuje len približne u 0,5 % pacientov. Táto komplikácia je obzvlášť znepokojujúca vzhľadom na prognózu pacienta, keďže sa uvádza len 25 % 5-ročné prežívanie pri adenokarcinóme pažeráka⁽²¹⁾.

Dysplázia súvisiaca s Barrettovým pažerákom sa hodnotí pomocou 2-stupňového systému hodnotenia (nízky a vysoký stupeň) (**obrázok 4**). Dôležité je odlíšiť BE bez dysplázie a s dysplastickými zmenami. Samotný BE vykazuje maturá-

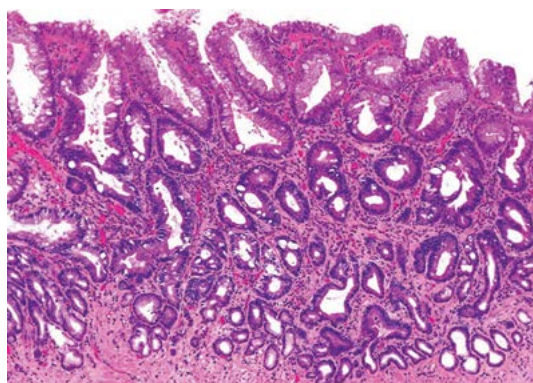
Obrázok 3. Metaplázia sliznice pažeráka. Hlava šípky ukazuje na pseudopohárikovité bunky, HE 400x⁽⁷⁾



Obrázok 4. Barrettov ezofág s HG dysplastickými zmenami, HE, 100x (University of Michigan Virtual slide box)



Obrázok 5. Ezofág s reaktívnymi zmenami v kategórii IND. HE, 100x (WebPatholgy)



ciu povrchových buniek, pričom bunky v spodných častiach epitelu môžu mať mierne zväčšené jadrá, znaky atypii sú nepočítateľné. Pri dysplastických zmenách dochádza celkovo k zvýšeniu počtu žliazok so stratou povrchovej maturácie, podobne ako pri kolorektálnych adenómoch.

Medzi dysplastickými zmenami sa objavila aj kategória „neurčitý nález pre dyspláziu“ (IDN). Tento pojem zahŕňa všetky zmeny na sliznici, pri ktorých nie je možné rozhodnúť, či tieto zmeny vznikli na základe zápalu alebo regenerácie alebo predstavujú skutočné neoplastické lézie. Špecifické diagnostické kritériá pre túto kategóriu nie sú jasne stanovené a jeho klinický význam a manažment nie sú dostatočne preštudované. Z toho vyplýva, že diagnóza neurčitej dysplázie by sa mala obmedziť na prípady, v ktorých sú zmeny príliš výrazné, na negatívne, ale nie dostatočné na dyspláziu (**obrázok 5**)⁽²²⁾.

Na druhom konci stupnice však môže byť ťažké rozlíšiť medzi neurčitou kategóriou dysplázie a dyspláziou nízkeho stupňa.

Žalúdok

Vzhľadom na vysokú životnú úroveň v západných častiach sveta patrí žalúdok svojím uložením aj funkciou k často a ťažko skúšaným orgánom. Z anatomického pohľadu sa jeho stavba veľmi nelíši od ostatných orgánov GIT, výrazne sa odlišuje svojou histologickou stavbou sliznice. V žalúdku sa nachádzajú 3 typy žliaz; žliazky kardia, gastrické a pylorické, pomenované podľa časti žalúdka, v ktorej sa nachádzajú.

Patologické stavy sliznice žalúdka

Atrofická gastritída (**obrázok 6**) je stav charakterizovaný chronickým zápalom žalúdočnej sliznice s atrofiou, so stratou žliazok a s rozvojom metaplázie⁽²³⁾. Existujú dva typy: autoimunitná metaplastická atrofická gastritída (AMAG) a environmentálna metaplastická atrofická gastritída (EMAG), ktorú bežne spôsobuje *Helicobacter pylori*.

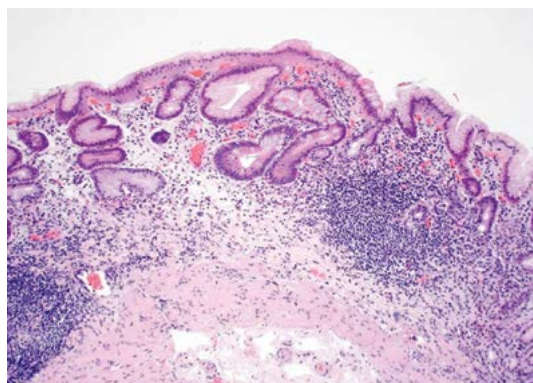
AMAG je forma metaplastickej (chronickej) atrofickej gastritídy, ktorá vedie k nahradeniu normálnej oxyntickej sliznice atrofickou a metaplastickou sliznicou, čo vedie k atrofickej gastritíde s prevahou v korpuse žalúdka, k zníženiu alebo úplnej strate produkcie kyseliny a pepsínu a strate vnútorného faktora, ktorý môže progredovať do závažnej formy anémie s nedostatkom vitamínu B₁₂⁽²⁴⁾.

EMAG sa začína v anstre a neskôr sa rozširuje na telo a fundus, v takomto prípade hovoríme o multifokálnej atrofickej gastritíde. Príčinou tejto atrofie je infekcia *H. pylori* alebo nesprávne diétne faktory (fajčenie, korenené a slané jedlá, dusikaté zlúčeniny v potravinách)⁽²⁵⁾. Oba typy metaplázie, intestinálna aj pylorická/pseudopylorická, sú asociované so zvýšeným rizikom vzniku karcinómu žalúdka.

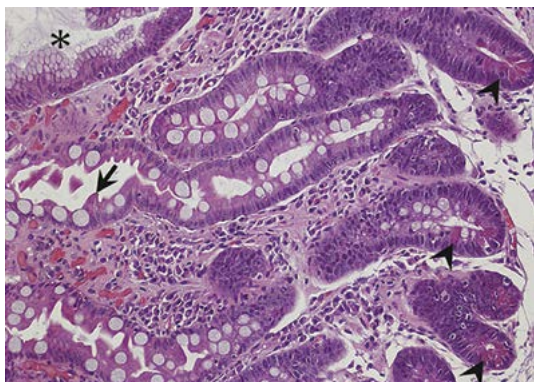
Histologický obraz oboch typov atrofickej gastritídy je veľmi podobný. Základom je prítomnosť chronického zápalového infiltrátu v stenčenej sliznici, v ktorej nachádzame aj menší počet žliazok často s metaplastickými zmenami. Hlavné a parietálne bunky oxyntickej sliznice sú nahradzané pseudopylorickým typom sliznice, ktorý sa nachádza v oblasti pyloru. Epitelové bunky antrálnej sliznice sú nahradzané intestinálnym typom buniek – pohárikovité bunky. Častá je aj hyperplázia G-buniek sliznice.

Atrofická gastritída a gastrická intestinálna metaplázia sú preukázané prekancerózne lézie pre adenokarcinóm žalúdka črevného typu, o priamom spojení pseudopylorickej metaplázie so vznikom žalúdočného karcinómu sa však stále diskutuje^(26,27). V spojení so vznikom IM žalúdka bolo pomenovaných niekoľko rizikových faktorov, medzi ktoré patrí infekcia *Helicobacter pylori* a súvisiaca genomika, genetické faktory hostiteľa, faktory prostredia, reumatologické poruchy, strava a črevný mikrobióm⁽²⁷⁾.

Obrázok 6. Atrofia sliznice tela žalúdka. HE, 200x. (Pathology outlines)



Obrázok 7. Kompletná intestinálna metaplázia žalúdka. HE, 200x⁽²⁷⁾ (šípka – kefkový lem buniek, hlava šípky Panethove bunky na dne krypt)



Histológia metaplastických zmien žalúdočnej sliznice

Intestinálna metaplázia je definovaná ako zmena žalúdočného epitelu na intestinálny typ sliznice s pohárikovitými bunkami a kolumnárnymi mucinóznymi bunkami.

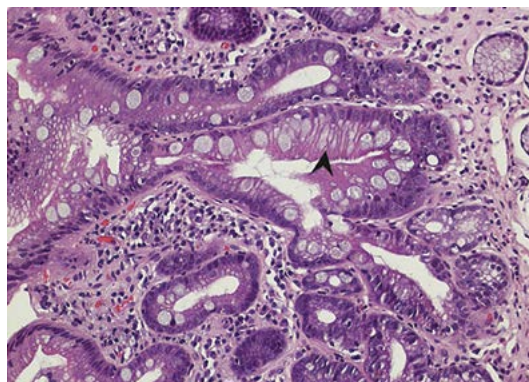
Intestinálna metaplázia

Rozoznávame dva typy intestinálnej metaplázie – intestinálna metaplázia typu tenkého čreva a typu kolonickej sliznice. Väčšina prípadov IM sa dá klasifikovať ako kompletná alebo nekompletná metaplázia. Kompletný typ IM (**obrázok 7**) sa podobá epitelu tenkého čreva a je charakterizovaný dobre vyvinutými pohárikovitými bunkami rozptýlenými medzi cylindrické absorpčné bunky s charakteristickým kefkovým lemom. Panethove bunky nachádzame na dne krypt⁽²⁸⁾. Pri nekompletnom type IM (**obrázok 8**) nachádzame pohárikovité bunky rôznej veľkosti a intervenujúce cylindrické bunky tvoriace hlien bez kefkového lemu.

IM môže byť rozdelená aj na základe typu hlienu. Tento klasifikačný systém založený na type mucínu navrhli patológovia Filipe a Jass, ktorý rozoznáva 3 typy gastrickej IM^(29,30). Na ich detekciu používa špeciálne farbiace techniky bežne používané v laboratóriách patológií. Farbením alcianová modrá (AM) spoločne s PAS (periodic acid schiff) rozlišuje neutrálne mucíny, ktoré sa farbja purpurovo a sú fyziologicky prítomné v žalúdku, od kyslých mucínov, ktoré sa farbja na modro a bežne sú prítomné v črevnej sliznici. Kyslé mucíny sa nenachádzajú v žalúdočnej sliznici, s výnimkou malého počtu buniek v oblasti krčka žľazky v oxyntickej sliznici. Farbenie zamerané na prítomnosť obsahu diamínu železa (HID) v kombinácii AM zasa rozlišuje kyslé mucíny na sialomucíny, ktoré sa farbja na modro a sú prítomné v tenkom a hrubom čreve, a na sulfomucíny, ktoré sa farbja do hneda a prevládajú v hrubom čreve⁽²⁷⁾. Imunohistochemicky kompletná metaplázia exprimuje intestinálne typy mucínu, kefkový lem môžeme dokázať aj farbením CD10, avšak MUC1, MUC5AC a MUC6 má zníženú expresiu. Pri inkompletnej metaplázii vychádzajú v kombinácii gastrický mucín a MUC2⁽²⁶⁾.

IM typ I predstavuje kompletnú intestinálnu metapláziu, IM typ II a III predstavuje, naopak, inkompletnú, kolonickej metapláziu⁽²⁶⁾. Keďže vývoj karcinómu žalúdka je pomalý a nepredvídateľný proces a práve intestinálna metaplázia je ľahko rozpoznateľným markerom atrofie, javí sa subtypi-

Obrázok 8. Inkompletná intestinálna metaplázia žalúdka (hlava šípky – intracytoplazmatický mucín). HE, 200x⁽²⁷⁾



zácia intestinálnej metaplázie pomocou spomínaného farbenia výhodná na identifikovanie pacientom s rôznym rizikovým potenciálom. Črevná metaplázia podtypu III sa často považuje za prekursorovú léziu adenokarcinómu žalúdka intestinálneho typu⁽²⁷⁾.

Pylorická/pseudopylorická metaplázia

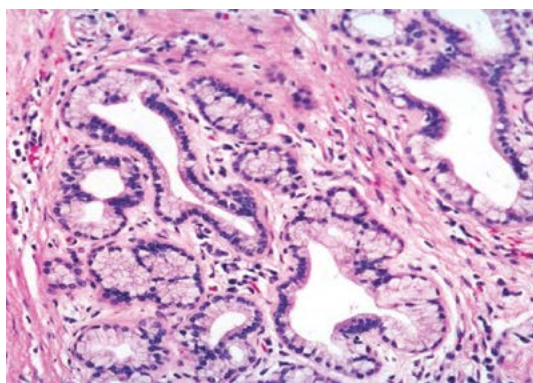
Pri kontinuálnom zápale a postupnej atrofii dochádza k progresívnej strate parietálnych buniek, čoho dôsledkom dochádza k zmene oxyntickej sliznice. Pylorickú/pseudopylorickú metapláziu tvorí pylorická sliznica nachádzajúca sa na mieste, kde by mala byť fyziologická sliznica fundu žalúdka⁽³¹⁾.

Pri diagnostike pylorickej a pseudopylorickej metaplázie si môžeme pomôcť imunohistochemiou s použitím imunofarbiva pepsinogén I (PG I), MUC6 aj TFF2 markerom. Pepsinogén I je exprimovaný v mucinózných a hlavných bunkách fundu žalúdka na rozdiel od antrálnej sliznice. Pylorická metaplázia je v základnom farbení H&E morfológicky rovnaká ako pôvodná pylorická sliznica a v imunohistochemickom farbení je pozitívna na MUC6 a negatívna na PG I. Pseudopylorická metaplázia je tiež v základnom farbení H&E rovnaká ako pôvodná pylorická sliznica, ale imunohistochemicky vykazuje pozitivitu na PG I, zatiaľ čo pylorická metaplázia je negatívna na tento marker⁽³⁵⁾. Bohužiaľ, v mnohých prácach neboli pylorické a pseudopylorické metaplázie opísané oddelene a často sa považujú za rovnocenné „pylorické alebo pseudopylorické metaplázie“⁽³⁶⁾. Podľa Wada a spol. by sa mali jednotky pylorickej a pseudopylorickej metaplázie používať samostatne. Ich zistenia naznačujú, že pseudopylorická metaplázia sa vyskytuje najskôr v procese atrofie a potom sa mení na pylorickú metapláziu podľa progresie atrofie⁽³¹⁾.

Vývoj metaplázie žalúdka

Metaplázia žalúdka je potenciálne reverzibilnou adaptačnou zmenou, ale tak ako pri iných typoch metaplázie za určitých okolností dochádza k významným cytologickým zmenám, čím sa metaplázia posúva do ďalšieho levelu zmien, do dysplázie. Nádorové zmeny žalúdka sa vyvíjajú prostredníctvom dobre známej prekancerózne kaskády: od atrofickej gastritídy cez intestinálnu metapláziu, dyspláziu nízkého

Obrázok 9. Pylorická metaplázia žľazníka, HE, 400x⁽⁴⁴⁾



stupňa, dyspláziu vysokého stupňa až po vznik karcinómu, pričom pravdepodobnosť progresie sa zvyšuje s chronickým zápalom či pretrvávajúcou infekciou *H. pylori*⁽²⁶⁾.

Žľazník

Stena žľazníka je histologicky veľmi odlišná od zvyšku gastrointestinálneho traktu, čo sa stáva dôležitým pri stagin-gu nádorov. V žľazníku chýba lamina muscularis mucosae aj submukóza. V žľazníku sa môžu vyvinúť rôzne typy hyperplastických lézií a metaplastických zmien. K najčastejším typom epitelovej metaplázie patrí metaplázia s gastrickým a intestinálnym typom epitelu. Odhliadnuc od diferenciálnodiagnostického významu má metaplázia úlohu ako potenciálna prekursorová lézia pre vznik karcinómu. Diagnóza biliárnych lézií môže byť náročná, ale je nevyhnutná pre ďalší klinický manažment pacientov. Lézie žľazníka vykazujú široké spektrum morfológických zmien, ktoré mnohé môžu imitovať nádorové ochorenie.

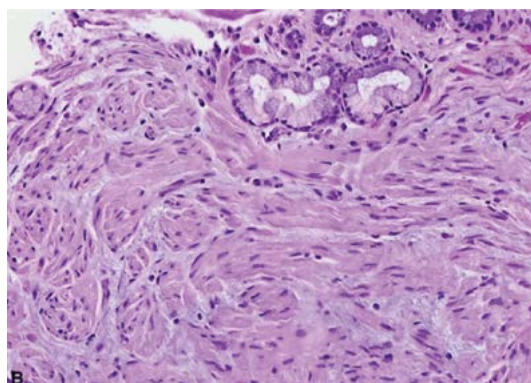
Histológia metaplastických zmien žľazníka

Metaplastické zmeny epitelu žľazníka sa považujú za prekursorsy vzniku karcinómu žľazníka. V žľazových cestách nachádzame najčastejšie dva typy metaplázie: žalúdočný a črevný typ. Zriedkavo nachádzame aj iné typy, ako je skvamózny a pankreatický acinárnny typ. Vznik metaplázií je spojený s vyšším vekom a prítomnosťou žľazových kameňov⁽³⁹⁾. Žalúdočná metaplázia je najbežnejším typom metaplázie a nachádza sa asi v 50 % žľazníkov odstránených pre chronickú cholecystitídu alebo cholelitiázu⁽⁴⁰⁾. Adenomatózna hyperplázia žľazníka je stav charakterizovaný hyperpláziou metaplastických žľaziek pylorického typu bez bunkových atypií.

Gastrická metaplázia žľazníka je definovaná ako prítomnosť žľaziek gastrického typu, samostatne alebo v skupinkách v lamina propria, alebo zriedkavejšie vo svalovine žľazníka. Žľazky môžu mať epitel pylorického, antrálneho alebo mucinózneho charakteru. Neuroendokrinné bunky sa môžu tiež vyskytnúť⁽⁴¹⁾. Frekvencia výskytu gastrickej metaplázie po elektívnych cholecystektómiách pre zápal alebo cholelitiázu sa opisuje v rozsahu od 66 do 80 %⁽⁴²⁾.

