

Ročník X.

newslab

časopis laboratórnej medicíny



2019

Primárny liposarkóm pankreasu – kazuistika a prehľad literatúry

Primary pancreatic liposarcoma – the case report and literature review

Sekvenovanie DNA v laboratórnej diagnostike bakteriálnych patogénov

DNA sequencing in laboratory diagnostics of bacterial pathogens

Význam a diagnostika antifosfolipidových protilátok u žien s poruchami reprodukcie

Importance and diagnostic of anti-phospholipid antibodies in women with reproductive disorders

Vývoj komplexných chromozómových prestavieb u pacienta s ALL

Development of complex chromosome rearrangements in a patient with ALL

Infekcia HCV – viac ako 20 rokov vývoja terapie

HCV infection – more than 20 years of drug development

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

newslab už desať 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.

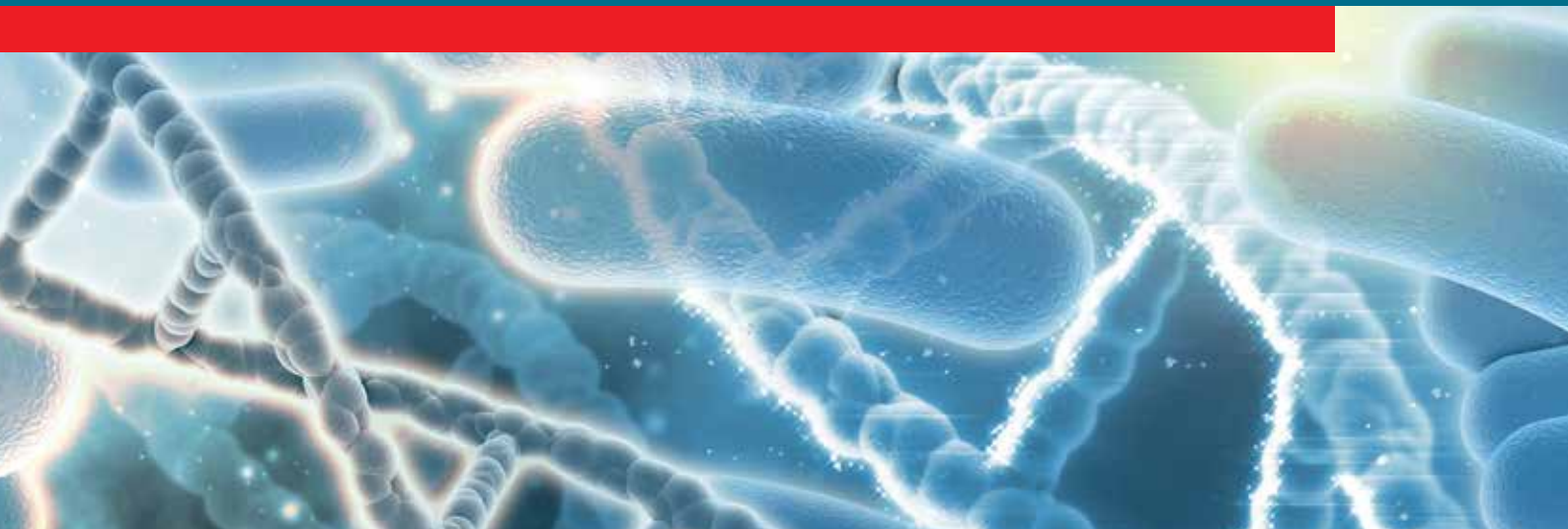
Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

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 priatelia, milí čitatelia,

otvárate nové číslo časopisu, ktorý dúfa, že vám priblíži výstupy aktuálneho výskumu zasahujúce do laboratórnej medicíny, ktoré môžu mať priamy dosah pre lepšiu diagnostiku, liečbu a prognózu pacientov. Vedecký výskum prináša so sebou veľa zaujímavých momentov, vzrušenia, ale aj množstvo práce a namáhavých a únavných okamihov.

V minulosti bola veda prakticky vždy doménou mužov. Aj keď aj v súčasnosti sú možnosti žien presadiť sa vo vede ťažšie, tieto rozdiely sa postupne zmazávajú. Dobre to vidíme pri udeľovaní Nobelovej ceny za fyziológiu a medicínu. Doteraz bola, od svojho počiatku v roku 1901, táto cena udelená 109 laureátom. Z tohto počtu bolo 12 žien, z ktorých 5 žien bolo ocenených až v posledných rokoch, v 21. storočí.

Prvá žena, ktorej bola v roku 1947 udelená Nobelova cena za fyziológiu a medicínu, bola Gerty Coriová. Narodila sa v roku 1896 v Prahe, v tom čase v Rakúsko-Uhorsku. Vyštudovala medicínu a neskôr pracovala ako pediatrička v Karolínskej detskej nemocnici vo Viedni. Tam si vzala za manžela Carla Ferdinanda Coriho, lekára a budúceho biochemika. Vzhľadom na ťažkú životnú situáciu a vážne spoločenské problémy v súvislosti s jej židovským pôvodom emigrovali manželia v roku 1922 do Spojených štátov amerických. Gerty Coriová spolu so svojim manželom sa ďalej venovali vo svojom výskume najmä biochémií a enzymológii. V roku 1936 opísali Coriho cyklus, cyklus katalytickej premeny glykogénu, za ktorý im neskôr udelili Nobelovu cenu. Ich výskum sa stal kľúčovým pre pochopenie metabolizmu bunky a prispel aj k pochopeniu chorôb, ktoré sa spájajú s poruchami ukladania glykogénu.

Gerty Coriová bola prvá, ale úspešných žien vo vede, ktoré by v budúcnosti mohli byť laureátkami Nobelovej ceny, vidíme čoraz viac. Mnohé z nich publikujú aj v našom časopise. Keby sme brali práve Newslab ako ukazovateľ, boli by výsledky veľmi optimistické. V minulom roku v našom časopise publikovalo celkovo 46 žien, čo je presne 2x toľko ako publikujúcich mužov. Väčšina z nich má celý svoj vedecký život ešte pred sebou a verím, že bude úspešný. Možno sa medzi nimi skrýva aj niekto, kto v budúcnosti prevezme v Štokholme cenu za mimoriadne vedecké výsledky.

Milé kolegyně, prajem vám všetkým veľa úspechov.



MUDr. Pavol Janega, PhD.

Pôvodné práce

- Význam a diagnostika antifosfolipidových protilátok u žien s poruchami reprodukcie** 5
Veronika Páleníková, Elena Tibenská
- Využitie NGS (next generation sequencing) v rutinnej diagnostike** 9
Lucia Žideková, Ľubica Majerová, Michaela Patáková Zrubcová, Antónia Hatalová, Renata Lukačková
- Effect of selected pre-analytic factors on immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors and cell proliferation marker Ki-67 in breast carcinomas** 13
Monika Bialešová, Jozef Kuruc
- Imunitná odpoveď v malígnom melanóme – výsledky pilotnej štúdie** 20
Jana Lacová, Andrea Janegová

Prehľadové práce

- Sekvenovanie DNA v laboratórnej diagnostike bakteriálnych patogénov** 25
Barbora Markusková, Aneta Lichvariková, Hana Drahovská
- Processing of genomic data with privacy preserving methods** 28
Rastislav Hekel, Ondrej Pös
- Secondary findings in the era of genomic medicine** 32
Zuzana Kubiritová

- HCV infection – more than 20 years of drug development** 37
Silvia Rybecká, Adriána Liptáková, Stanislav Stuchlík
- HELLP syndróm** 40
Lucia Striešková
- ACTN3: „Rýchlostný gén“** 42
Martina Pečimonová
- Diabetes: Cybernetic point of view** 47
Matúš Rebro, Marián Tárnik, Eva Miklovičová, Ján Murgaš

Kazuistiky

- Vývoj komplexných chromozómových prestavieb u pacienta s ALL** 51
Gabriela Veselá, Andrea Blahová, Alexandra Oravcová, Kristína Lengyelová, Alena Žákovičová, Kristína Juríková, Lenka Cicmanová-Palčová, Lucia Žideková, Ľubica Majerová, Renata Lukačková
- Primárny liposarkóm pankreasu – kazuistika a prehľad literatúry** 56
Kristína Mikuš-Kuracinová, Helena Gavurová, Monika Sekerešová

Novinky, názory a pohľady

- Črevná mikróflóra – čo znamená pre nás a čo pre ňu môžeme znamenať my?** 61
Ján Radvánszky

Ročník 10, 2019, číslo 1
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: apríl 2019

Redakčná rada:

Šéfredaktorka:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Členovia:

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

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

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

Výkonné redaktorky:

Mgr. Slavomíra Šindelářová
PhDr. Mária Žeglenová

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Lucia Vecseiová

Všetky články sú plne recenzované.

Registrácia MK SR pod číslom EV 5164/15

ISSN 1338-9661 (tlačené vydanie)

ISSN 2454-0021 (online)

Časopis je indexovaný v Bibliographia

Medica Slovaca (BMS).

Citácie sú spracované v CIBaMed.

Citačná 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.

Význam a diagnostika antifosfolipidových protilátok u žien s poruchami reprodukcie

Veronika Páleníková^{1,2,3}, Elena Tibenská⁴

¹Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika

²Laboratoř reprodukční biologie, Biotechnologický ústav AV. ČR, v. v. i, BIOCEV, Vestec, Česká republika

³Katedra biochémie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika

⁴Klinická imunológia a alergológia, Medirex, a. s., Bratislava, Slovenská republika

Antifosfolipidové protilátky sa viažu na fosfolipidy alebo na komplex fosfolipid – bielkovina. Výskyt týchto protilátok môže viesť k tvorbe trombóz a poruchám tehotenstva, čo je príznakom nezápalového autoimunitného ochorenia – antifosfolipidového syndrómu. Medzi hlavné laboratórne kritériá antifosfolipidového syndrómu patria kardiolipínové protilátky a protilátky proti β -2-glykoproteínu I. Ďalšími typmi protilátok, ktoré sa detegujú v sérach pacientov, sú protilátky proti fosfatidylserínu, fosfatidyletanolamínu, protrombínu či anexínu V. Presný vznik a vývoj týchto protilátok nie je známy, preto sa vedú diskusie, ktoré protilátky sa najviac vyskytujú u pacientov s antifosfolipidovým syndrómom a ktoré by mali byť zahrnuté v hlavných kritériách. Preto bolo naším cieľom sledovať výskyt a vplyv antifosfolipidových protilátok u žien s poruchami reprodukcie a sledovať liečbu antifosfolipidových protilátok.

Kľúčové slová: antifosfolipidové protilátky, antifosfolipidový syndróm, neplodnosť

Importance and diagnostic of anti-phospholipid antibodies in women with reproductive disorders

Antiphospholipid antibodies bind to the phospholipids or complex protein-phospholipid. The occurrence of those antibodies can lead to the creation of thrombosis or pregnancy disorders that are symptoms of non-inflammatory autoimmune disease - antiphospholipid syndrome. Main criteria of antiphospholipid syndrome are cardiolipin antibodies and antibodies against β -2-glycoprotein 1. Other types of antibodies detected in sera of patients are antibodies against phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, prothrombin or annexin V. Origin and development of those antibodies are not known, and there is ongoing discussion which antibodies are the most present in patients with antiphospholipid syndrome and which ones should be part of main criteria. Therefore, our aim was to observe the occurrence and effect of antiphospholipid antibodies in women with reproductive disorders and their treatment.

Keywords: antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome, infertility

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 5 – 8

Úvod

Záporne nabité fosfolipidy sú podstatnou zložkou všetkých membrán, preto sú vhodným antigénom pre antifosfolipidové protilátky (APLA)⁽¹⁾. Tieto protilátky sa viažu aj na proteíny, ktoré vytvárajú komplexy s fosfolipidmi, kam zaraďujeme napríklad β -2-glykoproteín I (β 2GPI)⁽²⁾. APLA sú heterogénna skupina protilátok, ktorá sa podieľa na tvorbe nezápalového autoimunitného ochorenia s názvom antifosfolipidový syndróm (APS). Okrem výskytu APLA v sére alebo plazme je toto ochorenie asociované najmä s trombózami a poruchami tehotenstva⁽³⁾. U žien, u ktorých bol diagnostikovaný APS počas tehotenstva, môže dôjsť ku komplikáciám, čo môže byť spôsobené namierením APLA proti placente, keď dochádza k preeklampsii, placentárnej isuficiencii alebo pôsobia negatívne na rozvoj a funkciu trofoblastu⁽⁴⁾. Okrem toho môže dôjsť aj k prestupu APLA cez placentu, čo môže viesť k mozgovým abnormalitám a poškodeniu kognitívnych funkcií u narodených detí⁽⁵⁾. Tvorba trombózy, ktorá následne poškodzuje placentu, môže vzniknúť vplyvom APLA na zrýchlenie koagulácie, zníženie fibrinolýzy⁽⁶⁾, aktiváciou endotelových buniek alebo komplementu⁽⁷⁾.

APS sa v praxi delí na primárny a sekundárny APS, pričom primárny APS je označovaný vtedy, keď vznikol bez nejakej zjavnej príčiny, zatiaľ čo sekundárny APS vznikol v dôsledku prítomnosti nejakej iného ochorenia či infekcie⁽⁸⁾. Diagnóza APS je stanovená na základe sapporských kritérií, podľa ktorých je APS diagnostikované vtedy, keď je stanovené aspoň jedno klinické kritérium (tehotenská morbidita alebo trombóza) a jedno laboratórne kritérium, ktorým je výskyt APLA. Medzi hlavné APLA patria protilátky proti β 2GPI (anti- β 2GPI) a antikardiolipínové protilátky (ACLA). Okrem hlavných typov APLA rozoznávame protilátky v tzv. non-kritériách, to sú napríklad protilátky proti fosfatidylserínu, etanolamínu či protrombínu. Všetky APLA sa stanovujú štandardizovanými testami ELISA, pričom sa stanovujú buď IgG, alebo IgM izotypy, alebo sa robí celkový skrining protilátok⁽⁹⁾.

Vysoká heterogenita APLA a ich vplyv na priebeh tehotenstva sú dôvodom potratov alebo predčasných pôrodov. Mnoho lekárov však neberie do úvahy patologický vplyv imunitného systému na reprodukciu. Preto bolo naším cieľom poukázať na dôležitosť APLA, a to hlavne tých, ktoré sú zaradené do „non-kritérií“. V tomto projekte sme sa zamerali

hlavne na sledovanie výskytu APLA u žien s diagnostikovanou neplodnosťou a liečbu týchto protilátok.

Materiál a metodika

Súbor tvorilo 1 246 pacientok (vek: 20 – 50 rokov) s diagnózou neplodnosť bez liečby. Sérum bolo získané z krvi odobratej do uzavretého odberného systému s géloom počas prvého vyšetrenia. V sérach pacientok sme sledovali osem typov antifosfolipidových protilátok, pričom sa sledovali anti- β 2GPI a ACLA z hlavných kritérií a protilátky z „non-kritérií“: protilátky proti fosfatidylserínu, fosfatidyletanolamínu, kyseline fosfatidovej, anexínu V a IgG a IgM protilátky proti protrombínu.

Na stanovenie APLA sme použili kvantitatívnu metódu ELISA, ktorá je založená na interakcii antigén – protilátka (anti- β 2GPI – ORGENTEC, ORG 521S; ACLA – ORGENTEC, ORG 515S; kyselina antifosfatidová – Delta Biologicals S.r.l, Subsidiary of ERBA Diagnostics, CA-206; antianexín V – IMTEC, ITC59550; antifosfatidylserín – IMTEC, ITC59027; antifosfatidyletanolamín – IMTEC, ITC59400; antiprotrombín IgG/IgM – AIDA, REF 10229). Séra boli uschovávané v mrazničke pri teplote nižšej ako -18°C . Antigén (napr.: β 2GPI) je naviazaný na pevnú fázu a inkubuje sa so vzorkami, kalibrátormi a kontrolami, ktoré obsahujú primárne protilátky interagujúce s antigénom na pevnej fáze. Na primárne protilátky sa následne naviaže sekundárna, na ktorej je naviazaný konjugát (chrenová peroxidáza). Výsledok sa stanovuje spektrofotometricky⁽¹⁰⁾.

Získané výsledky sme štatisticky vyhodnotili pomocou štatistického programu StatsDirect Statistal Analysis Software.

Tabuľka 1. Vyhodnotenie výskytu jednotlivých typov APLA. V tabuľke je uvedený počet pacientok, u ktorých boli sledované jednotlivé protilátky (n), počet pozitívnych a percentuálne zastúpenie pozitívnych nálezov.

Protilátky	n	pozitívne	%
β 2GPI	1239	14	1,13
ACLA	1245	5	0,40
Fosfatidylserín	1199	149	12,43
Protrombín IgM	1163	99	8,51
Protrombín IgG	1165	65	5,58
Annexín V	1195	19	1,59
Fosfatidyletanolamín	1199	11	0,92
Kyselina fosfatidová	427	3	0,70

Tabuľka 2. Kombinácia výskytu rôznych typov APLA. Protilátky proti APLA sa veľmi často vyskytujú v kombinácii. Uvedené je percentuálne zastúpenie vzoriek reagujúcich s rôznymi typmi APLA antigénov a frekvencia výskytu rôznych kombinácií protilátok.

Protilátky	Všetci pozitívny	Pozitívny viac ako na 1 APLA	%	Protilátky							
				ACLA	Anti- β 2GPI	Fosfatidylserín	Fosfatidyletanolamín	Annexín V	Kyseliny fosfatidová	IgG	IgM
ACLA	5	5	100	-	80,00	80,00	-	20,00	40,00	40,00	-
Fosfatidyletanolamín	11	9	81,82	-	-	88,89	-	11,11	-	-	11,11
Kyselina fosfatidová	3	2	66,67	100,00	100,00	100,00	-	-	-	50,00	-
Annexín V	19	11	57,89	9,09	18,18	63,64	9,09	-	-	9,09	27,27
Anti- β 2GPI	14	6	42,86	66,67	-	66,67	-	33,33	33,33	33,33	-
Protrombín IgG	65	21	32,31	9,52	9,52	47,62	-	4,76	4,76	-	47,62
Protrombín IgM	99	30	30,30	-	-	43,33	3,33	10,00	-	33,33	-
Fosfatidylserín	149	42	28,19	9,52	9,52	-	19,05	16,67	4,76	23,81	30,95

V prípade kvalitatívnych dát sme počítali len percentily. Pri testoch, kde sa sledovala liečba, sme najprv zisťovali normalitu dát pomocou StatsDirectu a následne sme zvolili pri nenormálnom rozdelení dát štatistický Mannov-Whitneyho test (sledovanie účinnosti liečby v prípade protilátok proti fosfatidylserínu, fosfatidyletanolamínu, anexínu V a protrombínu IgG). Pri sledovaní liečby v prípade protilátok proti IgM a β 2GPI sme zistili normálne rozdelenie dát, preto sme využili t-test paired. Výsledky sme považovali za štatisticky významné, keď p-hodnota bola menšia ako 0,05.

Výsledky

Z 1 246 pacientok bolo 24 % žien pozitívnych na niektorú protilátku z APLA (**tabuľka 1**). Z hlavných kritérií sa najčastejšie vyskytovali protilátky anti- β 2GPI (1,13 %). ACLA sa vyskytovali iba u 0,40 % pacientok, čiže mali najnižšie zastúpenie zo všetkých APLA, ktoré sme sledovali.

Z „non-kritérií“ sa najčastejšie vyskytovali protilátky proti fosfatidylserínu (12,43 %). Tieto protilátky mali najvyššie zastúpenie zo všetkých sledovaných APLA. IgM protilátky proti protrombínu boli pozitívne u 8,51 % pacientok a IgG antiprotrombínové protilátky boli pozitívne u 5,58 % pacientok. Protilátky proti placentárnemu proteínu anexínu V boli pozitívne u 1,59 % žien, zatiaľ čo fosfatidyletanolamínové protilátky boli pozitívne u 0,92 % pacientok. Z „non-kritérií“ boli najmenej zastúpené protilátky proti kyseline fosfatidovej, ktorá bola pozitívna iba u 0,70 % žien, čo je o 0,30 % vyšší výskyt ako v prípade ACLA. Zastúpenie jednotlivých protilátok možno vidieť v **tabuľke 1**.

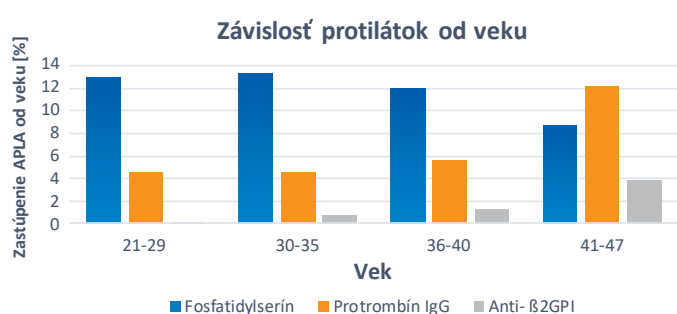
ACLA ako najmenej zastúpené protilátky mali najvyššiu kombináciu s iným typom APLA (100 %). Najviac sa vyskytovali v kombinácii s protilátkami proti β 2GPI a fosfatidylserínu (pri oboch 80 %). Fosfatidyletanolamínové protilátky boli v kombinácii s inými APLA v 81,82 %, pričom najviac sa vyskytovali s protilátkami fosfatidylserínu (88,89 %). Protilátky proti kyseline fosfatidovej boli v kombinácii s inými APLA u 2 z 3 pozitívnych pacientov. Až 100 % kombináciu mali s ACLA, anti- β 2GPI a fosfatidylserínovými protilátkami. Anti- β 2GPI protilátky boli pozitívne s viacerými protilátkami u 42,86 % pacientok. Najčastejšiu kombináciu mali s ACLA a fosfatidylserínovými protilátkami (pri oboch 66,67 %). Protrombínové IgG protilátky sa vyskytovali v kombinácii s inými APLA častejšie (32,31 %) než IgM protrombínové protilátky (30,30 %). IgG protilátky proti protrombínu boli najviac v kombinácii s protilátkami proti fosfatidylserínu a IgM protilátkami proti

protrombínu (pri oboch 47,62 %). IgM boli najčastejšie v kombinácii s protilátkami proti fosfatidylserínu (43,33 %). Fosfatidylserínové protilátky mali najnižšie percento v kombinácii s inými protilátkami (28,19 %), pričom najviac bol pozitívny s IgM protilátkami proti protrombínu (30,95 %). Výsledky je možné vidieť v **tabuľke 2**.

Okrem výskytu jednotlivých APLA sme sledovali ich výskyt vzhľadom na vek. Pacientky sme rozdelili do 4 vekových skupín: 20 – 29 rokov, 30 – 35 rokov, 36 – 40 rokov a 41 – 50 rokov. Závislosť protilátok od veku sme zaznamenali iba v prípade protilátok proti β 2GPI a protrombínu IgG (**graf 1**). Okrem toho protilátky proti anexínu V boli vyššie u starších žien, ale rozdiel nie je štatisticky významný. Výskyt ostatných protilátok nezávisel od veku.

Na základe dostupných informácií o pacientkach sme vybrali súbor pacientok, u ktorých bolo možné sledovať vplyv liečby na výskyt APLA. Týmto ženám bol nasadený LMWH (*low molecular hepariny*), aspirín, vitamín D a kortikoidy. Sledovali sme obsah protilátok pred nasadením liečby a obsah protilátok po nasadení liečby. Okrem protilátok IgG proti protrombínu došlo u všetkých pacientok k poklesu APLA po nasadení liečby (**tabuľka 3**). Niektoré pacientky boli pozitívne na viacero APLA naraz, pričom po nasadení liečby došlo vo všetkých prípadoch k poklesu protilátok, ktoré boli pred liečbou zvýšené. Avšak v niektorých prípadoch po nasadení liečby došlo k vzostupu iného typu protilátok, ktoré pred liečbou pozitívne neboli. Najčastejšie boli takto zvýšené protilátky proti anexínu V a oba izotypy protrombínových protilátok. Niektorým pacientkam sa podarilo po nasadení liečby otehotnieť, avšak presné informácie o poklese neplodnosti a úspešnosti tehotenstva nie sú k dispozícii vzhľadom na ukončenie štúdie pred získaním týchto informácií.

Graf 1. Závislosť protilátok od veku. Graf znázorňuje závislosť protilátok pre protrombín IgG a anti- β 2GPI od veku. Výskyt protilátok proti protrombínu a proti β 2GPI signifikantne stúpa s vekom, naopak, protilátky proti fosfatidylserínu nie sú závislé od veku.



Tabuľka 3. Sledovanie vplyvu liečby na pokles protilátok proti APLA. V tabuľke sú uvedené priemerné hodnoty (protilátok pred liečbou a po nej, uvedené sú aj smerodajné odchýlky a p-hodnota pre každý typ protilátok.

Protilátky	n	pred liečbou		po liečbe		p
		priemer	SD	priemer	SD	
β 2GPI	3	17,72	± 5,98	9,46	± 6,41	0,36
Fosfatidylserín	20	19,11	± 6,90	11,87	± 10,07	0,0005
fosfatidyletanolamín	7	15,6	± 18,38	7,3	± 1,94	0,0012
Annexín V	10	32,22	± 29,21	11,1	± 6,55	0,0022
Protrombín IgG	14	18,29	± 7,55	21,33	± 24,47	0,54
Protrombín IgM	4	18,22	± 4,41	15,7	± 4,16	0,28

Diskusia

V našej štúdií sme sledovali výskyt APLA u žien s poruchami reprodukcie. Tieto protilátky sú zodpovedné za spontánne potraty, vnútromaternicovú smrť plodu, preeklampsiu či žilovú trombózu⁽²⁾. Z 1 246 žien bolo 24 % pozitívnych na niektorú z APLA.

Protilátky proti ACLA a anti- β 2GPI sú zaradené medzi hlavné kritériá APS, no ich výskyt u pacientok s poruchami reprodukcie je minoritný. Názory na vplyv prítomnosti ACLA a anti- β 2GPI protilátok na priebeh tehotenstva sú kontroverzné. Na jednej strane sa uvádza, že ACLA sa podieľa na reprodukčných problémoch, zatiaľ čo druhá strana tvrdí, že ACLA nie sú spojené s tehotenskou morbiditou⁽¹¹⁾. V našom súbore žien nebola frekvencia výskytu ACLA protilátok u žien s poruchami reprodukcie výrazná (len 0,4 %), vyskytovali sa vždy v kombinácii s iným typom APLA. Protilátky anti- β 2GPI sa v našom súbore vyskytovali len u 1,13 % žien. Anti- β 2GPI sa vyskytovali hlavne v kombinácii s fosfatidylserínovými protilátkami a s ACLA. Prepojenie medzi ACLA a anti- β 2GPI môže byť spôsobené tým, že ACLA majú epitop na bielkovine β 2GPI, preto sú schopné priamo sa naň viazať. V prípade výskytu dvoch hlavných typov protilátok u neplodných žien sa zvyšuje pravdepodobnosť vzniku APS aj ťažšie zdravotné problémy počas tehotenstva⁽¹²⁾.

V našom súbore neplodných žien sa najčastejšie vyskytovali protilátky proti fosfatidylserínu (12,43 %). Aj štúdie Nayfe a kol. (2013) a Žigona a kol. (2013) uvádzajú, že najviac sa na poruchách tehotenstva podieľajú fosfatidylserínové protilátky. Zvýšené boli aj protilátky proti protrombínu. Viac sa vyskytoval izotyp IgM než IgG, no vo väčšine štúdií je s APS najviac spájaný IgG izotyp. Predpokladá sa, že výskyt IgM môže byť spojený s prebiehajúcim infekčným stavom⁽¹⁵⁾. IgG izotypy sú spájané hlavne so stratami plodu v skorých fázach tehotenstva⁽¹⁶⁾. Protilátky proti protrombínu majú časté krížové reakcie aj s fosfatidylserínovými protilátkami, a takáto kombinácia sa podieľa na zvýšených trombózach a poruchách tehotenstva⁽⁹⁾. V našom prípade bol takýto kombinovaný výskyt zistený medzi fosfatidylserínovými protilátkami a IgG protrombínovými protilátkami (u 47,62 % žien) a ďalej bol zistený medzi fosfatidylserínovými protilátkami a IgM protrombínovými protilátkami (u 43,33 % žien). Viaceré štúdie uvádzajú, že protrombínové protilátky sú dependentné od fosfatidylserínu, preto sa odporúča vyšetřovať fosfatidylserínové aj protrombínové protilátky súčasne v jednom behu ELISA. Takéto vyšetřenie zlepšuje kvalitu diagnostického testu zachytením väčšieho množstva protilátok, preto k nemu chceme pristúpiť aj my.