Pylorická metaplázia (tiež nazývaná pseudopylorická) je najčastejším typom metaplastickej zmeny v žľazníku (**obrá-**

Obrázok 10. Pylorická metaplázia žľazníka v nervovom zväzku HE, 200x⁽⁴⁵⁾

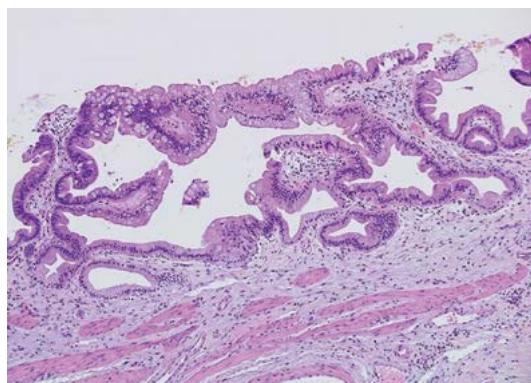


zok 9). Morfológicky vytvárajú malé rozvetvené žľazky, kryté cylindrickým alebo kubickým epitelom s bohatou svetlou cytoplazmou⁽⁴³⁾. Od pylorickej metaplázie treba odlišiť adenóm z pylorických žľaziek (pyloric gland adenoma), ktorý je histologicky podobný, tvorí však makroskopicky identifikovateľnú ohraničenú léziu (> 0,5 cm). Pylorický adenóm, tak ako aj metaplázia, vykazuje pozitivitu MUC6, adenóm môže byť na rozdiel od metaplázie aj CDX2 pozitívny. Je dôležité si uvedomiť, že tieto žľazky majú skutočne výzor pylorických žľaz a od žľaziek žľazníka sa odlišujú histologicky, histochemicky aj štruktúrne.

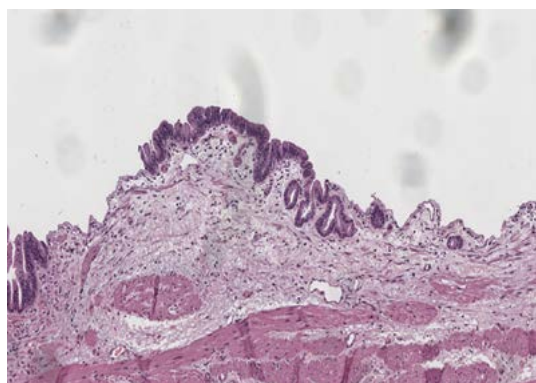
Metaplastické pylorické žľazky môžu byť prítomné v lamina propria, nezriedka ich však nachádzame vo svalovej vrstve a pri seróze, môže byť zachytený aj perineurálny rast, ktorý imituje adenokarcinóm (**obrázok 10**)⁽⁴¹⁾. Aj v týchto prípadoch sa však musíme vrátiť k hodnoteniu cytologických vlastností buniek, ktoré sú, pri tejto metaplázii, spravidla blandného vzhľadu.

Intestinálna metaplázia (IM) žľazníka je charakterizovaná prítomnosťou oblastí zložených z črevných cylindrických buniek, pohárikovitých buniek, neuroendokrinných buniek a Panethových buniek s odlišnou expresiou mucínu (**obrázok 11**). Tento typ metaplázie je oveľa menej bežný vo vzorkách z cholecystektómie ako pylorická metaplázia a bol zaznamenaný približne v 30 % žľazníkov s cholecystitídou⁽³⁹⁾. Zvyčajne ide o „neúplnú“ metapláziu, pretože bunky zried-

Obrázok 11. Intestinálna metaplázia žľazníka. HE, 100x.



Obrázok 12. Dysplázia epitelu žľčníka. HE 100x (University of Michigan Virtual slide box)



kavo vykazujú zreteľný kefkový lem. Počiatková lézia začína ako niekoľko pohárikovitých buniek na povrchu sliznice, nie na dne krýpt. Nasleduje progresia lézie smerom nadol, ktorá môže dosiahnuť Rokitansky-Aschoffové sínusy. Imunohistochemicky vykazuje tento typ metaplázie pozitívitu MUC2 a CDX2.

Vývoj metaplastických zmien žľčníka

Ako je spomínané aj v predchádzajúcich častiach tejto práce, ani osud metaplázie žľčníka nie je odlišný. Dysplázia žľčníka (obrázok 12) je považovaná za preinvazívnu biliárnu neopláziu, bola zaznamenaná u 40 % až 60 % pacientov s invazívnym karcinómom, u 30 % pacientov so sklerotizujúcou cholangitídou a náhodne u 1 až 3,5 % vzoriek po cholecystektómii^(39,48,49). Na rozdiel od ostatných lézií žľčníka je metaplázia a dysplázia nerozoznateľná použitím zobrazovacích metód.

LITERATÚRA

1. Yantiss RK. Diagnostic challenges in the pathologic evaluation of Barrett esophagus. Arch Pathol Lab Med, 2010. 134(11): p. 1589-1600.
2. Lyamina SV, et al. Cellular and molecular mechanisms of inflammation of esophageal mucosa under different. Ter Arkh, 2018. 90(2): p. 79-84.
3. Lowe D, P. Kudravalli, and R. Hsu, Barrett Metaplasia, in StatPearls. 2022: Treasure Island (FL).
4. Lu Zhang1†, B.S., Xi Zhou1, QiongQiong Wei1, Sicheng Liang1, Gang Luo1, Tao Li3 and Muhan Lü1*, Barrett's Esophagus and Intestinal Metaplasia. Frontiers in oncology, 2021. 11.
5. Wang KK, RE Sampliner, and G. Practice Parameters Committee of the American College of, Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. Am J Gastroenterol, 2008. 103(3): p. 788-797.
6. Bandla S, et al. Comparison of cancer-associated genetic abnormalities in columnar-lined esophagus tissues with and without goblet cells. Ann Surg, 2014. 260(1): p. 72-80.
7. Watanabe G, et al. Intestinal metaplasia in Barrett's oesophagus may be an epiphenomenon rather than a preneoplastic condition, and CDX2-positive cardiac-type epithelium is associated with minute Barrett's tumour. Histopathology, 2015. 66(2): p. 201-214.
8. Bhat S, et al. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. J Natl Cancer Inst, 2011. 103(13): p. 1049-1057.
9. Harrison R, et al. Detection of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: an observational comparator study suggests the need for a minimum of eight biopsies. Am J Gastroenterol, 2007. 102(6): p. 1154-1161.

Záver k morfológickým zmenám žľčníka

Koncept metaplázia – dysplázia – karcinóm sa dobre etabloval vo vývoji karcinómov vo viacerých častiach gastrointestinálneho traktu, žľčník nevynímajúc. Odhaduje sa zhruba 10-ročné obdobie, v ktorom prebieha táto zmena⁽⁵¹⁾. Vzhľadom na úzku súhrnu medzi rozvojom karcinómu a chronickej cholecystitídy môžeme predpokladať, že zápal môže byť hlavným faktorom spúšťajúcim včasné metaplastické zmeny v epitelu žľčníka, ktoré môžu postupne progredovať^(49,52). Takéto metaplastické zmeny ostávajú klinicky aj diagnosticky nemé. Práve absencia spoľahlivých biomarkerov a skriningových vyšetrení na rakovinu žľčníka v kombinácii s biologicky agresívnym správaním tohto typu malignity vedie k zlej prognóze týchto pacientov⁽⁵³⁾.

ZÁVER

Mikroskopicky detegovateľné metaplastické zmeny patria z pohľadu zmien k adaptačným zmenám, zabezpečujú funkciu jednotlivých tkanív pri zmenených podmienkach. Tieto zmeny sú v niektorých lokalitách gastrointestinálneho traktu súčasťou kaskády metaplázia – dysplázia – karcinóm, na základe čoho dokáže gastroenterológ v spolupráci s patológom predvídať vývoj ochorenia a prispôbovať tomu manažment pacienta.

Podakovanie

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

10. Gatenby PA, et al. Relevance of the detection of intestinal metaplasia in non-dysplastic columnar-lined oesophagus. Scand J Gastroenterol, 2008. 43(5): p. 524-530.
11. Jankowski JAZ, et al. Esomeprazole and aspirin in Barrett's oesophagus (AspECT): a randomised factorial trial. Lancet, 2018. 392(10145): p. 400-408.
12. Kelly CJ, et al. Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk. Scand J Gastroenterol, 2007. 42(11): p. 1271-1274.
13. Takubo K, et al. Cardiac rather than intestinal-type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma. Hum Pathol, 2009. 40(1): p. 65-74.
14. Alvarez Herrero L, et al. Validation of the Prague C&M classification of Barrett's esophagus in clinical practice. Endoscopy, 2013. 45(11): p. 876-882.
15. Sharma P, et al. The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria. Gastroenterology, 2006. 131(5): p. 1392-1399.
16. Weusten B. et al. Endoscopic management of Barrett's esophagus: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. Endoscopy, 2017. 49(2): p. 191-198.
17. Thota PN, et al. Low Risk of High-Grade Dysplasia or Esophageal Adenocarcinoma Among Patients With Barrett's Esophagus Less Than 1 cm (Irregular Z Line) Within 5 Years of Index Endoscopy. Gastroenterology, 2017. 152(5): p. 987-992.
18. Fléjou J-F. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. Gut, 2005. 54(suppl 1): p. i6-i12.

19. Siddiki HA, et al. Intestinal metaplasia of the gastric cardia: findings in patients with versus without Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*, 2019. 89(4): p. 759-768.
20. Rice TW, DT Patil and EH Blackstone. AJCC/UICC staging of cancers of the esophagus and esophagogastric junction: application to clinical practice. *Annals of cardiothoracic surgery*, 2017. 6(2): p. 119.
21. McDaniel M and R Conran. Educational Case: Barrett Esophagus. *Academic Pathology*, 2019. 6: p. 237428951984808.
22. Thota PN, et al. Clinical significance and management of Barrett's esophagus with epithelial changes indefinite for dysplasia. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2016. 7(3): p. 406-411.
23. Rugge M. et al. Histological assessment of gastric pseudopyloric metaplasia: Intra- and inter-observer consistency. *Dig Liver Dis*, 2021. 53(1): p. 61-65.
24. Pittman ME, et al. Autoimmune Metaplastic Atrophic Gastritis: Recognizing Precursor Lesions for Appropriate Patient Evaluation. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2015. 39(12): p. 1611-1620.
25. Namekata T, et al. Chronic atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection among Japanese Americans in Seattle. *Am J Epidemiol*, 2000. 151(8): p. 820-830.
26. Nagtegaal ID, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 2020. 76(2): p. 182-188.
27. Shah SC, et al. Histologic Subtyping of Gastric Intestinal Metaplasia: Overview and Considerations for Clinical Practice. *Gastroenterology*, 2020. 158(3): p. 745-750.
28. Correa P, MB Piazuelo, and KT Wilson. Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol*, 2010. 105(3): p. 493-498.
29. Jass JR and MI Filipe. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J*, 1981. 13(6): p. 931-939.
30. Filipe MI, et al. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer*, 1994. 57(3): p. 324-329.
31. Wada Y, et al. Pyloric, pseudopyloric, and spasmolytic polypeptide-expressing metaplasias in autoimmune gastritis: a case series of 22 Japanese patients. *Virchows Archiv*, 2021. 479(1): p. 169-178.
32. Goldenring J. Pyloric metaplasia, pseudopyloric metaplasia, ulcer-associated cell lineage and spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia: reparative lineages in the gastrointestinal mucosa.: Pyloric metaplasia in GI mucosal repair. *The Journal of Pathology*, 2018. 245.
33. Graham DY, M Kato, and M. Asaka, Gastric endoscopy in the 21st century: appropriate use of an invasive procedure in the era of non-invasive testing. *Digestive and Liver Disease*, 2008. 40(7): p. 497-503.
34. Xia HH, et al. Aberrant epithelial expression of trefoil family factor 2 and mucin 6 in *Helicobacter pylori* infected gastric antrum, incisura, and body and its association with antralisation. *Journal of clinical pathology*, 2004. 57(8): p. 861-866.
35. Solcia E, et al. Exocrine and endocrine epithelial changes in types A and B chronic gastritis, in *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer. 1990, Springer. p. 245-258.
36. Wada Y, et al. Histological changes associated with pyloric and pseudopyloric metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication. *Virchows Archiv*, 2020. 477(4): p. 489-496.
37. El-Zimaity, H.M.T. Gastric atrophy, diagnosing and staging. *World journal of gastroenterology*, 2006. 12(36): p. 5757-5762.
38. Rajan N, et al. A Case Report of Typhoidal Acute Acalculous Cholecystitis. *Case reports in infectious diseases*, 2014. 2014: p. 171496.
39. Odze R, Benign and malignant tumors of gallbladder and extrahepatic bile ducts. Odze RD, Goldblum JR. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009: p. 845-875.
40. Mukhopadhyay S and SK Landas. Putative precursors of gallbladder dysplasia: a review of 400 routinely resected specimens. *Arch Pathol Lab Med*, 2005. 129(3): p. 386-390.
41. Zimmermann A. Hyperplastic Lesions and Metaplastic Changes of the Gallbladder, in *Tumors and Tumor-Like Lesions of the Hepatobiliary Tract*. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 1-17.
42. Misra V, et al. *Helicobacter pylori* in areas of gastric metaplasia in the gallbladder and isolation of *H. pylori* DNA from gallstones. *Pathology*, 2007. 39(4): p. 419-424.
43. Katabi N, Neoplasia of Gallbladder and Biliary Epithelium. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2010. 134(11): p. 1621-1627.
44. Hoang M, et al. Metaplastic Lesions of the Extrahepatic Bile Ducts: A Morphologic and Immunohistochemical Study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2001. 14: p. 1119-1125.
45. Albores-Saavedra J. and D.E. Henson, Pyloric gland metaplasia with perineural invasion of the gallbladder: A lesion that can be confused with adenocarcinoma. *Cancer*, 1999. 86(12): p. 2625-2631.
46. Khan MR, et al. Gallbladder intestinal metaplasia in Pakistani patients with gallstones. *Int J Surg*, 2011. 9(6): p. 482-485.
47. Teo CH, CK Leow, and SA Chang. A pseudoepithelioid cyst arising from exuberant squamous metaplasia of the gallbladder. *Arch Pathol Lab Med*, 2005. 129(6): p. e138-140.
48. Sasatomi, E, O. Tokunaga, and K. Miyazaki. Precancerous conditions of gallbladder carcinoma: overview of histopathologic characteristics and molecular genetic findings. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 2000. 7(6): p. 556-567.
49. Lewis JT, et al. Prevalence and risk factors for gallbladder neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis: evidence for a metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am J Surg Pathol*, 2007. 31(6): p. 907-913.
50. Kozuka S, et al. Relation of adenoma to carcinoma in the gallbladder. *Cancer*, 1982. 50(10): p. 2226-2234.
51. Roa I, et al. Preneoplastic lesions in gallbladder cancer. *J Surg Oncol*, 2006. 93(8): p. 615-623.
52. Jain K, et al. Sequential occurrence of preneoplastic lesions and accumulation of loss of heterozygosity in patients with gallbladder stones suggest causal association with gallbladder cancer. *Ann Surg*, 2014. 260(6): p. 1073-1080.
53. Seretis C, et al. Metaplastic changes in chronic cholecystitis: implications for early diagnosis and surgical intervention to prevent the gallbladder metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *J Clin Med Res*, 2014. 6(1): p. 26-29.

MUDr. Kristína Mikuš Kuracinová, PhD.

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

Instabilita krátkych tandemových repetícií v onkológii: potenciál tekutej biopsie

Jakub Styk^{1,2,3}, Matej Hrnčiar², Ondrej Pös^{1,2}, Silvia Bokorová^{1,2}, Daniela Klimová³, Vanda Repiská^{3,4}, Ján Radvánszky^{1,5}, Tomáš Szemes^{1,2}

¹Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

²Geneton, s.r.o., Bratislava

³Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

⁴MEDIREX GROUP ACADEMY n.o., Nitra

⁵Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Štúdie zamerané na inovácie diagnostických prístupov v oblasti personalizovaného manažmentu onkologických ochorení poukazujú na potrebu kontinuálneho progresu analýzy málo preštudovaných genomických variácií, akou je práve variabilita krátkych tandemových repetícií (STR)/mikrosatelitov, označovaná ako mikrosatelitová instabilita (MSI). Do popredia sa dostávajú alternatívne skriningové postupy využívajúce analýzu cirkulujúcich nukleových kyselín (cfDNA/ctDNA). Dôraz sa kladie na využitie potenciálu *high-throughput* technológií, akou je masívne paralelné sekvenovanie (MPS). Ukazuje sa, že komplexná genomická analýza mikrosatelitov môže zefektívniť proces stratifikácie pacientov s MSI asociovanými nádormi. V predkladanej práci diskutujeme o spôsoboch analýzy MSI pomocou inovatívnych a menej invazívnych metód založených na tekutej biopsii, ako aj o ich benefitoch a limitáciách. Poukazujeme na súčasný stav diagnostiky MSI v onkologickej praxi so zreteľom na presun zo sféry konvenčných stratégií k reaktívnym personalizovaným prístupom a cielenej prevencii.

Kľúčové slová: krátke tandemové repetície, mikrosatelitová instabilita, masívne paralelné sekvenovanie, tekutá biopsia, extracelulárna DNA

Instability of short tandem repeats in oncology: the potential of liquid biopsy

Studies focused on innovations in diagnostic approaches in the personalized management of oncological diseases point to the need for continuous progress in the analysis of little-studied genomic variations, such as variability within short tandem repeats (STR)/microsatellites, referred to as microsatellite instability (MSI). Alternative screening procedures using the analysis of circulating nucleic acids (cfDNA/ctDNA) are coming to the fore. Emphasis is placed on utilizing the potential of high-throughput technologies such as massively parallel sequencing (MPS). It is shown that a comprehensive genomic analysis of microsatellites can streamline the process of stratification of patients with MSI-associated tumours. In the presented work, we discuss the methods of MSI analysis using innovative and less invasive methods based on liquid biopsy and their benefits and limitations. We point out the current status of MSI diagnostics in oncology practice regarding the shift from the sphere of conventional strategies to reactive personalized approaches and targeted prevention.

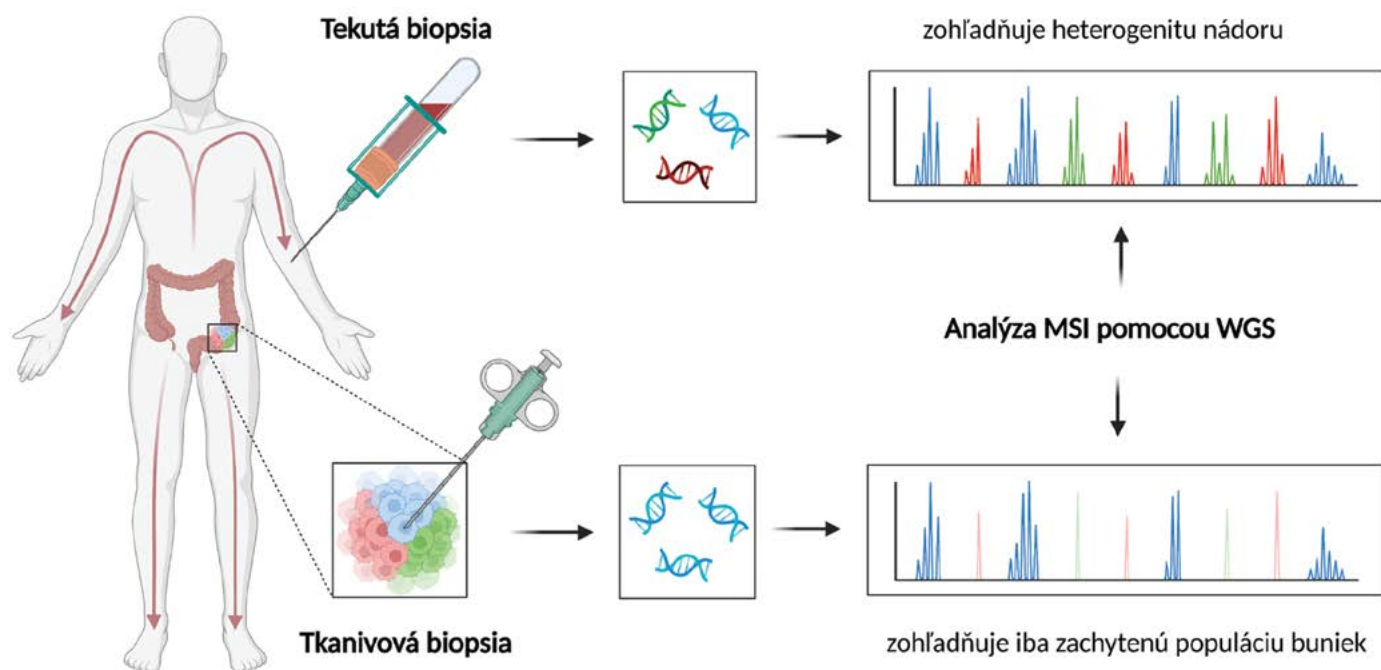
Keywords: short tandem repeats, microsatellite instability, massively parallel sequencing, liquid biopsy, extracellular DNA

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 83 – 86

Úvod

Krátke tandemové repetície (STR – z angl. *short tandem repeats*)/mikrosatelity patria medzi najrýchlejšie mutujúce oblasti v ľudskom genóme a sú zdrojom genetickej variability, ktorá bola historicky dlhodobo podceňovaná. Dnes je už všeobecne známe, že sa spájajú s množstvom dobre opísaných fenotypov a patologických stavov^(1,2). Somatická STR variabilita nazývaná aj mikrosatelitová instabilita (MSI), je charakteristickým znakom niektorých onkologických ochorení. Je definovaná ako zmena v dĺžke STR motívov (typicky

tvorených 2 – 6 nukleotidovými opakovaniami zoradenými niekoľkokrát za sebou)⁽³⁾. STR lokusy zvyknú akumulovať in-dely (inzercie a delécie nukleotidov v menšom rozsahu) viacerých básových párov v dôsledku zlyhania opravného mismatch repair (MMR) mechanizmu⁽⁴⁾. MSI sa vyskytuje zhruba v 10 – 15 % kolorektálnych, gastrických a endometriálnych karcinómov a menej často v iných solídnych nádoroch. Tento fenotyp replikačnej chyby je považovaný za poznávacie znamenie dedičného predispozičného nádorového ochorenia, Lynchovho syndrómu (LS)⁽⁵⁾. Nádory sú klasifikované na



Obrázok 1. Tkanivová biopsia analyzuje diskretnú časť nádoru a nemusí zachytiť komplexnú mieru intratumorovej heterogenity (iba modré bunky). Je známe, že DNA z celého nádoru je konštantne uvoľňovaná do krvného obehu. Tekutá biopsia tak dokáže zachytiť ctDNA z celej populácie nádorových buniek (červené, modré a zelené bunky). S využitím prístupov na platforme MPS v kombinácii s tekutou biopsiou je tak možné v jednom skriningovom teste analyzovať instabilitu v širšom spektre STR lokusov (v desiatkach až tisícach STR motívov naprieč genómom). Takéto diagnostické stratégie poskytujú najreprezentatívnejšiu metódu pre personalizovaný, prediktívny a cieľový skrining MSI, ktorý môže predstavovať ľahko implementovateľný doplnok iných diagnostických testov vychádzajúcich z podstaty analýzy ctDNA/cfDNA a celogenómového MPS (vytvorené pomocou BioRender.com).

základe proporcie nestabilných STR motívov do troch tried: MSI-H tumory a MSI-L tumory (podľa podielu instabilných motívov) a mikrosatelitovo stabilné tumory (MSS) bez detegovateľnej instability v analyzovaných STR motívoch. V súčasnosti sa objavuje konsenzus postačujúcej binárnej klasifikácie: MSI a MSS⁽⁶⁾, vzhľadom na podobnosť klinických aspektov medzi MSI-L a MSS malignitami⁽⁷⁾. Pacienti s nádormi s preukázanou MSI majú v porovnaní s MSS lepšiu prognózu v skorých štádiách ochorenia a znížený benefit z adjuvantnej chemoterapie na báze 5-fluorouracilu v II. a III. štádiu⁽⁸⁾. Naopak, MSI predstavuje jeden z hlavných prediktorov odpovede pacienta na inovatívne protinádorové terapie prostredníctvom inhibície imunitných kontrolných bodov⁽⁹⁾.

Metódy detekcie MSI na báze tekutej biopsie

Konvenčné metódy detekcie prítomnosti MSI ako imunohistochemia (IHC) a MSI-PCR sú stále najrozšírenejšími diagnostickými a skriningovými postupmi. Informačný potenciál reflektujúci variabilitu v STR motívoch je však v tomto prípade limitovaný dostupnosťou nádorového aj referenčného kontrolného tkaniva. Ich aplikácia je preto možná iba v prípade už diagnostikovaných a chirurgicky dostupných nádorov. Konvenčné a rutinne používané invazívne metódy sú tak čoraz častejšie suplované o menej invazívne techniky s možnosťou využitia vysoko citlivého sekvenovania fragmentov cell-free DNA/cirkulujúcej tumorovej DNA (cfDNA/ctDNA), extrahovaných z periférnej krvi. Ich benefit spočíva práve v detekcii MSI bez potreby predošlej znalosti o prítomnosti, lokalizácii a chirurgickej dostupnosti tumoru. Spoločným menovateľom štandardných diagnostických testov

vyšetrujúcich MSI v onkológii je invazívnosť, nemožnosť opakovaného monitorovania, nedostupnosť alebo obťažnosť bioptického vyšetrenia pri niektorých formách tumorov s neadekvátnym nádorovým tkanivom alebo ťažko dostupnou lokalizáciou^(10,11) a v neposlednom rade neschopnosť reflektovania intratumorovej heterogenity (**obrázok 1**). Medzi technické obmedzenia môžeme zaradiť aj možnosť falošne pozitívnych, repsektíve falošne negatívnych výsledkov IHC analýz, ktoré vznikajú pri polymorfizmoch v STR lokusoch⁽¹²⁾.

Z uvedených dôvodov sa čoraz väčší počet laboratórií snaží zaradiť analýzu ctDNA do programov rutinného MSI skriningu^(13,14). ctDNA obsahuje genomické alterácie, ktoré umožňujú prekonanie intratumorovej heterogenity a zachytenie MSI statusu na úrovni celého nádoru^(15,16). Bolo pozorované, že disperzia počtu nestabilných STR lokusov nepriamo koreluje s hustotou mutácií nadmerne zastúpených v aktívne transkribovaných oblastiach. Relatívna deplécia MSI v stabilných polohách nukleozómov tiež hovorí, že konfigurácia chromatinu je hlavným determinantom jej distribúcie⁽¹⁷⁾. Vysoká koncentrácia variability STR lokusov bola pozorovaná aj v regulačných génových oblastiach, ako sú promótor a enhancer, v aktívne transkribovaných oblastiach (euchromatín) a v rámci intergénových, intronických a 3' neprekladaných oblastiach (3' UTR), na rozdiel od neaktívneho konštitutívneho heterochromatinu⁽¹⁸⁾. Komplexná analýza MSI na úrovni celého genómu má zároveň potenciál transformovať biomedicínsky dosah STR variability nad rámec bežných vyšetrení, s výraznou pridanou hodnotou pre onkologického pacienta. V prospech posunu diagnostiky MSI z oblasti reaktívnych prístupov k proaktívnemu skriningu na báze celoge-

nómového sekvenovania cirkulujúcich cfDNA/ctDNA hovoria štúdie preukazujúce vysokú mieru zhody v porovnaní s konvenčnou tkanivovou biopsiou^(19,20).

Potenciál využitia v manažmente pacientov^(21,22), ako aj testovanie MSI prostredníctvom ctDNA alebo cfDNA je stále v štádiu vývoja. Pred ich implementáciou je potrebné vyriešiť viaceré výzvy. Milníkom, ktorý stojí v aktívnejšom introdukovaní nových prístupov priamo k pacientovi je absencia štandardizovaných procedúr, protokolov a postupov ohľadom odberu, prípravy, spracovania, uskladnenia a validácie vzoriek v dostupných štúdiách. Tieto metodologické aspekty dokážu signifikantne ovplyvniť následné analýzy cfDNA/ctDNA a môžu viesť k biasom pri porovnávaní postupov naprieč štúdiami^(23,24). Napriek tomu, že tekutá biopsia môže byť diagnosticky spoľahlivou alternatívou s preukázateľne vysokou senzitivitou a špecificitou^(19,20), boli opísané aj niektoré jej limitácie⁽²⁵⁾. Problémom sú najmä nádory s nízkou koncentráciou cirkulujúcich tumorových buniek a tiež tumory, ktoré uvoľňujú nízke koncentrácie fragmentov ctDNA do krvného obehu⁽²⁶⁾.

Medzi dostupné testy využívajúce cfDNA patrí napríklad OncoLBx, vytvorený ako kombinácia jednomolekulového sekvenovania (SMSEQ) a panela, ktorý pozostáva zo 75 génov a 5 homopolymérnych markerov. Validáčny test preukázal, že OncoLBx dokáže detegovať variantné alely s frekvenciou $\geq 0,1$ % pre SNV a indely, $\geq 0,5$ % pre fúzie, $\geq 4,5$ % pre CNV a ≥ 2 % pre MSI, pričom vykazuje špecifickosť $\geq 99,99$ % pre všetky typy variantov⁽²⁷⁾. Willis et al. demonštrovali robustnosť svojho prístupu pre detekciu MSI pomocou FDA schváleného testu Guardant360® CDx (Guardant Health, Redwood City, CA, USA). Preukázal vysokú citlivosť v porovnaní s metódami založenými na tkanivovej biopsii⁽¹⁹⁾. Sľubným sa zdá aj prístup pre paralelnú a neinvazívnu detekciu MSI a nádorovej mutačnej záťaže/nálože, ktorý je vysoko efektívny v predikcii protinádorovej odpovede na imunoterapiu. Vo validačných analýzach dosiahol 100 % senzitivitu a špecifickosť na pároviach vzorkách nádorového a zdravého tkaniva⁽²⁸⁾. Rovnaké hodnoty zaznamenal aj FoundationOne® Liquid CDx (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA)⁽²⁹⁾.

Vzhľadom na vysokú mieru fragmentácie a nízku frakciu ctDNA v krvi (0,01 % v skorých štádiách rakoviny) spolu s technickými artefaktmi generovanými počas laboratorného spracovania, sú potrebné robustné, validované a veľmi citlivé hodnotiace algoritmy a bioinformatické nástroje^(26,29). S využitím panela ColonCore a bioinformatického nástroja bMSISEA (blood MSI signature enrichment analysis) bola preukázaná testovacia senzitivita 94,1 % a špecifickosť 100 %

s minimálnou frakciou ctDNA 0,4 %. Daný algoritmus je schopný užívateľovi poskytnúť výstup v podobe binárnej klasifikácie vzoriek na MSI, respektíve MSS⁽³⁰⁾. Nástroj MSIsensor-ct⁽³¹⁾ vychádzajúci z MPS dát cfDNA dosiahol 100 % koreláciu s konvenčnými prístupmi, a to už pri minimálnej frakcii ctDNA nad 0,05 % a hĺbkou pokrytia viac ako 3 000x. Pri týchto špecifikáciách je hodnotiaci nástroj MSIsensor-ct schopný spoľahlivej detekcie MSI. Skoré a včasné zachytenie MSI pomocou analýzy tekutej biopsie má tak široké klinické využitie počas celoživotného sledovania nielen pacientov s kolo- rektálnym karcinómom. Môže umožniť: (i) efektívnejší manažment pacientov s LS a ich asymptomatických príbuzných, ktorí majú zvýšené celoživotné riziko vzniku asociovaných malignít; (ii) lepšiu prognózu z hľadiska indikácie liečby pre pacientov s vysokou mierou instabilných STR lokusov; (iii) vynechanie fluorouracilovej, karboplatinovej, a cisplatinovej adjuvantnej chemoterapie u pacientov s diagnostikovanou MSI, a to z dôvodu preukázateľne nízkej odpovede tumoru na dané formy terapie⁽⁸⁾; a (iv) predikciu účinnosti inovatívnych liečebných prístupov na báze imunoterapie, s cieľom identifikovať takých jedincov, pre ktorých môže byť takýto typ personalizovanej liečby prospešný⁽¹⁰⁾.

Zhrnutie

Analýza MSI pomocou tekutej biopsie a stratégie vychádzajúcich z MPS predstavuje na základe dostupných štúdií sľubný prístup nielen v skorej detekcii, prediktívnej diagnostike a cielenej prevencii, ale taktiež v manažmente protinádorovej terapie a následného monitorovania odpovede. Takýto skrining ponúka možnosti pacientom so zvýšeným rizikom vzniku ochorenia súvisiaceho s MSI aj bez rodinnej anamnézy alebo pacientom, ktorých nádorové tkanivo je nedostupné, prípadne môže byť jeho získanie kontraindikované. Vďaka prekonávaniu rôznych technologických a bioinformatických limitácií vychádzajúcich z podstaty repetitívnych STR motívov a cfDNA/ctDNA sú prístupy detekcie MSI čoraz bližšie k ich plnohodnotnej implementácii do rutínnej klinickej diagnostiky.

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.

LITERATÚRA

1. Bugllyó G, Styk J, Pös O, et al. Liquid Biopsy as a Source of Nucleic Acid Biomarkers in the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022; 23. doi:10.3390/ijms23084284
2. Depienne C, Mandel J-L. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 2021; 108: 764-785.
3. Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2000; 126: 455-476.
4. Reyes GX, Schmidt TT, Kolodner RD, Hombauer H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma.* 2015; 124: 443-462.

5. Bugllyó G, Styk J, Pös O, et al. Liquid Biopsy as a Source of Nucleic Acid Biomarkers in the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022; 23. doi: 10.3390/ijms23084284
6. Redford L, Alhilal G, Needham S, et al. A novel panel of short mononucleotide repeats linked to informative polymorphisms enabling effective high volume low cost discrimination between mismatch repair deficient and proficient tumours. *PLoS One.* 2018; 13: e0203052.
7. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015; 148: 77-87.e2.

8. Battaglin F, Naseem M, Lenz H-J, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018; 16: 735-745.
9. Rizzo A, Ricci AD, Gadaleta-Caldarola G. MSI-H/dMMR and cancer immunotherapy: current state and future implications. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2021. pp. 345-347. doi: 10.1080/23808993.2021.1946391
10. Lenz H-J, Van Cutsem E, Luisa Limon M, et al. First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol*. 2022; 40: 161-170.
11. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 3753-3758.
12. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol*. 2019; 5: 551-555.
13. Styk J, Buglyó G, Pös O, et al. Extracellular Nucleic Acids in the Diagnosis and Progression of Colorectal Cancer. *Cancers*. 2022; 14. doi: 10.3390/cancers14153712
14. Gahan PB. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: Proceedings of the 6th international conference on circulating nucleic acids in plasma and serum held on 9-11 November 2009 in Hong Kong. Springer Science & Business Media; 2010.
15. Kasi PM. Mutational burden on circulating cell-free tumor-DNA testing as a surrogate marker of mismatch repair deficiency or microsatellite instability in patients with colorectal cancers. *J Gastrointest Oncol*. 2017; 8: 747-748.
16. Gargalionis AN, Papavassiliou AG. Liquid Biopsies in Colorectal Cancer: Monitoring Genetic Heterogeneity. *Trends Cancer Res*. 2017; 3: 166-168.
17. Kim T-M, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*. 2013; 155: 858-868.
18. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park W-Y, Kim T-M, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*. 2017; 8: 15180.
19. Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, et al. Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 7035-7045.
20. Silveira AB, Bidard F-C, Kasperek A, Melaabi S, Tanguy M-L, Rodrigues M, et al. High-Accuracy Determination of Microsatellite Instability Compatible with Liquid Biopsies. *Clin Chem*. 2020; 66: 606-613.
21. Kubirytova Z, Radvanszky J, Gardlik R. Cell-Free Nucleic Acids and their Emerging Role in the Pathogenesis and Clinical Management of Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. doi: 10.3390/ijms20153662
22. Szilágyi M, Pös O, Márton É, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2020; 21. doi: 10.3390/ijms21186827
23. Pös Z, Pös O, Styk J, et al. Technical and Methodological Aspects of Cell-Free Nucleic Acids Analyzes. *Int J Mol Sci*. 2020; 21. doi:10.3390/ijms21228634
24. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy - Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018; 16: 190-195.
25. Ding Y, Li W, Wang K, Xu C, Hao M, Ding L. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*. 2020; 2020: 6843180.
26. Wang L, Ajani JA. Ushering in Liquid Biopsy for the Microsatellite Status: Advantages and Caveats. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019. pp. 6887-6889.
27. Atkins A, Gupta P, Zhang BM, et al. Detection of Circulating Tumor DNA with a Single-Molecule Sequencing Analysis Validated for Targeted and Immunotherapy Selection. *Mol Diagn Ther*. 2019; 23: 521-535.
28. Georgiadis A, Durham JN, Keefer LA, et al. Noninvasive Detection of Microsatellite Instability and High Tumor Mutation Burden in Cancer Patients Treated with PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 7024-7034.
29. Woodhouse R, Li M, Hughes J, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One*. 2020; 15: e0237802.
30. Cai Z, Wang Z, Liu C, et al. Detection of Microsatellite Instability from Circulating Tumor DNA by Targeted Deep Sequencing. *J Mol Diagn*. 2020; 22: 860-870.
31. Han X, Zhang S, Zhou DC, et al. MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data. *Brief Bioinform*. 2021; 22. doi: 10.1093/bib/bbaa402

Mgr. Jakub Styk

Vedecký park Univerzity Komenského
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
e-mail: styk6@uniba.sk

The role of nitric oxide in endometrial carcinoma

Katarína Krajčírová, Pavol Janega, Martina Cebová

Institute of Normal and Pathological Physiology, Centre of Experimental Medicine SAS, Bratislava

Endometrial carcinoma is the sixth most common type of cancer in women. The constant increase in incidence is probably related to the increasing prevalence of obesity. Nitric oxide as a signaling molecule is involved in several diseases, including cancer. It is an important vasodilator, it inhibits platelet aggregation and it is important in the immune response. A key mediator of immune activation and inflammation is inducible nitric oxide synthase (iNOS) which has a dual role depending on the position and localization of nitric oxide.