Ďalšími významnými APLA sú protilátky proti fosfatidyletanolamínu, ktoré sme detegovali u 0,92 % pacientok. Sugi a kol. (2004) vo svojej štúdií uvádzajú vyšší výskyt týchto protilátok u žien s poruchami tehotenstva v skoršej aj v neskoršej fáze gravidity. Protilátky proti anexínu V boli detegované u 1,59 % žien. Anexín V je bielkovina produkovaná placentou, ktorá má veľmi dobrú afinitu k fosfolipidom a viaže sa aj na povrch trombocytov. Vďaka tejto afinite k fosfolipidom vytvára mriežku okolo membrány, čím zabraňuje aktivite koagulačnej kaskády. V dôsledku zvýšenej produkcie protilátok proti anexínu V dochádza k vyštíepovaniu tejto bielkoviny z povrchu a spúšťa sa koagulácia. Výsledkom je zvýšené riziko straty plodu⁽¹⁸⁾. Veľmi častým javom je súčasný výskyt protilátok proti rôznym antigénom, napr. kombinácia protilátok proti anexínu V s protilátkami proti fosfatidylserínu sa vyskytla u 63,64 % žien.

Plodnosť ženy závisí od jej veku. Zaujímalo nás, či sú APLA závislé od veku u žien s diagnostikovanou neplodnosťou, pretože publikácií o vplyve veku na APLA je málo. Nezaznamenali sme závislosť výskytu protilátok proti fosfolipidom (kardiolipín, fosfatidylserín, fosfatidyletanolamín a kyselina fosfatidová) od veku. Naopak, zistili sme, že s rastúcim vekom stúpa výskyt anti- β 2GPI. Mehdi a kol. zistili, že frekvencia výskytu β 2GPI u žien stúpa s vekom⁽¹⁹⁾, preto je možné, že aj protilátky proti nemu môžu byť častejšie. Podobný trend

sme zachytili taktiež pri IgG protilátkach proti protrombínu, ale už nie pri IgM protilátkach proti protrombínu.

Naše pacientky s pozitívnymi APLA boli liečené aspirínom, LMWH, vitamínom D a kortikoidmi. Viaceré štúdie poukázali na to, že liečba aspirínom s heparínom alebo kortikoidmi je účinnejšia ako liečba samotným aspirínom^(20,21). Po nasadení liečby došlo poklesu protilátok proti fosfatidylserínu, etanolamínu a anexínu V. Protilátky proti β 2GPI a protrombínu IgM tiež poklesli, avšak tento pokles nebol štatisticky významný. V prípade anti- β 2GPI to mohlo byť spôsobené nedostatčným množstvom pacientov pozitívnych na túto protilátku. Protilátky proti protrombínu IgG stúpili v porovnaní s hladinou pred liečbou. Tento rozdiel však nie je signifikantný.

Záver

Antifosfolipidové protilátky sa podieľajú na poruchách reprodukcie u takmer štvrtiny žien s poruchami reprodukcie. V našej štúdií sme ukázali častý výskyt protilátok proti fosfatidylserínu (12,43 %) a protrombínu (8,51 % – IgM, 5,58 % – IgG) u žien s poruchami reprodukcie. Naopak, výskyt klasických protilátok proti ACLA a anti- β 2GPI bol veľmi nízky (0,40 %, resp. 1,13 %). Po nasadení liečby pacientkam so zvýšenými APLA (aspirín, vitamín D, LMWH a kortikoidy) dochádzalo k zníženiu APLA protilátok. Liečbu treba udržiavať aj počas gravidity, aby sa predchádzalo potratom.

LITERATÚRA

1. Lazúr J. Antifosfolipidový syndróm. *Inertná med* 2008; 8: 527-531.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Branch BW, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
3. Sada PR, Coben H, Isenberg D. The pathophysiology of antiphospholipid syndrome. *Open Urology Nephrol J* 2015; 8: 2-9.
4. Tong M, Viall C, Chamley L. Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment. *Hum Reprod Update* 2014; 21: 97-118.
5. Mekinian A, Lachassinne E, Nicaise-Roland P, et al. European registry of babies born to mothers with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 217-222.
6. Pierangeli SS, Vega-Ostertag M, Harris EN. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res* 2004; 114: 467-476.
7. Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003; 112: 1644-1654.
8. Prima FAFD, Valenti O, Hyseni E, et al. Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *J Prenat Med* 2011; 5: 41-53.
9. Meroni PL, Chighizola CB, Rovelli F, et al. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthrit Res Ther* 2014; 16: 1-14.
10. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978; 31: 507-520.
11. Clark CA, Laskin CA, Spitzer, Anticardiolipin antibodies and recurrent early pregnancy loss: a century of equivocal evidence. *Hum Reproduction Update* 2012; 18: 474-484.
12. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, et al. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *JEM* 1994; 2: 457-462.
13. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, et al. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* 2013; 52: 1358-1367.
14. Žigon P, Čučnik S, Ambrožič A, et al. Detection of Antiphosphatidylserine/Prothrombin Antibodies and Their Potential Diagnostic Value. *Clin. Dev. Immunol* 2013; 2013: 1-8.
15. Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol* 2012; 3: 1-10.
16. von Landenberg P, Matthias T, Zaech J, et al. Antiprothrombin antibodies are associated with pregnancy loss in patients with the antiphospholipid syndrome. *AJRI* 2003; 49: 51-56.
17. Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30: 326-332.
18. Rand JH. Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *Circ Res* 2002; 90: 29-37.
19. Mehdi H, Aston CE, Sanghera DK, et al. Genetic variation in the apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. *Hum Genet* 1999; 105: 63-71.
20. Rai R, Cohen H, Dave M, et al. Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 1997; 314: 253-257.
21. Silver RK, MacGregor SN, Sholl JS, et al. Comparative trial of prednisone plus aspirin versus aspirin alone in the treatment of anticardiolipin antibody-positive obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1411-1417.



Mgr. Veronika Páleníková
 Čabradský Vrbovok 41
 962 51 Čabradský Vrbovok
 e-mail: v.n.palenikova@gmail.com

Využitie NGS (next generation sequencing) v rutinnej diagnostike

Lucia Žideková¹, Ľubica Majerová¹, Michaela Patáková Zrubcová¹, Antónia Hatalová², Renata Lukačková¹

¹Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

²Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava

Sekvenovanie novej generácie (*next generation sequencing*, NGS), tiež známe ako masívne paralelné sekvenovanie, umožňuje analýzu veľkého objemu dát v jednom teste. Viac ako 90 % sekvenačných dát je získaných princípom SBS (*sequencing by synthesis*) od firmy Illumina. Zaradenie myeloidného NGS panela medzi rutinné vyšetrenia bolo na oddelení lekárskej genetiky, Medirex, a. s., najvýznamnejším míľnikom v diagnostike myeloproliferatívnych ochorení za rok 2018. Štandardným diagnostickým postupom bolo kaskádové vyšetrenie génov *JAK2*, *CALR* a *MPL*, pomocou ktorých možno odlíšiť pravú polycytémiu (*polycythemia vera*, PV), esenciálnu trombocytémiu (ET) a primárnu myelofibrózu (PMF). Z dôvodu WHO reklasifikácie myeloproliferatívnych ochorení z roku 2016 bolo nevyhnutné rozšíriť panel vyšetrovaných génov pre správne zaradenie pacientov do špecifických skupín, monitorovanie liečebnej odpovede a zaradenie do transplantáčného procesu.

Kľúčové slová: NGS, myeloproliferatívne neoplázie, rutinná diagnostika

Application of NGS (next generation sequencing) in routine diagnostics

Next generation sequencing (NGS) also known as massive parallel sequencing is able to detect a large amount of data in a single assay. More than 90% sequence data is obtained from sequencing by synthesis (SBS) principle from Illumina. Including myeloid NGS panel into routine examination was the most significant diagnostic milestone for patients with myeloproliferative neoplasms on the department of medical genetics, Medirex, a. s. in 2018. Standard diagnostic procedure is cascade examination of *JAK2*, *CALR* and *MPL* genes to distinguish polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Due to new WHO reclassification of myeloproliferative diseases in 2016, it was necessary to extend the panel of examined genes for correct assessment of diagnosis, monitoring of treatment response and inclusion into transplantation process.

Keywords: NGS, myeloproliferative neoplasms, routine diagnostics

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 9 – 12

Úvod

Termín myeloproliferatívne neoplázie (MPN) označuje skupinu ochorení, ktorých patogenéza sa začína transformáciou pluripotentnej kmeňovej bunky. V transformovanej bunke dochádza k somatickým mutáciám, ktoré poskytujú selektívnu výhodu pre patologický klon, ktorý potláča fyziologickú hemopoézu. Dôsledkom tohto procesu dochádza aj k vývoju krvných elementov z jedného hematologického radu, ktorý výrazne prevyšuje ostatné⁽¹⁾. Základné rozdelenie MPN je založené na prítomnosti, resp. neprítomnosti Philadelphia (Ph) chromozómu. Medzi Ph pozitívne neoplázie patrí chronická myelocytová leukémia (CML) s prítomnosťou *BCR-ABL1* fúzie. Ph negatívne MPN zvyčajne nesú somatickú *driver* mutáciu v génoch *JAK2*, *CALR* alebo *MPL*, ktoré sú hlavnými diagnostickými markermi spolu s hematologickými a morfológickými abnormalitami. Transformácia ochorenia do myelodysplastického syndrómu (MDS) alebo sekundárnej akútnej myeloidnej leukémie (AML) je možná pri Ph+ a Ph– MPN⁽²⁾.

Ph negatívne MPN

Medzi Ph– MPN sú zaradené neoplázie bez *BCR-ABL1* fúzie. Táto skupina zahŕňa pravú polycytémiu (PV), esenciálnu trombocytémiu (ET) a primárnu myelofibrózu (PMF). WHO klasifikácia MPN je založená najmä na morfológických

zmenách v kostnej dreni a počte krvných elementov v periférnej krvi. Trombocytóza je hlavným znakom pre ET, ale býva prítomná aj pri iných MPN. Erytrocytóza je diagnostickým znakom pre PV a leukocytóza sa vyskytuje u pacientov s pokročilým štádiom ochorenia. Pacienti s PMF majú často kombináciu prejavov, avšak v signifikantnej časti sa vyskytuje najmä anémia. Na diferenciálnu diagnostiku uvedených ochorení sa v rutinnej praxi využíva detekcia somatických mutácií na molekulovej úrovni. Vo viac ako 95 % prípadov sú za vznik MPN zodpovedné *driver* mutácie v génoch *JAK2*, *CALR* a *MPL*⁽³⁾. Štandardným postupom pri určení diagnózy je detekcia mutácie *JAK2* (V617F) a v prípade negativity sa pokračuje detekciou mutácií *JAK2* v exóne 12 – 15. Pozitívny nález je v takomto prípade indikátorom PV. V prípade negatívneho výsledku pokračuje vyšetrenie analýzou génu *CALR*, v ktorom sa vyskytujú najmä *frame-shift* (FS) mutácie posledného exónu, čo má za následok vznik alternatívneho C-konca v peptide. Ak nie sú prítomné ani mutácie v géne *CALR*, vyšetrenie je v poslednom kroku zamerané na detekciu *MPL* (W515L/K). Prítomnosť somatických mutácií v génoch *CALR* a *MPL* je v priamej súvislosti s diagnózami ET a PMF, ktorých patogenéza postihuje megakaryocytovú líniu buniek. ET súvisí najmä s megakaryocytovou proliferáciou a PMF s diferenciáciou – myelodyspláziou⁽⁴⁾. Na základe poslednej WHO reklasifikácie myeloproliferatívnych neoplázií

z roku 2016 bolo nevyhnutné zahrnúť do rutinej molekulogenetickej diagnostiky ďalšie gény pre správne zaradenie pacientov do jednotlivých skupín, určenie liečebnej stratégie a prognózy, monitorovanie MRD (minimálna reziduálna choroba) a na posúdenie zaradenia do transplantáčného programu. Požadované gény zahŕňajú *ASXL1*, *IDH1/IDH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *TET2* a *EZH2*⁽⁵⁾. Vhodnou alternatívou simultánneho vyšetrenia viacerých génov, resp. vybraných exónov a hotspotových oblastí bolo zavedenie panelového NGS do rutinej diagnostiky myeloproliferatívnych neoplázií.

Next generation sequencing (NGS)

Najčastejšie využívaným postupom pri NGS je tzv. *sequencing by synthesis* (SBS) od firmy Illumina. Proces spočíva v tom, že počas cyklu DNA syntézy sú fluorescenčne značené dNTP inkorporované do templátového vlákna pomocou DNA polymerázy. V každom cykle je daný nukleotid identifikovaný prostredníctvom excitácie fluorofóru. Pred samotným sekvenovaním je potrebná príprava tzv. knižnice. Základným princípom prípravy knižnic je fragmentácia DNA, prípadne cDNA s následnou modifikáciou 3' a 5' koncov vlákien, na ktorých dochádza k ligácii adaptérov. K jednotlivým vzorkám sa počas prípravy pridáva unikátna kombinácia adaptérov, čo umožňuje multiplexovú analýzu (do 96 vzoriek). Fragmenty DNA s viazanými adaptérmi sú následne amplifikované pomocou PCR reakcie a prečistené podľa príslušného protokolu⁽⁶⁾. Na tvorbu klastrov je potrebná hybridizácia amplifikovaných knižnic na flow-cell. Na jej povrchu sa nachádzajú oligonukleotidy komplementárne k sekvenciám adaptérov. Po hybridizácii nastáva tvorba klastrov prostredníctvom mostíkovej amplifikácie, počas ktorej DNA polymeráza vytvorí komplementárne vlákno k templátu. Pôvodné vlákno je odmyté a ponechané je nové, reverzné. Na konci reverzného vlákna sa nachádza adaptérová sekvencia, pomocou ktorej sa nové vlákno prichytí na komplementárny oligonukleotid na povrchu flow-cell. DNA polymeráza tak vytvorí

nové komplementárne vlákno identické s pôvodným templátom. Vzniknutá dsDNA je denaturovaná, a tak sa môže samostatne každé vlákno opäť prichytiť adaptérom na príslušný oligonukleotid (**obrázok 1**). Uvedeným spôsobom vznikajú naraz vo vzorke tisíce klastrov, ktoré sú sekvenované v priebehu 2-3 dní. Prítomnosť konkrétnej bázy vo vlákne DNA je detegovaná pomocou štyroch reverzibilných terminátorov, ktoré sú značené fluoreescenčnými farbivami s rozdielnou emisiou. Sekvenátor (MiSeq System, Illumina) po každom cykle odfotí fluorescenčné signály na flow-cell a po ukončení analýzy poskladá výslednú sekvenciu⁽⁸⁾.

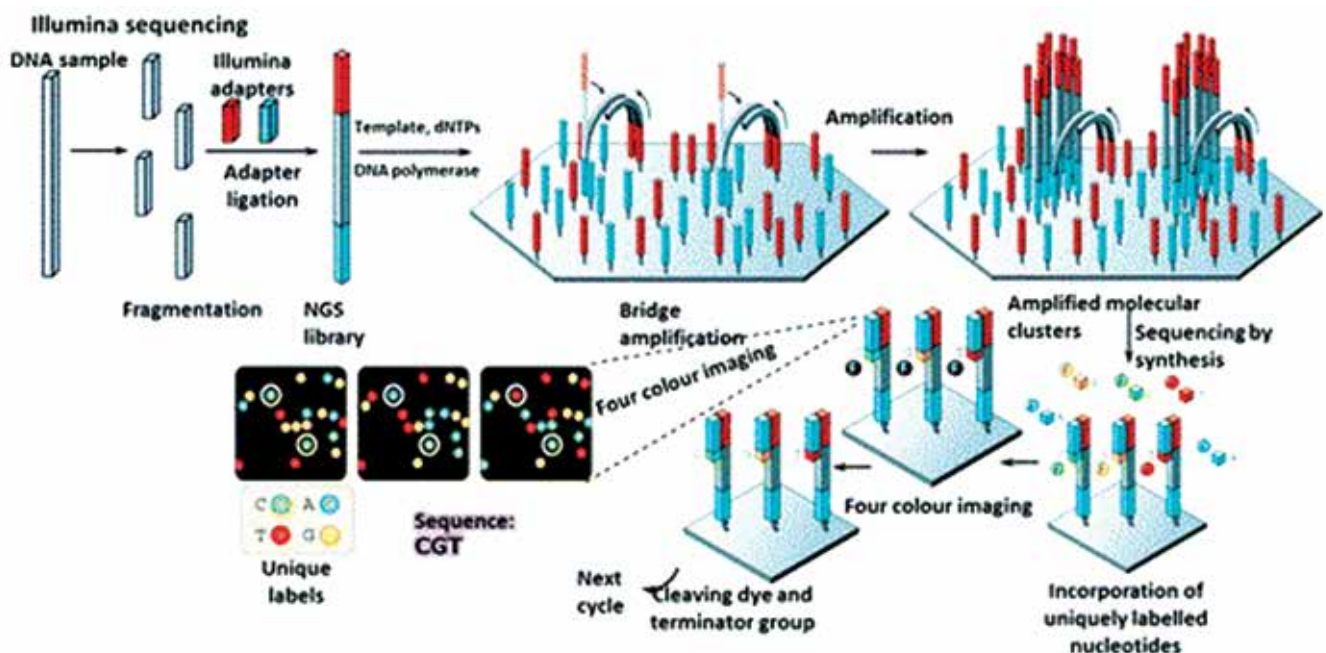
Súbor pacientov

V roku 2018 bolo do rutinej diagnostiky zavedené panelové sekvenovanie TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina. Do súboru bolo zatiaľ zaradených 56 pacientov. Použitým materiálom bola gDNA získaná izoláciou z plnej kostnej drene a periférnej krvi. Do vyšetrenia boli zahrnutí pacienti s diagnózou zo skupiny myeloproliferatívnych neoplázií. Najčastejšie išlo o pacientov nereagujúcich na liečbu s podozrením na prítomnosť mutácie v iných génoch, ako *JAK2*, *CALR* a *MPL*, u pacientov s ťažko definovateľnou diagnózou z dôvodu polyfenotypového prejavu ochorenia alebo v prípade predikcie úspešnosti transplantáčného procesu.

Materiál a metódy

Na oddelení lekárskej genetiky, Medirex, a. s., bolo medzi rutinné vyšetrenia pacientov s MPN zavedené panelové sekvenovanie TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina. Uvedená metóda slúži na detekciu somatických variantov, ktorých výskyt je typický najmä pre akútnu myeloidnú leukémiu (AML), myelodysplastický syndróm (MDS), myeloproliferatívne neoplázie (MPN), chronickú myeloidnú leukémiu (CML), chronickú myelomonocytovú leukémiu (CMML) a juvenilnú myelomonocytovú leukémiu (JMML). Uvedený panel pokrýva 15 génov (exóny) a v 39 génoch zahŕňa hotspotové

Obrázok 1. Schéma mostíkovej amplifikácie⁽⁷⁾



oblasti (**tabuľka 1**). Okrem génov *JAK2*, *CALR* a *MPL* zahŕňa všetky ostatné gény potrebné na diagnostiku MPN podľa najnovšej WHO klasifikácie z roku 2016. Vstupným materiálom je gDNA s koncentráciou 50 ng na reakciu. Použitá bola chémia MiSeq Reagent Kit v3 v kombinácii s nano-flow-cell, čo umožňuje simultánnu analýzu 8 vzoriek. Veľkosť výsledných amplikónov je ~250 bp. Získané výsledky boli hodnotené v softvéroch Finalist Dx, Ingenuity a IGV. Do správy pre klinikov boli uvedené iba sekvenčné varianty s patogénnym a pravdepodobne patogénnym významom, s počtom čítaní aspoň 500x a alelovou frekvenciou nad 5 %.

Výsledky

Pacient 1.

46-ročná pacientka liečená od roku 2009 s diagnózou PV vo FNsP F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici. V roku 2017 progresia ochorenia do sekundárnej myelofibrózy. V marci 2018 na oddelení lekárskej genetiky, Medirex, a. s., bola panelovým NGS detegovaná prítomnosť sekvenčného variantu *JAK2* (V617F) s patogénnym významom a alelovou frekvenciou 50 %. V tom istom mesiaci bola prítomnosť uvedenej mutácie potvrdená metódou real-time PCR s 53 % zastúpením. V apríli 2018 bola pacientka zaradená do transplantáčného programu v Nemocnici sv. Cyrila a Metoda v Bratislave. V tom čase bola kvantita mutovaného *JAK2* už 73 %. V júni 2018 bol prvýkrát vyšetrený chimérizmus po transplantácii. Hodnota pôvodnej autológnej krvotvorby klesla pod 2 % a *JAK2* (V617F) na 0,64 %.

Pacient 2.

49-ročný pacient bol v apríli 2018 odoslaný na genetické vyšetrenie do centrálného laboratória Medirex, a. s., s podozrením na CML. Výsledok analýzy *BCR-ABL1* zlomov bol bez nálezu. V tom istom mesiaci boli pomocou *FISH* vyšetrené gény *MLL*, *CRLF2*, *ABL2* a molekulovou MLPA analýzou gén *IKZF1*. Uvedené vyšetrenia mali negatívny výsledok. U pacienta bol zároveň vyšetrený vstupný panel pre AML, z ktorého pozitívny výsledok mala iba hodnota exprese *WT1* (NCN = 0,05). V máji 2018 bol u pacienta vyšetrený myeloidný NGS panel, pomocou ktorého bola detegovaná

prítomnosť sekvenčného variantu v géne *CSF3R* (T618I) s patogénnym významom. Alelová frekvencia bola 39 %. V septembri 2018 bolo realizované kontrolné NGS vyšetrenie, ktorým bola dokázaná stúpajúca hodnota mutovaného génu až na 48 %. Hladina exprese *WT1* génu mala tiež stúpajúci charakter. U pacienta je podozrenie na relaps.

Pacient 3.

47-ročný pacient liečený v Nemocnici sv. Cyrila a Metoda s diagnózou PV. V roku 2018 prechod do sekundárnej myelofibrózy. V januári 2018 bol vyšetrený vstupný panel pre MPN. Pomocou real-time PCR bola detegovaná prítomnosť mutácie *JAK2* (V617F), kvantita 86 %. U pacienta bol následne vyšetrený myeloidný NGS panel, ktorý potvrdil prítomnosť sekvenčných variantov v génoch *DNMT3A* (R659C) s alelovou frekvenciou 40,2 % a *JAK2* (V617F) s alelovou frekvenciou 60,7 %. U pacienta je zvažovaná alogénna transplantácia.

Diskusia

WHO klasifikácia MPN ochorení z roku 2016 zahŕňa nové diagnostické entity podľa prítomnosti genetických variantov (mutácií) vybraných génov. Diagnostické kritériá boli rozšírené vďaka zavádzaniu nových citlivejších metód molekulovej diagnostiky a cielemu sekvenovaniu klinicky relevantných génov. Ďalšie mutácie v génoch, ktoré sa podieľajú na epigenetickej regulácii a signalizácii, zohrávajú kľúčovú úlohu v patogenéze MPN. Mutácie v epigenetických regulátoroch sú zapojené do iniciácie a progresie ochorenia. Cieľom práce bolo zavedenie panelového NGS do rutinej molekulovo-genetickej diagnostiky týchto ochorení. Na analýzu pacientov bol použitý TruSight Myeloid Sequencing Panel od firmy Illumina, ktorým možno analyzovať 54 génov v jednej reakcii. Pomocou uvedeného vyšetrenia sú zachytené aj mutácie s prediktívnym významom pre prognózu a prežívanie pacientov, ale aj na posúdenie úspešnosti transplantáčného procesu. Zavedenie panelového NGS má v rutinej diagnostike významné postavenie, pretože umožňuje aj detekciu takých mutácií, ktoré by pri bežnom vyšetřovacom algoritme vôbec neboli zachytené. Pri PMF sa v čase diagnózy vyskytujú iné mutácie ako v *JAK2*, *CALR* a *MPL* vo viac ako 50 %. Pri PV a ET sú ďalšie mutácie detegované približne v 10 % prípadov.

Tabuľka 1. Prehľad génov v TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina⁽⁹⁾

Gén	Cieľová oblasť / exón	Gén	Cieľová oblasť / exón	Gén	Cieľová oblasť / exón	Gén	Cieľová oblasť / exón
ABL	4-6	DNMT3A	celý	KDMT6A	celý	RAD21	celý
ASXL1	12	ETV6/TEL	celý	KIT	2, 8-11, 13, 17	RUNX1	celý
ATRX	8-10; 17-31	EZH2	celý	KRAS	2-3	SETBP1	4 (časť)
BCOR	celý	FBXW7	9-11	MLL	5-8	SF3B1	13-16
BCORL1	celý	FLT3	14, 15, 20	MPL	10	SMC1A	2, 11, 16, 17
BRAF	15	GATA1	2	MYD88	3-5	SMC3	10, 13, 19, 23, 25, 28
CALR	9	GATA2	2-6	NOTCH1	26-28, 34	SRSF2	1
CBL	8-9	GNAS	8-9	NPM1	12	STAG2	celý
CBLB	9-10	HRAS	2-3	NRAS	2-3	TET2	3-11
CBLC	9-11	IDH1	4	PDGFRA	12, 14, 18	TP53	2-11
CDKN2A	celý	IDH2	4	PHF6	celý	U2AF1	2, 6
CEBPA	celý	IKZF1	celý	PTEN	5, 7	WT1	7, 9
CSF3R	14-17	JAK2	12-14	PTPN11	3, 13	ZRSR2	celý
CUX1	celý	JAK3	13				

Mutácia v géne *TET2* sa pri PMF vyskytuje v 19 % a *ASXL1* až v 40 % prípadov. Obe sú pri MPN asociované so zlou prognózou⁽¹⁰⁾. Výskyt patogénnych variantov v génoch *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* a *IDH1/2* indikuje u pacientov výrazne skrátený čas prežívania. V prípadoch s dvomi a viac mutáciami je medián dožitia 2,6 roka, pri jednej mutácii 7 rokov a v prípadoch bez mutácií v uvedených génoch je medián prežívania 12,3 roka⁽¹¹⁾. Hlavnou výhodou NGS analýzy je simultánna analýza veľkého množstva DNA s vysokou citlivosťou v porovnaní s klasickým Sangerovým sekvenovaním. Sekvenovaním mnohých génov naraz možno vyšetriť aj viaceré diagnózy, čo značne skraca čas nasadenia vhodnej terapie. NGS analýzou je stanovená aj alelová frekvencia danej mutácie, čo slúži najmä na sledovanie účinku liečby a MRD (minimálna reziduálna choroba). Zatiaľ najväčšou nevýhodou všetkých NGS analýz je veľký objem získaných dát, ktoré musia byť okrem iného vyhodnotené so zreteľom na daný druh ochorenia a pô-

vod zachytenej mutácie (somatická vs germinálna). V neposlednom rade je pri hodnotení dát potrebné brať ohľad aj na etickú stránku a citlivosť získaných informácií o danom pacientovi v súvislosti s diagnózou.

Záver

Sekvenovanie novej generácie sa v rutinej diagnostike používa v čoraz vyššej miere a predstavuje významný nástroj na potvrdenie, resp. vylúčenie viacerých diagnóz v jednej analýze. Detekcia patogénnych variantov v daných génoch má diagnostický a prognostický význam u pacientov s myeloproliferatívnymi neopláziami. NGS vyšetrenie je tiež dôležité na stanovenie klonálneho charakteru ochorenia. Najväčšou výzvou do budúcnosti je zefektívnenie vyhodnotenia veľkého objemu získaných dát a zavedenie štandardného postupu na hodnotenie ich kvality.

LITERATÚRA

1. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood* 2017; 129(12): 1607-161.
2. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2017; 376: 2168-2181.
3. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classica myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017; 129(6): 680-692.
4. Schalling M, Gleiss A, Gisslinger B, et al. Essential thrombocythemia vs. pre-fibrotic/early primary myelofibrosis: discrimination by laboratory and clinical data. *Blood Cancer J* 2017; 7(12): 643-647.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20): 2391-2405.
6. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 251364.
7. Chandran A. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies and Its Application in Chemical Biology. In: *Advancing Development of Synthetic Gene Regulators*. Springer These 2018.
8. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 2016; 107(1): 1-8.
9. <https://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-myeloid.html#gene-list>
10. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *SF3B1*, *SUZ12*, and *TET2* in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 743-755.
11. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014; 28(9): 1804-1810.



Mgr. Lucia Žideková

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

Effect of selected pre-analytic factors on immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors and cell proliferation marker Ki-67 in breast carcinomas

Monika Bialešová, Jozef Kuruc

Medicyt, s. r. o., Trenčín

The goal of the work was to study the effects of pre-analytic factors such as freezing, delayed and prolonged fixation on the immunohistochemical expression of following biomarkers in breast carcinoma tissue: estrogen receptors, progesterone receptors and cell proliferation marker Ki-67. Then we compared the data with immunohistochemical results found in standard processed samples of the same biological material. Research was performed on a set of 50 tissue excisions of mammary carcinomas. The outputs were compared with analogous parameters of similar samples processed by standard histotechnology methodology. Proven statistically, significant deviations from the standard were as follows: after the tissue freezing, we observed a significant reduction in the quantitative and qualitative immunohistochemical expression of all three antibodies. In the tissue samples with the 2-hour delayed fixation, we saw a significant decrease only in the intensity of the staining (expression quality) of all three biomarkers. In the case of the 7-day prolonged fixation, only the quality of the staining (expression) of the cell proliferation marker was significantly reduced. Some of our findings appear to have significant clinical effects in some specific situations.

Keywords: freezing, delayed fixation, prolonged fixation, immunohistochemical analysis, biomarkers, breast carcinoma

Vplyv vybraných predanalytických faktorov na imunohistochemickú analýzu estrogénových receptorov, progesterónových receptorov a markeru bunkovej proliferácie Ki-67 v karcinómoch prsníka

Cieľom práce bolo sledovať vplyvy predanalytických faktorov ako zmrazenie, oneskorená a predĺžená fixácia na imunohistochemickú expresiu biomarkerov estrogénových receptorov, progesterónových receptorov a markeru bunkovej proliferácie Ki-67 v tkanivách karcinómov prsníka a následne získané údaje objektívne porovnať so štandardne spracovanými vzorkami rovnakého biologického materiálu. Výskum sme realizovali na súbore 50 tkanivových excízií karcinómov mliečnej žľazy, výstupy sme následne porovnali s analogickými parametrami podobných vzoriek spracovaných štandardnou histotechnologickou metodikou. Preukázané štatisticky významné odchýlky od štandardu boli nasledovné. Vplyvom mrazu sme zaznamenali signifikantné zníženie kvantitatívnej aj kvalitatívnej imunohistochemickej expresie všetkých troch protilátok. V tkanivových vzorkách exponovaných 2-hodinovej oneskorenej fixácii sme preukázali signifikantný pokles iba intenzity farbenia (kvality expresie) všetkých troch biomarkerov. V prípade 7-dňovej predĺženej fixácie sa významne znížila len kvalita farbenia (expresie) protilátkou proti antigénu Ki-67. Niektoré naše zistenia sa javia, že by v niektorých špecifických situáciách mohli mať aj významné klinické dôsledky.

Kľúčové slová: zmrazenie, oneskorená fixácia, predĺžená fixácia, imunohistochemická analýza, biomarkery, marmárny karcinóm

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 13 – 19

Introduction

Breast cancer is generally regarded as the most worldwide common oncological disease with a high mortality rate. In the past the disease occurred mostly in older women aged around 60. In recent 20 years, the occurrence of breast cancer has risen in younger women aged 25-45, which represents an increase of more than 30%. This issue also includes the male population, but the incidence in males is so low that we may consider it to be still rare. Despite the facts presented, diagnostics and especially the treatment of this

disease has progressed over the last decade. In an effort to provide patients with the longest survival and highest quality of life, it is desirable to continually gain new insights and innovations in this issue, which we then successfully incorporate into practice. Early disease detection is the main task of screening programs for better prognosis and, ultimately, for lower mortality⁽¹⁾. Immunohistochemistry (IHC) is a laboratory test method that allows us to detect different antigens in the examined tissues, more precisely in cells, on the basis of the specific binding of the antigen to the antibody^(2,3).

Such an analysis helps to accurately define the type of tumor of the mammary gland and consequently it allows the oncologist to indicate a targeted therapy. The key test for breast cancer treatment is the analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and cell proliferation marker (Ki-67). These immunohistochemical stains must be standardized precisely, and therefore even slight deviations from the standard pre-analytical manipulation with a breast tissue may have a negative impact on the results of the monitored parameters⁽⁴⁾.

The object of our interest was to monitor and assess differences in the immunohistochemical expression of ER, PgR and Ki-67 in pre-analytically processed breast cancer tissues compared to breast carcinoma tissues that were treated with well-defined deviations from standard pre-analytical treatment. These deviation from standard included freezing, delayed and prolonged fixation.

Material and methods

The series included 50 female patients with breast cancer, who were clinically indicated and subsequently examined by frozen section (FS) intraoperative method in Medicyt, s. r. o. surgical pathology laboratory Trenčín from 6th December 2017 to 31th May 2018. The age range of the patients was 32-81 years. The processing of all monitored parameters in all patients was anonymous.

From a surgical point of view, the procedures included partial excisions or mastectomies and they were performed at the gynecological and surgical clinic of the Faculty Hospital in Trenčín. For our examinations, we used carcinoma samples obtained from received fresh unfixed mammary surgical tissue.

Four tissue samples (4x2 mm) were obtained from each tumor, and they were subsequently processed by the methods listed below.

The first tissue sample was dedicated for standard histological processing (STD) and biopsy examination. After excision we placed immediately in 10% formalin. After 24 hours of fixation, it was included in conventional histotechnological tissue processing followed by IHC analysis.

The second tissue sample was exposed to frost. Immediately after its excision, we applied it to a cryogel-covered target and we placed it in the cryostat at -25 °C for 30 min. After removal from the cryostat, the sample was allowed to thaw at a room temperature and then it was fixed in 10% formalin. After a 24-hour fixation, we included the sample into standard tissue processing followed by IHC analysis.

The third sample was used to examine the delayed fixation. After excision, the sample was left at room temperature for 2 hours and then we placed it in 10% formalin. After 24 hours fixation, the sample was included into standard processing and IHC analysis.

The fourth tissue sample was exposed an extended fixation. After it was excised by us, we immediately placed it in 10% formalin for 7 days. After the fixation, we included it into the standard tissue processing and IHC analysis as in the abovementioned cases.

The processing was performed as follows. We made 3 tissue sections from a sample, processed by standard histotechnological method, and placed on 3 xylanized slides each

with a control. Subsequently, the sections were stained immunohistochemically for ER, PgR and Ki-67 (one marker per slide). We also produced 3 tissue sections from each frozen, prolonged and delayed fixation sample that were applied to 3 pre-prepared xylanized slides. There were 4 sections on each slide (one from the frozen tissue, the second from the late fixation tissue, the third from the extended fixation tissue and the fourth was the control) (**Figure 1**). IHC analysis of ER, PgR and Ki-67 (one marker per slide) was also performed on individual slides. Monoclonal antibodies ER (clone EP1, 1:100, Santa Clara, USA, Dako), PgR (clone PgR636, 1:25, Santa Clara, USA, Dako) and Ki-67 (clone MIB-1, FLEX, Ready-to-Use, Santa Clara, USA, Dako) were used. The positive controls included tissue of the uterine cervix (ER and PgR) and appendix vermiformis (Ki-67) as recommended by NordiQC (**Figure 2**).

IHC analysis was performed in the automated VENTANA system. For each excision, conventional hematoxylin eosin (HE) stained section was also made (**Figure 3**). All sections were examined by surgical pathologist who used the template protocol for evaluating the results of tested biomarkers in breast cancer patients (the protocol developed by the College of American Pathologists)⁽⁵⁾. When a situation arose that the carcinoma was not captured in the section (e.g., the carcinoma tissue was exhausted), the sample was evaluated as non-diagnostic.

For the statistical analysis, in accordance with our aim to test the hypothesis of the influence of the pre-analytical factors on the expression of the biomarkers which we studied, we selected a pair test because it is a set of the same samples that have been subjected to several different conditions. We expressed the degree of expression both quantitatively and qualitatively. We have substituted the categorical variables for the nominal ones with the purpose to quantify the change in the degree of expression due to a specific pre-analytical factor. Using Shapiro-Wilk's test, we verified the normality of the data distribution according to Gaussian's normal distribution. Since none of the data sets showed normal distribution, we selected a nonparametric Wilcoxon pair test with a p-value of ≤ 0.05 for hypothesis testing.

Figure 1. Scheme for the preparation of tissue for IHC analysis

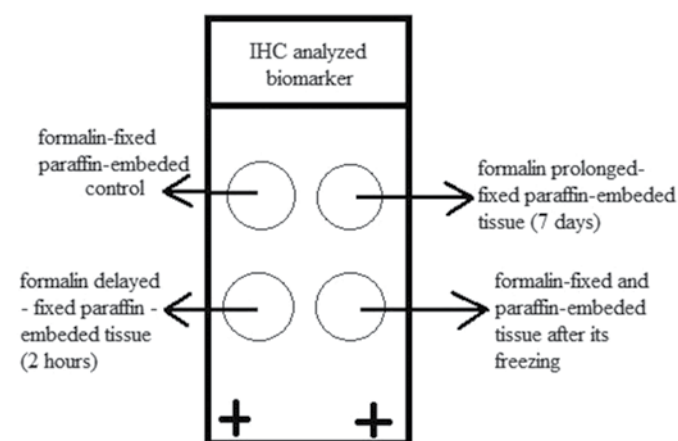


Figure 2. Immunohistochemical analysis of monitored biomarkers ER, PgR and Ki-67 (magnification 630x)

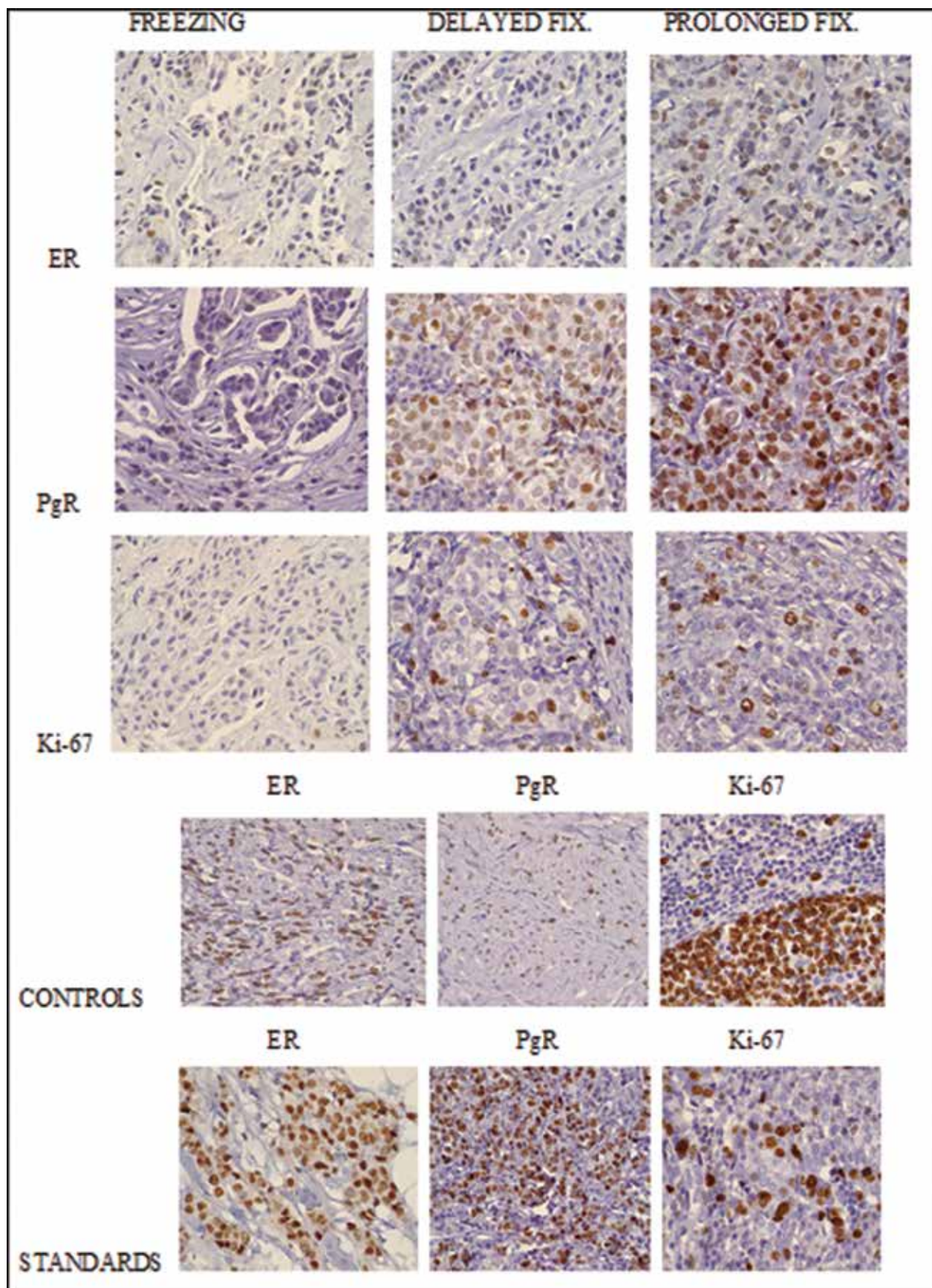


Figure 3. The mounted slides with stained sections



Results

Our statistical analysis showed following results:

- Significant decrease in quantitative and qualitative expression of ER (quantity: $p = 0.0001$, quality: $p = 0.0000$), PgR (quantity: $p = 0.0036$, quality: $p = 0.0002$) and Ki-67 (quantity: $p = 0.0024$; quality: $p = 0.0002$) due to freezing.
- With delayed fixation, we observed a significant reduction in only the qualitative expression in all biomarkers studied (ER: $p = 0.0000$; PgR: $p = 0.0102$; Ki-67: $p = 0.0128$). Quantitative expression showed a non-significant decrease in ER ($p = 0.0801$) and PgR ($p = 0.8415$), Ki-67 in this group did not differ from the standard, i.e., it was without change ($p = 0.8337$).
- Significant effect of prolonged 7-day fixation was observed only in a form of decreased qualitative expression of Ki-67 ($p = 0.0030$). An increased quantitative expression of ER ($p = 0.4009$), PgR ($p = 0.4179$) and Ki-67 ($p = 0.3125$) was also detected, but it was not significant. In the quality of ER expression ($p = 0.0688$), we also noticed a significant decrease. The quality of PgR expression ($p = 0.5755$) did not differ from the standard (Table 1).

Discussion

Current knowledge of an effect of freezing on the IHC expression of ER, PgR and Ki-67 is still scarce, which stimulated our effort put into this study. Previously, Argon et al. (2014) studied the effect of freezing on the quantitative and qualitative immunoprofile of ER, PgR and HER2 biomarkers in breast cancer. Their study included 53 cases of breast cancer with intraoperative histologic consultation followed by processing of the same tissue for conventional histology and for IHC examination of ER, PgR and HER2. The sample used for comparison was also taken from the same tissue, subjected to standard processing, and analyzed by the same IHC method. Pre-analytical influence of freezing was not studied. The change in the quantity of ER expression in the investigated samples compared to the standard was not demonstrated in 42 cases. On the contrary, in 10 cases it was lower and in one case it was higher. The quality of ER expression was the same in 46 cases, 6 cases showed lower expression and in one case the expression was higher. Changes in the quantity of PgR expression were not present in 44 cases, but in 9 samples the authors observed a decreased expression. The quality of PgR expression in 47 patients was unchanged in comparison with the standard and 6 cases showed lower expression. The differences in the expressions of both biomarkers between frozen and non-frozen tissue samples were evaluated as statistically significant for both quantity and quality⁽⁶⁾. In our study, we recorded a 2.5-fold increase of cases with reduced expression (25 cases), a 6-fold rise of cases with quantitatively increased expression (6 cases), and a 2.4-fold decrease of cases without change (19 cases). Regarding quality of expression, our series showed a 5.6-fold increase of cases with decreased expression quality (34 cases), and also 2 times more cases with increased expression quality (2 cases) and up to 15 times fewer cases without change (3 cases). When compared to our outcomes, when determining the quantity of PgR expression, we have detected 1.5 times more cases with reduced expression (14 cases), and 1.4 times less cases without expression change (14 cases). As Argon et al. observed no case with an increase in PgR expression, we do not have a correlation to our 5 cases. In terms of quality, we detected a 3.5-fold increase of cases with reduced PgR expression (21 cases) and a 9.4-fold decrease in cases without changing the quality expression (5 cases). They also did not record any case with an increased quality of PgR expression due to freezing, in contrast with 2 recorded cases in our study⁽⁶⁾. In a further comparison with Argon et al. study we saw significant differences

Table 1. Results of statistical analysis of the influence of selected pre-analytic factors on the quantitative and qualitative expression of ER, PgR and Ki-67

	ER		PgR		Ki-67	
	Quantity	Quality	Quantity	Quality	Quantity	Quality
FREEZE	↓	↓	↓	↓	↓	↓
DELAYED FIXATION	(non-signif. ↓)	↓	(non-signif. ↓)	↓	(no change ↓)	↓
7-DAY FIXATION	(non-signif. ↑)	(non-signif. ↓)	(non-signif. ↑)	(no change ↑)	(non-signif. ↑)	↓

Blue and red arrows mean increase and decrease, respectively

in the results especially in the number of cases with reduced ER and PgR expression. It is difficult to explain these differences exactly. One reason could be the effect of the different cryogel composition that was in direct contact with tissues during the rapid intraoperative examinations. Because they did not report the exact size of tissue in the study (the thickness of tissue excisions determined by rapid intraoperative biopsy - RIOB), we can suppose that our investigated excisions affected by frost were thicker. Larger thickness of our tissue excisions could result in slower/insufficient penetration of the fixative in the already thawed sample and thus autolytic processes could start. This process could cause alteration of ER and PgR antigenicity of our material. The authors also did not report the exact time exposure of frost to the tissue. We assumed that tissue sent to RIOB must be examined within 15 minutes. If it was immediately thawed after FS, the time exposure of frost to tissue was about half the time shorter compared to us. An indirect factor to be taken into account is the stagnation of pre-prepared sections prior to the IHC analysis itself. Equipment of our laboratory at the time of the research did not allow a prompt IHC analysis of the research specimens. Our pre-prepared sections were often analysed more than a week after set up of tissue-cut slides. Routine (standard) IHC examinations were preferred for reason of quick diagnosis in the patients. Also, Downsett et al. (2011) reported in their study as one of the factors negatively impacting on expression of Ki-67 the extended exposure of the sections on air at room temperature, before the IHC analysis⁽⁷⁾. In spite of the different biomarkers we observed, we could, to a certain extent, accept this factor as having a possible negative effect on the expression of antibodies. Another potential factor could be the histological heterogeneity of the tumor tissue itself in individual tissue excisions.

Mengel et al. (2002) performed an extensive inter-laboratory study of 1-minute exposure to freezing (liquid nitrogen) of various tissue types inserted into the cryogel for expression of Ki-67. 172 laboratories were integrated with 5,160 samples analysed from 30 different tissue sample types. The proliferation index of frozen tissue samples that were subsequently thawed for 30 minutes and immersed into non-buffered formalin was significantly lower compared to the same type of tissue sample fixed immediately in un-buffered formalin without freezing. The complex output of frost effect monitoring on the quantitative and qualitative expression of ER, PgR and Ki-67 represents a significant shift in all monitored parameters towards the STD⁽⁸⁾. The influence of frost on the tumor tissue itself in the cryodestruction therapy process was described by Babaian et al. (2008). The consequences can be applied to all three studied biomarkers. They describe the formation of ice extracellular crystals with the induction of a hyperosmotic environment, which leads to the transfer of water from the cell, its shrinkage and the destruction of the intracellular matrix. At temperatures below -15 °C, intracellular ice is also formed, which expands, destroying the cell surface as well as individual cellular structures, including lysosomes, which is associated with the release of the enzymes present. Damage also occurs in the process of defrosting of the tissue. In the body, the damaged cells are removed using the immune system⁽⁹⁾. Considering these

facts, we suppose that in our study the damage of cellular structures, including lysosomes, followed by releasing of enzymes, could lead to autolysis and thus to the change/loss of the antigenicity.

According to the American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists, delay of the tissue fixation dedicated for the IHC analysis of ER and PgR should not exceed more than 1 hour to avoid its antigenic degradation⁽⁵⁾. For the Ki-67 antigen, we did not find any study which mentions such time-limits for delayed fixation. However, there are several research papers that followed the effects of delayed fixation on ER and PgR expression. Khoury et al. (2009) observed the effect of delayed fixation on the quantitative and qualitative expression of ER and PgR with a delay of 10 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h and 8h in comparison with STD. Since the resected breast tissue from the operating room was transported to the pathology department, 2-5 minutes was taken into account. They found that ER and PgR expression declined with progressive ischemia at room temperature. ER expression analyzed by the clone of the primary antibody 1DE began to decrease after 2 hours and the PgR detected by the PgR636 clone at 1-hour fixation delay, but is statistically insignificant⁽¹⁰⁾. Quite similar results are also reported by Qui et al. (2010). They also compared the ER and PgR expression of the examined samples affected by delayed fixation and STD with the same time lags and at room temperature. They observed that the quantitative and qualitative expression of the SP1 clone of ER decreases with a 1-hour delay in fixation as well as expression of the PgR636 antibody clone, but are non-significant in both. They also observed the effect of delayed fixation with the same conditions on 3 different clones of the primary ER antibody (SP1, 1D5 and 6F11). They found that despite of the fact that expression of the ER clone SP1 already declined with a 1-hour delayed fixation, the overall effect is ultimately lower compared to the other two anti-ER antibody clones. This clone also presented more intense nuclear staining, weaker backgrounds and no cytoplasmic staining compared to clones 1D5 and 6F11⁽¹¹⁾. The results of a study conducted by Kim, et al. (2015) also bring interesting findings. They observed the effects of delayed fixation (cold ischemic time CIT) \leq 3 hours at room temperature and delayed fixation $>$ 12 hours at a controlled temperature of 4 °C on the immunohistochemical expression of ER, PgR and Ki-67. The results showed a significant increase in ER expression in ER-positive tumors, and the increased proliferation index in tumors with original Ki-67 expression $<$ 10% in the set of tissue with delayed fixation longer than 12 hours at 4 °C. These findings were not observed in other studies. On the contrary, they show a decrease in expressions due to delayed fixation. This can be explained by the fact that long CIT ($>$ 12 h) samples were placed in a refrigerator at 4 °C with a short exposure to room temperature, while short CIT (\leq 3) specimens were exposed to room temperature for the entire delayed fixation⁽¹²⁾. Compared to our observations, where we recorded a significant decrease only in the quality of ER, PgR and Ki-67 expressions, we can state that the results are similar in some parameters. Discrepancies can be attributed to the before mentioned stagnation of the prepared sections before IHC analysis with a time difference of more than 7 days, or to the fact that the tumor tissue volume

could show some histological variability. However, differences in the compared studies could also have been due to the different composition of fixative. In the both mentioned studies of the effect of delayed fixation on IHC expression of ER and PgR, the authors used as a fixative solution a 10% buffered formalin. We also used 10% formalin but it was un-buffered. We can assume that a significant decrease in the quality of expression of all three biomarkers studied could be due to the synergistic effect of delayed fixation (and the resulting degradation of antigens or epitopes), together with fixation in 10% un-buffered formalin where the pH is not constant. The negative effect on the quality of expression of 10% un-buffered formalin in this case could rest in its decreasing pH after immersing the tissue in which the degradation of the antigens has already been started due to cold ischemia (delayed fixation). A significant decrease in the quality of expression of individual markers is anticipated as a consequence of degradation at epitope level, not at the level of whole cell. Therefore, we noticed a significant reduction in only the quality of individual expressions. However, we can't exclude the effects of proteolytic degradation with the consequent lowering of pH that could degrade antigenic epitopes.

Prolonged fixation is considered by Clinical Oncology / College of American Pathologists as a factor influencing the decrease of immunoreactivity of ER and PgR expression, but it was not mentioned an exact length of prolonged fixation⁽⁵⁾. We have noticed a relative lack of studies in the available literature in the case of the effect of the prolonged fixation on expression of Ki-67, similarly as in the case of delayed fixation. Yildiz-Aktas et al. (2012) investigated the effect of 96-hour fixation on IHC expression of ER and PgR in mammary carcinoma tumor cells. They compared the results from tumor excisions with results from core-cut biopsies of specific cases. Of the 47 cases, they observed 1 quantitative variation of the result in terms of the appearance of positive ER expression in a 96-hour fixed sample against a standard that did not show any ER expression. In general, only minor non-significant changes in the qualitative and quantitative expression of ER and PgR have been recorded. The authors attributed these changes to the histological heterogeneity of the tumor or intra-observative variability⁽¹³⁾. Against this background, we can consider IHC analysis of samples fixed for 96 hours as valid and equivalent to IHC analysis of tissue samples processed by standard method.

In another study, Arima et al. (2015) observed a non-significant decrease in quantitative and qualitative ER expression in samples fixed for 2 days compared to standard, while the effect of prolonged fixation on Ki-67 expression was shown to be significant (quantitatively decreasing expression with prolonged fixation time)⁽¹⁴⁾. Compared to the results of our study, we can point to some concordance in the findings. Due to the 7-day prolonged fixation, we also noticed a statistically non-significant shift in quantitative and qualitative ER expression both in terms of decreasing quality and increasing quantity. In the occurrence of qualitative expression of PgR, the results of our examinations were unchanged on average and we only noticed a non-significant increase in the quantitative expression of the biomarker. The minimum deviations in our results could again be attributed to histological heterogeneity of tumors or intra-observative

variability. A statistically significant decrease in quality and a non-significant increase in quantity of Ki-67 expression can be attributed to the protein „cross-link“ bonds formed by the effect of the chemical properties. Thus, pre-analytically affected samples could mean in practice, in some (rare) cases, a false decrease in the proliferation index below the critical value of 20% expression, with possible consequences for the patient's treatment. Mengel et al. (2002) also dealt with the effect of 6-hour, 24-hour, 3-day and 7-day prolonged fixation for Ki-67 expression in its extensive inter-laboratory (172 laboratories) study. They performed a total of 5,160 analyzes separately for each tissue specimen in different fixative solutions. Their analyzes show a mild decrease of Ki-67 proliferation index in samples fixed in un-buffered formalin as compared to buffered formalin at 6-hour (29% vs. 30%) and 24-hour fixation (24% vs. 28%). However, after a 3-day fixation, they noticed an increase of 34% vs. 29%. They performed the 7-day fixation only on tissue samples in un-buffered formalin, but they observed again the drop to 30%. They conclude that for a common practice a better choice for analysis of Ki-67 is when the tissue is included in a processing after at least 24-hour fixation in buffered formalin, because the results showed a 4% higher proliferation index Ki-67⁽⁶⁾. In comparison with the results of our study, some discrepancies can be attributed to a significant difference in the histological types of examined tissue. We focused only on the tumor tissue of the mammary gland. Mengel et al. in their studies observed 30 various types of tissues⁽⁶⁾. It should also be kept in mind that our series of 50 samples is substantially smaller than their series with 5,160 analyses. Thus, except of the Ki-67 cell proliferation marker quality expression, we could consider the prolonged fixation of 7 days as clinically insignificant. The results of the IHC analysis of the three markers (ER, PgR and Ki-67) in the tissues pre-analytically affected by prolonged exposure to 10% formalin at room temperature are comparable to those of the same IHC analysis in the standard tissues.