Key words: endometrial carcinoma, nitric oxide, inducible NOS, cyclooxygenase-2

Úloha oxidu dusnatého pri karcinóme endometria

Karcinóm endometria je šiestym najčastejším druhom zhubného ochorenia u žien. Stále narastanie incidence pravdepodobne súvisí so zvyšujúcou sa prevalenciou obezity. Oxid dusnatý ako signálna molekula sa podieľa na viacerých ochoreniach vrátane rakoviny. Je dôležitým vazodilatátorom, inhibuje agregáciu krvných doštičiek a má význam pri imunitnej odpovedi. Kľúčovým mediátorom imunitnej aktivácie a zápalu je indukovaná syntéza oxidu dusnatého (iNOS), ktorá má dvojitú úlohu v závislosti od koncentrácie a lokalizácie oxidu dusnatého.

Kľúčové slová: karcinóm endometria, oxid dusnatý, indukčná NOS, cyklooxygenáza-2

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 87 – 91

Introduction

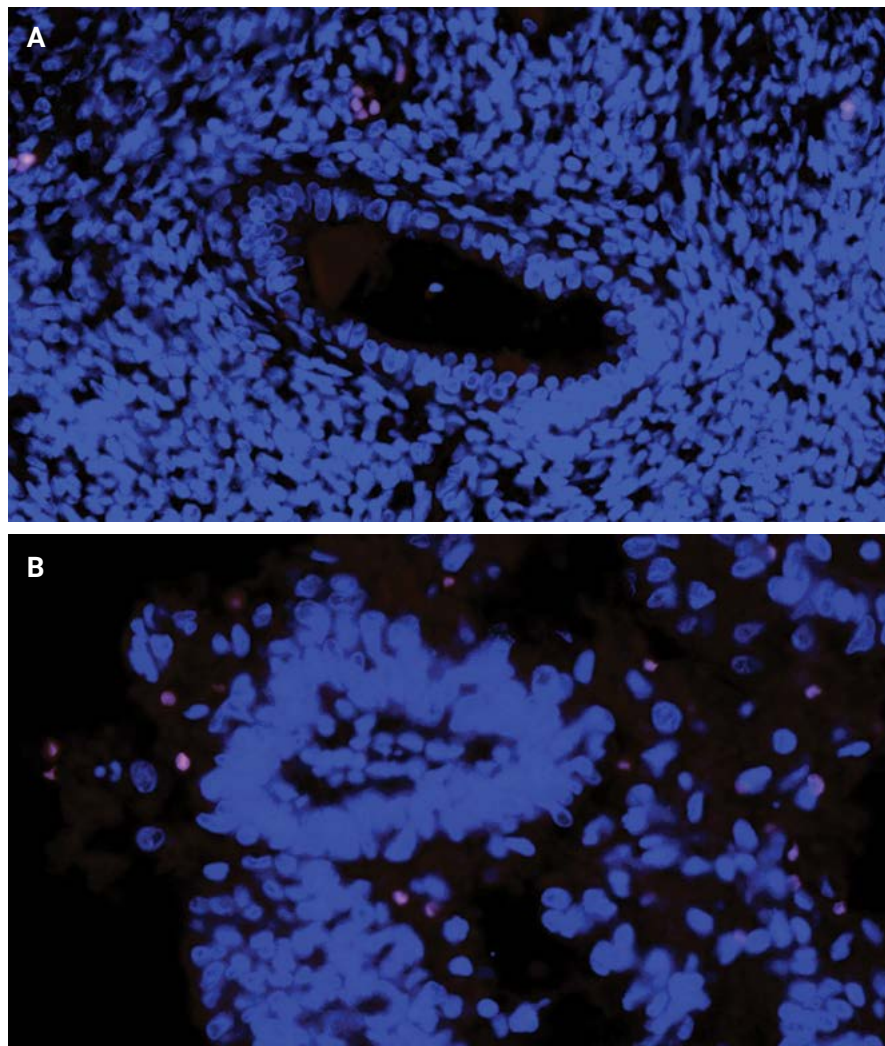
Endometrial carcinoma is the most common type of cancer of the female genital tract in developed countries. Worldwide, it is the sixth most common malignant disease in women⁽¹⁾. The incidence is still increasing, probably due to the increasing prevalence of obesity. It is manifested by abnormal vaginal bleeding, which complicates the detection of cancer in premenopausal women. In these women the disease is usually detected in later stages. However, the incidence of endometrial cancer is greater in postmenopausal women, in whom early detection is associated with good prognosis. The currently accepted model of carcinogenesis categorizes endometrial carcinoma into two broad classifications: type I or type II based on genetic and morphological features⁽²⁾. The endometrium naturally undergoes structural modifications and changes in specialized cells in response to fluctuations in estrogen and progesterone levels during the menstrual cycle. Prolonged exposure of cells to high estrogen levels leads to hyperplasia of endometrial cells, which increases the risk of developing atypical hyperplasia, a thickening of the endometrium which is a precursor of type I endometrial cancer. Type I is generally associated with elevated estrogen levels that are not suppressed by progesterone⁽³⁾. It occurs more often (85 %) than type II, it has a higher survival rate and lower rate of recurrence⁽⁴⁾. It is often diagnosed in the early stages and therefore has a better prognosis. Risk factors include those that lead to increased estrogen levels without increasing protective progesterone levels. These include obesity, in which increased adiposity increases aromatase activity, leading to the conversion of androgens to estrogens; treatment with tamoxifen, which blocks estrogen receptors in the breasts but stimulates them in

the uterus; postmenopausal estrogen therapy without progesterone; estrogen-producing tumors; nulliparity; chronic anovulation and last but not least aging⁽⁵⁾. Excessive fat consumption and being overweight (defined as a BMI of at least 25 kg/m²) is a major risk factor present in almost 50 % of women with endometrial carcinoma. BMI over 25 kg/m² doubles the risk of developing endometrial cancer and BMI over 30 kg/m² even triples the risk⁽⁶⁾. Obesity remains the risk factor even when circulating estrogen levels are normal⁽⁷⁾. On the other hand, administration of hormonal contraceptives or multiple births have an effect on reduction the risk of endometrial carcinoma. Type II endometrial cancer is more rare than type I and isn't linked to estrogen levels. However, it is more aggressive, manifests itself in advanced stages and therefore has worse prognosis. It affects women who have endometrial atrophy, lower body weight and develop later in life. It is also more common in women of african descent⁽⁸⁾.

Characteristics, properties and signaling of nitric oxide

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule involved in several diseases including cancer⁽⁹⁾. It is a potent vasodilator, inhibitor of platelet aggregation, neurotransmitter and also important in the immune response. It is synthesized endogenously in several tissues by converting L-arginine to L-citrulline in the presence of four isoforms of nitric oxide synthase (NOS). Endothelial and neuronal NOS are expressed constitutively and they are calcium-dependent and produce NO in low concentration in pico- and nanomolar range over a short period of time ranging from a few seconds to minutes to regulate various signaling pathways. Inducible NOS (iNOS) is calcium-independent and it is induced by cytokines, endoto-

Figure 1. nNOS expression in endometrium. nNOS did not show striking positivity neither in physiological endometrial tissue (A) nor in cases of endometroid endometrial carcinoma (B). nNOS Ms Ab, DyLight 594, 400x



xines and hypoxia under oxidative stress. On the contrary, it produces significant concentrations of NO (in the micromolar range) over a longer period of time ranging from hours to days. Mitochondrial NOS (mNOS) is considered as an alternative to neuronal NOS (nNOS) which is produced in mitochondria⁽¹⁰⁾. NOS is expressed differently in obese and non-obese individuals and it is overexpressed in many tumors⁽¹¹⁾. In cancer, NO acts in two ways depending on the concentration. At pico- and nanomolar concentrations it promotes tumorigenesis by activation of angiogenesis, which stimulates tumor progression by allowing oxygen and nutrients to flow into the tumor, leading to cell proliferation. It also promotes invasiveness and the formation of metastases⁽¹²⁾. However, at high concentrations (micro- to millimolar) it has anti-cancer effects, causing extensive DNA damage, oxidative and nitrosative stress, which leads to cytotoxicity and apoptosis of tumor cells⁽¹³⁾.

The presence of NOS in the endometrium has been described in many species, suggesting a role of NO in normal endometrial functions. In the human endometrium, endothelial (eNOS) and iNOS have been localized to the glandular epithelium in the nonpregnant uterus. Likewise, NO may be involved in the initiation and control of menstrual bleeding. In ad-

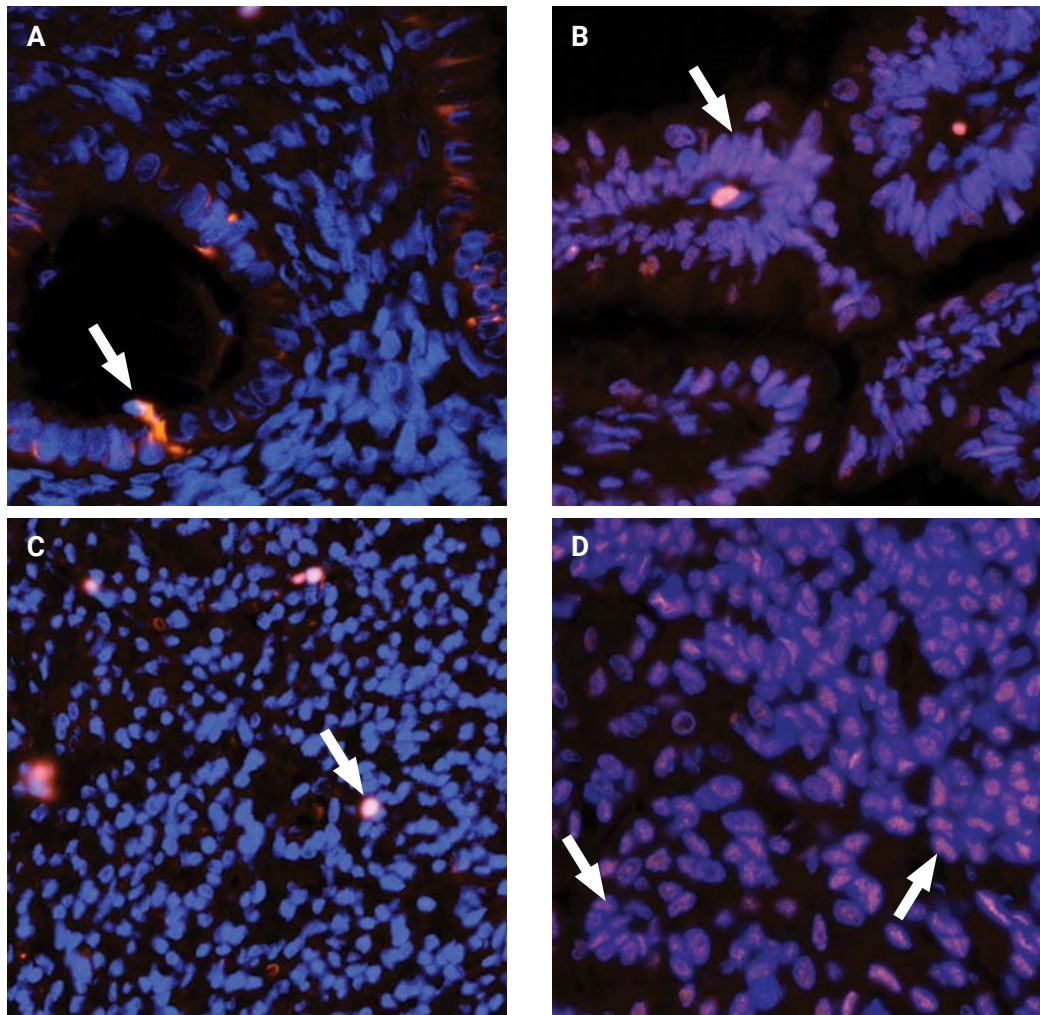
dition, it may play a role in inhibiting platelet aggregation in the endometrium, where menstrual hemostasis is thought to occur primarily through vasoconstriction rather than clot formation⁽⁵⁾.

Our analysis (**Figure 1-3**) shows that regular expression of eNOS is predominant in endometrial tissue, particularly in endometrial glandular epithelial cells. iNOS shows only focal irregular positivity in epithelial cells as well as in stroma. In cases of endometrial carcinoma, we observed a striking increase in nuclear positivity of iNOS in both tumor cells and stroma.

Angiogenesis and iNOS

Angiogenesis, the process that leads to the formation of new blood vessels, is a prerequisite for tumor growth due to the need of oxygen and nutrients. Molecular studies have shown that susceptibility to gynecological tumors such as endometrial carcinoma and cervical cancer increases due to increased inflammatory markers including increased expression of iNOS and cyclooxygenase-2 (COX-2)⁽¹⁴⁾. COX-2 is a key enzyme in the biosynthesis of prostaglandins and it is involved in the development of inflammatory processes and carcinogenesis, including the induction of angiogene-

Figure 2. iNOS expression in endometrium. iNOS exhibited focal cytoplasmic positivity in both sporadic endometrial glandular cells (A) and stroma (C) in physiological endometrial tissue. However, there was a striking increase in nuclear positivity of iNOS in cases of endometrial endometrioid carcinoma (B, D). iNOS Ms Ab, DyLight 594, 400x



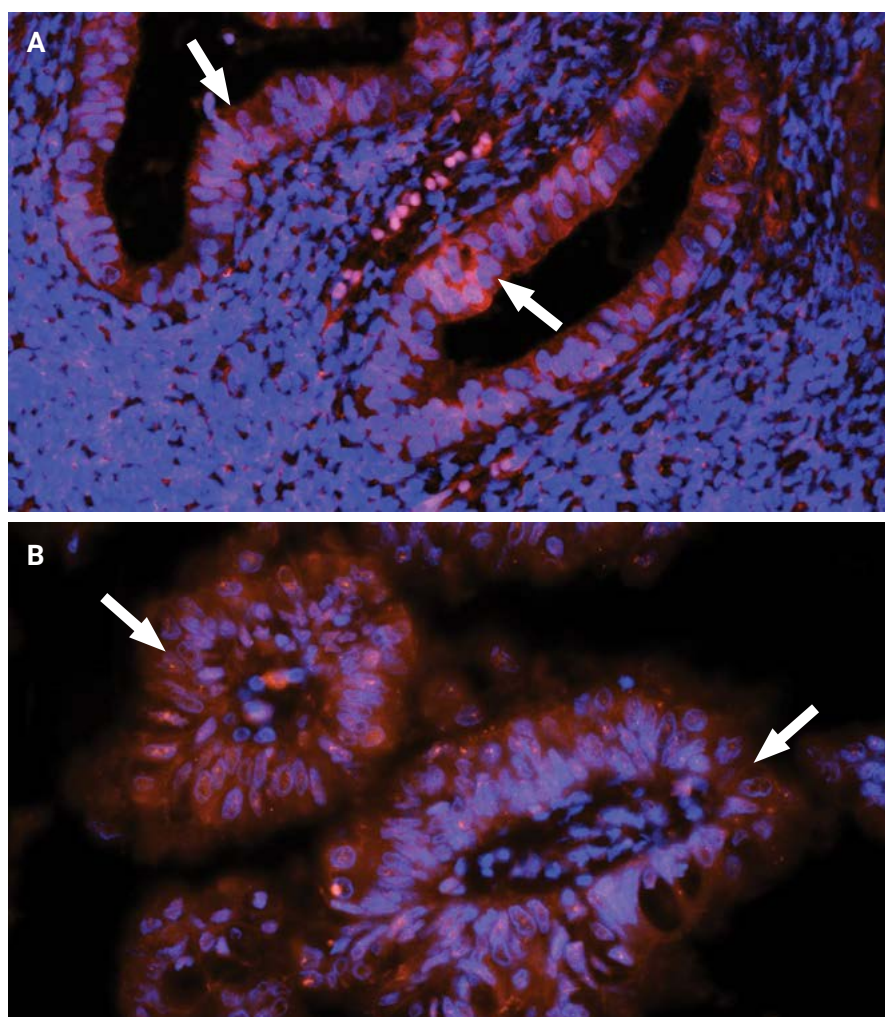
sis. Immunohistochemical analysis also revealed that COX-2 expression was significantly associated with endometrial cancer risk and development. Increased production of prostaglandins and increased release of COX-2 can induce neovascularization⁽¹⁵⁾. However, the prognostic significance of COX-2 expression in endometrial carcinoma remains controversial. Recently, experimental studies have shown that NO produced by iNOS increases COX-2 activity. Li et al.⁽¹⁶⁾ in their study investigated the significance of COX-2 and iNOS in thirty woman patients with endometrial carcinoma. They investigated the relationship of these molecular markers to tumor characteristics and microvascular density. They showed that iNOS overexpression in endometrial carcinoma significantly correlated with microvascular density. In this study, expression of iNOS was detected in 21 of 30 (73 %) tumors but in none of the five normal endometrial samples. Microvascular density was higher in patients with confirmed iNOS expression than in those without iNOS expression. Thus, iNOS expression is significantly correlated with microvascular density. These researchers also confirmed that endometrial cancer cells are able to modulate NO synthesis. Their results show that a significant up-regulation of iNOS in endometrial cancer cells may be responsible for endometrial tumor car-

cino genesis. The association between iNOS overexpression and tumor spread could be supported by iNOS-mediated increased ability of invasion. On the other hand, several studies show that the presence of NO in tumors or their microcirculation has adverse affects on survival of malignant cells⁽¹⁷⁾. Its positive effect can be mediated through the mutagenesis of p53, subsequently leading to the loss of its inhibitory effect and the up-regulation of Bcl-2 expression which has antiapoptotic effects⁽¹⁸⁾. Typical NO mechanisms mediating apoptosis include caspase activation, chromatin condensation and DNA fragmentation⁽¹⁹⁾. NO can inhibit DNA synthesis by hypoxia or by regulation of the expression of p53 and other apoptosis-related proteins, which inhibit tumor growth or kill tumor cells through cytotoxicity⁽²⁰⁾.