Conclusion

Our results show that freezing has a significant negative impact on the quantity and quality of expression of all three antibodies. The most altered antigen by freezing was ER (EP1), followed by PgR (PgR636) and Ki-67 (MIB1). These findings indicate that the frozen breast cancer tissue is not suitable for further immunohistochemical analysis. This is important for indication of intraoperative examinations in cases with small tumor size. Regarding delayed fixation, we observed a significant decrease in only the qualitative expression (color intensity) of all three biomarkers. Even in the case of delayed fixation, ER appears to be the most alterable marker. The PgR and Ki-67 antibodies were less altered. We conclude that after the delayed fixation the quantitative expression of all three antibodies do not show significant changes and therefore delayed fixation has not a significant impact on managements and treatment of the patients. A significant decrease in only the quality of expression of all three biomarkers suggests that delayed fixation of non-frozen tissue degrades antigens at epitope level. Significant changes in prolonged fixation were noticed only in reduced quality (staining intensity) of the antibody against

the Ki-67 antigen. The changes in immunohistochemical expression in tissues due to prolonged fixation are comparable to standard specimens and therefore we consider prolonged fixation clinically non-significant. We also have to note that in all of the tested biomarkers we observed sporadic variations which were statistically non-significant. However, we think that in rare cases, they could have negative impacts on the treatment of individual patients in real clinical practice. Based on these facts, we believe that correctly defining, standardizing and observing pre-analytical and analytical laboratory procedures in biopsy diagnostics is necessary to constantly emphasize and improve.

REFERENCES

1. Tan PH, Sahin AA. Atlas of Differential Diagnosis in Breast Pathology (Atlas of Anatomic Pathology) 1st Ed. New York : Springer 2017. 625p.
2. Taylor CR, Shi S. Techniques of immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. In Dabbs, DJ, et al. Diagnostic Immunohistochemistry : theranostic and genomic Applications. 4th Ed. Philadelphia: Elsevier 2014: 1-38.
3. Mateička F. Protilátky. In Mateička F, Blažičková S, Bošák V. Imunológia: Pre poslucháčov FZSP. 1. Vyd. Bratislava : Slovak Academic Press 2005: 22-26.
4. Gilcrease Mz. Encyclopedia of Cancer. 3th ed. Berlin : Springer 2011: 3984p.
5. Fitzgibbons PL, Bose S, Chen YY, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. 8th ed. Northfield : College of American Pathologists 2018: 32 p.
6. Argon A, Sener A, Zekioglu O, et al. The Effect of Freezing on the Immunoprofile of Breast Carcinoma Cells. Balkan Medical Journal 2014; 31(4): 335-339.
7. Downsett M, Nielsen TO, A'hern R, et al. Assessment of Ki67 in Breast cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. Journal of the National cancer Institute 2011; 103(22): 1656-1664.
8. Mengel M, Wasielewski R, Wiese B, et al. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. The Journal of Pathology 2002; 198(4): 292-299.
9. Babaian RJ, Donnelly B, Bahn D, et al. Best Practice Statement on Cryosurgery for the Treatment of Localized Prostate Cancer. The Journal of Urology 2008; 180(5): 1993-2004.
10. Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Modern Pathology 2009; 22(1): 1457-1467.
11. Qui J, Kulkarni S, Chandrasekhar R, et al. Effect of Delayed Formalin Fixation on Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer: A Study of Three different Clones. American Journal of Clinical Pathology 2010; 134(5): 813-819.
12. Kim HJ, Lee HB, Yoo TK, et al. The Effect of Cold Ischemic Time on Immunohistochemical Evaluation of Invasive Ductal Carcinoma. Journal of Breast Disease 2015; 3(2): 60-64.
13. Yildiz-Aktas IS, Dabbs DJ, Cooper KL, et al. The Effect of 96-Hour Formalin Fixation on the Immunohistochemical Evaluation of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Expression in Invasive Breast Carcinoma. American Journal of Clinical Pathology 2012; 137(5): 691-698.
14. Arima N, Nishimura R, Osako T, et al. 2015. The importance of tissue handling of surgically removed breast cancer for an accurate assessment of the Ki-67 index. Journal of Clinical Pathology 2015; 68(9): 1-5.



Mgr. Monika Bialešová
 Medicyt, s. r. o., Trenčín
 Legionárska 28, 911 71 Trenčín
 e-mail: bialesova.monika@gmail.com

Imunitná odpoveď v malígnom melanóme – výsledky pilotnej štúdie

Jana Lacová¹, Andrea Janegová^{1,2}

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

²Patologicko-anatomické oddelenie, Fakultná nemocnica v Trnave

Malígný melanóm predstavuje nádor s výraznou heterogenitou nádorových buniek, určujúcich jeho agresívne správanie. Akumulácia mutácií však vedie aj k vzniku neoantigénov, proteínov, ktoré sú schopné vyvolať protinádorovú imunitnú odpoveď u pacienta. Cieľom predloženej pilotnej štúdie bolo posúdiť aktiváciu protinádorovej imunity v rôznych typoch melanocytových lézií kože, zahŕňajúc prípady benígnych komplexných névov, dysplastických névov a povrchovo sa šíriaceho malígneho melanómu aj pokročilého nodulárneho malígneho melanómu. Zamerali sme sa na prítomnosť cytotoxických T-lymfocytov a NK buniek, ktoré sú považované za kľúčové efektorové bunky protinádorovej imunity. V porovnaní s benígnym melanocytovým névom sme v ostatných melanocytových léziách zaznamenali výraznejšiu protinádorovú zápalovú odpoveď charakteristickú vzostupom infiltrácie tkaniva lymfocytmi s predominciou cytotoxických T-lymfocytov. Výrazný vzostup peritumorálne aj intratumorálne prítomných cytotoxických T-lymfocytov sme pozorovali už v dysplastických névoch aj v prípadoch superficiálne sa šíriaceho malígneho melanómu. V prípadoch pokročilého nodulárneho malígneho melanómu bol vzostup peritumorálnych lymfocytov na hranici signifikantnosti, kým intratumorálne lymfocyty signifikantne zvýšené neboli. Imunitná odpoveď zohráva úlohu v procese progresie malígneho melanómu. Pochopenie regulácie imunitnej odpovede môže byť kľúčové v terapii malígneho melanómu v budúcnosti.

Kľúčové slová: malígný melanóm, protinádorová imunita, cytotoxické T-lymfocyty, NK bunky

Immune response in malignant melanoma – results of the pilot study

Malignant melanoma is a tumour with marked heterogeneity of tumour cells, determining its aggressive behaviour. Accumulation of mutations, however, leads to the formation of neoantigens, proteins that are capable of eliciting an antitumour immune response in patients. The objective of the presented pilot study was to assess the activation of antitumor immunity in various types of skin melanocytic lesions, including cases of benign complex nevi, dysplastic nevi and superficial spreading malignant melanoma as well as advanced nodular malignant melanoma. We have focused on the presence of cytotoxic T-lymphocytes and NK cells, which are key effector cells of antitumour immunity. Compared to benign melanocytic nevi, we have seen a more pronounced anticancer inflammatory response in other melanocytic lesions, characterized by increased tissue infiltration by lymphocytes with predominance of cytotoxic T-lymphocytes. A significant increase in both peritumoural and intratumoural cytotoxic T-lymphocytes was observed in dysplastic nevi as well as cases of superficial spreading malignant melanoma. In cases of advanced nodular malignant melanoma, the increase was at the significance limits; intratumoural lymphocytes were not increased. Immune response plays a role in the process of malignant melanoma progression. Understanding the regulation of immune response may be a key point in the therapy of malignant melanoma in the future.

Keywords: malignant melanoma, antitumor immune response, cytotoxic T-lymphocytes, NK cells

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 20 – 24

Úvod

Po kardiovaskulárnych ochoreniach sú onkologické ochorenia druhou najčastejšou príčinou smrti. Hoci sa malígný melanóm nenachádza na popredných priečkach najčastejšie sa vyskytujúcich nádorov, neskorá diagnostika tohto nádoru vedie k zlej prognóze pacienta. Jeho prognóza výrazne závisí od štádia, v ktorom je melanóm diagnostikovaný, preto je veľmi dôležitý jeho včasný záchyt. Na Slovensku v súčasnosti neexistuje spoľahlivý skriningový program podozrivých kožných lézií. Diagnostika je často závislá od všímavosti pacientov, ich rodinných príslušníkov, prípadne všeobecných lekárov. Samovyšetrenie, poznanie vlastných névov, je kľúčové. Vznik malígneho melanómu je sprevádzaný zmenami tvaru, okrajov, farby aj rastového vzoru kožnej pigmentovej lézie.

Každé takéto podozrivé ložisko by mal vyšetriť dermatovenerológ a v prípade potreby nález histologizovať a definitívnu diagnózu by mal potvrdiť patológ. Pri včasných štádiách postačí chirurgická excízia, v prípade zachytenia v neskoršom štádiu, najmä pri prítomnosti vzdialených metastáz, sa už k liečbe pripája aj systémová terapia, prípadne biologická terapia.

Rizikový faktor vzniku tohto typu nádoru predstavuje hlavne ultrafialové žiarenie. Je dokázané, že hlavne intermitentné vystavenie kože slnku a spálenie, sú predispozičnými faktormi vzniku melanómu. K ďalším etiologickým faktorom patrí typ kože, genetické vplyvy, vek a počet névov. Závažná je stúpajúca incidencia tohto tumoru v celej vyspelej Európe. Uvádza sa, že jeho výskyt sa v posledných 30 rokoch

strojnásobil, alarmujúci je aj štvornásobný vzostup mortality za toto obdobie⁽¹⁾.

Malígny melanóm predstavuje nádor s výraznou heterogenitou nádorových buniek, charakteristickú akumuláciou početných mutácií. Aj keď na jednej strane výrazná genetická variabilita malígneho melanómu predurčuje jeho agresívne správanie vzhľadom na vznik nových vlastností a schopnosť vráťane rezistencie na podávanú terapiu, na druhej strane táto výrazná genetická variabilita vedie k vzniku neoantigénov, proteínov, ktoré nie sú vlastné samotnému organizmu a ktoré môžu aktivovať jeho imunitný systém. Protinádorová imunita je v súčasnosti intenzívne študovaná a predstavuje zaujímavú oblasť na identifikáciu nových terapeutických cieľov⁽²⁾. Lieky zasahujúce do aktivácie protinádorovej imunity sa v posledných rokoch stali súčasťou štandardnej liečby pokročilého malígneho melanómu⁽³⁾. Experimentálne je testovaná aj protinádorová vakcinácia, ktorá môže v budúcnosti zmeniť priebeh choroby a prognózu postihnutých pacientov⁽⁴⁾.

Cieľom predloženej práce bolo posúdiť aktiváciu protinádorovej imunity v rôznych typoch melanocytových lézií kože, zahŕňajúc prípady bežných névov, dysplastických névov a malígneho melanómu. Zamerali sme sa na prítomnosť cytotoxických T-lymfocytov a NK buniek, ktoré sú považované za kľúčové efektorové bunky protinádorovej imunity.

Metodika

Základný súbor pilotnej štúdie tvorilo 17 pacientov s melanocytovými léziami kože, ktorým bolo realizované bioptické vyšetrenie a stanovená histopatologická diagnóza. Vyšetrený materiál tvorili archívne prípady vzoriek fixovaných formalínom a zaliatych v parafíne (FFPE). Získaný materiál pochádzal z archívu Ústavu patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Bratislave z rokov 2015 – 2017.

Pacienti boli rozdelení do štyroch skupín:

- pacienti s benígnymi komplexnými (zmiešanými) névami (5 pacientov)
- pacienti s dysplastickými (Clakovými) névami (4 pacienti)
- pacienti so superficiálne sa šíriacim melanómom (SSM) (4 pacienti)
- pacienti s pokročilým nodulárnym malígnym melanómom s prítomnými vzdialenými metastázami (NMM) (4 pacienti)

Dostupné vzorky boli štandardne histopatologicky spracované a farbené hematoxylínom a eozínom s následným histopatologickým hodnotením podľa aktuálne publikovaných WHO štandardov.

Vzorky boli následne imunohistochemicky zafarbené na prítomnosť CD8 + cytotoxických T-lymfocytov a CD56 + NK buniek; odparafínované rezy boli krátko inkubované v destilovanej vode s 0,5 % roztokom peroxidu vodíka. Následne sme vzorky preniesli do PBS (fyziologického roztoku puľovaného fosfátmi 10 mM, s 0,5 % BSA, 0,005 % Tween, pH 7,2), kde boli inkubované 20 minút. Vzorky boli revitalizované vo vodnom kúpeli s použitím Dako PT Link (Agilent, Santa Clara, California) pri pH 8 a následne inkubované počas 1 hodiny pri laboratórnej teplote s roztokmi primárnych protilátok

riedených v roztoku Antibody dilutant (Agilent, Santa Clara, California). Použité boli nasledujúce primárne protilátky: anti-CD8 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) ready to use, riedená 1 : 2 a anti-CD56 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) ready to use, riedená 1 : 2. Po prepláchnutí 3x 5 minút vo fyziologickom roztoku PBS boli následne rezy inkubované 40 minút s komerčným polymérom proti králičím a myšacím proteínom konjugovaným s chrenovou peroxidázou Envision (Agilent, Santa Clara, California) a po opakovanom prepláchnutí 3x 5 minút vo fyziologickom roztoku PBS bola reakcia vyvolaná inkubáciou s Vector-VIP (Vector Laboratories, Burlingame, USA) počas 5 minút. Preparáty boli následne krátko dofarbené hematoxylínom.

Expresia vybraných markerov bola hodnotená samostatne okolo nádorovej lézie (peritumorózne) a vnútri nádorovej lézie (intratumorózne) semikvantitatívne nasledovne:

- bunky neboli prítomné (DPS skóre 0)
- + bol prítomný slabý a nepravidelný infiltrát pozitívnymi bunkami (do 50 na zorné pole 400x) (DPS skóre 1)
- ++ bol prítomný pravidelný infiltrát pozitívnymi bunkami (50 – 100 na zorné pole 400x) (DPS skóre 2)
- +++ bol prítomný výrazný difúzný pravidelný infiltrát pozitívnymi bunkami (viac ako 100 na zorné pole 400x) (DPS skóre 3)

Údaje sme následne štatisticky spracovali. Miera infiltrácie tkaniva príslušným typom imunokompetentných buniek je vyjadrená ako priemer ± štandardná chyba merania. Normalita hodnôt bola overená použitím D'Agostino Pearson omnibus normality testu. Rozdiely medzi skupinami boli analyzované pomocou testu neparametrického Mannovho-Whitneyho testu. Hodnoty $p < 0,05$ boli posudzované ako signifikantne významné.

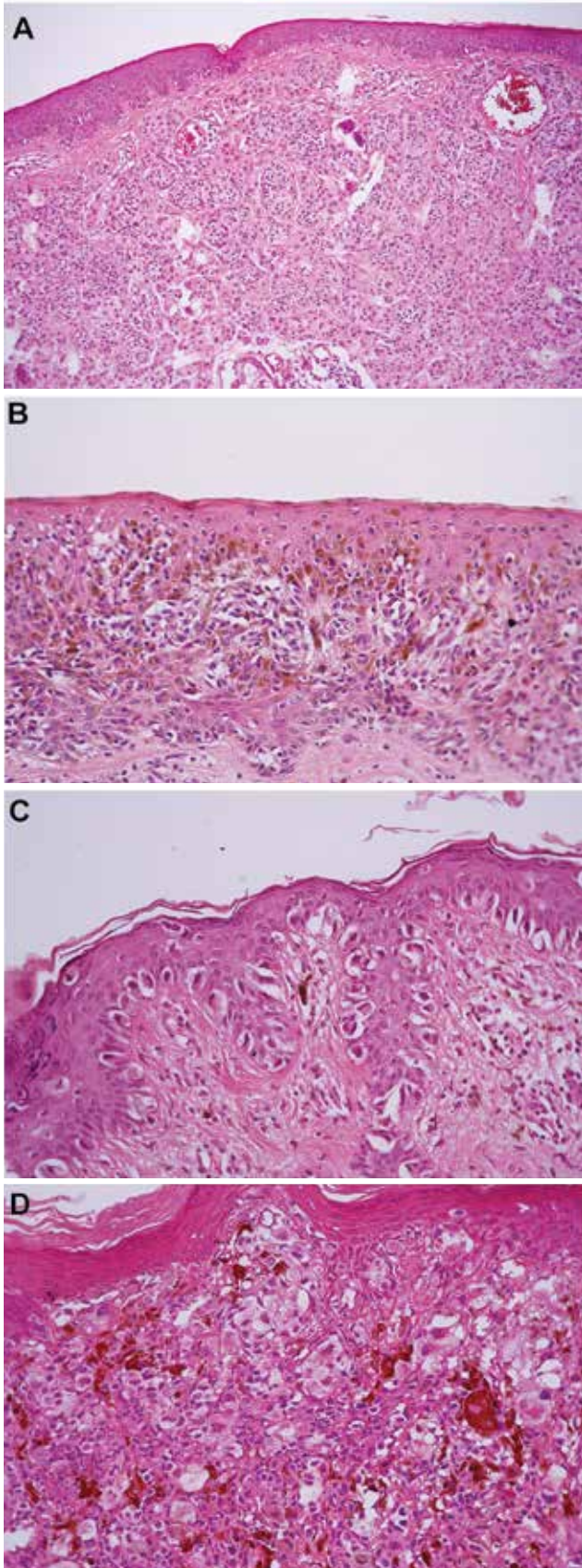
Výsledky

V prípadoch benígneho komplexného melanocytového névu sme pozorovali len slabú a nepravidelnú infiltráciu CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi v okolí lézie, v žiadnom prípade neboli zápalové bunky prítomné vnútri melanocytových hniezd. V 4 prípadoch sme nepozorovali žiadne CD56+ NK bunky peritumorózne ani intratumorózne, v 1 prípade bol prítomný slabý pravidelný infiltrát CD56+ NK bunkami peritumorózne.

V porovnaní s benígnym melanocytovým névom sme v prípadoch dysplastického névu aj malígneho melanómu zaznamenali výraznejšiu protinádorovú zápalovú odpoveď charakteristickú vzostupom infiltrácie tkaniva lymfocytmi (**obrázok 1**).

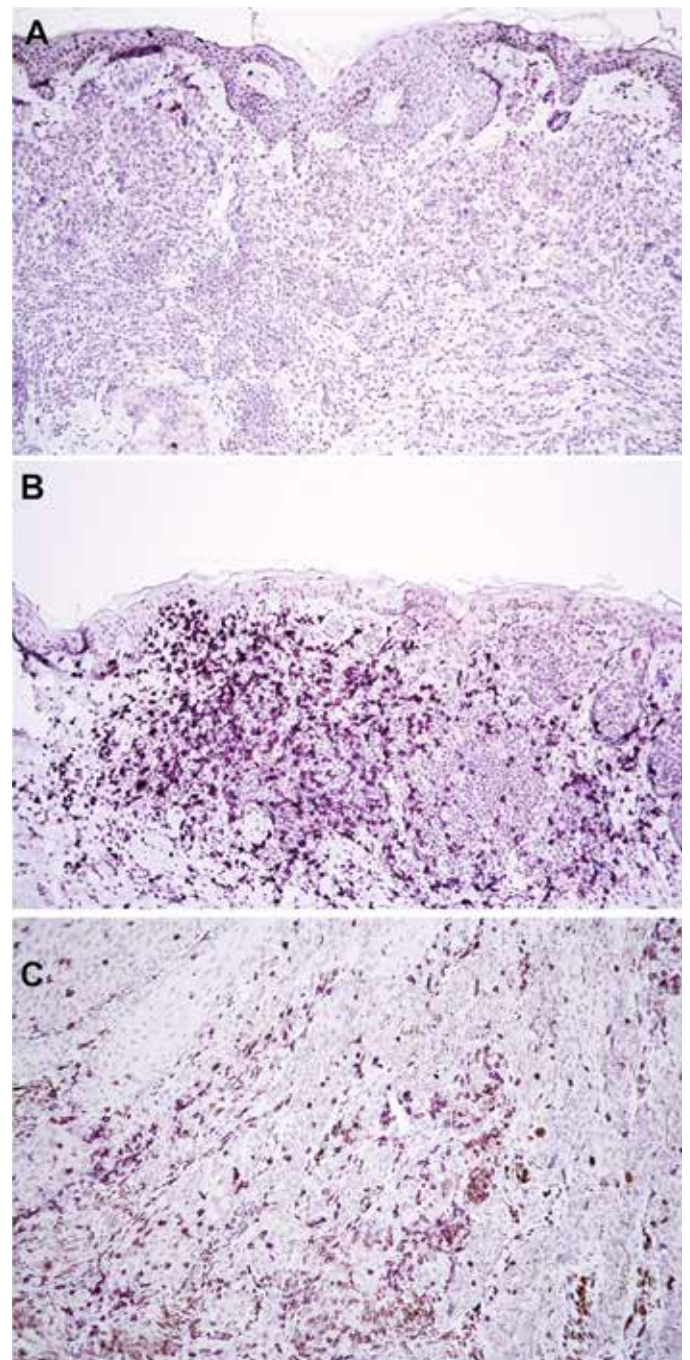
Pozorovali sme signifikantný vzostup intraléziivo aj periléziivo prítomných CD8 pozitívnych cytotoxických T-lymfocytov (**obrázok 2**) v dysplastickom néve (s hodnotou skóre $2,25 \pm 0,48$, resp. $2 \pm 0,41$) aj v povrchovo sa šíriacom malígnom melanóme (s hodnotou skóre $2,5 \pm 0,29$) v porovnaní s benígnym melanocytovým névom (s hodnotou skóre $0,4 \pm 0,24$, resp. $1,75 \pm 0,75$). V prípadoch pokročilého nodulárneho malígneho melanómu bol tento vzostup v porovnaní s benígnym névom peritumorózne na hranici signifikantnosti (s hodnotou skóre $2 \pm 0,41$), vzostup intratumorózných lymfocytov signifikantný nebol (**obrázok 3, 4**).

Obrázok 1. Protinádorová zápalová odpoveď v melanocytových léziách kože. V porovnaní s benígnym melanocytovým névom (A) sme v prípade dysplastického névu (B) aj superficiálneho malígneho melanómu (C) a pokročilého nodulárneho malígneho melanómu (D) zaznamenali výraznejšiu protinádorovú zápalovú odpoveď charakteristickú vzostupom infiltrácie tkaniva lymfocytmi.

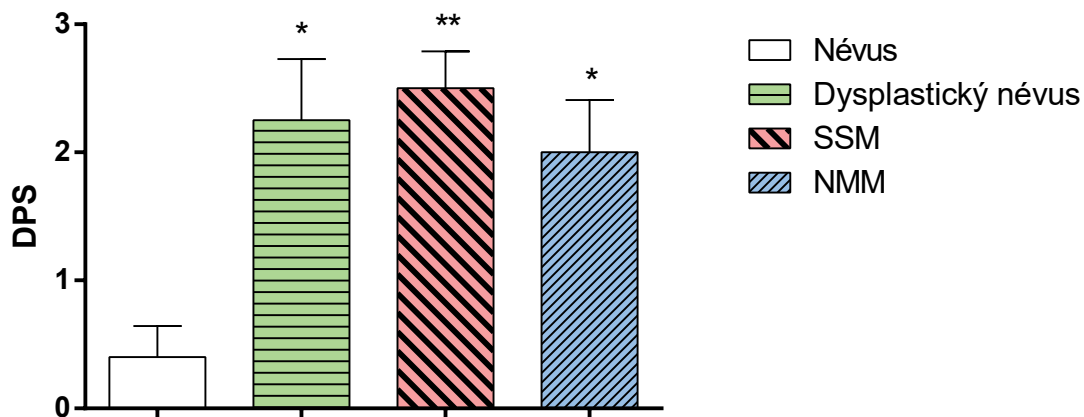


CD56+ NK bunky peritumorózne aj intratumorózne nevykazovali štatisticky významný rozdiel medzi skupinami, len v prípade dysplastického névu sme pozorovali vzostup (s hodnotou $1,25 \pm 0,4787$), ktorý bol v porovnaní s benígnym komplexným névom (s hodnotou $0,4 \pm 0,4$) na hranici významnosti. V prípadoch superficiálne sa šíriaceho melanómu (s hodnotou $0,67 \pm 0,33$) a pokročilého nodulárneho melanómu (s hodnotou $0,5 \pm 0,29$) sa infiltrácia NK bunkami neodlišovala od prípadov benígnych komplexných névov (obrázok 5).

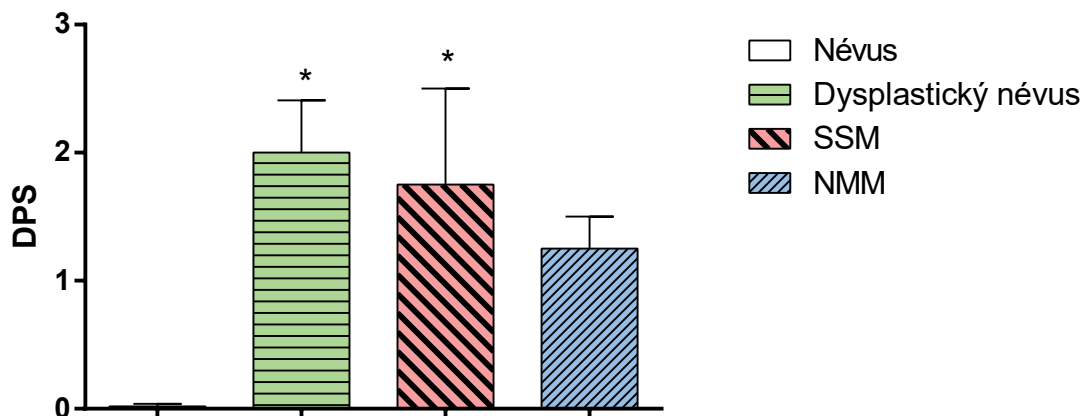
Obrázok 2. Infiltrácia tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi. V benígnych névoch (A) sme pozorovali minimálnu alebo žiadnu infiltráciu tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi. Tá výrazne stúpla v dysplastických névoch (B), menej výrazný vzostup sme pozorovali v prípade pokročilého nodulárneho malígneho melanómu (C). IHC-Px, CD8, Vector-VIP (fialová farba), 200x.



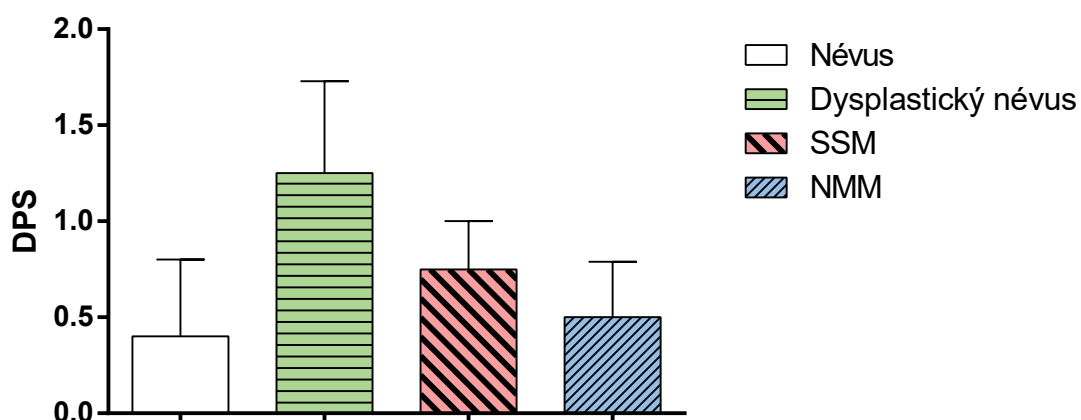
Obrázok 3. Infiltrácia tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi okolo melanocytovej lézie. Pozorovali sme signifikantný vzostup CD8 pozitívnych cytotoxických T-lymfocytov v dysplastickom néve ako aj v povrchovo sa šíriacom a pokročilom nodulárnom malígnom melanóme v porovnaní s benígnym melanocytovým névom.



Obrázok 4. Infiltrácia tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi vnútri melanocytovej lézie. Pozorovali sme signifikantný vzostup CD8 pozitívnych cytotoxických T-lymfocytov v dysplastickom néve aj v malígnom melanóme šíriacom sa povrchovo v porovnaní s benígnym melanocytovým névom. V pokročilom nodulárnom malígnom melanóme tento vzostup signifikantný nebol.



Obrázok 5. Infiltrácia tkaniva CD56+ NK bunkami. NK bunky nevykazovali štatisticky signifikantný rozdiel medzi skupinami, len v prípade dysplastického névu sme pozorovali vzostup, ktorý bol v porovnaní s benígnym komplexným névom na hranici signifikantnosti.



Diskusia

Protinádorová imunita je veľmi dôležitá súčasť obranyschopnosti organizmu pri vznikajúcich nádoroch. Má viacero efektorových zložiek, kľúčovú úlohu zohráva špecifická bunková imunita.

Výsledky našej pilotnej štúdie poukazujú na vzostup infiltrácie tkaniva CD8+ cytotoxickými T-lymfocytmi vnútri aj v okolí melanocytových lézií, a to už v prípadoch dysplastického névu. Minimálna, prípadne žiadna infiltrácia nebola pozorovaná v okolí benígneho komplexného névu. Zaujímavé

zistenie je, že v prípadoch pokročilého nodulárneho melanómu pozorujeme nižšiu úroveň infiltrácie CD8+ cytotoxickými T-lymfocyty. Podobné, ale menej výrazné výsledky sme pozorovali aj v prípade CD56+ NK buniek, kde výsledky neboli štatisticky signifikantné.

Podľa Park et al.⁽⁵⁾ je prítomnosť lymfocytov v malígnom melanóme priaznivý prognostický faktor, ale klinickopatologický význam intra- a peritumorálnych lymfocytov ostáva nejasný. Autori pozorovali, že vysoká infiltrácia lymfocyty, najmä peritumorálne, bola asociovaná s nižším gradom nádoru podľa Clarka a menšou hrúbkou podľa Breslawa. U týchto pacientov bolo tiež pozorované dlhšie prežívanie. V prípade analýzy subtypov melanómu neboli dokázané žiadne signifikantné rozdiely. To je v súlade aj s našimi pozorovaniami.

Naopak, v štúdií Rahbar et al.⁽⁶⁾ sa u pacientov s primárnou formou kožného melanómu ukázala pozitívna korelácia medzi hrúbkou a štádiom nádoru a infiltráciou cytotoxickými T-lymfocyty. Autori však nehodnotili samostatne rôzne histologické typy malígnych melanómov so zameraním na progresiu choroby. Skúmanie prítomnosti lymfocytov a prognózy pacienta doposiaľ neprineslo jednoznačné závery o klinickom význame tohto hodnotenia. Predpokladá sa však, že imunitný systém je zodpovedný za inhibíciu vzniku vzdialených metastáz, deštrukciu nádorových buniek a môže byť zodpovedný za spontánnu regresiu malígneho melanómu. Viacerí autori opisali, že malígny melanóm bez dôkazu primárneho origa má lepšiu prognózu a menej agresívny priebeh ako porovnateľný nádor, kde je primárne ložisko dokázateľné. Za tento paradox je pravdepodobne zodpovedná práve aktivácia imunitného systému^(7,8).

Malígny melanóm je vysokoimunogénny tumor, je charakteristický vysokou bunkovou variabilitou v dôsledku akumulácie početných mutácií vedúcich k výraznej heterogenite tumoru. Práve akumulácia početných mutácií vedie k tvorbe nádorových neoantigénov aktivujúcich imunitný systém. Bunky imunitného systému vo veľkej miere reagujú na prítomnosť nádorových antigénov, o čom svedčí prítomnosť týchto buniek v nádore a jeho okolí. Nádor má mechanizmy, ktorými môže ovplyvniť aktiváciu imunitného systému⁽⁹⁾. To môže viesť k nekontrolovanej proliferácii buniek.

Ukazuje sa, že imunitná odpoveď zohráva dôležitú úlohu v procese vzniku a progresie malígneho melanómu. Jednou z možností terapie melanómu je práve ovplyvnenie imunitnej odpovede. Táto terapia v súčasnosti znamená výrazný pokrok v terapii metastázujúceho malígneho melanómu. Výsledky našej pilotnej štúdie naznačujú, že pri progresii malígneho melanómu dochádza k útlmu protinádorovej imunitnej odpovede. Nižšiu infiltráciu tkaniva cytotoxickými T-lymfocyty intratumorálne sme pozorovali vo všetkých prípadoch pokročilého nodulárneho malígneho melanómu. Práve pochopenie princípov regulácie imunitnej odpovede vo vzťahu k štádiu choroby bude mať veľký význam pre využitie týchto poznatkov v terapii pacientov v budúcnosti.

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

LITERATÚRA

1. Janega P, Szemes T, Minarik G. Malígny melanóm – nové aspekty výskumu *NewsLab* 2017; 8(1): 44-47.
2. Zeuthen J, Dzhandzhugazyan K, Hansen MR, et al. The immunogenic properties of human melanomas and melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Bratisl Lek Listy* 1998; 99(8-9): 426-434.
3. Jacquelot N, Roberti MP, Enot DP, et al. Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. *Nature Communications* 2017; 8(1): 592.
4. Ridolfi L, de Rosa F, Fiammenghi L, et al. Complementary vaccination protocol with dendritic cells pulsed with autologous tumour lysate in patients with resected stage III or IV melanoma: protocol for a phase II randomised trial (ACDC Adjuvant Trial). *BMJ Open* 2018; 8(8): e021701.
5. Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget* 2017; 8(9): 14759-14769.
6. Rahbar M, Naraghi ZS, Mardanpour M, et al. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Effect on Clinical Outcome of Muco-Cutaneous Melanoma. *Indian J Dermatol* 2015; 60(2): 212.
7. van der Ploeg AP, Haydu LE, Spillane AJ, et al. Melanoma patients with an unknown primary tumor site have a better outcome than those with a known primary following therapeutic lymph node dissection for macroscopic (clinically palpable) nodal disease. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(9): 3108-3116.
8. Weide B, Faller C, Elsasser M, et al. Melanoma patients with unknown primary site or nodal recurrence after initial diagnosis have a favourable survival compared to those with synchronous lymph node metastasis and primary tumour. *PLoS One* 2013; 8(6): e66953.
9. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, et al. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* 2017; 8(62): 106132-106142.

Jana Lacová

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
e-mail: jana.lacova94@gmail.com

Sekvenovanie DNA v laboratórnej diagnostike bakteriálnych patogénov

Barbora Markusková, Aneta Lichvariková, Hana Drahovská

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

V klinickom mikrobiologickom laboratóriu sa v súčasnosti čoraz častejšie využívajú metódy založené na sekvenovaní DNA. Tradičným postupom používaným pri identifikácii a typizácii patogénnych baktérií je sekvenovanie samostatných lokusov, najčastejšie génu pre 16S rRNA alebo siedmich génov kódujúcich proteíny pomocou metódy MLST. V poslednom období sa však rýchlo rozvíjajú aj metódy celogenómového sekvenovania, ktoré poskytujú komplexnú informáciu o pôvodcovi ochorenia, ale vyžadujú náročné bioinformatické vyhodnocovanie získaných dát. Na porovnanie genómov baktérií možno využiť viaceré aplikácie dostupné na internete, napríklad celogenómovú MLST alebo nástroj PATRIC. Viaceré špecializované databázy umožňujú aj predikciu prítomnosti génov rezistencie proti antibiotikám.

Kľúčové slová: patogén, celogenómové sekvenovanie, identifikácia, antibiotická rezistencia

DNA sequencing in laboratory diagnostics of bacterial pathogens

Presently, methods based on DNA sequencing are frequently used in clinical microbiology laboratory. Single locus sequencing is a traditional method used for bacterial identification and typing, 16S rRNA gene and MLST are the most frequently used ones. Recently the whole genome sequencing methods were applied in the clinical microbiology. This approach provides complex information about infectious agents. However, they demand advanced bioinformatic data evaluation. Bacterial genomes could be compared by several web-based applications; the examples are the whole genome MLST approach and PATRIC server. Several specialized databases are also devoted to detection of antibiotic resistance genes in sequenced bacterial genomes.

Keywords: pathogen, whole genome sequencing, identification, antibiotic resistance

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 25 – 27

V klinickom mikrobiologickom laboratóriu sa na identifikáciu a typizáciu pôvodcov infekčných ochorení tradične používajú fenotypové diagnostické metódy založené na kultivácii mikroorganizmov, mikroskopických technikách a špecializovaných postupoch, ako je biotypizácia, sérotypizácia alebo stanovenie citlivosti na antibiotiká. Zároveň v súčasnosti dochádza k významnému rozvoju technológií sekvenovania DNA, čo umožňuje v praktických mikrobiologických aplikáciách čoraz viac využívať priame genotypové metódy.

Sekvenovanie jednotlivých génov

V taxonómii baktérií sa tradične využíva úplné alebo čiastočné sekvenovanie génu pre 16S rRNA zodpovedného za syntézu RNA malej podjednotky ribozómu. Ako prvý tento prístup zaviedol Carl Woese, ktorý na základe porovnania sekvencií rRNA v roku 1977 definoval *Archea* ako samostatnú taxonomickú skupinu prokaryotov líšiacu sa od klasických baktérií⁽¹⁾. 16S rRNA gén má dĺžku približne 1,5 kbp a nachádzajú sa na ňom konzervatívnejšie a variabilnejšie úseky. To umožňuje navrhnuť univerzálne primery (pre všetky baktérie alebo skupinovo špecifické), ktoré sa používajú na PCR a sekvenovanie. Pri analýze je dôležité, že získané sekvencie možno porovnávať s databázami sekvencií, a tým vyhodnotiť príbuznosť kmeňov získaných v rozličných štúdiách. Existuje niekoľko relevantných databáz ribozómových sekvencií: Ribosomal Database Project, Silva, GreenGenes. Databáza Living Tree Project (<http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>) obsahuje sekvencie 16S and 23S rRNA génov typových kmeňov validne opísaných druhov baktérií a archeí dôležitých na taxonomické účely⁽²⁾.

Okrem nesporných výhod má však identifikácia baktérií na základe 16S rRNA génu svoje limity. Prvou nevýhodou je vysoká konzervatívnosť 16S rRNA sekvencií, preto v niektorých prípadoch nemožno jednoznačne odlíšiť kmene patriace do príbuzných druhov, ako sú niektoré streptokoky a enterobaktérie, a tiež nie je možná diskriminácia medzi rôznymi kmeňmi rovnakého druhu. Zároveň genómy baktérií obsahujú viacero kópií rRNA operónu (napríklad genóm *E. coli* má sedem rRNA operónov), ktoré nie sú sekvenčne identické, čo znižuje presnosť pri stanovení príbuznosti kmeňov⁽³⁾.

Okrem ribozómových génov sa pri identifikácii a typizácii baktérií často využíva sekvenovanie génov kódujúcich proteíny. Takéto sekvencie možno porovnávať na úrovni nukleotidov (vysoká variabilita spôsobená degeneratívnosťou genetického kódu) alebo na úrovni aminokyselín (vyššia konzervovanosť vhodná pri porovnávaní vzdialenejších taxónov). Spa typizácia, založená na sekvenovaní variabilných oblastí *spa* génu kódujúceho stafylokokový proteín A, je často používaná metóda na stanovenie príbuznosti kmeňov *Staphylococcus aureus*⁽⁴⁾.

V roku 1998 bola na stanovenie príbuznosti kmeňov *Neisseria meningitidis* zavedená metóda multilokusovej sekvenčnej typizácie (Multi-locus sequence typing, **MLST**) a neskôr sa táto metóda začala používať aj pri typizácii iných klinicky významných baktérií⁽⁵⁾. Metóda je založená na sekvenovaní (najčastejšie) siedmich génov rozložených v rôznych častiach bakteriálneho genómu. Cieľové gény sú odlišné pre rôzne bakteriálne druhy, ale platí zásada, že sa vyberajú gény základného metabolizmu (tzv. housekeeping gény), ktoré predstavujú najstabilnejšiu časť bakteriálneho genómu.

Pri baktériách je častým javom horizontálny transfer génov medzi nepríbuznými baktériami. Preto pri sekvenovaní iba jedného lokusu, ktorý bol v predchádzajúcom období predmetom génového transferu, sa môžu dva kmene javiť ako identické, ale sekvenovaním iných častí ich genómov sa zistí, že tieto kmene nie sú príbuzné. Sekvenovaním v rámci MLST sa preto určí/eliminuje vplyv horizontálneho transferu génov medzi nepríbuznými baktériami.

Metóda MLST má oproti klasickým typizačným technikám (ako napr. PFGE) výhodu v digitálnom charaktere sekvenčných dát. Pri vyhodnocovaní príbuznosti kmeňov sa postupuje tak, že sekvencie z jedného lokusu (génu) sa navzájom porovnávajú a jednotlivé alely sa očísľujú v takom poradí, v akom sa získali (t. j. sekvencia lokusu z prvého sekvenovaného kmeňa má číslo 1, sekvencia nasledujúceho kmeňa líšiaca sa aspoň o jeden nukleotid má číslo 2 atď.). Na základe kombinácie alel zo všetkých lokusov (alelického profilu) sa kmeňu priradí výsledné číslo nazývané sekvenčný typ (ST). Vyhodnocovanie a uchovávanie MLST dát sa uskutočňuje v databázach špecifických pre jednotlivé druhy baktérií. Väčšinu z týchto databáz možno nájsť na stránke <http://pubmlst.org/databases/>, na konci roku 2018 tam bolo deponovaných 105 schém pre baktérie a 10 schém pre eukaryotické mikroorganizmy.

Pri vyhodnocovaní podobnosti medzi izolátmi sa vychádza z alelických profilov. Príbuzné kmene majú rovnaké ST alebo ST, ktoré sa líšia len v niekoľkých alelách, nepríbuzné kmene majú sekvenciu odlišnú vo väčšine lokusov. Týmto spôsobom sa príbuzné ST zhlukujú do tzv. klonálnych komplexov, ktoré zahrňujú súbor geneticky príbuzných, ale nie úplne identických baktérií⁽⁵⁾.

Metóda MLST umožňuje dobre rozlíšiť kmene bakteriálnych druhov s vysokou vnútrodruhovou variabilitou, napr. *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Cronobacter* sp. Na druhej strane existujú patogény napr. *Bacillus anthracis* alebo *Yersinia pestis*, ktoré sa vyznačujú vysokou genetickou homogenitou a pre ich typizáciu je metóda MLST málo diskriminatívna^(5,6).

Celogenómové sekvenovanie

Prvým bakteriálnym druhom so známym genómom bol *Haemophilus influenzae*, publikovaný v roku 1995⁽⁷⁾. Na jeho sekvenovanie bol použitý klasický prístup prípravy genómovej knižnice v plazmidových vektoroch, sekvenovanie náhodných fragmentov pomocou Sangerovej metódy a bioinformatické skladanie získaných sekvenčích dát do výslednej molekuly, preto bol tento postup prácny, pomalý a cenovo náročný. V súčasnosti ho nahradili viaceré metódy sekvenovania novej generácie, ktoré sú založené na vysokokapacitnom paralelnom sekvenovaní DNA molekúl. Tieto metódy sú schopné generovať obrovské množstvá základných sekvenčných dát v krátkom čase a pri nízkych nákladoch na jednu sekvenovanú bázu. Cena samotného sekvenovania, ktorá sa v súčasnosti pohybuje pod sumou 100 € za genóm, už nie je limitujúcim faktorom, a tak sa celogenómové sekvenovanie stáva dostupným aj pre mnohé rutinné laboratóriá. Napríklad v USA sú od roku 2013 sekvenované genómy všetkých izolátov z humánnych klinických prípadov *L. monocytogenes*^(8,9).

Dôležitou súčasťou sekvenovania bakteriálnych genómov je bioinformatické vyhodnocovanie získaných dát. Vo

väčšine súčasných next-gen technológií je výstupom veľké množstvo krátkych navzájom sa prekrývajúcich sekvenčných čítaní. Preto prvým krokom pri analýze dát je skladať (assembly) sekvencií do čo najdlhších kontinuálnych úsekov (contigov). Zložené sekvencie, najčastejšie vo forme viacerých nespojených lineárnych sekvenčích (whole genome contigs), sa v klinickom mikrobiologickom laboratóriu môžu ďalej využiť na presnú identifikáciu pôvodcu ochorenia, stanovenie génov virulencie a rezistencie proti antibiotikám a na určenie príbuznosti kmeňov pri epidemiologických štúdiách.

Pre spracovanie údajov z next-gen sekvenovania je potrebné mať k dispozícii bioinformatické nástroje, ktoré sú schopné spracovať veľké množstvo dát vo veľkých súboroch kmeňov. Je žiaduce, aby tieto nástroje boli jednoduché na obsluhu a dostupné pre širokú odbornú verejnosť bez hlbších znalostí z informatiky a programovania. Jednou z možností pri vyhodnocovaní je využitie dostupných webových programov, napríklad pomocou aplikácií prístupných na stránke Center of genomic epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>). Program SpeciesFinder vyhľadáva v čiastočne sekvenovaných genómoch 16S rRNA gény a na základe najpríbuznejšej sekvencie zaradí kmeň do bakteriálneho druhu. Iný spôsob na druhovú identifikáciu je K-mer-Finder, ktorý porovnáva v genómových sekvenciách prítomnosť navzájom sa prekrývajúcich k-merov s dĺžkou 16 bp bez zohľadnenia ich lokalizácie na chromozóme a kmeň zaradí na základe najpríbuznejšieho kmeňa z databázy. Tento prístup je veľmi rýchly a dostatočne presný. Ďalšie programy umožňujú zistiť z celogenómových sekvenčích niektoré dôležité vlastnosti kmeňov: napr. MLST, spa typ, sérotyp, prítomnosť plazmidov, génov virulencie a génov rezistencie proti antibiotikám⁽¹⁰⁾.

Iným spôsobom porovnávanie celogenómových sekvenčích je využitie prístupu MLST, tzv. celogenómové MLST (wgMLST) pomocou softvérového nástroja BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database)⁽⁶⁾. Tento program extrahuje z celogenómových sekvenčích bakteriálnych izolátov sekvencie jednotlivých génov, sekvenciám priradí čísla alel podobným spôsobom ako v klasickej MLST, a potom porovnáva kmene na základe zhody alebo rozdielov v alelách jednotlivých génov. Program je vytvorený hierarchicky a možno v ňom ľubovoľne zvoliť súbor génov, ktoré sa použijú pri analýze. Rovnakú databázu preto možno využiť na druhovú identifikáciu pôvodcu ochorenia pomocou analýzy ribozómových génov (rMLST), na zaradenie kmeňov do sekvenčných typov a klonálnych komplexov pomocou klasickej MLST aj na typizáciu kmeňov s vysokou diskrimináciou (napr. pri sledovaní vývoja epidémií v rámci jednej nemocnice), keď sa porovnávajú sekvencie všetkých spoločných génov (wgMLST)^(6,11).

Komplexným nástrojom na analýzu dát z celogenómového sekvenovania prokaryotických organizmov je webová aplikácia PATRIC (The Pathosystems Resource Integration Center)⁽¹²⁾. PATRIC umožňuje online analýzu bakteriálnych genómov jednotlivých používateľov a ich porovnanie s verejne dostupnými údajmi. Program je primárne zameraný na patogény, preto má veľkú perspektívu využitia v klinickom výskume. Jednou z významných vlastností je vyhľadávač génov rezistencie proti antibiotikám, ktorý využíva databázy so známymi mechanizmami rezistencie ako CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) a NDARO (National Database

of Antibiotic Resistant Organisms). PATRIC ďalej umožňuje identifikovať gény kódujúce virulénne faktory a transportéry, modelovať metabolické dráhy a porovnávať proteómy jednotlivých organizmov. Na identifikáciu baktérií možno využiť najbližšieho príbuzného organizmu v databáze a vyhodnotiť fylogenetické vzťahy v rámci vlastnej zbierky mikroorganizmov. Komplexnosť systému PATRIC dopĺňajú aj aplikácie umožňujúce základné spracovanie sekvenčných dát, t. j. skladanie (assembly) krátkych čítaní do contigov a anotácia sekvencií.

Stanovenie citlivosti na antibiotiká

Stanovenie citlivosti pôvodcu ochorenia k antimikrobiálnym látkam je jednou zo základných úloh klinického mikrobiologického laboratória. V súčasnosti sa testovanie antibiotickej citlivosti určuje takmer výhradne fenotypovými metódami na základe rastu baktérií v prítomnosti antibakteriálnych látok. Zároveň však súčasné technológie umožňujú odvodiť rezistenciu kmeňov pomocou vyhľadávania génov rezistencie v bakteriálnej DNA. Identifikácia génov rezistencie je vhodná aj na overenie citlivosti kmeňov, ktorá bola určená fenotypovo, a tiež na identifikáciu kmeňov so slabou expresiou v podmienkach *in vitro*. Detekcia týchto génov sa tradične robí pomocou metód PCR alebo DNA microarray⁽¹³⁾. Výhodou analýzy celogenómových sekvencií je, že v princípe poskytujú všetky údaje na určenie molekulárnych mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie, a to aj bez predchádzajúcej znalosti fenotypu. Na predikciu génov rezistencie existujú viaceré špecializované databázy. Jednou z najpoužívanejších je databáza ARG-ANOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation), ktorú možno stiahnuť a využívať pomocou lokálneho softvéru na analýzu sekvencií⁽¹⁴⁾. Druhou možnosťou je využitie webových aplikácií,

ako je ResFiner⁽¹⁵⁾ alebo CARD⁽¹⁶⁾, ktoré sú pravidelné aktualizované. Stanovenie rezistencie priamo z bakteriálnych celogenómových sekvencií zatiaľ stále komplikujú nedostatočné vedomosti o všetkých genetických zmenách vedúcich k zníženej citlivosti bakteriálnych kmeňov na antibiotiká. Najväčším problémom pri rutinej implementácii WGS je aj nedostatok automatizovaných, používateľsky prívetivých interpretačných nástrojov, pomocou ktorých by bolo možné rýchlo a jednoducho poskytnúť klinicky významné informácie⁽¹⁷⁾. Rýchly vývoj technológií v tejto oblasti je predpokladom efektívneho využitia v blízkej budúcnosti.

Záver

Techniky celogenómového sekvenovania majú veľký potenciál stať sa pevnou súčasťou rutinných vyšetrení v klinickej mikrobiológii, pretože umožňujú detailnú analýzu pôvodcov infekčných ochorení pomocou univerzálneho prístupu. Ich výhodou je aj možnosť identifikácie patogénov v zmesových vzorkách bez predchádzajúcej kultivácie. Okrem identifikácie a typizácie mikroorganizmov sú tieto techniky principiálne vhodné na určenie rezistencie proti antibiotikám, aj keď v súčasnosti ešte nemožno jednoznačne odvodiť fenotyp mikroorganizmu zo známej genómovej sekvencie. V budúcnosti je predpokladom ďalšie zlepšovanie technológií sekvenovania DNA, skrátenie času a zníženie ceny analýz, takže tieto postupy budú čoraz viac nahrádzať tradičné metódy závislé od kultivácie, používané v klinických laboratóriách.

Grantová podpora: Táto publikácia vznikla s podporou grantov APVV-16-0168, APVV-16-0119 a projektu Biomakro 2 (ITMS 26240120027).

LITERATÚRA

1. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51(2): 221-271.
2. Rossello-Mora R, Amann R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst Appl Microbiol* 2015; 38(4): 209-16.
3. Turcovsky I, Kunikova K, Drahovska H, Kaclikova E. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; 99(2): 257-69.
4. Sabat AJ. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 2013; 18(4): 20380.
5. Urwin R, Maiden MCJ. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003; 11(10): 479-487.
6. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11(10): 728-36.
7. Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269(5223): 496.
8. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Inf* 2018; 24(4): 355-360.
9. Stasiewicz MJ, den Bakker HC, Wiedmann M. Genomics tools in microbial food safety. *Current Opinion in Food Science* 2015; 4: 105-110.
10. Larsen MV, Cosentino S, Lukjancenko O, et al. Benchmarking of Methods for Genomic Taxonomy. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1529.
11. Kadlicevova V, Kajsik M, Soltys K, et al. Characterisation of *Cronobacter* strains isolated from hospitalised adult patients. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018; 111(7): 1073-1085.
12. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(D1): D535-D542.
13. Batchelor M, Hopkins KL, Liebana E, et al. Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008; 31(5): 440-451.
14. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, et al. ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(1): 212-220.
15. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(11): 2640-4.
16. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(7): 3348-57.
17. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23(1): 2-22.



doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.

Katedra molekulárnej biológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
e-mail: hana.drahovska@uniba.sk

Processing of genomic data with privacy preserving methods

Rastislav Hekel, Ondrej Pös

Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

Genomic data become more available and affordable because of the advancements in sequencing technologies. Analysis and interpretation of these data, especially genomic variants, is essential for development of personalized medicine. Accordingly, a sequenced genome is likely to become the standard part of personal medical record. Nevertheless, processing and storing genomic data introduces a risk of abuse by potential adversary, since a genome contains sensitive personal traits and is the ultimate person identifier. Therefore, from security point of view, genomic data must be treated and protected like personal data. On the other hand, it is crucial to keep the data available for further research. This conflict of interests is a motivation for development of novel privacy preserving methods for storage and processing of genomic data.

Keywords: genomic data, personal data, privacy, protection

Spracovanie genomických údajov pomocou metód so zachovaním súkromia

Genomické údaje sa stávajú čoraz dostupnejšími vďaka pokrokom v sekvenčných technológiách. Analýza a interpretácia týchto údajov, hlavne genomických variantov, je kľúčová pre rozvoj personalizovanej medicíny. V súlade s tým sa sekvenovaný genóm pravdepodobne stane štandardnou súčasťou zdravotnej karty. Spracovávanie a uchovávanie genomických údajov však súčasne predstavuje riziko ich zneužitia potenciálnym protivníkom, pretože genóm obsahuje citlivé osobné údaje a je definitívnym osobným identifikátorom. Z tohto dôvodu musia byť genomické údaje, z hľadiska bezpečnosti, spravované a chránené ako osobné údaje. Na druhej strane je veľmi dôležité, aby genomické údaje boli k dispozícii pre ďalší výskum. Tento konflikt záujmov je motiváciou na vývoj nových metód pre bezpečné uchovávanie a spracovávanie genomických údajov.

Kľúčové slová: genomické údaje, osobné údaje, súkromie, ochrana

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 28 – 31

Introduction

A biological sample collected in the beginning of genomic analysis contains a genome in chemical form as a DNA molecule. In massive parallel sequencing the molecule is fragmented and placed on sequencing platform where fragments are read in parallel creating digital sequences of DNA bases called reads⁽¹⁾. These reads are randomly ordered with unknown direction and unknown DNA strand of origin. If genomic reads belong to an organism with known reference genome, such as human, they are sorted in process called mapping.

Aim of the mapping is to reconstruct the original genome sequence. Each read is aligned and thus mapped to the most probable region of origin on the reference genome. An aligned and mapped read is often simply called alignment. Reads without a sufficiently probable match are considered unmapped. It is worth to mention that mapping process requires significant computer power, hence running it on computing server in parallel is reasonable. Set of aligned reads is de facto a digital copy of the DNA contained within the biological sample⁽²⁾.