Conclusion

NO plays an important role in tumor initiation, growth and metastasis in endometrial carcinoma. However, the inducible isoform of NOS appears to play a dual role in cancer that depends on the concentration and localization of NO. In cancer cells, it can contribute to increased proliferation, metastasis and even drug resistance. On the other hand, it can adversely affect the survival of tumor cells.

Figure 3. eNOS expression in endometrium. eNOS shows strong and regular cytoplasmic expression both in cases of physiological endometrial tissue (A) and in cases of endometrial endometrioid carcinoma (B). eNOS Rb Ab, DyLight 594, 400x



Acknowledgment

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Center for Biomedical Research – BIOMEDIRES – II. Phase, ITMS: 313011W428, co-financed by the European Regional Development Fund.

Pod'akovanie

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

1. World cancer research fund international. Worldwide cancer data. Available at: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>. (Accessed 25.11.2022)
2. Huvila J, Pors J, Thompson EF, et al. Endometrial carcinoma: molecular subtypes, precursors and the role of pathology in early diagnosis. J Pathol. 2021; 253: 355-365.
3. Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of their pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. Adv Anat Pathol. 2002; 9: 145-184.
4. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice bulletin no. 149: endometrial cancer. Obstet Gynecol. 2005; 125: 1006-1026.
5. Amant F, Moerman P, Neven P, et al. Endometrial cancer. Lancet. 2005; 366: 491-505.
6. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N Engl J Med. 2003; 348: 1625-1638.
7. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, et al. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. J Natl Cancer Inst. 1996; 88: 1127-1135.
8. Boruta II DM, Gehrig PA, Fader AN, et al. Management of women with uterine papillary serous cancer: a Society of Gynecologic Oncology (SGO) review. Gynecol Oncol. 2009; 115: 142-153.
9. Salimian-Rizi, B.; Achreja, A.; Nagrath, D. Nitric Oxide, The forgotten child of tumor metabolism. Trends Cancer. 2017; 3: 659-672.
10. Somasundaram V, Basudhar D, Bharadwaj G, et al. Molecular mechanisms of nitric oxide in cancer progression, signal transduction, and metabolism. Antioxid Redox Signal. 2019; 30: 1124-1143.

11. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1244-1251.
12. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, et al. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol.* 2013; 11: 118.
13. Harada K, Supriatno, Kawaguchi S, et al. Overexpression of iNOS gene suppresses the tumorigenicity and metastasis of oral cancer cells. *In Vivo.* 2004; 18: 449-455.
14. Ozel E, Peştereli HE, Simşek T, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in ovarian surface epithelial carcinomas: is there any correlation with angiogenesis or clinicopathologic parameters? *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16: 549-555.
15. Li M, Li M, Wei Y, Xu H. Prognostic and Clinical Significance of Cyclooxygenase-2 Overexpression in Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2020; 10: 1202.
16. Li W, Xu RJ, Jiang LH, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. *Med Oncol.* 2005; 22: 63-70.
17. Khan FH, Dervan E, Bhattacharyya DD, et al. The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOT? *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 9393.
18. Ferrer P, Asensi M, Priego S, et al. Nitric oxide mediates natural polyphenol-induced Bcl-2 down-regulation and activation of cell death in metastatic B16 melanoma. *J Biol Chem.* 2007; 282: 2880-2890.
19. Dimmeler S and Zeiher AM. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide: Biol Chem.* 1997; 1: 275-281.
20. Qiu H, Orr FW, Jensen D, et al. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells. *Am J Pathol.* 2003; 162: 403-412.

Bc. Katarína Krajčírová

Institute of Normal and Pathological Physiology
Centre of Experimental Medicine SAS
Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava
e-mail: katarina.krajcirova12@gmail.com

Oxid dusnatý a jeho význam pri poškodení tkaniva a v reparácii

Ľubica Bernátová¹, Pavol Janega^{1,2}

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

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

Oxid dusnatý je molekula s významným pleotropným účinkom v organizme, schopná pôsobiť ako voľný radikál a súčasne aj ako biologická signálna molekula. Zaraďujeme ju medzi dôležitých mediátorov fyziologických, ale i patologických dejov. Aj keď má kľúčový význam pri poškodení tkaniva a rozvoji zápalu, významný je jej efekt na aktiváciu reparačných procesov v tkanive. Regulačný účinok NO má svoju úlohu pri obnovení integrity poškodeného tkaniva. Súčasný výskum naznačuje budúcnosť terapeutických postupov ovplyvňujúcich regulácie sprostredkované NO pri liečbe mnohých chorôb vrátane ischemicko-reperfúzneho poškodenia tkaniva, ako aj diabetickej nohy.

Kľúčové slová: oxid dusnatý, poškodenie tkaniva, reparácia, NO syntázy

Nitric oxide and its importance in tissue damage and repair

Nitric oxide is a molecule with a significant pleiotropic effect in the body, capable of acting as a free radical and at the same time as a biological signalling molecule. It is one of the critical mediators of both physiological and pathological processes. Although it is crucial in tissue damage and the development of inflammation, its effect on the activation of tissue repair processes is significant. The regulatory effect of NO has a role in restoring the integrity of damaged tissue. Current research suggests a future for therapeutic approaches affecting NO-mediated regulation in treating many diseases, including ischemia-reperfusion tissue injury and diabetic foot.

Keywords: nitric oxide, tissue damage, repair, NO synthase

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 92 – 95

Úvod

Z historického hľadiska je za objaviteľa oxidu dusnatého (NO) považovaný anglický filozof a chemik Joseph Priestley, ktorý už v roku 1772 identifikoval túto molekulu a opísal jej vlastnosti. Avšak historický prelom v ére NO nastal až v 20. storočí v súvislosti s výskumom úlohy NO v živých organizmoch. V roku 1992 označil časopis Science túto molekulu za „molekulu roka“. Dňa 10. decembra 1998 sa Robert Francis Furchgott, Louis Ignarro a Ferid Murad stali nositeľmi Nobelovej ceny za objav NO ako signálnej molekuly v kardiovaskulárnom systéme. Toto ocenenie vzbudilo veľký záujem o výskum tejto molekuly, a tak sa NO, dovtedy známy len ako plyn s negatívnym vplyvom na životné prostredie dostal do popredia odborných periodík a významných časopisov⁽¹⁾.

V súčasnosti je úloha NO v mnohých systémoch vrátane kardiovaskulárneho, endokrinného aj centrálného nervového systému. Molekula má význam v terapii infarktu myokardu a pri liečbe mnohých ischemických cievnych chorôb vrátane diabetickej nohy. Štúdie potvrdzujú jeho pozitívny účinok v liečbe chronických rán a pri ovplyvnení ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu^(2,3).

Všeobecná charakteristika oxidu dusnatého

NO je molekula, ktorá má duálny charakter, schopná v organizme vystupovať ako voľný radikál a súčasne aj ako biologická signálna molekula. Najvýznamnejšou odlišnosťou NO od iných biologických mediátorov je jeho schopnosť ľahko difundovať cez membrány. Je schopná priamo ovplyvňovať

bunky v bezprostrednej blízkosti svojej syntézy bez ohľadu na anatomické prepojenie⁽⁴⁾.

Syntéza NO je komplexná chemická reakcia, ktorá je katalyzovaná prostredníctvom bunkových NO syntáz (NOS)⁽⁵⁾. V súčasnosti je opísaných 5 izoform, avšak pre ľudský organizmus sú najvýznamnejšie tri: neuronálna NOS1, indukčná NOS2 a endotelová NOS3⁽⁶⁾.

NOS1 bola identifikovaná v bunkách centrálného a periférneho nervového systému, v bunkách sietnice, myokardu a kostrového svalstva⁽⁵⁾. Zodpovedá za väčšinu celkovej produkcie NO v nervovom systéme, ktorá je nevyhnutná pre synaptický prenos a neuroplasticitu. Dnes už existujú dôkazy, ktoré naznačujú, že NOS1 sa podieľa na rozvoji niektorých patologických procesov v centrálnom nervovom systéme. Závislosť medzi expresiou NOS1 a ochoreniami však ostáva dodnes do veľkej miery neznáma a predmetom ďalšieho skúmania⁽⁷⁾.

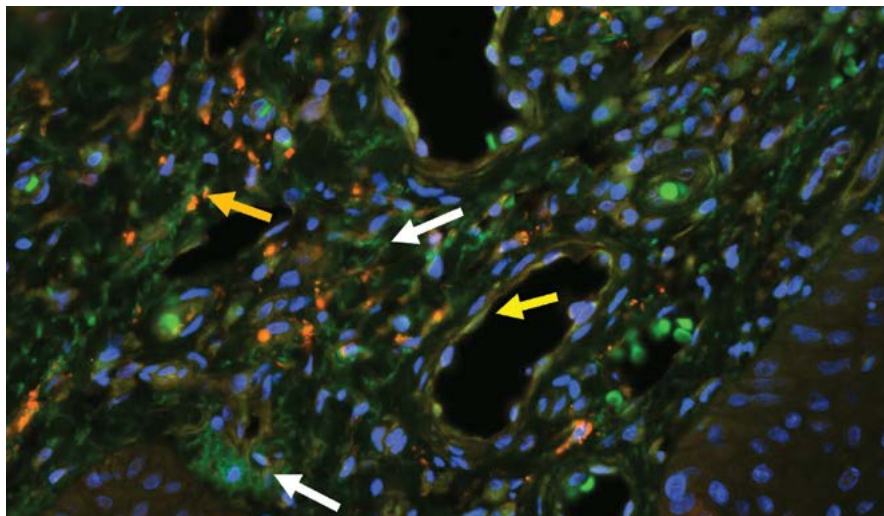
NOS3 je veľmi dôležitá pre produkciu NO v bunkách endotelu, a preto má rozhodujúcu úlohu v kardiovaskulárnom systéme⁽⁶⁾.

Veľké množstvo chorôb má zápalovú zložku, jedným z mediátorov aktivácie imunitného systému a zápalu je **NOS2**. Dysregulácia alebo jej nadmerná aktivácia spôsobí rozvoj patologických procesov v organizme. Podieľa sa na vzniku a progresii nádorových chorôb, neurodegeneratívnych zmien, aterosklerózy, má význam v sepe a pociťovaní bolesti. Snaha ovplyvniť syntézu NO je predmetom výskumu. Bolo objavených mnoho inhibítorov, ktoré sú účinné v štúdiách na zvieratách, avšak nie vždy preukázali svoju účinnosť v humánnej

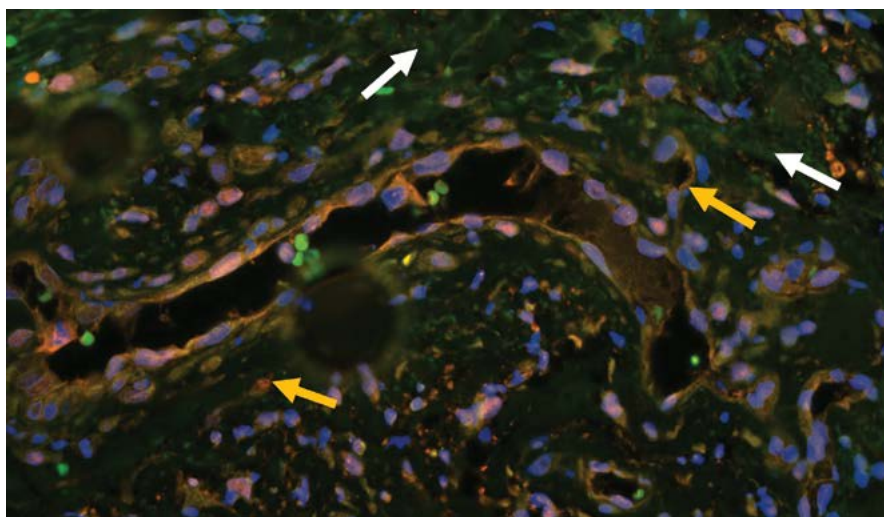
Obrázok 1. Aktivácia NO syntáz v granulačnom tkanive počas reparácie. Počas reparácie dochádza k aktivácii expresie NOS2 tak v bunkách sprievodného zápalu (biela šípka), ako aj vo fibroblastoch a endotelových bunkách (žltá šípka) novotvorených ciev. V neskorších štádiách reparácie produkcia NOS2 klesá a je sprevádzaná vzostupom pravidelnej pozitivity NOS3.

NOS2-IF-DyLight 488 nm (zelená farba), NOS3-IF-DyLight 594 nm (červená farba), jadrá DAPI 358 nm (modrá farba), 400x

A Skoré štádium reparácie



B Neskoré štádium reparácie



medicíne. Pochopenie regulácií tvorby a pôsobenia NO je nevyhnutné pre potenciálne využitie v liečbe⁽⁸⁾.

Mechanizmy pôsobenia NO

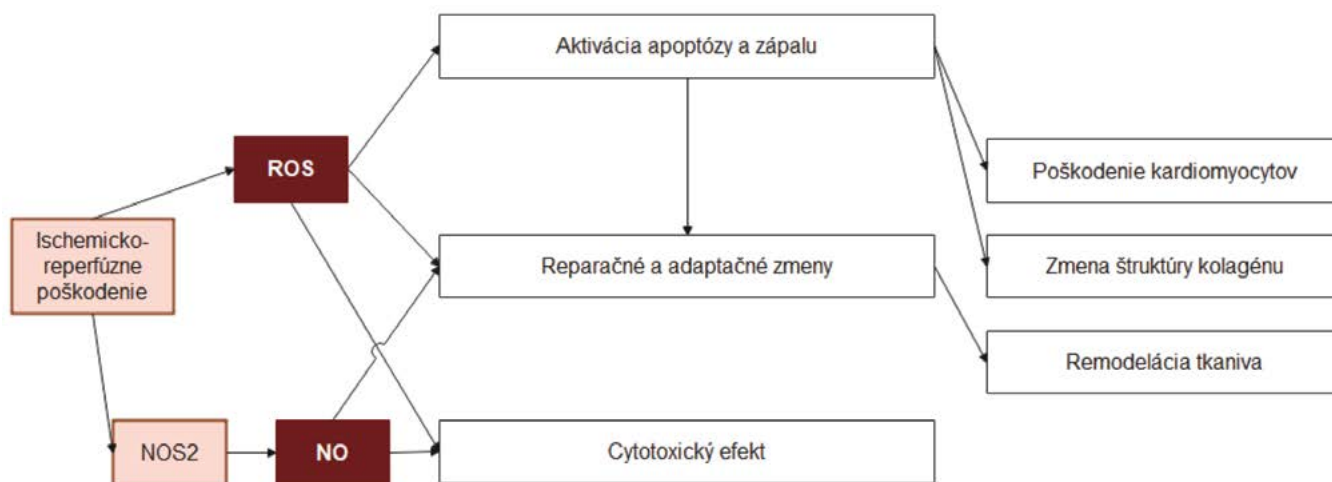
NO zaradujeme medzi dôležité mediátory fyziologických, ale i patologických procesov. Ide o lipofilnú, chemicky reaktívnu molekulu s krátkou životnosťou. NO je molekula, ktorá môže pôsobiť priamymi a nepriamymi účinkami. Priame účinky sa vyskytujú najmä medzi NO a špecifickými biologickými molekulami, zatiaľ čo nepriame sú zabezpečené prítomnosťou reaktívnych foriem oxidov dusíka. Štúdie, ktoré podrobne opísali mechanizmus priamych a nepriamych účinkov na molekulovej úrovni, predstavovali neskôr podklad pre lepšie pochopenie zapojenia NO vo fyziologických a patologických procesoch⁽⁹⁾.

Priamy účinok môže byť zabezpečený dvomi mechanizmami, a to priamou interakciou na bunkovej úrovni alebo cestou aktivácie rozpustnej guanylátcyklázy a následne prostredníctvom druhého posla – cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP)⁽¹⁾. Priamy účinok NO vyplýva z jeho syntézy

v bunkách a následného uvoľňovania do okolia difúziou. Tento pasívny transport môže byť ovplyvnený viacerými faktormi, ako je napr. pôsobenie rôznych mediátorov alebo depolarizácia membrány⁽¹⁰⁾. NO prechádza hlavne cez membrány buniek, kde pôsobí ako signálna molekula, a vedie k zmene funkcie cieľových proteínov a taktiež biologických procesov⁽¹⁾.

Nepriamy účinok mnohí autori označujú aj ako účinok sprostredkovaný voľnými radikálmi, resp. tzv. cytotoxický účinok. V súčasnosti je možné nepriame účinky NO rozdeliť do dvoch kategórií, a to na účinky vyvolané nitrozačným stresom a na účinky spôsobené oxidačným stresom⁽¹¹⁾. Kým nitrozačný stres môže za splnenia určitých podmienok vyvolať tvorbu karcinogénnych nitrozamínov, oxidačný stres je, naopak, opísaný v patogenéze rôznych chorôb, pre ktoré je charakteristická prítomnosť chronického zápalu⁽¹⁾. V ľudskom organizme má molekula NO kľúčovú úlohu pri regulácii fyziologických funkcií, akými sú najmä prenos nervových vzruchov, udržiavanie homeostázy a vazodilatácia. Za patologických podmienok môžu jeho vyššie koncentrácie pôsobiť

Obrázok 2. Schematický náčrt úlohy NO v procesoch poškodenia tkaniva a v reparačno-adaptačných zmenách.



antibakteriálne, antivírusovo a antiparazitárne. Tieto koncentrácie však môžu pôsobiť aj škodlivo v dôsledku prozápalového účinku NO⁽¹⁾, čo môže mať priamy vplyv na rozvoj mnohých chorôb⁽¹²⁾. Aby bolo možné ovplyvňovať negatívne a škodlivé účinky tohto mediátora, je potrebné dôkladne poznať mechanizmus syntézy a pôsobenia NO na jednotlivé orgánové systémy, venovať mu dostatočnú pozornosť a tak poznať jeho zapojenie vo fyziologických a patologických procesoch⁽¹⁾.

Ischemicko-reperfúzne poškodenie tkaniva

Ischémia a následná reperfúzia poškodeného tkaniva predstavujú procesy, ktoré prispievajú k chorobnosti a zvyšovaniu mortality v širokej škále akútnych stavov. Medzi takéto akútne stavy patrí najmä ischemická cievna mozgová príhoda, akútny infarkt myokardu, rôzne traumy, akútne poškodenie obličiek a ďalších tkanív⁽¹³⁾.

Je známy súvis s rizikovými faktormi ischemického poškodenia a endoteliálnej dysfunkcie spojenej s nedostatkom NO. Fyziologické koncentrácie NO syntetizované NOS3 regulujú cievny tonus a majú v srdci kardioprotektívny účinok. Avšak počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia sa v myokarde spúšťa kaskáda procesov, ktorých výsledkom je znížená biologická dostupnosť NO syntetizovaného NOS3. Cytotoxický účinok produkovaného NO a s N súvisiacich voľných radikálov je jednou z príčin poškodenia tkaniva⁽¹⁴⁾. Práve vyčerpanie tetrahydrobiopterínu (BH4), ktorý je dôležitým kofaktorom NO-syntáz, vedie k dysfunkcii NOS3 a k zvýšenej tvorbe voľných kyslíkových radikálov počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia. Nekontrolovaná tvorba NO pomocou NOS2 poškodzuje kardiomyocyty priamou cytotoxicitou alebo prostredníctvom peroxynitritu, ktorý vzniká reakciou NO a superoxidového radikálu⁽¹⁵⁾.

NO má aj priamy vplyv na funkciu myokardu, ovplyvňuje koronárny obeh, vedie k vazodilatácii a zníženiu agregability trombocytov. NO priamo pôsobí na kardiomyocyty, ovplyvňuje apoptózu, zlepšuje prežívanie buniek⁽¹⁶⁾. Kardioprotektívny účinok na myokard zabezpečuje NO svojím antihypertrofickým účinkom a zvyšovaním ischemickej tolerancie, znižuje kontraktilnú frekvenciu kardiomyocytov, mierne znižuje intenzitu kontrakcie a urýchľuje relaxáciu⁽¹⁾.

Predpokladá sa, že signalizácia NO proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu je zameraná na mitochondrie a práve mitochondrie sú cieľom jeho kardioprotektívneho účinku. Ak je signálna dráha NO inhibovaná alebo nejakým iným mechanizmom narušená, tak mechanizmus preconditioningu prostredníctvom NO zmizne⁽¹⁷⁾.

Úloha NO v procesoch reparácie

Aj keď má NO kľúčový význam pri poškodení tkaniva a rozvoji zápalu, je dobre opísaný aj jeho efekt na aktiváciu reparačných procesov v tkanive. Regulačný účinok NO má význam pri obnovení integrity tkaniva. NO uvoľňovaný v reparovanom tkanive prostredníctvom NOS2 a NOS3 reguluje tvorbu kolagénu a proliferáciu buniek na zvieracích modeloch hojenia rán. Delécia génu pre NOS2 spomaľuje hojenie a, naopak, experimentálne podávanie arginínu so zvýšenou produkciou NO zlepšuje procesy hojenia⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Podávanie arginínu v potrave zvyšuje pevnosť rany a ukladanie kolagénu, čo však neplatí v prípade zvierat s deléciou NOS2 génu. Strata funkčného génu NOS2 ruší priaznivý účinok arginínu pri hojení rán⁽²¹⁾.

Aj z týchto dôvodov sa považujú donory NO za potenciálne terapeutické látky v procesoch hojenia rán. Synergicky môže pôsobiť aj schopnosť oxidu dusnatého regulovať zápal a eradikovať bakteriálne infekcie. NO v experimente inhibuje rast *Stafylococcus aureus* (MRSA) a *Pseudomonas aeruginosa* rezistentných proti metilínu bez toho, aby pôsobil cytotoxicky na ľudské bunky⁽²²⁾. Začlenenie NO do polymérov pri výrobe polymérových gélov, obväzov a chirurgických materiálov má potenciálne výhody pri hojení rán. Štúdie ukazujú, že aplikácia NO zlepšuje aj vaskularizáciu rán, pričom toto zistenie by mohlo mať výrazný potenciál aj pri liečbe mnohých ďalších chronických chorôb⁽²³⁾. V tejto súvislosti je zaujímavá aj možnosť liečby rán spojených s cukrovkou vrátane diabetickej nohy⁽²⁴⁾. NO môže byť na diabeticke rany aplikovaný buď ako plyný NO, alebo môžu byť aplikované donory NO v obväzoch alebo polymérových géloch s postupným uvoľňovaním NO⁽³⁾. Cieľom výroby krycích materiálov s obsahom NO je využiť jeho potenciál pri hojení rán reparáciou.

Záver

Oxid dusnatý je molekula s významným pleotropným účinkom v organizme. Aj keď sa podieľa na progresii poškodenia tkanív, a to najmä v prípadoch jeho nekontrolovanej tvorby a aktivácie voľnoradikálového poškodenia prostredníctvom voľných radikálov odvodených od dusíka organizmu, predstavuje na druhej strane kľúčovú molekulu regulujúcu procesy obnovy poškodeného tkaniva a reparácie. Mnohé vedecké štúdie sú preto zamerané na využitie NO ako účinnej terapeutickú látku v liečbe ochorení a potvrdzujú pozitívny účinok donorov NO v terapii chronických rán a ischemicko-reperfúzneho poškodenia.

Podakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-17-0526 a 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.

LITERATÚRA

1. Antosova M. Farmakológia oxidu dusnatého. 2013; Martin: Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova lekárska fakulta v Martine.
2. Gawrys J, Gajeci D, Szahidewicz-Krupska E, et al. Intraplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Metabolic Pathway: From Discovery to Clinical Implications in Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 1015908.
3. Malone-Povolny MJ, Maloney SE, Schoenfish MH. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Adv Healthc Mater* 2019; 8(12): e1801210.
4. Kupkova Z, Benes L. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metódy detekcie biologického oxidu dusnatého. *Chem. Listy* 2004; 98: 116-122.
5. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 2010; 23(1): 1-11.
6. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 2016; 575(2 Pt 3): 584-599.
7. Poon CH, Tsui KC, Chau SC, et al. Functional Roles of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Neurodegenerative Diseases and Mood Disorders. *Curr Alzheimer Res* 2021; 18(10): 831-840.
8. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 2020; 40(1): 158-189.
9. Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, et al. [Nitric oxide metabolism]. *Wiad Lek* 2006; 59(11-12): 889-893.
10. Klinger JR, Kadowitz PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *Am J Cardiol* 2017; 120(8S): S71-S79.
11. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(1): 18-31.
12. Hirst DG, Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol* 2011; 704: 1-13.
13. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17(11): 1391-1401.
14. Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev* 2002; 7(4): 391-405.
15. Xiang M, Lu Y, Xin L, et al. Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 6614009.
16. Yue ZJ, Yu ZB. [Cardioprotection by the inhibitory effect of nitric oxide]. *Sheng Li Xue Bao* 2011; 63(3): 191-197.
17. Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Monit* 2011; 17(2): RA44-52.
18. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* 2002; 183(4): 406-412.
19. Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998; 101(5): 967-971.
20. Stechmiller JK, Childress B, Cowan L. Arginine supplementation and wound healing. *Nutr Clin Pract* 2005; 20(1): 52-61.
21. Shi HP, Efron DT, Most D, et al. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* 2000; 128(2): 374-378.
22. Wang DC, Clark JR, Lee R, et al. Development of Antimicrobial Nitric Oxide-Releasing Fibers. *Pharmaceutics* 2021; 13(9).
23. Lowe A, Bills J, Verma R, et al. Electrospun nitric oxide releasing bandage with enhanced wound healing. *Acta Biomater* 2015; 13: 121-130.
24. Janegova A, Janega P. Impaired tissue repair is a concomitant feature of diabetes mellitus (pathophysiological study and case report). *NewsLab* 2022; 13(1): 14-18.

Lubica Bernátová

Ústav patologickej anatómie LF UK
Sasinkova 17, 811 08 Bratislava
e-mail: bernatova31@uniba.sk

Biopsia dychu: potenciálny zdroj DNA pre biomedicínske aplikácie

Ondrej Pös^{1,2}, Monika Kubáňová³, Jakub Styk^{1,2,4}, Silvia Bokorová^{1,2}, Werner Krampfl^{1,2,3}, Tatiana Sedláčková^{1,2}, Vanda Repiská⁴, Bálint Nagy^{2,5}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

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

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

³Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

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

⁵Ústav humánnej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Debrecín, Maďarsko

Koncept biopsie dychu s cieľom identifikovať alterácie na úrovni genómu jedinca je v záujme výskumu už niekoľko dekád. Rozvoj metodických prístupov zachytu a extrakcie DNA zo vzduchu a zavádzanie výkonných genomických technológií do rutinej praxe posúva jej využitie v sfére modernej personalizovanej medicíny na úroveň neinvazívnej biopsie. Mnohé závažné a časté patológie sa v skorých štádiách prejavujú s minimálnym, prípadne nulovým fenotypom. Vo väčšine týchto prípadov všeobecne platí, že čím neskôr je ochorenie diagnostikované, tým je liečba pacienta menej efektívna. Biopsia dychu tak môže poskytovať včasný spôsob detekcie ochorení vrátane rakoviny už od ich počiatočných štádií. Preukazuje sľubný potenciál stať sa novým diagnostickým a skriningovým štandardom preventívnych, prediktívnych a cielených biomedicínskych aplikácií. Analýza vzoriek dychu umožňuje okrem identifikácie inovatívnych DNA biomarkerov detekciu infekčných agensov, napríklad vírusových častíc, a hodnotenie ich vplyvu na ľudské zdravie. V danej práci poskytujeme prehľad aktuálnych metodických prístupov dychovej biopsie a poukazujeme na jej vysoký potenciál v oblasti biomedicínskych aplikácií. **Kľúčové slová:** biopsia dychu, cfDNA, eDNA, biomarker, rakovina

Breath biopsy: a potential source of DNA for biomedical applications

The concept of breath biopsy to identify alterations in the genome has been in the interest of research for decades. The development of systematic approaches to collecting and extracting DNA from the breath and the introduction of powerful genomic technologies into routine practice brings its use in modern personalized medicine to the level of non-invasive biopsy. Many severe and frequent pathologies manifest in the early stages with a minimal phenotype or even without manifestation. In most of these cases, it is generally true that the later the disease is diagnosed, the less effective the patient's treatment. Breath biopsy can thus provide a method of early disease detection, including cancer, from its initial stages. It shows promising potential to become a new diagnostic and screening standard for preventive, predictive, and targeted biomedical applications. In addition to identifying innovative DNA biomarkers, the analysis of breath samples also enables the detection of infectious agents, such as viral particles, and the assessment of their impact on human health. In this work, we overview the current methodological approaches to respiratory biopsy and point out its high potential in biomedical applications. **Keywords:** breath biopsy, cfDNA, eDNA, biomarker, cancer

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 96 – 98

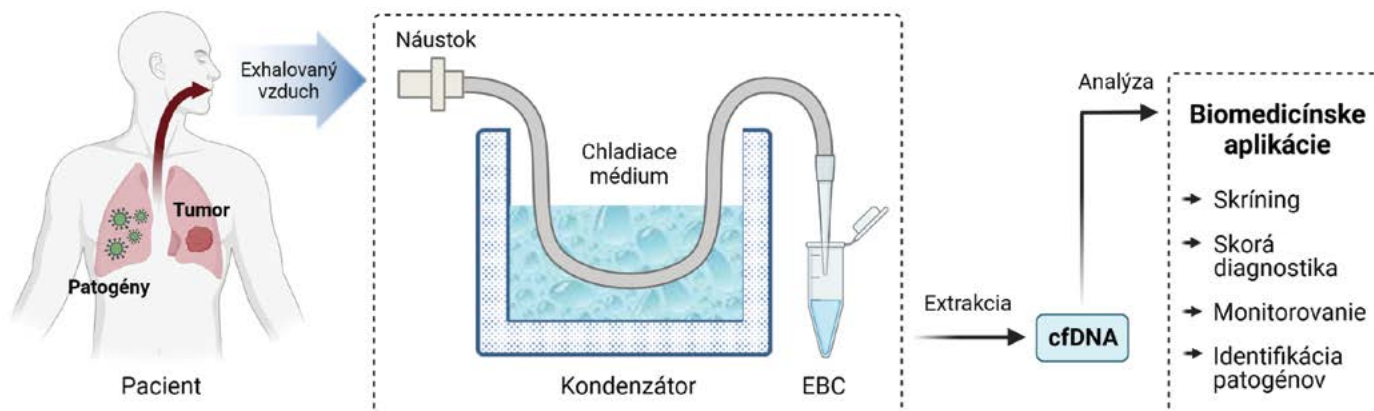
Úvod

Koncept odoberania vzoriek vydychovaného vzduchu, známy tiež ako dychová biopsia (angl. *breath biopsy*), pre analýzu zmien spojených s patogenézou ochorení nie je úplne nový. Dávno pred súčasnou diagnostikou bol vydychovaný vzduch využívaný na rozpoznávanie niektorých chorôb. Napríklad sladký zápach dychu bol spájaný s diabetom mellitom, rybí zápach s ochorením pečene a zápach podobný moču s ochorením obličiek⁽¹⁾. V súčasnosti je zavedených viacero dychových testov, ktoré sa bežne využívajú v praxi, napr. meranie vydychovaného oxidu dusnatého pri diagnostike a monitorovaní astmy⁽²⁾.

Nové technológie a tiež zvýšený dôraz na vysokovýkonnú biologickú analýzu a metaboliku v súčasnej ére genomi-

ky pomohli rozšíriť výskum v oblasti dychovej biopsie, a preto rýchlo rastie záujem o tzv. *Breathomiku*⁽³⁾. Vydychovaný ľudský vzduch obsahuje tisíce prchavých organických zlúčenín (angl. *volatile organic compounds*; VOC), ktoré majú potenciál ako biomarkery pre diagnostiku ochorení vrátane rakoviny^(4,5). O viacerých zavedených dychových testoch, ktoré využívajú analýzu endogénnych alebo exogénnych VOC, sa diskutuje v práci Pham and Beauchamp 2021⁽⁶⁾. Avšak vydychovaný vzduch obsahuje okrem volatilných zlúčenín respiračné kvapôčky pochádzajúce z pľúc a dýchacích ciest. Tieto mikroskopické častice aerosólu v sebe dokážu niesť nevolatilnú hmotu, ako sú elektrolyty, sacharidy, enzýmy, nukleové kyseliny, zvyšky dehydrovaných epitelových buniek a/alebo bielych krviniek⁽⁷⁾ a tiež rôzne infekčné agensy (napr. bakté-

Obrázok 1. Schéma dychovej biopsie. Cieľom prístupu je odber vydychovaného vzduchu a jeho následná kondenzácia, pričom vznikne tekutý kondenzát (EBC), z ktorého možno extrahovať cfDNA pre genetické analýzy. Účelom môžu byť biomedicínske aplikácie, ako je identifikácia patogénov respiračného traktu alebo skrining, skorá diagnostika či monitorovanie nádorových ochorení.



rie, huby a vírusy)⁽⁸⁾. Napriek tomu, že vydychovaný vzduch je v podstate odpadovým produktom, predstavuje bohatý zdroj pre neinvazívne získavanie a analýzu biomarkerov využiteľných vo výskume a v potenciálnych biomedicínskych aplikáciách.

Metódy získavania a analýzy DNA z vydychovaného vzduchu

Jedným z prístupov na získanie genetického materiálu z dychovej biopsie je kondenzácia vydychovaného vzduchu (angl. *exhaled breath condensate*; EBC). V štúdiách boli na zber tohto typu vzorky opísané rôzne customizované aj komerčne dostupné systémy, ako sú RTube, EcoScreen, TURBO-DECCS alebo Anacon⁽⁹⁾. Princíp odberu EBC prebieha tak, že teplý vzduch vydychovaný z pľúc začne kondenzovať, keď príde do kontaktu s chladiacim médiom, respektíve kondenzačným systémom prístroja. Vydychovaný vzduch sa po kondenzácii mení na kvapalinu zachytávanú v systéme. Na chladienie sa môžu použiť rôzne médiá, ako je napríklad ľad, suchý ľad, tekutý dusík alebo elektrické chladiace systémy a iné. Pri teplotách pod 4 °C dochádza ku kondenzácii vydychovaného vzduchu, avšak samotná teplota kondenzácie môže ovplyvniť koncentráciu biomarkerov v EBC. Čas potrebný na odber vzoriek je priamoúmerný získanému objemu EBC, pričom podľa dostupnej literatúry možno získať za 10 – 30 minút približne 1-3 ml vzorky. S prihliadnutím na individuálnu variabilitu sa však môže výsledný objem EBC pre každého jedinca líšiť⁽¹⁰⁾. Množstvo DNA extrahovanej z EBC je pomerne nízke a nie vždy spĺňa kvantitu požadovanú pre daný typ analýzy⁽¹¹⁾, no v literatúre bola opísaná priemerná koncentrácia extrahovanej DNA v 100 µl eluátu približne 20 ng/µl⁽¹²⁾.