Aligned reads reveal differences between a sequenced and the reference genome, called genomic variants. Whole set or even specific selection of genomic variants is unique to each individual hence a genome is the ultimate person identifier. Moreover, some of these variants reveal sensitive information such as predisposition to diseases (e.g. cancer) or physical traits (e.g. race, eye colour)⁽³⁾. (**Figure 1**)

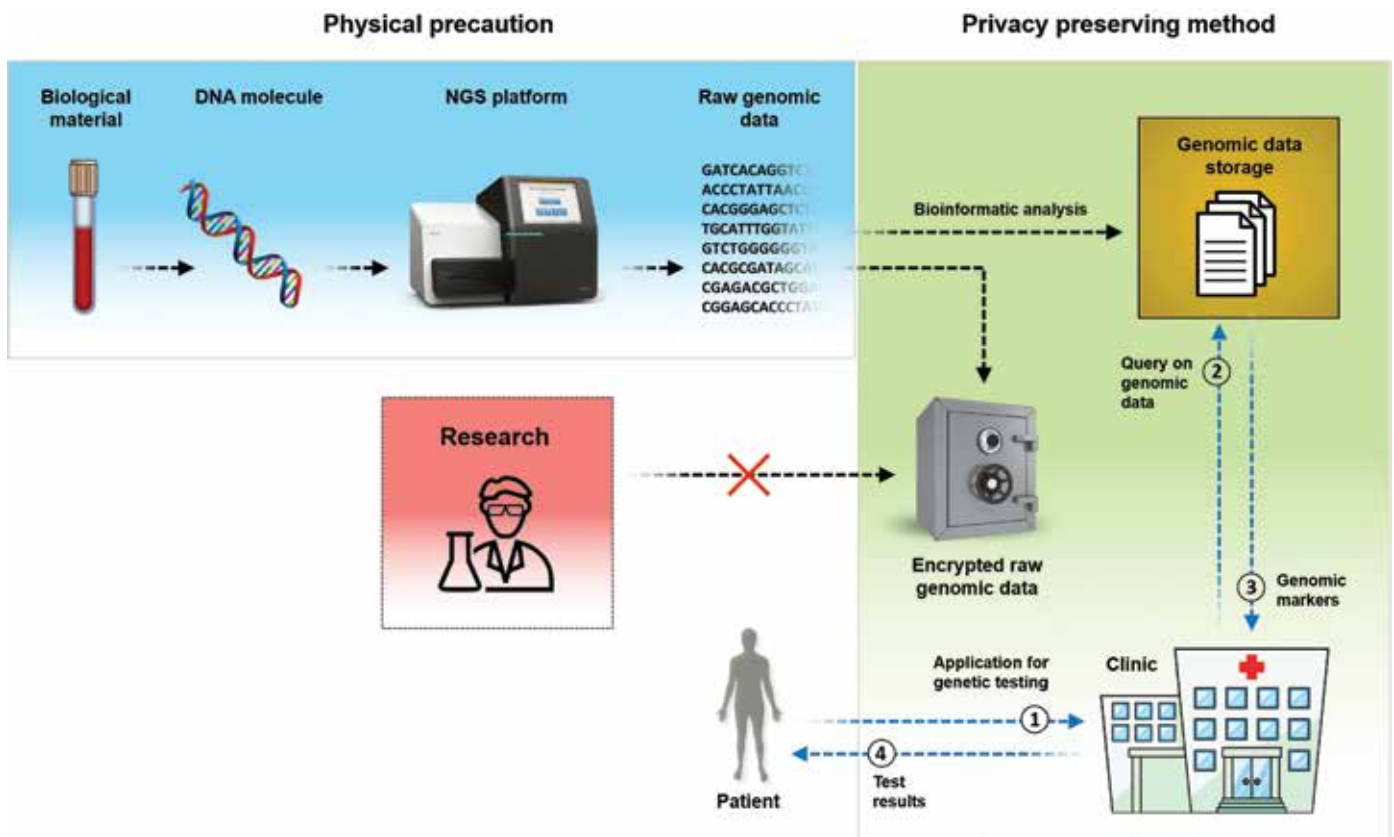
Typical clinical genetic test is a query on a personal genomic data. Genetic test can be conducted with goal to select suitable treatment or to evaluate risk for a particular disease. Usually, the outcome of this test is based on presence of specific variants associated with a tested trait. This provides a great incentive to study genomic variants, which are de facto the backbone of personalized medicine. Linking variants to specific traits is a subject of variant associations studies. Genome-Wide Association Study (GWAS) is common type of variant study in which genomes of many participants with varying phenotypes are compared for a particular trait or a disease. If one variant is more common in the group with an observed trait, the variant is said to be associated with it⁽⁴⁾.

Most variant studies require only limited access to short regions of specific genes, such as diagnosis of specific disorder with a known set of causal genes. In addition, some analyses do not even require information about genomic variants at all. For example, chromosome aneuploidy detection needs only information about number of reads aligned to individual chromosomes, in other words coverage, that is not major subject to misuse or person identification⁽⁵⁾.

Although the final product of a variant analysis is not the genome itself, there is a preference to keep raw aligned reads along the interpreted variants for the following reasons:

- Algorithms for variant calling are not mature, they can have various settings and trade-offs.

Figure 1. Common processing of genomic data intended for medical use. DNA is collected from biological material and placed on sequencing platform. Until now privacy is protected by standard physical precautions. Typically, personal variants or other medically relevant personal data are derived from a genome and the genome itself is encrypted and archived. With consent of a patient his personal genomic data can be tested for specific markers by a medical clinic. Genomic data are subject to potential abuse, hence they need to be protected by some privacy preserving method during the whole genetic testing. Researchers have no way to utilize non-personal data within the sequenced genome without direct consent of patient and support from both the medical clinic and data storage.



- Disease such as cancer can cause specific variations in diseased cells. These can be misclassified as sequencing errors by only looking at variant calls, while examining raw reads can reveal the true cause.
- It is impossible to know which (novel) variants are going to be proved as significant in the future.

Until the sequencing the privacy of the genome can be preserved by standard physical precautions. However, the sequencing creates digital copy of a genome and from there it must be secured digitally to prevent unwanted copying, modifying and sharing. The interpretation of genomic data intended for treatment can be abused in hands of a potential adversary⁽⁶⁾. In contrary, it is crucial to keep genomic data available for further research⁽⁷⁾.

Privacy problems

In the literature, there are several solutions suggested for privacy and security of digital health records based on de-identification and aggregation methods. However, these solutions are not applicable to personal genomic data as genome itself is an ultimate identifier of an individual. Akgün et al. 2015 provide great overview on privacy processing of genomic data and state the following major problems which need to be solved⁽⁸⁾:

- **Private read alignment on public cloud**
Alice wants to make a sequence alignment for her whole genome on a public cloud controlled by Bob, without revealing the genome to Bob.
- **Query on private genomic data**
Alice wants to test her genome for some biological trait. The test is provided by Bob, who must query Alice's genome with publicly known markers for that trait. Alice does not want to reveal her whole genome to Bob.
- **Query on private genomic database**
Alice want to test a hypothesis using a genomic database, while Bob (responsible for the database) wants to preserve the privacy of the data-owners.
- **Privacy-preserving sharing of private statistical database**
GWAS produces population statistics for associations between variants and specific traits. Alice wants to query statistics relevant for her study, while Bob (responsible for GWAS) do not want to reveal if some individual is part of GWAS.

Cryptographic solutions

1. Secure Multiparty Computation (SMC)

Sequence alignment is likely to be outsourced to public clouds due to high computation cost. Public cloud is

considered as an insecure environment where private data can be obtained by an adversary. Due to this concern secure computation scheme must be used instead of standard alignment algorithms. SMC is basis of some proposed solutions⁽⁹⁾. The method allows two or more entities jointly compute on private data without revealing the data to each other or a third party. This enables outsourcing most of computation intensive read mapping without disclosing genetic information. Moreover, work of Jagadeesh et al. 2017 showed how SMC can be used to securely identify causative variants in individuals between multiple parties. More precisely, they focus on variants in Mendelian patients and use SMC methods based on Yao's protocol. The computation can be run on the whole genomes provided by various parties (e.g. institutions, patients) to jointly discover the causative variants, while not revealing the genomes to each other⁽¹⁰⁾.

2. Homomorphic Encryption

Variant association studies require unrestricted access to large databases of genotype and phenotype data to compute reliable statistics. These data collected from volunteering patients are at risk of privacy breach when stored in unencrypted form. Kim et al. 2015 proposed solution to this problem: encrypting both genotype and phenotype data by homomorphic encryption scheme. They take several statistical algorithms commonly used in GWAS studies and altering them so they can be run on the encrypted data. Homomorphic encryption is allowing to directly compute on the encrypted data without knowing a passphrase⁽¹¹⁾. Work of Sousa et al. 2017 enables a user to securely store and retrieve millions of genomic variants of all types for one or multiple individuals on the cloud. Variants are encrypted with symmetric key and can be efficiently searched without revealing anything to the cloud provider. They use homomorphic encryption and private information retrieval techniques⁽¹²⁾. Novel approach proposed by Shimizu et al. 2016 combines efficient string data structure called positional Burrows–Wheeler transform (PBWT) with two cryptographic techniques called additive homomorphic encryption and oblivious transfer⁽¹³⁾.

3. Differential privacy

It is impossible to publish information from a private statistical database without revealing some amount of private information, therefore a small number of database queries can reveal a presence of some record. For instance, the presence of specific genome with known minor allele frequencies can be detected in some statistical dataset. First, these frequencies must be compared against reference population frequencies and then against frequencies from the dataset. Finally, the difference is evaluated with statistical t-test.⁽¹⁴⁾ Differential privacy solves this problem by maximizing the accuracy of queried statistics while minimizing the information about presence of specific record. Solution offers trade-off between utility (accuracy) and privacy. Unencrypted data is available only through special queries which add noise to the result of each query. Differentially private genomic databases differing from each other by only one individual's data, have indistinguishable statistical features.

Processing of raw genomic data

Clinical genetic testing is becoming common in personalized medicine and each conducted test introduces a risk to genomic privacy of a patient. Since most of these tests are based on presence of specific genomic variants, the typical solution is to extract all the variants from an underlying genomic data and store them in encrypted form suitable for secure analysis^(11,12,15). The raw genomic data, typically in form of aligned reads, are not further considered. They are usually encrypted and stored separately so they can be reused in the future when novel variants are discovered.

Only one of all examined works on the subject of genomic privacy is focused at secure storage, retrieval and processing of a raw genomic data. Ayday et al. 2014 propose a scheme that stores genomes of patients in form of encrypted alignments, in a public *biobank*. A *medical unit* can request a genomic region from a *biobank* without revealing the scope of the request, so the *biobank* can not infer the nature of the genetic test behind the request. The *biobank* provides only alignments that include at least one base from the requested range. Nucleotide bases outside of this range are masked from the *medical unit* while no decryption is involved. Returned alignments are decrypted in requested range at the *medical unit*. Encryption keys are stored separately at *masking and key manager*, because not all patients are capable of protecting their keys on a private device. Furthermore, when patient controls his key, he must be involved in all operations of medical unit, related to his genome, which is not practical when conducting research. Identities of *medical units* or patients are not revealed to the *masking and key manager*⁽¹⁵⁾.

Protection from third party

Even though conventional digital security methods can protect against unauthorized use of personal data, they do not protect the data from misuse by an authorized third party. The data can be potentially accessed by a third party in legal way under data sharing policy without the owner's knowledge. According to some opinions, this problem cannot be efficiently solved using current technological solutions. For this reason, the solution seems to remain on legislation and on the awareness of the society⁽¹⁶⁾. Although this may be true, the dynamic consent approach give the owner an ability to retain control over his personal data. Instead of giving single consent to share the data under some policy at the time of sampling, the owner can choose to share his data with trusted party on demand. This aspect is considered to be a core element of modern information privacy⁽¹⁷⁾.

Conclusion

All of the reviewed schemes for privacy preserving processing of genomic data do not consider or completely encrypt the underlying raw genomic data. Retrieval, decryption or interpretation of the raw genomic data is available only through special procedures by authorized parties. Besides, some sort of consent is required when requesting the data. As a result, information produced by DNA sequencing is constrained or unavailable for further research by scientific

community. Nevertheless, information within raw genomic data not related to personal variants should be fully available for scientific studies. This information is not considered private or individual specific, therefore it can be utilized by

genomic studies unrelated to variants. With this intention a novel method for secure and reversible masking of personal variants would help both patients and scientific research.

REFERENCES

1. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008; 456: 53-59.
2. Bleidorn C. Alignment and Mapping. *Phylogenomics*. Springer, Cham; 2017. pp. 105-125.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405-424.
4. Genome-Wide Association Studies Fact Sheet. In: National Human Genome Research Institute (NHGRI) [Internet]. [cited 7 Jan 2019]. Available: <https://www.genome.gov/20019523/genomewide-association-studies-fact-sheet/>
5. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014; 101: 1375-1382.
6. Frizzo-Barker J, Chow-White PA, Charters A, Ha D. Genomic Big Data and Privacy: Challenges and Opportunities for Precision Medicine. *Comput Support Coop Work*. Springer Netherlands 2016; 25: 115-136.
7. Shen H, Ma J. Privacy Challenges of Genomic Big Data. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1028: 139-148.
8. Akgün M, Bayrak AO, Ozer B, Sağiroğlu MŞ. Privacy preserving processing of genomic data: A survey. *J Biomed Inform* 2015; 56: 103-111.
9. Erlich Y, Narayanan A. Routes for breaching and protecting genetic privacy. *Nat Rev Genet*. 2014; 15: 409-421.
10. Jagadeesh KA, Wu DJ, Birgmeier JA, et al. Deriving genomic diagnoses without revealing patient genomes. *Science* 2017; 357: 692-695.
11. Kim M, Lauter K. Private genome analysis through homomorphic encryption. *BMC Med Inform Decis Mak* 2015; 15(Suppl 5): S3.
12. Sousa JS, Lefebvre C, Huang Z, et al. Efficient and secure outsourcing of genomic data storage. *BMC Med Genomics* 2017; 10: 46.
13. Shimizu K, Nuida K, Rättsch G. Efficient privacy-preserving string search and an application in genomics. *Bioinformatics* 2016; 32: 1652-1661.
14. Homer N, Szlinger S, Redman M, et al. Resolving individuals contributing trace amounts of DNA to highly complex mixtures using high-density SNP genotyping microarrays. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000167.
15. Ayday E, De Cristofaro E, Hubaux J-P, Tsudik G. The Chills and Thrills of Whole Genome Sequencing [Internet]. 2013. Available: <http://arxiv.org/abs/1306.1264>
16. Savage N. Privacy: The myth of anonymity. *Nature* 2016; 537: S70-S72.
17. Erlich Y, Williams JB, Glazer D, et al. Redefining genomic privacy: trust and empowerment. *PLoS Biol* 2014; 12: e1001983.

Mgr. Rastislav Hekel

Vedecký park Univerzity Komenského
 Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
 e-mail: rastislav.hekel@geneton.sk

Secondary findings in the era of genomic medicine

Zuzana Kubiritová

Institute for Clinical and Translational Research, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

By the using of whole exome and whole genome analyses in the field of genomic medicine, an amount of data generated is increasing widening thus also the spectrum of results from genetic analyses. Secondary findings (SF) represent the results of genetic analysis that are not directly related to the primary aim of the analysis. These are positive findings in genes known to cause rare genetic diseases for which there is currently some form of therapy or prevention. The association of *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* recommends to investigate these genes in parallel with the every primary analysis ordered and encourage laboratories/clinicians to disclose these results to patients. However, besides that such SF have potential medical benefit, they also represent additional work for the laboratories/clinicians, and certain psychological burden for patients and their relatives. Therefore, there are different views on ACMG recommendations and the question is widely debated.

Keywords: secondary findings; incidental findings; genetic testing and screening; massively parallel sequencing

Sekundárne zistenia v ére genomickej medicíny

Pri používaní celoexómových a celogenómových analýz v genomickej medicíne narastá množstvo generovaných dát, teda aj spektrum výsledkov genetických analýz. Sekundárne zistenia predstavujú výsledky genetickej analýzy, ktoré sa netýkajú priamo primárnej analýzy. Sú to pozitívne nálezy v génoch, o ktorých je známe, že zapríčiňujú zriedkavé genetické ochorenia, pre ktoré v súčasnosti existuje nejaká forma terapie či prevencie. Spoločnosť Amerického kolégia lekárskej genetiky a genomiky (ACMG) odporúča vyšetrovať takéto gény popri primárnej analýze, pričom odporúča tiež, aby laboratória/lekári reportovali tieto výsledky pacientom. Hoci sekundárne zistenia majú potenciálny medicínsky benefit, predstavujú prácu navyše pre laboratória a lekárov, ako aj psychickú záťaž pre pacienta a jeho príbuzných. Preto na odporúčania ACMG existujú rôzne názory.

Kľúčové slová: sekundárne zistenia; náhodné zistenia; genetické testovanie a skrining; masívne paralelné sekvenovanie

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 32 – 36

Introduction

Due to technological advances and decreasing cost of DNA sequencing, especially the massively parallel (MPS) versions of it, this method became accessible for many indications and for many health care providers⁽¹⁾. Applications of MPS expand to many other fields. They are useful for identification of *de novo* variants, diagnostics of monogenic and complex diseases and also for prognostic, reproductive and prenatal diagnostics and in choosing of appropriate therapy^(2,3). Fast implementation of MPS into clinical practice in a relatively short time brought many challenges and barriers, which must be overcome for effective use of benefits and opportunities offered by MPS in the context of improving healthcare. At present, there are available plenty of molecular-diagnostics tests, ranging from analysis of single gene or gene panels to sequencing analysis of whole exomes (WES) or even whole genomes (WGS). Secondary findings represent one of many benefits offered by MPS. This article provides an overview of main aspects and problems regarded of managing of secondary findings, which are currently the most discussed topic in the field of genomic medicine. Practical application of secondary findings analysis represent another important part of this topic, however they are not subject of this article.

Incidental and secondary findings

As DNA sequencing getting scaled up to exome and genome levels, it increases the probability of identification of potential abnormalities that are not directly related to the reasons, for which testing was primarily ordered. These findings are named by a well-known term „incidental findings“ (IF)⁽⁴⁾. It is estimated that during WES the probability of identification of such type of finding in adult population is 1,2%-5% and is rising if the analyzed region is increasing⁽⁵⁾. The primary findings are always results of active investigation of primary genomic targets for which the test was designed. However, IF do not describe always the same and for example for patient undergoing testing due to suspected diagnosis, IF could mean something different as for clinician who can expect such findings (known as anticipatable findings). On the other hand, for healthy individuals undergoing genetic testing from various reasons virtually all findings are incidental^(4,6). In 2013, the association of *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* created the minimum list of genes and recommended to investigate these genes in addition with any ordered primary genomic analysis. From the findings in these genes they recommended to report well known pathogenic and likely pathogenic variants to patient as IF. The list included 56 genes that are associated with rare

monogenic diseases for which there is an effective therapy or prevention available (so called preventable clinical conditions). These are mainly cardiologic conditions and specific types of cancers⁽⁷⁾. The ACMG also elaborated a process for including/excluding genes for the minimum list and established the Working Group for overseeing of updating the list. In line with this, in 2016 they published the updated ACMG recommendations with 59 genes on the list (**Table 1**) and several updates on recommendations. The ACMG recognized the need for detailed informed consent in which patient can choose if want to know the results of such analysis. Second change was that the term „secondary finding“ (SF) replaced the original term of „incidental findings“, because „IF“ is not suitable name for process in which genes from the list are intensively investigated, i.e. they are not truly incidental⁽⁸⁾. The term „incidental findings“ was reserved to those which are to be found in the region of the primary analysis but are not related to the primary diagnosis. It was reported that approximately 2% of all samples sequenced had such a finding⁽⁹⁾, while similar frequency of positive SF was also confirmed in a recent study in which 1%-1,5% out of 5000 participants have a SF in genes from the ACMG list⁽¹⁰⁾.

Attitudes to the analysis of secondary findings

Genomic testing has tended to move from research to clinical practice, however it is important to emphasize that

the research and the clinical field are two fundamentally different activities. While the main objective of research is progress in science, in clinical field it is a responsibility for patient. Participants of research studies are usually patients recommended by clinician, so it is necessarily to set up conditions in accordance with ethic principles which are common in clinical field. It means that a component of research should be the ethic protocol, which is a generally adhered in clinical care, although in research normally does not exist⁽¹¹⁾. Because of this it is difficult to decide how to approach of processing SF and so various views exist on the ACMG recommendations. Also, other organizations have published the recommendations regarding SF in genomic sequencing. Unlike ACMG recommendations these differ mainly in attitude to opportunistic screening also in the case of life threatening clinically relevant findings. As an example, the recommendations of the Canadian College of Medical Genetics (CCMG)⁽¹²⁾ and the recommendations of the European Society for Human Genetics (ESHG)⁽¹³⁾, these prefer cautious approach in analysis of SF regarding to lack of empiric knowledge about clinical significance of some variants. Both recommendations prefer targeted approach for analysis of genomic results and with the use of selective filtering process they limit the analysis only to narrow choice of genes related to primary request of testing. By this approach they avoid of detection of SF (**Table 2**). Recently, The French Society of Predictive

Table 1. The list of genes recommended by ACMG for analysis of secondary findings. In the table there are 29 phenotypes of rare diseases and 59 genes associated with them. Next to the gene it is indicated a mode of inheritance.

Phenotype	Gene and inheritance
Hereditary breast and ovarian cancer	<i>BRCA1</i> ^{AD} , <i>BRCA2</i> ^{AD}
Li-Fraumeni syndrome	<i>TP53</i> ^{AD}
Peutz-Jeghers syndrome	<i>STK11</i> ^{AD}
Lynch syndrome	<i>MLH1</i> ^{AD} , <i>MSH2</i> ^{AD} , <i>MSH6</i> ^{AD} , <i>PMS2</i> ^{AD}
Familial adenomatous polyposis	<i>APC</i> ^{AD}
<i>MYH</i> -associated polyposis; adenomas, multiple colorectal, <i>FAP</i> type 2	<i>MUTYH</i> ^{AR}
Juvenile polyposis	<i>BMPR1A</i> ^{AD} , <i>SMAD4</i> ^{AD}
Von Hippel-Lindau syndrome	<i>VHL</i> ^{AD}
Multiple endocrine neoplasia type 1	<i>MEN1</i> ^{AD}
Multiple endocrine neoplasia type 2	<i>RET</i> ^{AD}
Familial medullary thyroid cancer	<i>RET</i> ^{AD}
<i>PTEN</i> hamartoma tumor syndrome	<i>PTEN</i> ^{AD}
Retinoblastoma	<i>RB1</i> ^{AD}
Hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome	<i>SDHD</i> ^{AD} , <i>SDHAF2</i> ^{AD} , <i>SDHC</i> ^{AD} , <i>SDHB</i> ^{AD}
Tuberous sclerosis complex	<i>TSC1</i> ^{AD} , <i>TSC2</i> ^{AD}
WT1-related Wilms tumor	<i>WT1</i> ^{AD}
Neurofibromatosis type 2	<i>NF2</i> ^{AD}
Ehlers-Danlos syndrome, vascular typer	<i>COL3A1</i> ^{AD}
Marfan syndrome, Loeys-Dietz syndromes, and familial thoracic aneurysms and dissections	<i>FBN1</i> ^{AD} , <i>TGFBR1</i> ^{AD} , <i>TGFBR2</i> ^{AD} , <i>SMAD3</i> ^{AD} , <i>ACTA2</i> ^{AD} , <i>MYH11</i> ^{AD}
Hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy	<i>MYBPC3</i> ^{AD} , <i>MYH7</i> ^{AD} , <i>TNNT2</i> ^{AD} , <i>TNNI3</i> ^{AD} , <i>TPM1</i> ^{AD} , <i>MYL3</i> ^{AD} , <i>ACTC1</i> ^{AD} , <i>PRKAG2</i> ^{AD} , <i>GLA</i> ^{XL} , <i>MYL2</i> ^{AD} , <i>LMNA</i> ^{AD}
Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	<i>RYR2</i> ^{AD}
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	<i>PKP2</i> ^{AD} , <i>DSP</i> ^{AD} , <i>DSC2</i> ^{AD} , <i>TMEM43</i> ^{AD} , <i>DSG2</i> ^{AD}
Romano-Ward long -QT syndrome types 1, 2, 3, Burgada syndrome	<i>KCNQ1</i> ^{AD} , <i>KCNH2</i> ^{AD} , <i>SCN5A</i> ^{AD}
Familial hypercholesterolemia	<i>LDLR</i> ^{SD} , <i>APOB</i> ^{SD} , <i>PCSK9</i> ^{AD}
Wilson disease	<i>ATP7B</i> ^{AR}
Ornithine transcarbamylase deficiency	<i>OTC</i> ^{XL}
Malignant hyperthermia susceptibility	<i>RYR1</i> ^{AD} , <i>CACNA1S</i> ^{AD}

AD – autosomal dominant; **SD** – semidominant; **AR** – autosomal recessive; **XL** – X-linked⁽⁸⁾

and Personalized Medicine (SFMP) published similar recommendations as ACMG. These are related to the management of SF in cancer-related genes in adults. They created the list of 60 hereditary cancer-related genes (of which 22 are on the ACMG list). Genes were divided into 3 classes according to the evaluation the risk, actionability and level of evidence from the literature. Based on these criteria SFMP recommends informing clinician and patients of SF in actionable predisposition genes related to hereditary cancers (class 1), but the informed consent must be given. The SFMP emphasize the need for double consent, i.e. after a period of time, patients can go back to their decision and can express their opinion again⁽¹⁴⁾.

How to proceed in the management of secondary findings?

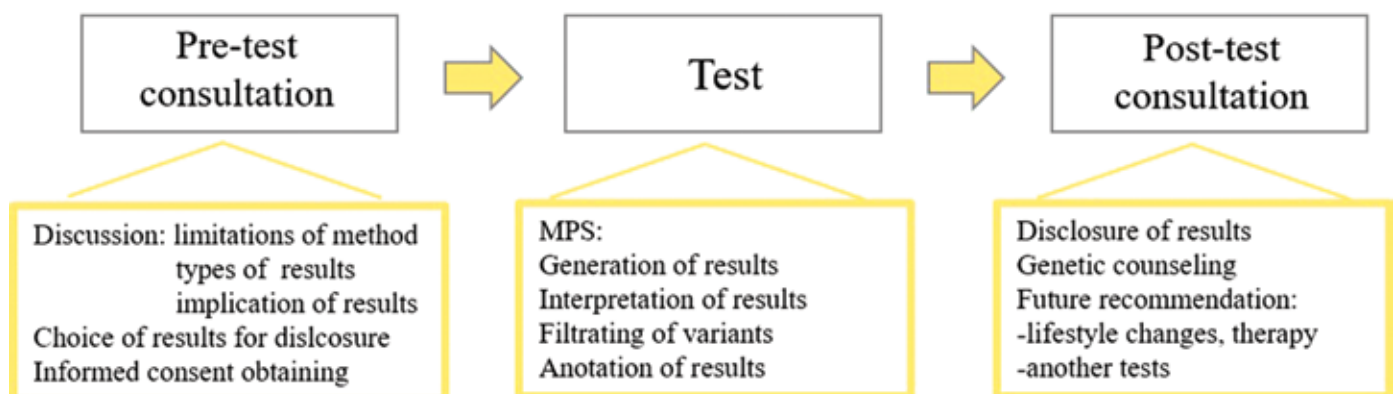
Controversy recommendations of ACMG met a lot of criticism. They are subject of many debates, on which the ethic aspects of genomic testing and views on reporting of results in the field of research and clinical diagnostics are discussed. Based on recent studies, arguments for non-disclosing of results are various. The most often argument is the possibility of psychologic harm, stress, anxiety or behavioral changes due to disclosing of sensitive information, from which not all could be solved. Beside this, all clinical data could cause discrimination and stigmatization in private life but also from the part of employers or insurance companies^(15,18). These negative implications of knowledge of results affect patient and his relatives. Arguments for non-disclosing of results re-

gard also the need of verification such findings and it represents increasing cost of laboratories for validation tests and beside this, there is the need for qualified specialists who should mediate managing of SF. The most significant concern is that after detecting of SF a therapy is needed, and this could be itself harmful and expensive and it may not be covered by insurance company⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Arguments for disclosing of results are not so various, they focus on patient's health due to that medically relevant findings could initiate an early treatment and prevent development of disease. Not only patient but also his relatives could profit from such findings⁽¹⁸⁾. In other studies, experts and also general public express their opinion on managing SF, why and in what case SF should be investigated, which results should be disclosed, who is authorized to make a decision regarding of disclosing results and who should report these results^(15,19,20). Many studies discuss the motivations and worries of patients from genetic testing and if the patients are willing to pay for such analysis. Patients preferences regarding types of disclosed results are also discussed⁽²¹⁻²³⁾. It follows from recent studies that, the view of most of the responders is that for the better healthcare the SF should be investigated, but it is appropriate to know the patient's preferences. The most of patients or participants want to know results also in the case that not all results are actionability findings, but there are also patients who want to know only the results of the primary analysis. Before testing, patients should get relevant information regarding of analysis, types of results, their implications and the possibilities of therapy or prevention in the

Table 2. Attitude of selected organizations to analysis of secondary findings. In the table there are 3 organizations dealing with human genetics and their views on analysis of SF summarized in 4 key points^(edited from 32)

Key points	ACMG (7,8)	CCMG (12)	ESHG (13)
Informed consent	Possibility of SF, and which might be returned, must be discussed during informed consent		
Opportunistic screening	Laboratories should screen list of genes known to be associated with medically important conditions for pathogenic variants	Laboratories should take a targeted approach, limiting their search to genes relevant to the primary indication where possible	Laboratories should take a targeted approach, limiting their search to genes relevant to the primary indication
Opt out	Participants can opt out of the screening of the list of additional variants	Where an additional list of genes is screened, participants can opt out of their screening	
Children	Should be screened for adult-onset disorders as they are clinically useful to parents	Should not be screened for adult-onset disorders as standard practice	Guidelines need to be established as to which information should be returned in children

Figure 1. Scheme of secondary findings analysis. The picture illustrates how should be manage secondary findings analysis. The analysis should consist of 3 main steps which should be perform step by step as indicated by arrows. The text under each step express what should be included in this step. MPS-massively parallel sequencing.



case of identifying of positive findings. Based on these information, patients could decide if they want to know these results and if yes which one. After testing the disclosing of result should be managed by the genetic specialist during the counseling (**Figure 1**).

Secondary findings in minors

Issues related to reporting of clinically significant findings from genetic testing of children and minors represent a special category of discussions to SF. While genetic testing and screening of newborn are common, genetic testing of pediatric patients are not so common and should be indicated only in the case of suspected diagnosis or selecting or setting up a dose of pharmacologic drugs. Positive family history of genetic disease should be known in the case of predictive testing of pediatric patient and an early intervention should positively affect the morbidity and mortality⁽²⁴⁾. In many countries information from genetic testing of child not related to his health condition are not generated. Also, late onset diseases are not investigated. For the maintaining of children autonomy testing of carrier status and reporting of results are postponed until the time when a child will be able to decide and actively present during pre- and post- test consultation⁽²⁵⁾. Views on reporting these findings are different among organizations^(8,12,13). Although this information could have radical mental and emotional impact due to the child is „predestinated“ that a disease will develop in him in a few years⁽²⁶⁾, they represent a medical benefit and only single way how to detect pathogenic variants in parents or in other relatives. Because of that ACMG recommends to screen genes with known clinical significance and report results of IF and SF without limitation of age of patient⁽⁷⁾.

Informed consent in genetic testing

Informed consent serves as protection of patient's or participant's autonomy based on ethical principles of respect of human rights⁽²⁷⁾. Although genomic analyses have benefits they have some risks also and this all should be discussed during informed consent obtaining process. Informed consent would not meet its purpose in the case of not adequately explained aspects related to: technical and interpretational limitations; probability of detecting clinically significant findings (IF or SF); or the risk of loss of privacy or private information⁽²⁸⁾. Informed consent should include describing of method, process of testing and their limitations. Determining of patient's preferences related to types of results for disclosing should be also included in informed consent. Important part of informed consent is related to process of disclosing results in the case that patient dies prior to disclosing results. And another important part of informed consent is related to data re-analysis or storing the results in medi-

cal records of patient⁽²⁹⁾. It is essential to discuss these issues clearly and understandable for patient and this is related to the process of genetic counseling and to the need of specialized genetic counselor⁽³⁰⁾. Currently, it is not clear who is authorized to obtain informed consent from patient, however the recommendations of ACMG state that the clinician who ordered a testing is responsible for obtaining informed consent and, he should provide pre- and post- consultations for patient⁽⁷⁾. During the consultation patients should get important information based on which they can decide what they prefer to know. On the other hand, during the consultations in addition to results, the recommendations how to follow in the case of detecting a positive finding would be provided for patient^(18,31).

Conclusion

Secondary findings have potential to reveal severe rare diseases in a patient but also in his relatives and so allow to prevent disease development or to initiate an early treatment. The main objective of ACMG recommendations is to prevent morbidity and mortality related to rare diseases, for which there is available some form of therapy and ultimately, to improve healthcare. Among laboratories providing genetic testing, however, there are different views on managing SF. Some of them consider the minimum list of genes as a starting point or as an indicative list of genes to which add other genes based on their years of practice. Instead of adoption of ACMG recommendations, they create their own rules which they follow in their routine procedures. To make it possible to effectively use the potential medical benefits of such analyses in routine clinical care it is desirable to create a uniform approach together with a standard informed consent protocol for managing SF.

Acknowledgements: *The work in our laboratories were financially supported by the Operational Programme Research and Development funded by the European Research and Development Fund (ERDF) („DIARET_SK“ ITMS 26240120038); by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (VEGA 2/0115/15); and by the Ministry of Health of the Slovak Republic (MZSR_2018/46-SAV-5).*

Pod'akovanie: *Práca v našom laboratóriu bola finančne podporená Operačným programom Výskum a Rozvoj sponzovaným Európskym fondom regionálneho rozvoja (ERDF) („DIARET_SK“ ITMS 26240120038); Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 2/0115/15); a Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky (MZSR_2018/46-SAV-5).*

REFERENCES

1. Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) Available at: www.genome.gov/sequencingcostsdata. Accessed [14. 11. 2018].
2. Krier JB, Kalia SS, Green RC. Genomic sequencing in clinical practice: applications, challenges, and opportunities. *Dialogues Clin Neurosci* 2016; 18: 299-312.

3. Smith M. DNA sequence analysis in clinical medicine, proceeding cautiously *Front. Mol Biosci* 2017; 4: 24.
4. Shkedi-Rafid S, Dheensa S, Crawford G, et al. Defining and managing incidental findings in genetic and genomic practice. *J Med Genet* 2014; 51: 715.

5. Dorschner MO, Amendola LM, Turner EH, et al. Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants' exomes. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 631-640.
6. https://uwaterloo.ca/research/sites/ca.research/files/uploads/files/guideline_on_incidental_findings_reporting_aug_2016.pdf
7. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013; 15: 565-574.
8. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2016; 19(2): 249-255.
9. Levenson D. The AJMG SEQUENCE: Decoding News and Trends for the Medical Genetics Community. American college of medical genetics and genomics updates secondary findings guidelines: Revision adds new genes to testing list, outlines standardized process for including variants on list. *Am J Med Genet A* 2017; 173(3): 576-577.
10. Natarajan P, Gold NB, Bick AG, et al. Aggregate penetrance of genomic variants for actionable disorders in European and African Americans. *Sci Transl Med* 2016; (8)364: 364.
11. Berkman BE, Hull SC, Eckstein L. The unintended implications of blurring the line between research and clinical care in a genomic age. *Per Med* 2014; 11: 285-295.
12. Boycott K, Hartley T, Adam S, et al. The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: position statement of the Canadian College of Medical Geneticists. *J Med Genet* 2015; 52: 431-437.
13. van El CG, Cornel MC, Borry P, et al. Whole-genome sequencing in health care. Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: S1-5.
14. Pujol P, Vande Perre P, Faivre L, et al. Guidelines for reporting secondary findings of genome sequencing in cancer genes: the SFMPP recommendations. *Eur J Hum Genet* 2018; 26(12): 1732-1742.
15. Yu JH, Harrell TM, Jamal SM, et al. Attitudes of genetics professionals toward the return of incidental results from exome and whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* 2014; 95(1): 77-84.
16. Klitzman R, Appelbaum PS, Fyer A, et al. Researchers' views on return of incidental genomic research results: qualitative and quantitative findings. *Genet Med* 2013; 15: 888-895.
17. Klitzman R, Buquez B, Appelbaum PS, et al. Processes and factors involved in decisions regarding return of incidental genomic findings in research. *Genet Med* 2014; 16: 311-317.
18. Mackley MP, Fletcher B, Parker M, et al. Stakeholder views on secondary findings in whole-genome and whole-exome sequencing: a systematic review of quantitative and qualitative studies. *Genet Med* 2017; 19(3): 283-293.
19. Gouna EG, Armstrong N, Wallace SE. Compare and contrast: a cross-national study across UK, USA and Greek experts regarding return of incidental findings from clinical sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 344-349.
20. Middleton A, Morley KI, Bragin E et al. Attitudes of nearly 7000 health professionals, genomic researchers and publics toward the return of incidental results from sequencing research. *Eur J Hum Genet* 2016; 24(1): 21-29.
21. Sanderson SC, Linderman MD, Suckiel SA, et al. Motivations, concerns and preferences of personal genome sequencing research participants: Baseline findings from the HealthSeq project. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016;24(1):14-20.
22. Marshall DA, Gonzalez J, Johnson FR, et al. What are people willing to pay for whole-genome sequencing information, and who decides what they receive? *Genetics in Medicine* 2016; 18: 1295-1302.
23. Fiallos K, Applegate C, Mathews DJ, et al. Choices for return of primary and secondary genomic research results of 790 members of families with Mendelian disease. *Eur J Hum Genet* 2017; 25: 530-537.
24. Ross LF, Saal HM, David KL, et al. Technical report: Ethical and policy issues in genetic testing and screening of children. *Genetics in medicine* : official journal of the American College of Medical Genetics 2013; 15: 234-245.
25. Clarke AJ. Managing the ethical challenges of next-generation sequencing in genomic medicine. *Br Med Bull* 2014; 111: 17-30.
26. Abdul-Karim R, Berkman BE, Wendler D, et al. Disclosure of incidental findings from next-generation sequencing in pediatric genomic research. *Pediatrics* 2013; 131: 564-571.
27. Wolf SM, Annas GJ, Elias S. Point-counterpoint. Patient autonomy and incidental findings in clinical genomics. *Science* 2013; 340: 1049-1050.
28. Bergner AL, Bollinger J, Raraigh KS, et al. Informed consent for exome sequencing research in families with genetic disease: the emerging issue of incidental findings. *Am J Med Genet Part A* 2014; 164 A(11): 2745-2752.
29. Wolf SM, Lawrenz FP, Nelson CA, et al. Managing incidental findings in human subjects research: analysis and recommendations. *J. Law Med. Ethics* 2008; 36: 219-248
30. Cordier C, Lambert D, Voelckel MA, et al. A profile of the genetic counsellor and genetic nurse profession in European countries. *J Community Genet* 2012; 3: 19-24.
31. McGuire AL, Joffe S, Koenig BA, et al. Point-counterpoint: Ethics and genomic incidental findings. *Science* 2013; 340: 1047-1048.
32. Mackley MP and Capps B. Expect the unexpected: screening for secondary findings in clinical genomics research. *British Medical Bulletin.* 2017; 122(1): 109-122.



Mgr. Zuzana Kubiritová

Institute for Clinical and Translational Research
Biomedical Research Center
Slovak Academy of Sciences
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava
e-mail: kubiritova.zuzka@gmail.com

HCV infection – more than 20 years of drug development

Silvia Rybecká¹, Adriána Liptáková², Stanislav Stuchlík^{1,3}

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

²Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

³Science Park, Comenius University, Bratislava

Since the discovery of hepatitis C virus (HCV) in 1989 as a causing agent of acute and chronic hepatitis C (HC), therapy of the disease underwent substantial progress. Interferon was the golden standard for treating HC patients for more than two decades. This so-called conventional therapy resulted in sustained virological response¹ (SVR) only in 50 % of HCV genotype 1 patients and 80 % of HCV genotype 2 and 3 patients. This treatment had not only a significant impact to patient's quality of life but also was long-lasting (24-48 weeks). Nowadays pangenotypic regimens combining direct acting antiviral drugs (DAADs) are successful for 95 % of all HCV genotype patients and the therapy has shortened to 8 weeks.

Keywords: Hepatitis C, HCV polymorphism, direct acting antiviral drugs

Infekcia HCV – viac ako 20 rokov vývoja terapie

Od objavenia vírusu hepatitídy C (HCV) v roku 1989 ako pôvodcu akútnej a chronickej hepatitídy C (HC) terapia tohto ochorenia značne pokročila. Liečba interferónom predstavovala zlatý štandard terapie pre pacientov s HC viac ako dve dekády. Táto takzvaná konvenčná terapia vyvolala dlhodobú virologickú odpoveď (SVR) iba u 50 % pacientov s HCV genotypom 1 a u 80 % pacientov s genotypmi 2 a 3 s negatívnymi dôsledkami na kvalitu života pacienta a dĺžkou trvania 24 až 48 týždňov. Súčasná pangenotypická liečba, pozostávajúca z kombinácie takzvaných priamych antivirotik, je účinná až pre 95 % pacientov všetkých HCV genotypov s minimom nežiaducich účinkov.

Kľúčové slová: hepatitída C, polymorfizmus HCV, priamo účinkujúce antivirotiká

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 37 – 39

WHO estimated that in 2015, 71 million persons were living with chronic HCV infection worldwide (global prevalence: 1%) and that 399 000 had died from cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Aside from the burden of HCV infection secondary to liver-related sequelae, HCV causes an additional burden through comorbidities among persons with HCV infection, including depression⁽¹⁾, diabetes mellitus⁽²⁾ and chronic renal disease⁽³⁾. A proportion of these morbidities is directly attributable to HCV and is therefore referred to as extrahepatic manifestations. These manifestations are likely to be affected by treatment⁽⁴⁾.

Mechanism of infection

HCV, which is transmitted parenterally, enters the liver via the bloodstream. In the liver sinusoids, the virus can pass the fenestrated endothelium and contact the basolateral surface of hepatocytes. HCV host cell entry is a complex multistep process that requires numerous host cell proteins like scavenger receptor class B type I (SCARB1), claudin-1, occludin and tetraspanin CD81. All four entry factors need to be expressed on HCV-susceptible cells⁽⁶⁾. SCARB1 and CD81 binds to glycoprotein E2 on the surface of virion. However, exact function of all four host cell receptors is not clear and its experimental evidence is lacking. After cell surface binding and coordinated interaction with entry factors, HCV is taken up by clathrin mediated endocytosis.

No vaccine

Despite 20 years of intensive research, a vaccine to prevent infection with the HCV remains elusive. HCV diversity is classified into seven genetically distinct genotypes (HCV 1–7) that differ by more than 30 % at nucleotide level, and into more than 50 subtypes that differ between 15 % and 25 % at nucleotide level within genotypes. A major barrier for the development of vaccines, broadly active antivirals, and assays, is the high genetic diversity of HCV and its potential to quickly adapt to different environments. HCV is under constant immunological pressure. Neutralizing antibody response of the host is targeting mainly the viral envelope proteins E1 and E2, but the virus manages to escape due to the large plasticity in the highly variable regions in these proteins. Effective targeting of conserved regions (**Figure 1**) in the genome may improve vaccine design. While vaccine design is still under experimental stage, development of DAADs has progressed into clinical practice.

HCV – basics, that helped to improve the therapy

Understanding of all aspects of HCV lifecycle helps to find therapy strategies targeted straightly to virus. An example of this approach is discovery of miRNA-122 (miR-122) involvement in HCV infection and subsequent development of drug called miravirsin. HCV relies on the host miR-122 in a unique way as miR-122 binds to the 5'-non-translated region of the

¹Sustained Virological Response = absence of anti-HCV and HCV RNA in the blood 12 weeks after treatment

HCV genome, which results in increased stability of the latter and thus increased replication. Miravirsen represents the first RNA-interference-based drug currently undergoing phase II of clinical trials⁽⁷⁾. Silencing of expression miR-122 by Miravirsen leading to HCV genome degradation may be a solution for HC patients resistant to current pangenotypic regimens.

The story of increasing effectiveness

15 years ago the standard of care of adolescents and children infected with HCV was dual therapy with pegylated-interferon and ribavirin for 24 weeks for genotypes 2 and 3, and 48 weeks for genotypes 1 and 4. This combination resulted in an SVR rate of around 52% in children infected with HCV genotypes 1 and 4, and 89% in those infected with HCV genotypes 2 and 3, but was associated with significant side-effects⁽⁸⁾.

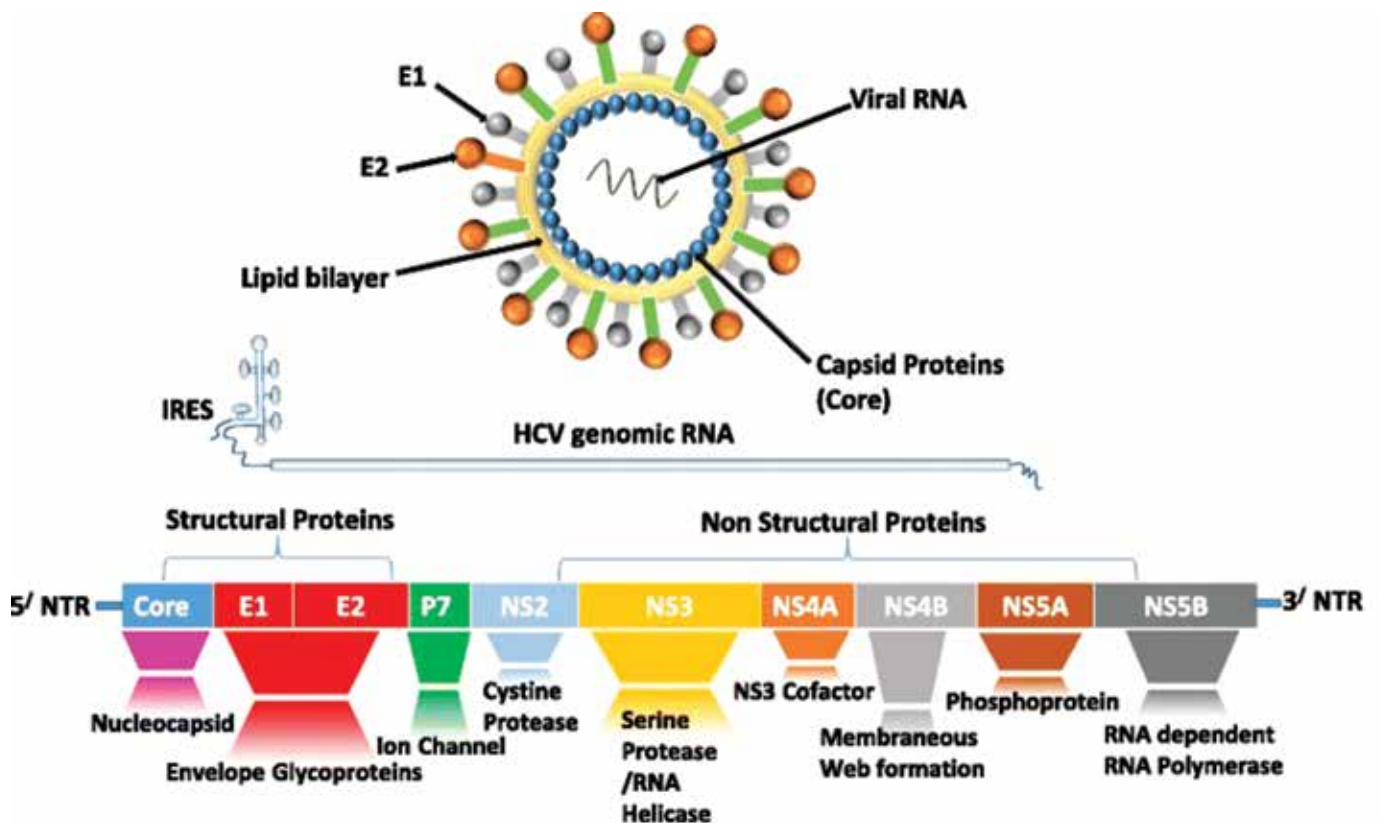
In 2011, two inhibitors against NS3 and NS4A viral proteases have been included in standard therapy in some regions, including Slovakia, which are mainly focused on the treatment of genotype 1. The triple combination of PEG-interferon, ribavirin and protease inhibitors improved virological response in several cohorts of patients from 50 % to 70 %^(9,10).

However, this approach has limited efficacy for a particular group of patients (with liver cirrhosis, liver transplant patients, patients who are primarily unresponsive to this type of treatment, and hemodialysis patients). An important aspect of the development of the NS3 inhibitor is resolution of the crystalline structure of this protein alone and in conjunction with the cofactor, which facilitated the design of the drug. There are currently several drugs that inhibit NS3 protease (**Table 1**). All DAADs against NS3 target the active

Table 1. Direct-acting antivirals (DAAs) divided according to class⁽⁴⁾

NS3/4 A (protease)	NS5A inhibitors	NS5B polymerase inhibitor (nucleotide analogue)	NS5B polymerase inhibitor (non-nucleoside analogue)
Glecaprevir	Daclatasvir	Sofosbuvir	Dasabuvir
Voxilaprevir	Velpatasvir		
Grazoprevir	Ledipasvir		
Paretaprevir	Ombatasvir		
Simeprevir	Pibrentasvir		
	Elbasvir		

Figure 1. The HCV genome consists of a 9.6 kilobase ORF flanked with 5' and 3' untranslated regions⁽⁵⁾. IRES-mediated translation of the ORF produces polyprotein that is processed by cellular and viral proteases into ten viral proteins: C, E1 and E2 structural proteins, and P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B non-structural proteins. Abbreviations: C: Core protein, IRES: Internal ribosome entry site, ORF: Open reading frame, NS: Non-structural protein



site of the protease, but it has been identified substitutions at this site that cause resistance⁽¹¹⁾.

NS5A is another virus protein candidate to inhibit. This multifunctional protein is an essential component of the viral replication complex, involved in the regulation of replication and the composition of the viral particle. These drugs (**Table 1**) have become a central part of the current combined DAAD therapy but have a relatively low barrier to the development of viral resistance⁽¹¹⁾.

NS5B is an HCV protein that functions as a RNA-dependent RNA-polymerase and is therefore a target for the inhibition of viral replication. The basic research of the NS5B polymerase has enabled the generation of efficient nucleoside analogues against HCV virions with various pangenomes. The great advantage is that it is targeting a highly conserved enzyme, and therefore, in this case, the barrier to the development of resistance is high. This category includes the drug sofosbuvir, which is used in the treatment of all genotypes of HCV. The combination of sofosbuvir with the NS5A inhibitor velpatasvir is effective against all six

genotypes of HCV^(12,13). As of May 2018, the FDA or the EMA had approved 13 direct-acting antivirals from four classes (**Table 1**). Therefore, nowadays HCV therapy, including Slovak medical practice, combines DAAs according to a specific genotype at the highest efficacy level according to the recommendation table.

Acknowledgments: *This publication is the result of project implementation: Development of the center of excellence for utilization of information on bio-macromolecules in disease prevention and in improvement of quality of life (ITMS 26240120027) supported by the R & D Operational Program funded by the ERDF.*

Podakovanie: *Táto publikácia je výsledkom implementácie projektu: Rozvoj centra excelentnosti pre využitie informácií o biomakromolekulách pri predchádzaní ochorení a zlepšenie kvality života (ITMS 26240120027) podporeného OPVaV z ERDF.*

REFERENCES

- Adinolfi LE, Nevola R, Rinaldi L, et al. Chronic Hepatitis C Virus Infection and Depression. *Clin Liver Dis* 2017; 21(3): 517-534. doi:10.1016/j.cld.2017.03.007
- Serfaty L. Metabolic Manifestations of Hepatitis C Virus: Diabetes Mellitus, Dyslipidemia. *Clin Liver Dis* 2017; 21(3): 475-486. doi:10.1016/j.cld.2017.03.004
- Long JD, Rutledge SM, Sise ME. Autoimmune Kidney Diseases Associated with Chronic Viral Infections. *Rheum Dis Clin N Am* 2018; 44(4): 675-698. doi:10.1016/j.rdc.2018.06.006
- World Health Organization. WHO | Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. WHO. <http://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-2018/en/>. Published 2018. Accessed December 3, 2018.
- Elberry MH, Darwish NHE, Mousa SA. Hepatitis C virus management: potential impact of nanotechnology. *Virology* 2017; 14: 88. doi:10.1186/s12985-017-0753-1
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457(7231): 882-886. doi:10.1038/nature07684
- Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharm Res* 2017; 34(7): 1339-1363. doi:10.1007/s11095-017-2134-2
- Mack CL, Gonzalez-Peralta RP, Gupta N, et al. NASPGHAN practice guidelines: Diagnosis and management of hepatitis C infection in infants, children, and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54(6): 838-855. doi:10.1097/MPG.0b013e318258328d
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 364(25): 2405-2416. doi:10.1056/NEJMoa1012912
- Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, et al. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2 b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet Lond Engl* 2010; 376(9742): 705-716. doi:10.1016/S0140-6736(10)60934-8
- Pawlotsky J-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* 2016; 151(1): 70-86. doi:10.1053/j.gastro.2016.04.003
- Feld JJ, Jacobson IM, Hézode C, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med* 2015; 373(27): 2599-2607. doi:10.1056/NEJMoa1512610
- Foster GR, Afdhal N, Roberts SK, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. *N Engl J Med* 2015; 373(27): 2608-2617. doi:10.1056/NEJMoa1512612



Mgr. Silvia Rybecká

Department of Molecular Biology,
Faculty of Natural Sciences, Comenius University
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
e-mail: silvia.rybecka@gmail.com

HELLP syndróm

Lucia Striešková

Geneton, s. r. o., Bratislava

HELLP syndróm je tehotenské ochorenie spájané s ťažkou formou preeklampsie, pričom termín HELLP je skratka používaná na opis klinického stavu, ktorý vedie k hemolýze, zvýšeným pečeňovým enzýmom a nízkemu počtu krvných doštičiek. Etiológia HELLP syndrómu nie je ešte úplne objasnená, no syndróm je spojený s vážnymi klinickými komplikáciami, ktoré môžu viesť k smrti matky a aj plodu. Preto je nevyhnutné nájsť spôsob, ako rýchlejšie diagnostikovať toto ochorenie a nájsť vhodnú klinickú intervenciu. HELLP syndróm je najčastejšie diagnostikovaný medzi 27. a 37. týždňom tehotenstva, no môže byť zaznamenaný až po pôrode.

Kľúčové slová: HELLP syndróm, preeklampsia, hemolýza

HELLP syndrome

HELLP syndrome is a pregnancy-related disease associated with a severe form of preeclampsia; the term HELLP is an abbreviation used to describe a clinical condition that leads to hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count. The etiology of HELLP syndrome is not fully elucidated yet, but the syndrome is associated with serious clinical complications that can lead to the death of both the mother and the foetus and it is, therefore, necessary to find a way to diagnose the disease more quickly and find appropriate clinical intervention. HELLP syndrome is most frequently diagnosed between the 27th and 37th weeks of pregnancy, but it can also be recorded postpartum.

Keywords: HELLP syndrome, preeclampsia, hemolysis

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 40 – 41

Úvod

HELLP (*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*) syndróm je závažnou komplikáciou tehotenstva, ktorý sa vyskytuje u 0,2 – 0,8 % tehotných žien a v 70 – 80 % prípadov koexistuje s preeklampiou. Preeklampsia je definovaná ako nový nástup hypertenzie a proteínúrie po 20. týždni tehotenstva u predtým zdravej ženy. Avšak hypertenzia alebo proteínúria nie sú prítomné u 10 – 15 % žien, u ktorých sa vyvinul HELLP syndróm⁽¹⁾. HELLP syndróm v roku 1982 prvýkrát opísal Weinstein a kol., pričom termín HELLP je skratka používaná na opis klinického stavu, ktorý vedie k hemolýze, zvýšeným pečeňovým enzýmom a nízkemu počtu krvných doštičiek⁽²⁾. HELLP syndróm môže viesť k rôznym komplikáciám ohrozujúcim život, ako je abrupcia placenty, pľúcny edém nasledovaný akútnou respiračnou insuficienciou, cerebrálne krvácanie, septický šok, akútne zlyhanie obličiek a hepatické krvácanie v dôsledku ruptúry pečene⁽⁴⁾.