Aplikácie DNA extrahovanej z ovzdušia a biopsie dychu

Vzduch obsahuje rôzne častice (napr. spóry, peľ, prach, baktérie, vírusy, respiračné kvapôčky), ktoré môžu zotrvať v atmosfére aj niekoľko dní. V závislosti od podmienok prostredia (napr. vlhkosti vzduchu) a veľkosti častíc môžu byť potom transportované na pomerne veľké vzdialenosti⁽¹³⁾. Aj preto sa molekuly DNA uvoľňujú do okolitého ovzdušia v po-

dobe tzv. environmentálnej DNA (eDNA), ktorá v súčasnosti predstavuje jeden z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich prístupov pre monitorovanie biodiverzity⁽¹⁴⁾. Fakt, že respiračné kvapôčky môžu obsahovať vírusy, je okrem iného dobrým predpokladom na monitorovanie prítomnosti patogénov⁽¹⁵⁾. Analýza eDNA na exponovaných stanovištiach s vysokou hustotou osôb by teda mohla predstavovať prístup na monitorovanie vírusov, ktoré sa šíria kvapôčkovou infekciou, ako je napríklad vírus SARS-CoV-2 v čase pandémie ochorenia COVID-19.

Na druhej strane analýza nukleových kyselín priamo z vydychovaného vzduchu má väčší potenciál pre biomedicínske aplikácie. Môže taktiež poslúžiť na identifikáciu patogénov respiračného traktu, no vydychovaný vzduch poskytuje aj neinvazívny prístup ku genetickému materiálu epitelovej výstelky pľúc⁽⁹⁾. Biopsia dychu sa preto javí ako vhodná alternatíva pre štúdium genetických zmien spojených s malignitami dýchacieho traktu, ako je napríklad rakovina pľúc⁽¹⁶⁾. Štandardné prístupy ako bronchoskopia a biopsia ihlou majú súvisiace riziká, a preto nie sú vhodné pre populačný skrining, ktorý by umožnil včasnú diagnostiku tohto ochorenia. Diagnostika nádoru v pokročilých štádiách však výrazne zhoršuje prežívanie pacientov, a preto sú žiaduce nové, neinvazívne diagnostické nástroje na skrining a včasnú diagnostiku rakoviny pľúc⁽¹⁷⁾. Ako vhodný a ľahko dostupný orgánovošpecifický zdroj biologických informácií sa javí dychová biopsia, pretože umožnila identifikáciu genetických zmien spojených s karcinogénou tohto ochorenia v EBC pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc⁽¹²⁾.

Pacienti v pokročilom štádiu rakoviny pľúc nie sú vždy schopní absolvovať opakovanú biopsiu na ďalšiu molekulárnu analýzu, preto sa aktívne vyvíjajú neinvazívne metódy na báze cell-free DNA (cfDNA). V tejto spojitosti Smyth a kol. študovali možnosť detekcie mutácie *EGFR* T790M na vzorkách *EGFR*-pozitívnych pacientov s adenokarcinómom pľúc vo IV. štádiu. Výsledky naznačujú, že EBC sú pre zachytenie cfDNA s mutáciou *EGFR* dokonca vhodnejším typom vzorky ako krvná plazma. Nedokonalá citlivosť plazmy je pravdepodobne spôsobená vysokými hladinami *wild-type* genómovej DNA, ktorá maskuje menej zastúpenú mutantnú alelu a príčinou je tiež vysoká nukleázová aktivita v krvi. EBC je acelulárna tekutina, a preto môže obsahovať nižšie hladiny *wild-type*

pe DNA, pričom aj hladina endogénnej nukleázy v pľúcach je v porovnaní s krvou oveľa nižšia⁽¹⁸⁾.

Nízky výťažok DNA z EBC komplikuje podrobnejšiu analýzu mutácií konvenčnými metódami, v dôsledku čoho je tento prístup relatívne slabo preskúmaný. Pozornosť je potrebné venovať optimalizácii odberu, uskladneniu a spracovaniu vzoriek EBC aj aplikácii citlivejších metód na analýzu genetického materiálu, ako je masívne paralelné sekvenovanie. Výsledky štúdie, ktorá skúmala túto problematiku, naznačujú, že DNA z vydychovaného vzduchu zdravých jedincov má potenciál na odhalenie mutácií, ktoré by mohli reprezentovať veľmi skoré neoplastické zmeny⁽¹⁶⁾. Analýza nukleových kyselín z EBC by teda mohla predstavovať sľubný prístup pre skrining a včasnú diagnostiku rakoviny pľúc, no keďže je to orgánovošpecifická biotekutina, môže mať potenciál aj pri vyšetrovaní metastatických ochorení v oblasti hrudníka⁽¹⁸⁾.

Záver

Na rozdiel od konvenčných skriningových prístupov vychádzajúcich predovšetkým z tkanivovej a tekutej biopsie, ktorých proces získavania predstavuje pre pacienta viac alebo menej stresujúci zákrok, je proces získavania dychovej biopsie z pohľadu diagnostickej aplikácie maximálne neinvazívnou stratégiou. Vydychovaný aerosól je rezervoárom klinicky relevantných genomických informácií, akými sú nukleové kyseliny, ale tiež proteínov, signálnych molekúl či rôznych vírusových a patogénnych agensov. Množstvo biomarkerov derivovaných z dychovej biopsie sa do pľúc a ná-

sledne do aerosólu dostáva prostredníctvom systematickej cirkulácie a difúzie priamo z krvi. Výskumy prebiehajúce v tejto oblasti naznačujú, že pomocou dychovej biopsie možno detegovať a následne monitorovať aj ochorenia vzdialených orgánových sústav, ako je centrálna nervová sústava, respektíve gastrointestinálny trakt. Z dychu extrahované substancie môžu slúžiť pri skoršej detekcii ochorenia v expandujúcej oblasti precíznej a personalizovanej biomedicíny. Vznikajúce skriningové testy na báze dychovej biopsie môžu práve vďaka svojej jednoduchšej implementácii nájsť uplatnenie aj v centrách primárnej starostlivosti. Majú veľký potenciál stať sa vhodným nástrojom populačných skriningových programov a dramaticky zlepšiť včasnú detekciu závažných patológií, a tým aj prežívanie pacientov s mnohými typmi onkologických a vírusových ochorení.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446 a Pangenomika pre personalizovaný klinický manažment infikovaných osôb na základe identifikovaného virálneho genómu a ľudského exómu, kód ITMS: 313011ATL7, spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Lawal O, Ahmed WM, Nijssen TME, et al. Exhaled breath analysis: a review of "breath-taking" methods for off-line analysis. *Metabolomics*. 2017; 13: 110.
2. Grob NM, Dweik RA. Exhaled nitric oxide in asthma: progress since the introduction of standardized methodology. *J Breath Res*. 2008; 2: 37002.
3. Kuo TC, Tan CE, Wang SY, et al. Human Breathomics Database. *Database* (Oxford). 2020; 2020: baz139. doi: 10.1093/database/baz139.
4. Wu X, Zhu L, Ma PC. Next-Generation Novel Noninvasive Cancer Molecular Diagnostics Platforms Beyond Tissues. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018; 38: 964-977.
5. Krilaviciute A, Heiss JA, Leja M, et al. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review. *Oncotarget*. 2015; 6: 38643-38657.
6. Pham YL, Beauchamp J. Breath Biomarkers in Diagnostic Applications. *Molecules*. 2021; 26. doi: 10.3390/molecules26185514.
7. Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A, et al. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117: 11875-11877.
8. Atkinson J, Chartier Y, Pessoa-Silva CL, et al. Natural Ventilation for Infection Control in Health-Care Settings. Geneva: World Health Organization; 2013.
9. Koc A, Goksel T, Pelit L, et al. cfDNA in exhaled breath condensate (EBC) and contamination by ambient air: toward volatile biopsies. *J Breath Res*. 2019; 13: 036006.
10. Youssef O, Sarhadi VK, Armengol G, et al. Exhaled breath condensate as a source of biomarkers for lung carcinomas. A focus on genet-

ic and epigenetic markers-A mini-review. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016; 55: 905-914.

11. Chen JL, Chen JR, Huang FF, et al. Analysis of p16 gene mutations and their expression using exhaled breath condensate in non-small-cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2015; 10: 1477-1480.
12. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Mulé G, et al. 3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from patients with non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 738-744.
13. Lynggaard C, Bertelsen MF, Jensen CV, et al. Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Curr Biol*. 2022; 32: 701-707.e5.
14. Clare EL, Economou CK, Faulkes CG, et al. eDNAir: proof of concept that animal DNA can be collected from air sampling. *PeerJ*. 2021; 9: e11030.
15. Hirota K. Air contamination with SARS-CoV-2 in the operating room. *J Anesth*. 2021; 35: 333-336.
16. Youssef O, Knuutila A, Piirilä P, et al. Presence of cancer-associated mutations in exhaled breath condensates of healthy individuals by next generation sequencing. *Oncotarget*. 2017; 8: 18166-18176.
17. Dent AG, Suttedja TG, Zimmerman PV. Exhaled breath analysis for lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013; 5 Suppl 5: S540-S550.
18. Smyth RJ, Toomey SM, Sartori A, et al. Brief Report on the Detection of the EGFR T790M Mutation in Exhaled Breath Condensate from Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol*. 2018; 13: 1213-1216.

RNDr. Ondrej Pös, PhD.

Vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
e-mail: ondrej.pos@uniba.sk

Patologická fraktúra progredujúca do subkompletnej osteodeštrukcie humeru

Samuel Horák¹, Mária Potočárová², Pavol Janega^{1,3}

¹Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Bratislava

²I. interná klinika, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Bratislava

³MEDIREX GROUP ACADEMY n. o., Nitra

Patologická fraktúra je stav, keď k zlomenine dôjde pri neprimerane nízkom zaťažení kosti, ktorej mechanická rezistencia je znížená chorobným procesom. Jednou z najzávažnejších príčin vzniku patologickej fraktúry je kostný nádor, či už primárny, alebo metastatický. Prezentujeme prípad 68-ročného muža s anamnézou adenokarcinómu hrubého čreva, u ktorého bol 17 mesiacov po osteosyntéze špirálovitej, dislokovanej fraktúry proximálnej časti diafýzy ľavého humeru diagnostikovaný rozsiahly nádor ramena, rádiologicky vzhľadu osteosarkómu, ktorý takmer kompletne deštruoval humerus.

Kľúčové slová: patologická fraktúra, kolorektálny adenokarcinóm, osteosarkóm

Pathological fracture progressing to subcomplete osteodestruction of the humerus

A pathologic bone fracture is when a bone breaks under inadequately low pressure due to decreased mechanical resistance caused by underlying bone disease. Primary and secondary bone tumours are one of the most severe causes of pathologic bone fractures. We present a case of a 68-year-old male with a history of colorectal adenocarcinoma, who has had an osteosynthesis due to a spiral, dislocated fracture of the proximal diaphysis of the left humerus. Seventeen months later, he manifested with a tumour widely spreading throughout his arm, which led to subtotal destruction of the entire humerus, with a radiologic appearance similar to osteosarcoma.

Keywords: pathological fracture, colorectal adenocarcinoma, osteosarcoma

NewsLab, 2022; roč. 13 (2): 99 – 103

Úvod

Patologická fraktúra je stav, keď k zlomenine dôjde pri neprimerane nízkom zaťažení kosti, ktorej mechanická rezistencia je znížená chorobným procesom. Nastávajú buď spontánne, alebo po traume, ktorá by pri normálnej kosti zlomeninu nevyvolala⁽¹⁾. Jednou z najzávažnejších príčin vzniku patologickej fraktúry je kostný nádor, či už primárny, alebo metastatický. Časť nádorov (karcinóm prostaty, prsníka, pľúc, štítnej žľazy, obličky) je charakteristická tvorbou včasných kostných metastáz, no v pokročilom štádiu sú pozorované pri mnohých solídnych nádoroch⁽²⁾. Prezentujeme prípad pacienta s adenokarcinómom hrubého čreva, u ktorého sa vytvorila patologická fraktúra vedúca k masívnemu rastu nádoru atypického správania.

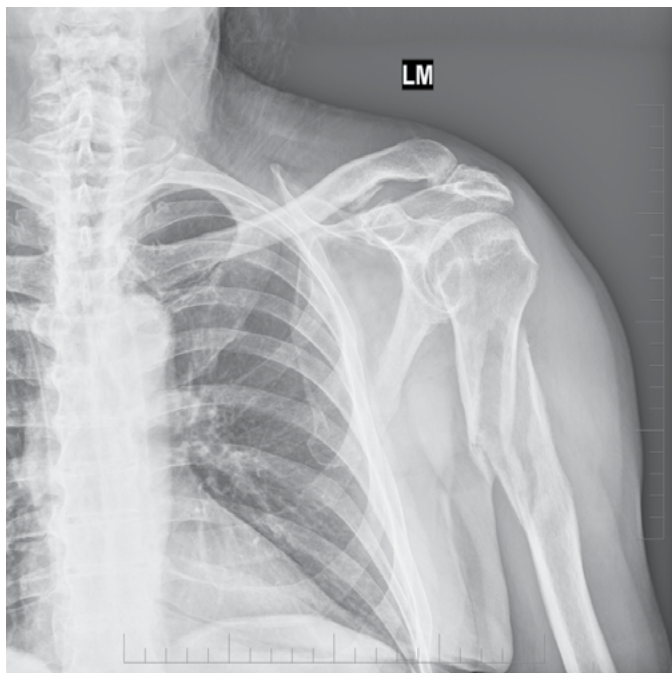
Prípadová štúdia

Na kliniku internej medicíny bol prijatý 68-ročný muž pre progresívnu celkovú slabosť, neprijímanie tekutín a stravy, stuhnutosť a poruchu hybnosti končatín, subfebrilitu a dehydratáciu. Pacient bol dlhodobo liečený na diabetes mellitus 2. typu inzulinom a perorálnymi antidiabetikami, s dlhodobo neuspokojivou kompenzáciou vedúcou k diabetickej nefropatii a výraznej generalizovanej ateroskleróze. K rozvoju aterosklerózy prispela aj arteriálna hypertenzia III. stup-

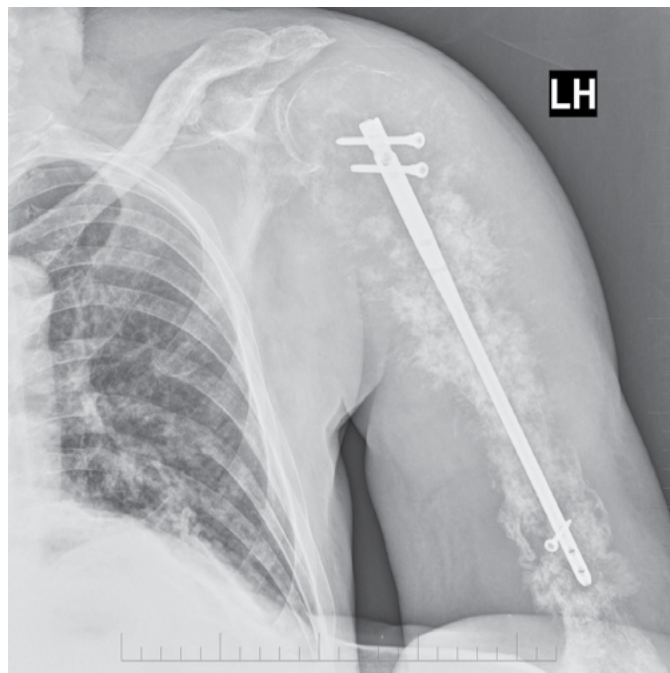
ňa podľa WHO/ISH klasifikácie, aktuálne dekapitovaná. Sedem rokov pred hospitalizáciou pacient podstúpil resekciu colon sigmoideum Hartmannovou operáciou pre adenokarcinóm, so štádiom IIIb, T3N1bM0. V nasledujúcich rokoch ochorenie progredovalo metastázovaním do pečene s karcinomatózou peritonea, pre ktorú pacient opakovane dostával rôzne cykly chemoterapie (XELOX, FOLFOX6, FOLFOX C2...). Pre početné nežiaduce účinky pacient odmietol v chemoterapii pokračovať.

Pacient bol prijatý na chirurgickú kliniku 17 mesiacov pred aktuálnou hospitalizáciou s cieľom osteosyntetického riešenia špirálovitej, dislokovanej fraktúry proximálnej časti diafýzy ľavého humeru (**obrázok 1**). Už počas tejto operácie bolo supponované, že môže ísť o patologickú fraktúru pri základnom onkologickom ochorení. Do terajšej hospitalizácie sa na celej ľavej hornej končatine rozvinul výrazný lymfedém. Ľavá horná končatina sa stala výrazne asymetrickou v porovnaní s pravou hornou končatinou, jej obvod v ramene dosahoval 35 cm, na pohmat bola bolestivá, s tuhými, hrboľatými masami v mäkkých tkanivách, bez porušenia kožného krytu. Na rtg. snímke ľavej hornej končatiny bol vizualizovateľný osteosyntetický klinec, no väčšina humeru, až na distálnu časť pri lakťovom kĺbe, bola spotrebovaná (**obrázok 2**). Do diferenciálnodiagnostickej úvahy pre potenciálnu príčinu subkom-

Obrázok 1. Špirálovitá, dislokovaná fraktúra proximálnej časti diafýzy ľavého humeru, bez nápadných nádorových zmien v kostiach a parenchýme pľúc.



Obrázok 2. V strede ľavého ramena je prítomný osteosyntetický klinec, no štruktúra humeru je až na distálnu časť pri lakťovom kĺbe kompletne spotrebovaná nádorovou masou, ktorá infiltruje mäkké tkanivá, s opacitou vzhľadu osifikácie. Na pľúcnom parenchýme sú difúzne prítomné nepravidelné zatienenia (metastatická progresia základného ochorenia).



pletnej osteodeštrukcie humeru prichádzala osteomyelitída alebo po chemoterapii sekundárne vzniknutý primárny nádor kosti – osteosarkóm, ktorý viac zodpovedal rádiologickému aj fyzikálnemu nálezu.

Po krátkej párdňovej hospitalizácii na klinike internej medicíny pacient vyčerpal svoje biologické rezervy pri kachexii a napriek komplexnej intenzívnej terapii zomrel pri príznakoch kardiorešpiračného zlyhania. Na úmrtí sa okrem základného onkologického ochorenia s metastatickou disemináciou do pľúc (**obrázok 2**) spolupodieľala dekompenzovaná arteriálna hypertenzia so sekundárnou hypertrofiou myokardu ľavej komory srdca, výrazné kalcifikačné zmeny aortálnej chlopne a chronická ischemická choroba srdca spôsobená aterosklerózou vetiev koronárnych artérií.

Počas následnej pitvy sa našli nádorové metastázy difúzne vo všetkých lalokoch pľúc, difúzne v pečeni, v početných brušných lymfatických uzlinách, oboch nadobličkách a v podkoží na prednej strane hrudníka. Onkológom opisovaná karcinomatóza peritonea prítomná nebola – pravdepodobne bola eradikovaná cyklami chemoterapie. Histomorfologický obraz nádorových hmôt bol charakteristický pre dobre diferencovaný adenokarcinóm pochádzajúci z hrubého čreva. Na reze ľavým ramenom bola difúzne prítomná nádorová masa, ktorá infiltrovala mäkké tkanivá aj humerus. Nádorová masa mala tuhú až tvrdú konzistenciu, na reze sivožltej farby, s vytekaním zakalenej sivočervenej tekutiny. Mäkké tkanivá boli takmer kompletne spotrebované, nádor prerastal až tesne k podkožiu vo všetkých smeroch, so zachovaním iba úzkeho lemu svaloviny (**obrázok 3**). Cievky a nervy sa v tomto teréne jednoznačne nepodarilo vizualizovať, no vonkajšia kompre-

sia ciev (a potenciálne aj invázia) nádorom pravdepodobne viedla k vzniku lymfedému. Humerus bol zachovaný iba v drobnej distálnej časti, inak ho nádor kompletne spotreboval, jeho štruktúra ani periost neboli identifikovateľné. V strede ramena sa nachádzal osteosyntetický klinec.

V histologickom obraze nádoru ramena bola riedka fibrózna stróma s nepočetnými fibroblastmi, ostrovčeky osteoidu kompaktnéj kosti s ojedinelými osteocytmi a vzácné osteoblastmi fyziologického vzhľadu bez atypií, bez nálezu buniek kostnej drene a tukového tkaniva. Difúzne bola táto masa prerastená útvarmi dobre až stredne diferencovaného adenokarcinómu s rozsiahlymi ložiskami nekróz (**obrázok 4 a 5**). Imunohistochemické vyšetrenie spolu s morfológiou nádoru potvrdilo origo z hrubého čreva (CK7–, CK20+, EMA+). Imunoprofil nádorových buniek vyšetrením na mismatch repair proteíny (MMR) bol MHL1–, PMS2+, MSH2+, MSH6+, čo bolo potvrdené aj metódou FISH (**obrázok 6**). Genetické vyšetrenie vzhľadom na kvalitu a fixáciu materiálu nebolo úspešné. Bunky osteosarkómu sa extenzívnym morfológickým a imunohistochemickým vyšetrením nádoru nenašli (dezmin–, CD99–, S100–).

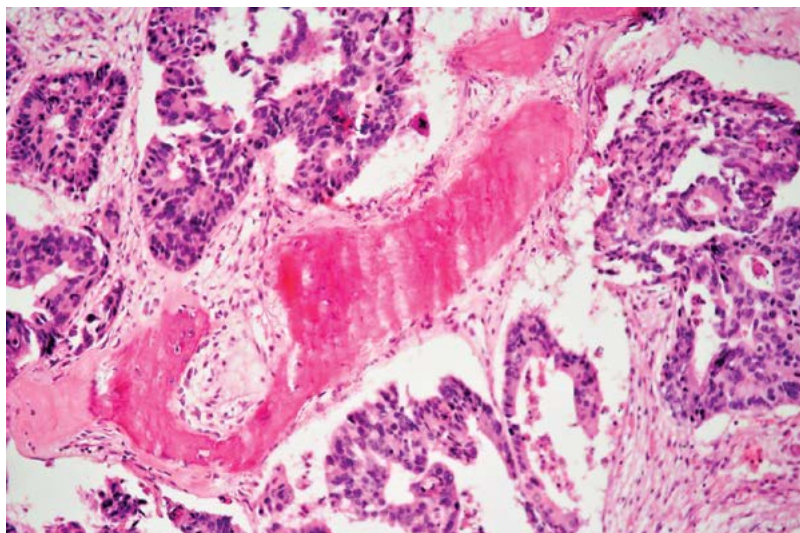
Diskusia

U pacientov s kolorektálnym adenokarcinómom sú typické metastázy do pľúc a pečene, iba u malej časti pacientov sa pozorujú kostné metastázy⁽³⁾. Ich prítomnosť výrazne zhoršuje prognózu, obzvlášť, ak sú metastázy v kostiach včasným alebo jediným prejavom diseminácie ochorenia^(3,4). Najčastejším prejavom je bolesť kosti, ktorá sa objavuje včasne a vedie k zníženej kvalite života pacienta, neraz

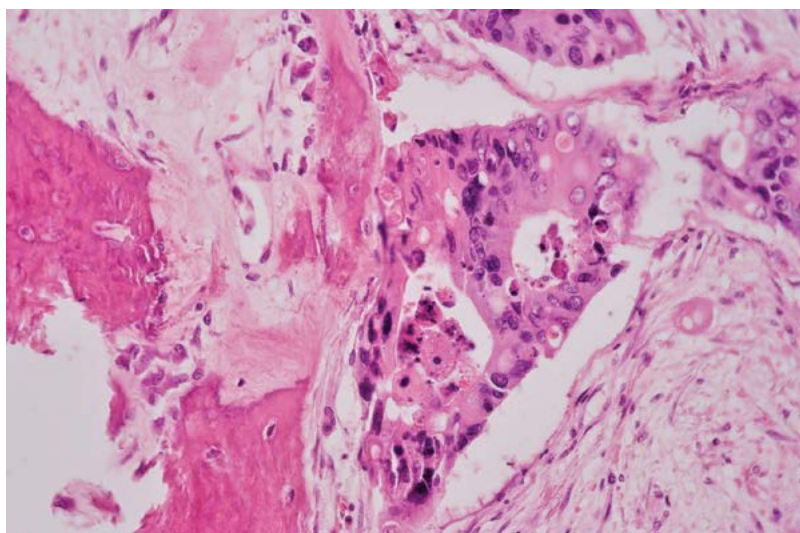
Obrázok 3. Pitevný nález – nádorová masa difúzne infiltrujúca mäkké tkanivá ľavého ramena, so zachovaním iba úzkeho lemu svaloviny a podkožia.



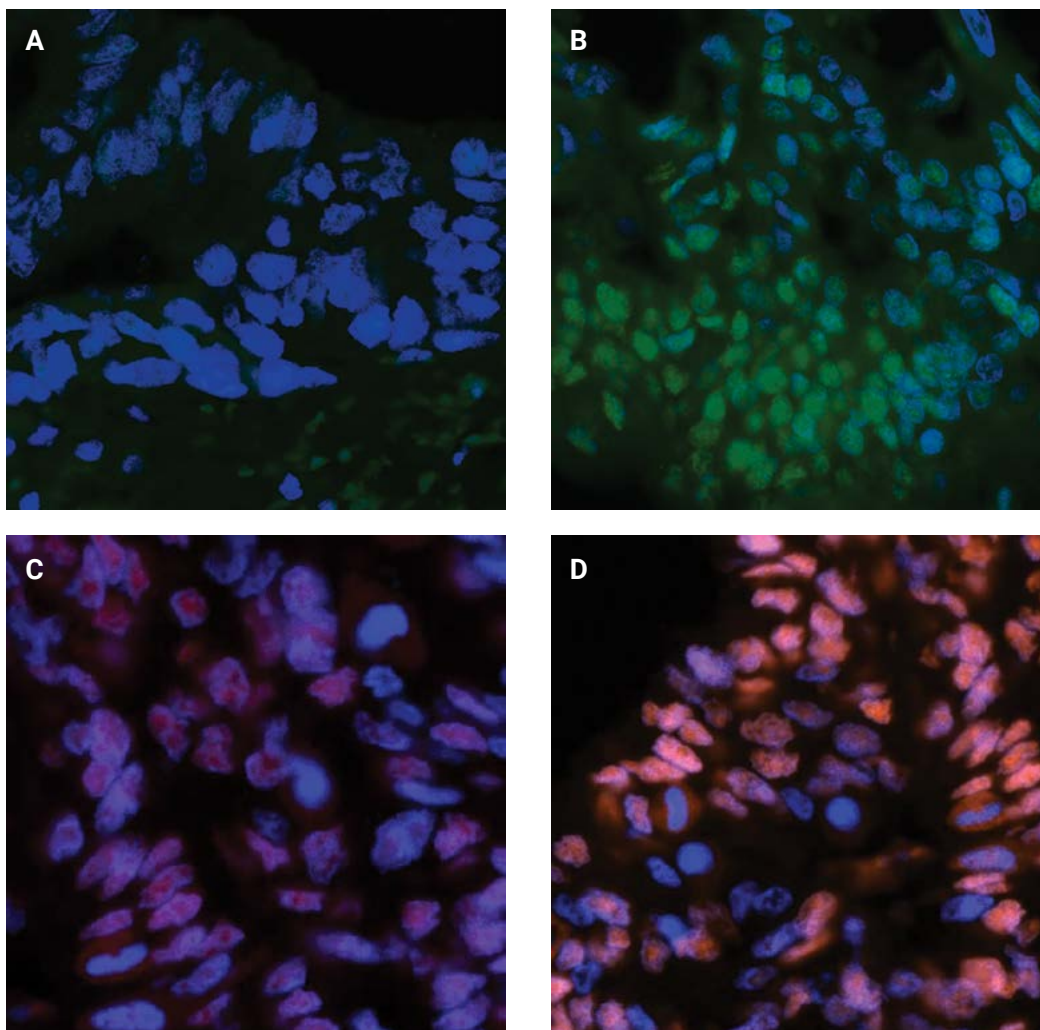
Obrázok 4. Štruktúry dobre až stredne diferencovaného adenokarcinómu, rastúce v riedkej fibróznej stróme v tesnej blízkosti osteoidu (HE, 200x).



Obrázok 5. Atypické bunky adenokarcinómu s obrazom „špinavej nekrózy“ v lúmene, rastúce v riedkej fibróznej stróme, v tesnej blízkosti kostných trámecov s nepočetnými osteocytmi (HE, 400x).



Obrázok 6. FISH expresia MMR proteínov v nádorovom tkanive. Nádorové bunky boli MHL1– (A), PMS2+ (B), MSH2+ (C), MSH6+ (D)



s nutnosťou ďalšej liečby (rádioterapia, bisfosfonáty)⁽⁴⁾. Kostné metastázy kolorektálneho adenokarcinómu bývajú zmiešaného typu, osteolytické aj osteoblastické, s variabilným zastúpením jednotlivých zložiek. Samotná tvorba alebo deštrukcia osteoidu osteoklastmi a osteoblastmi býva mediovaná cez viaceré signálne dráhy (proteín súvisiaci s parathormónom – PTHrP, NF-kappaB ligand, TGF, endotelín-1)⁽³⁾.

Extrémne vzácnym javom pri primárnom aj metastatickom adenokarcinóme hrubého čreva, ktorý nepostihuje skeletovú štruktúru, je kostná metaplázia. Prvýkrát bola opísaná v tridsiatych rokoch minulého storočia, s prevažným výskytom v rekte, menej často v colon ascendens a descendens, veľmi vzácné v metastázach v lymfatických uzlinách⁽⁵⁾. Presný mechanizmus vzniku kostného tkaniva v tomto teréne nie je objasnený, predpokladá sa, že nádorové bunky produkujú cytokíny (skupina BMP, osteokalcín)⁽⁶⁾, ktoré stimulujú kmeňové bunky na transformáciu do preosteoblastov až osteoblastov. V žiadnom opisovanom prípade sa však nepozorovala spongiózna kosť ani hemopoetické bunky kostnej drene^(5,6). Kostná metaplázia nemení prognózu pacienta, no histologicky a rádiologicky môže imitovať infiltráciu kosti pri lokálne pokročilom nádore⁽⁵⁾.

Osteosarkóm je najčastejší solídny, malígny, primárny nádor kostí. Vyskytuje sa vo forme primárneho osteosarkómu,

kde najčastejšie postihuje detských pacientov, a sekundárneho osteosarkómu ako následok malígnej transformácie osteoblastov a osteocytov v už patologicky zmenenom teréne⁽⁷⁾. Jeho výskyt je zväčša sporadický, býva spájaný s viacerými syndrómami (Liho-Fraumeniho, hereditárny retinoblastóm), genetickými mutáciami a alteráciami štruktúry chromozómov (6p21.3, 2p25.2)^(7,8). Pri sekundárnom osteosarkóme je najdominantnejším rizikovým faktorom predchádzajúca protinádorová terapia, najmä rádioterapia⁽⁹⁾, no prípady boli pozorované aj po mnohých rokoch po predchádzajúcej chemoterapii⁽¹⁰⁾. Jeho výskyt v diafýze je vzácny (9 %) a humerus je treťou najčastejšie postihnutou kosťou⁽¹¹⁾. V rádiologickom obraze je typicky prítomný infiltratívny nádor prerastajúci periost, so zvlášť „vychádzajúceho slnka“ a tvorbou Codmanovho trojuholníka. V pokročilom štádiu je príznačná totálna deštrukcia pôvodnej časti kosti a difúzna infiltrácia mäkkých tkanív, s novotvorbou kostného tkaniva v celej mase nádoru⁽¹²⁾. Potvrdenie a bližšia špecifikácia nádoru, najmä menej častých subtypov, sú možné až po bioptickom vyšetrení.

V opisovanej kazuistike bola patologická fraktúra humeru spôsobená metastázou adenokarcinómu hrubého čreva. Pravdepodobne išlo o mikroskopické ložisko, keďže uniklo rádiologickej detekcii a nebolo pozorované ani počas samotnej osteosyntézy. Pacient mal v čase vzniku fraktúry gene-

ralizované metastatické štádium ochorenia a vzhľadom na prerušenie protinádorovej liečby nie je progresia výnimočná. Zarážajúci je rozsah a vzhľad nádoru po relatívne krátkom čase rastu, ktoré svedčia o veľmi agresívnom správaní. Z hľadiska rádiologickej aj histopatologickej diagnostiky tohto prípadu je zavádzajúca a mätúca prítomnosť kosti v mase nádoru. Fragmenty osteoidu sú najpravdepodobnejšie zvyšky deštruovaného humeru, proti novotvorbe kostného tkaniva svedčí nízka celularita s prevahou osteocytov, bunky majú prevažne inaktívny fenotyp. Imunohistochemickým ani histomorfologickým vyšetrením sa neodhalili žiadne bunky, ktoré by pripomínali osteosarkóm.

Záver

Patologická fraktúra kosti je stav, pri ktorom vždy treba pátrať po príčine vzniku. Jej podkladom môžu byť benígne,

chronické procesy vedúce k zníženej denzite kosti, ako aj primárne a sekundárne nádory. U pacientov s malígnymi extraskeletovými nádormi, kde dôjde k metastatickému postihnutiu kostí, býva prognóza zväčša horšia.

Podakovanie

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

LITERATÚRA

1. Fayad LM, Kamel IR, Kawamoto S, et al. Distinguishing stress fractures from pathologic fractures: a multimodality approach. *Skeletal Radiol.* 2005 May; 34(5): 245-259.
2. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, et al. Bone Metastases: An Overview. *Oncol Rev.* 2017 May 9; 11(1): 321.
3. Baek SJ, Hur H, Min BS, et al. The Characteristics of Bone Metastasis in Patients with Colorectal Cancer: A Long-Term Report from a Single Institution. *World J Surg.* 2016 Apr; 40(4): 982-986.
4. Roth ES, Fetzer DT, Barron BJ, et al. Does colon cancer ever metastasize to bone first? a temporal analysis of colorectal cancer progression. *BMC Cancer.* 2009 Aug 7; 9: 274.
5. Mastracci L, Ficarra G, Bianchi R, et al. Adenocarcinoma With Osseous Metaplasia: Is It Bad to the Bone? *Int J Surg Pathol.* 2020 Feb; 28(1): 70-72.
6. Liu X, Xu J, Chen L. Colorectal carcinoma with osseous metaplasia. *Oncotarget.* 2017 Jun 20; 8(39): 65407-65413.
7. Lindsey BA, Markel JE, Kleinerman ES. Osteosarcoma Overview. *Rheumatol Ther.* 2017 Jun; 4(1): 25-43.
8. Savage SA, Mirabello L, Wang Z, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma. *Nat Genet.* 2013 Jul; 45(7): 799-803.
9. Khanna L, Prasad SR, Yedururi S, et al. Second Malignancies after Radiation Therapy: Update on Pathogenesis and Cross-sectional Imaging Findings. *Radiographics.* 2021 May-Jun; 41(3): 876-894.
10. Shimatani A, Aono M, Hoshi M, et al. Secondary osteosarcoma in patients previously treated for childhood cancer: Three case reports. *Mol Clin Oncol.* 2019 Jan; 10(1): 153-158.
11. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed. Vol. 3).
12. Yarmish G, Klein MJ, Landa J, Lefkowitz RA, Hwang S. Imaging characteristics of primary osteosarcoma: nonconventional subtypes. *Radiographics.* 2010 Oct; 30(6): 1653-1672.

MUDr. Samuel Horák

Ústav patologickej anatómie LF UK
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
e-mail: samuel.horak@fmed.uniba.sk

www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