Klinické príznaky a výskyt

Typickými klinickými príznakmi sú bolesť a palpačná citlivosť v epigastriu a v pravom hypochondriu, únava a nešpecifické príznaky. Ďalej sú to opuchy tváre a končatín, nauzea, vracanie, poruchy zraku, krvácaivé prejavy a hnačka; až 30 – 60 % žien má bolesti hlavy. Mnoho pacientok však opisuje aj malátnosť pár dní pred nástupom symptómov. Príznaky zvyčajne nepretržite postupujú a ich intenzita sa často spontánne mení. HELLP syndróm sa prejavuje väčšinou počas noci a cez deň príznaky ustupujú⁽⁴⁾.

V 70 % prípadov sa HELLP syndróm prejaví počas tehotenstva medzi 27. a 37. týždňom. Približne v 10 % prípadov sa prejaví pred 27. týždňom tehotenstva a 20 % po 37. týždni tehotenstva. HELLP syndróm sa môže prejavíť aj po pôrode,

a to väčšinou do 48 hodín u žien, ktoré mali pred pôrodom hypertenziu alebo proteinúriu. Hoci je to u každej tehotnej ženy variabilné, nástup HELLP syndrómu je zvyčajne rýchly⁽³⁾.

Ženy s čiastočným HELLP syndrómom majú menej symptómov a vyvinie sa u nich menej komplikácií ako u žien s úplným syndrómom. Avšak čiastočný alebo neúplný HELLP syndróm sa môže vyvinúť na úplnú formu tejto choroby⁽⁵⁾.

Sestry a deti ženy, ktorá trpela HELLP syndrómom, majú zvýšené riziko HELLP syndrómu. Takisto žena, ktorá už v predchádzajúcom tehotenstve mala HELLP syndróm, má zvýšené riziko jeho opätovného vzniku (14 – 24 %) a rovnako preeklampsie (22 – 28 %) v nadchádzajúcich tehotenstvách, čo poukazuje na súvisiace patogenetické mechanizmy⁽⁵⁾.

Ukázalo sa, že hoci HELLP syndróm môže mať vplyv aj na novorodenca, väčším problémom je skorý pôrod v dôsledku syndrómu, a teda skôr nízky gestačný vek dieťaťa ako samotný HELLP syndróm. Dvojčatá narodené matkám s HELLP syndrómom môžu vyvolať trombocytopéniu a neurologické komplikácie. Avšak väčšina novorodencov narodených ženám s HELLP syndrómom má normálny dlhodobý vývoj⁽⁵⁾.

Patofyziológia

Hemolýza

Rapidné zníženie počtu erytrocytov počas HELLP syndrómu je pravdepodobne dôsledkom poškodenia buniek spôsobeného ukladaním fibrínu, čo vedie k fragmentácii červených krviniek. Toto zistenie je konzistentné s mikroangiopatickou hemolytickou anémiou, s deformovanými červenými krvinkami pozorovanými v mikroskope spolu so schistocytmi aj s polychromáziou v periférnej krvi⁽⁷⁾.

Široko prístupné markery hemolýzy môžu byť hladiny laktátdehydrogenázy (LDH) a nekonjugovaného bilirubínu. Navyše prítomnosť retikulocytov môže byť vysvetlená ako úsilie organizmu čeliť týmto podmienkam a uvoľniť nezrelé bunky ako kompenzačný odraz. Ukázalo sa, že citlivejším a presnejším ukazovateľom hemolýzy je nezvyčajne nízka hladina haptoglobínu. Jeho stanovenie je však zriedkavo zahrnuté v rutinnom laboratórnom skríningu pacientov⁽⁴⁾.

Zvýšenie pečenejých enzýmov

Zvýšenie pečenejých enzýmov môže odrážať hemolytický proces aj postihnutie pečene. Hemolýza prispieva v podstate k zvýšeným hladinám laktátdehydrogenázy, zatiaľ čo zvýšené hladiny aspartátaminotransferázy (AST) a alanínaminotransferázy (ALT) sú väčšinou spôsobené poškodením pečene. Plazmatická glutatión-S-transferáza-a1 (GST-a1) môže poskytnúť citlivejší indikátor pre akútne poškodenie pečene ako AST a ALT a umožniť skoršie rozpoznanie. Avšak meranie GST-a1 nie je všeobecne používané a zatiaľ sa nenachádza v rutinnom diagnostickom postupe⁽⁴⁾.

Nízky počet krvných doštičiek

Nízky počet krvných doštičiek (trombocytopenia) v tehotenstve môže byť spôsobený gestačnou trombocytopeniou (59 %), imunitnou trombocytopenickou purpurou (11 %), preklampsiou (10 %) alebo HELLP syndrómom (12 %). Trombocytopenia je pri uvedených komplikáciách zriedkavá alebo častá, no pri HELLP syndróme úplne bežná. Zníženie počtu krvných doštičiek je pri HELLP syndróme spôsobené dôsledkom ich zvýšenej spotreby. Doštičky sa aktivujú a priľnú k poškodeným vaskulárnym endotelálnym bunkám, čo vedie k zvýšenému pohybu trombocytov s kratšou životnosťou⁽⁴⁾.

Liečba tehotných žien s HELLP syndrómom

Vo všeobecnosti existujú tri hlavné možnosti na liečbu žien s HELLP syndrómom. Tie zahŕňujú:

1) Okamžitý pôrod, ktorý je prvou voľbou v 34. týždni tehotenstva alebo neskôr.

2) Pôrod do 48 hodín po vyhodnotení, stabilizácii klinického stavu matky a liečbe kortikosteroidmi. Počas 27 až 34 týždňov tehotenstva sa táto možnosť javí ako najvhodnejšia vo väčšine prípadov.

3) Predčasná liečba dlhšie ako 48 – 72 hodín u tehotných žien pred 27. týždňom tehotenstva. V tomto prípade sa tiež používa liečba kortikosteroidmi⁽¹⁾.

Liečba HELLP syndrómu je založená na symptómoch syndrómu, a teda pacientkam s hypertenziou sú podávané lieky na hypertenziu a pod. Preto je potrebné sledovať červené krvinky, krvné doštičky a hladiny pečenejých enzýmov. Avšak jedinou spoľahlivou liečbou je pôrod. Pacientky s gestačným vekom nižším ako 34 týždňov, ktoré sú klinicky stabilné, môžu pôrod oddialiť na 36 až 48 hodín a v tomto čase sú im podávané kortikosteroidy na maturáciu pľúc plodu. Liečba HELLP syndrómu s kortikosteroidmi, zameraná na pulmonárnu maturáciu plodu a obnovenie počtu krvných doštičiek matky je bežná, ale jeho klinický význam zostáva zatiaľ nejasný⁽⁶⁾.

Záver

Hoci presná patofyziológia HELLP syndrómu je stále neznáma, existujú viaceré teórie. Je dôležité vedieť rozpoznať faktory, ktoré prispievajú k HELLP syndrómu. Včasné rozpoznanie a diagnostika sú dôležité pre liečbu matky aj dieťaťa s cieľom zníženia komplikácií, mortality a morbiditu. Pochopenie vplyvu HELLP syndrómu na plod, klinické príznaky, diagnostické hodnotenie novorodenca aj terapeutické prístupy a možnosti liečby by mohli pomôcť pri následnej starostlivosti o dieťa hneď po pôrode.

Napriek všetkým nedávnym pokrokom vo svojej včasnej diagnostike a liečbe je HELLP syndróm stále závažnou komplikáciou tehotenstva ohrozujúcou život. Keďže jeho patogenéza nebola úplne objasnená, HELLP syndróm zostáva komplexnou diagnostickou a terapeutickou výzvou. Hoci je nevyhnutné, aby vysokorizikové tehotné ženy boli dôkladne sledované, aby sa zabránilo rozvoju HELLP syndrómu, je veľmi dôležité posúdiť potrebu poradenstva pre pacientky pred tehotenstvom, najmä v prípadoch s pozitívnym vývojom preeklampsie a HELLP syndrómu v predchádzajúcom tehotenstve.

LITERATÚRA

1. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. BMC pregnancy and childbirth 2009; 9: 1-15.
2. Weinstein L. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. 1982. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2005; 142: 159-167.
3. Barnhart L. Syndrome and the Effects on the Neonate. Neonatal network 2015; 34: 269-273.
4. Abildgaard U, Heimdal K. Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count(HELLP): a review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013; 166: 117-23.

5. Jebbink J, Wolters A, Fernando F, et al. Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome – a review. Biochim Biophys Acta 2012; 1822: 1960-1969.

6. Dusse LM, Alpoim PN, Silva JT, et al. Revisiting HELLP syndrome. Clin Chim Acta 2015; 7: 117-120.

7. Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 2004; 103: 981-991.



Mgr. Lucia Striešková, PhD.

Geneton, s. r. o.

Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava,

e-mail: lucia.strieskova@geneton.sk

ACTN3: „Rýchlostný gén“

Martina Pečimonová

Geneton, s. r. o., Bratislava

Variant p. R577X v *ACTN3* géne je jedným z najštudovanejších a najreplikovateľnejších variantov asociovaných s predispozíciou na športový výkon. Vplyvom vzniku predčasného stop kodónu v syntéze α -aktinínu-3 kódovaného týmto génom dochádza k úplnej absencii tohto proteínu v kontraktilnom aparáte rýchlych svalových vlákien, čo vedie k ich premene na pomalé vlákna. Tento posun je sprevádzaný zmenami na štruktúrálnej, metabolickej, signalizačnej úrovni a pri spracovaní vápnika. Výskumy zamerané na štúdium vplyvu deficiencie α -aktinínu-3 na športový výkon u športovcov i bežnej neatletickej populácie odhalili výrazne nižšiu frekvenciu XX genotypu u vrcholových šprintérov a silových atlétov, čo nasvedčuje tomu, že tento genotyp nie je vhodný na rýchle a výkonné svalové kontrakcie, preto dostal *ACTN3* gén pomenovanie „gén pre rýchlosť“. Tento prehľadový článok prináša informácie o α -aktiníne-3, mechanizme jeho deficiencie a jej potenciálnych výhodách či nevýhodách pri určitých športových znakoch.

Kľúčové slová: ACTN3, α -aktinín-3, R577X, športový výkon

ACTN3: 'The gene for speed'

p. R577X variant in *ACTN3* gene is one of the most studied and replicated variants associated with the predisposition for sport performance. Due to the formation of premature stop codon in the synthesis of α -actinin-3 encoded by this gene, this protein is completely absent in the contractile apparatus of fast-twitch muscle fibers resulting in their transformation to slow-twitch fibers. This shift is accompanied with the changes in the structure, metabolism, signaling as well as calcium handling. Research focused on studying the effect of α -actinin-3 deficiency on sport performance in athletes, and non-athletic population revealed a significantly lower frequency of XX genotype in elite sprinters and power athletes suggesting that this genotype is not suitable for rapid and powerful muscle contractions. Therefore, the *ACTN3* gene got the name 'gene for speed'. This review provides information about α -actinin-3, the mechanism of its deficiency and the potential advantages and disadvantages in certain sport-associated traits.

Keywords: ACTN3, α -actinin-3, R577X, sport performance

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 42 – 46

Úvod

Športový výkon u človeka má sčasti genetické pozadie, pričom genetika vplyva z 30 % až 80 %, ale i environmentálne pozadie, ako je výživa, fyzická aktivita, rasová príslušnosť, pohlavie a vek. Počas posledných desaťročí sa výskum v oblasti športu sústredil na objasnenie vplyvu genetickej predispozície na športový výkon, čo viedlo k identifikácii množstva kandidátnych génov asociovaných s rozličnými športovými znakmi. Jedným z najštudovanejších a najlepšie replikovaných variantov asociovaných s výkonom kostrových svalov je p. R577X variant v *ACTN3* géne kódujúcom štruktúrally svalový proteín α -aktinín-3⁽¹⁾.

α -aktinínová génová rodina

α -aktinín-3 patrí medzi α -aktiníny, jednu z najkonzervovanejších génových rodín s dôležitou funkciou v rámci evolúcie, počas ktorej dochádzalo k formovaniu kontraktilného systému nevyhnutného na bunkové procesy, ako je cytokinéza, pohyblivosť buniek a kontrakcia svalstva⁽²⁾. Sú to dimérne proteíny spájajúce aktínové bielkoviny kontraktilného aparátu svalových vlákien. U cicavcov dochádza k expresii štyroch typov α -aktinínových izoform kódovaných génmi

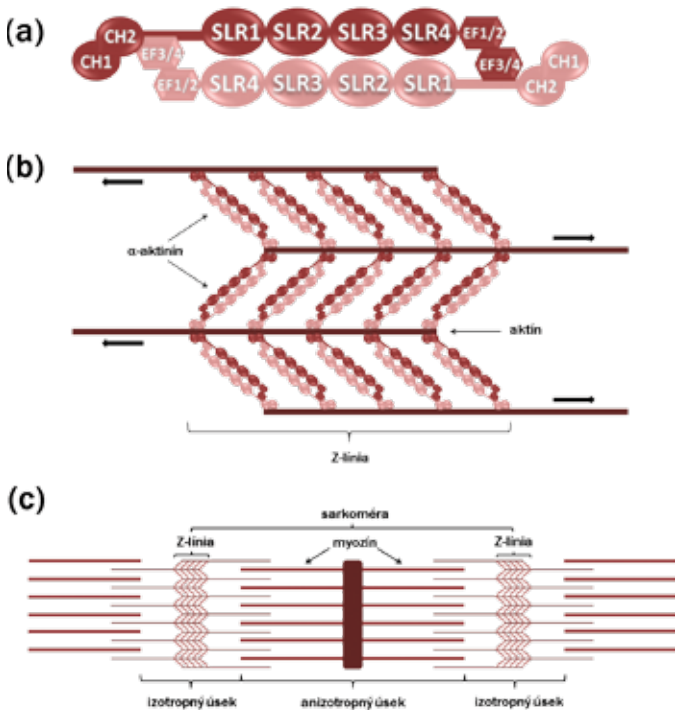
ACTN1-4 s odlišnými biochemickými vlastnosťami a rozdielnymi miestami expresie⁽³⁾. U človeka sú prítomné tri izoformy α -aktinínov, z nich dve, α -aktinín-2 a α -aktinín-3 kódované génmi *ACTN2* a *ACTN3*, sa podieľajú na stavbe svalového vlákna⁽⁴⁾. Nachádzajú sa v Z-línii, kde spájajú aktínové filamenty susediacich sarkomér⁽⁵⁾.

α -aktinínové diméry sú usporiadané antiparalelne a pozostávajú z troch domén vykazujúcich vysokú konzervovanosť sekvencií: (i) N-terminálnej domény zloženej z dvoch domén kalponínovej homológie (CH domény, z angl. *calponin-homology*), ktorá je zodpovedná za viazanie aktínových vlákien; (ii) stredovej domény pozostávajúcej zo štyroch opakovaní podobných spektrínu (SLR1-4, z angl. *spectrin-like repeats 1-4*) a (iii) C-terminálnej domény podobnej kalmodulínu s dvomi pármí motívov, tzv. *EF-hand* (EF1/2 a EF 3/4)⁽⁶⁾. Väzba aktínu sa uskutočňuje cez CH1 doménu, pričom samotná CH2 túto vlastnosť nemá. Schopnosť viazať aktín sa zvyšuje, ak sú obe domény skombinované⁽⁷⁾. Štruktúra α -aktinínu a jeho lokalizácia v sarkomére je schematicky znázornená na obrázku 1.

U ľudí sa vyskytujú tri typy vlákien kostrových svalov: typ I, IIA a IIB, ktoré sa odlišujú obsahom glykogénu, lipidov, myoglobínu a mitochondrií. Vlákna I. typu sa vyznačujú

pomalým časom kontrakcie a sú rezistentné proti únave. Vlákna II. typu majú, naopak, rýchly a krátky čas kontrakcie a ich motorické jednotky sú v porovnaní s pomalými vláknami náchylnejšie na únavu⁽⁸⁾. Vlákna typu I a IIA sú oxidatívne a využívajú ako zdroj energie pyruvát, ktorý je oxidovaný v mitochondriách, preto majú v porovnaní s rýchlymi vláknami podstatne viac mitochondrií, generujú však oveľa menej sily na kontrakciu svalu. Rýchle glykolytické vlákna typu IIB majú vysoký podiel glykogénu, ktorého anaeróbnou glykolýzou je produkované ATP slúžiace ako zdroj energie ATP na kontrakciu svalu⁽⁹⁾. Zatiaľ čo α -aktinín-2 je exprimovaný v srdcovom svale a kostrových svalových vláknach, α -aktinín-3 sa exprimuje výlučne v rýchlych svalových vláknach (všetky IIB typy a približne v 50 % typu IIA), ktoré sú zodpovedné za generovanie sily pri vysokej rýchlosti. Hoci sú si tieto izoformy veľmi podobné, rozdielny vzor ich expresie naznačuje rozdielne funkcie vo svalovom vlákne^(10,11,12). Prehľad rozdielov medzi jednotlivými typmi svalových vlákien je uvedený v **tabuľke 1**.

Obrázok 1. Štruktúra a lokalizácia α -aktinínu v sarkomére. (a) Domény antiparalelného diméru α -aktinínu: N-terminálne CH1 a CH2 domény zodpovedné za viazanie aktínových vlákien, centrálna časť pozostávajúca zo štyroch SLR opakovaní a C-terminálne EF-hand domény. (b) Usporiadanie α -aktinínových dimérov Z-línií a ich viazanie aktínu. (c) Schematické znázornenie lokalizácie Z-línie v rámci sarkoméry svalového vlákna. Prevzaté od Houweling a kol. (2018).



Tabuľka 1. Rozdiely medzi jednotlivými typmi svalových vlákien

Typ svalových vlákien	I. typ	IIA typ	IIB typ
	pomalé	pomalé, asi 50 % rýchle	rýchle
Expresia α -aktinínu	α -aktinín-2	α -aktinín-2, asi v 50 % vláknach i α -aktinín-3	α -aktinín-3
Miera unaviteľnosti	rezistentné proti únave	rezistentné proti únave	náchylné na únavu
Metabolizmus	oxidatívny	oxidatívny	glykolytický
Obsah mitochondrií	vysoký	vysoký	nízky
Obsah glykogénu	nízky	nízky	vysoký

α -aktinín-3

α -aktiníny sa vďaka svojej lokalizácii, funkcii a vysokej evolučnej konzervovanosti stali vhodnými kandidátmi na identifikáciu kauzatívnych mutácií asociovaných s muskulárnymi dystrofiami u ľudí. V roku 1996 North a Beggs uviedli, že deficiencia α -aktinínu-3 je asociovaná s kongenitálnou muskulárnou dystrofiou a že táto deficiencia by mohla byť markerom tohto ochorenia v podskupine pacientov⁽¹⁰⁾. Neskôr sa však ukázalo, že ide buď o sekundárny jav, alebo nezávislý fenomén, ktorý nemá s týmto ochorením absolútne žiadnu súvislosť. Táto deficiencia bola tiež nájdená u pacientov s rozličnými typmi muskulárnej dystrofie, bola však vylúčená väzbovou analýzou, prípadne bola detegovaná aj u pacientov, u ktorých už bola kauzatívna mutácia identifikovaná⁽¹³⁾.

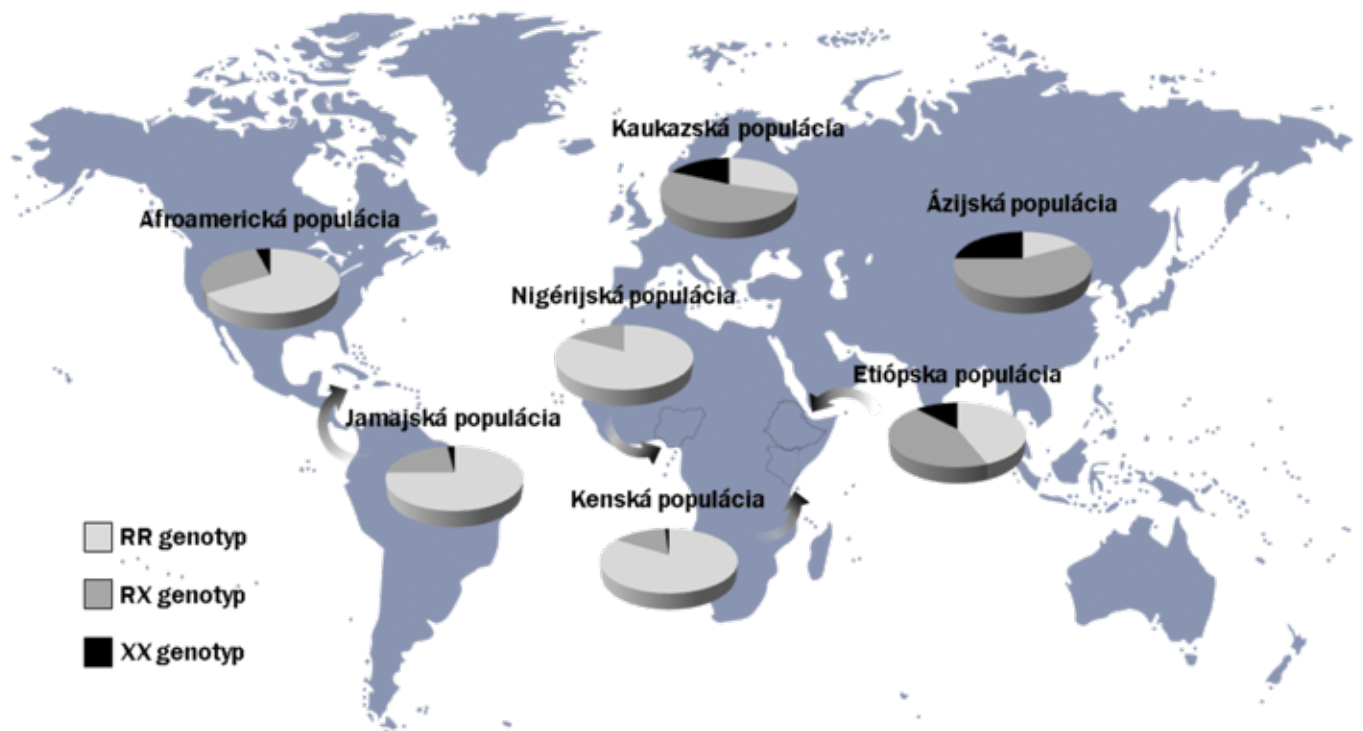
Mutácie v α -aktiníne-3 ako jedinom z rodiny ľudských α -aktinínov nie sú asociované so žiadnou patológiou, a to pravdepodobne z dôvodu kompenzácie jeho deficiencie α -aktinínom-2. Bola v ňom identifikovaná jediná mutácia NM_001104.3(ACTN3):c.1729C>T;p. Arg577Ter (p. R577X). Ide o jednonukleotidovú zmenu cytozínu za tymín, ktorá spôsobuje vznik predčasného stop kodónu, čo v konečnom dôsledku vedie k úplnej absencii α -aktinínu-3⁽¹⁴⁾. Táto zmena nevedie k patologickému fenotypu, čo naznačuje aj frekvencia výskytu minoritnej alely X, pričom sa predpokladá, že nositeľom XX genotypu je približne 1,5 miliardy ľudí. XX genotyp sa najčastejšie vyskytuje v ázijskej a kaukasskej populácii, kde sú jeho frekvencie 25 % a 18 %, v etiópskej kontrolnej neatletickej populácii je to 12 %, v afroamerickej 4 %, jamajskej 2 % a v kenskej iba 1 %^(15,16). V nigérijskej populácii sa XX genotyp nevyskytoval ani v testovanej neatletickej skupine, ani u vrcholových športovcov⁽¹⁵⁾. Frekvencie genotypov p.R577X sú graficky znázornené na obrázku 2.

Zvýšená frekvencia X alely v niektorých populáciách naznačuje pozitívnu selekciu tejto alely ako výsledok adaptácie na nižšiu teplotu okolia s obmedzeným zdrojom potravy⁽¹⁷⁾, keďže najčastejšie sa tento genotyp vyskytuje v severných oblastiach s nižšími priemernými ročnými teplotami a zníženou diverzitou druhov⁽¹⁸⁾. Zároveň je to jeden z mála *loss-of-function* variantov, ktoré sa v populácii udržali pomocou pozitívnej selekcie vplyvom migračnej expanzie moderných ľudí z Afriky do severnejších častí pred 40 000 až 60 000 rokmi⁽¹⁷⁾.

Zmeny v α -aktinín-3 deficientných svaloch

MacArthur a kol. (2008) využili na štúdium mechanizmu deficiencie α -aktinínu-3 Actn3 KO myšací model, ktorého fenotyp rekapituluje fenotyp navrhnutý asociačnými štúdiami u ľudí, pričom potvrdili dovedy publikované efekty ako zníženie sily v kostrových svaloch, zvýšený vytrvalostný výkon a rýchlejšie zotavenie z únavy navodenej kontrakciami svalov pri športovom výkone v porovnaní s divým typom myší.

Obrázok 2. Grafické znázornenie frekvencií jednotlivých genotypov variantu p. R577X v ACTN3 géne v testovaných populáciách. Genotypové frekvencie boli prevzaté od Yang a kol. (2007) a Scott a kol. (2010).



Keďže α -aktiníny všeobecne interagujú s množstvom cytoskeletálnych, sarkomérnych, signálnych a metabolických proteínov, v dôsledku absencie α -aktinínu-3 dochádza k nevyhnutným zmenám vo funkcii svalov na viacerých úrovniach, a to na štrukturálnej, metabolickej, signalizačnej úrovni, a tiež pri spracovávaní vápnika⁽¹⁹⁾.

U Actn3 KO myši bola absentujúca expresia α -aktinínu-3 kompenzovaná zvýšenou tvorbou α -aktinínu-2, pričom rýchle svalové vlákna boli transformované na pomalé, pri ktorých prevažujúcim fenotypom bola redukcia svalovej hmoty v priezovej oblasti, zmenené kontraktívne vlastnosti svalu a zmena metabolizmu z anaeróbného glykolytického na aeróbný oxidatívny, vplyvom čoho dochádza k zvýšenému uskladňovaniu glykogénu a zvýšenej aktivite oxidatívnych mitochondriálnych enzýmov. Predpokladá sa, že práve vďaka týmto zmenám, postihujúcim veľkosť svalu a jeho metabolizmus, keď dochádza k posunu k „energeticky výhodnejšej“ forme, dochádza k zvýšenému vytrvalostnému výkonu a efektívnejšej regenerácii svalov⁽¹⁹⁾.

Absenciou α -aktinínu-3 dochádza k zrušeniu jeho interakcie s množstvom proteínov Z-línie ako myotilín, titín, nebulín, dystrofín a β -integrín, vplyvom čoho nastáva zmena kontraktívnych vlastností Actn3 KO svalu. Proteíny ZASP, myotilín, desmín a γ -filamín sú nadregulované a v prípade myotilínu a desmínu môže dochádzať k ich agregácii, pričom obe tieto zmeny naznačujú aktívnu remodeláciu týchto deficientných svalov a tiež zvýšenú náchylnosť na poškodenie⁽¹⁹⁾. Nevyhnutný je však ďalší výskum zameraný na stanovenie úlohy α -aktinínu-3 pri oprave a remodelácii svalstva.

Rýchle glykolytické svalové vlákna využívajú ATP generované štiepením glykogénu, kde glukóza je konvertovaná na laktát pomocou enzýmu laktátdehydrogenáza (LDH) ako

zdroj energie na rapidne a energetické svalové kontrakcie. Vplyvom absencie α -aktinínu-3 dochádza k zmene na pomalé svalové vlákna, ktoré ako zdroj energie využívajú oxidáciu pyruvátu z glukózy cez cyklus kyseliny citrónovej, mitochondriálny elektrón-transportný reťazec a oxidáciu mastných kyselín. U Actn3 KO myši dochádza k zvýšenej regulácii mitochondriálnych dráh, redukcii LDH a akumulácii glykogénu, čo je kľúčovou vlastnosťou α -aktinín-3 deficientných svalových vlákien u myši aj ľudí^(17,19).

Myši deficientné na kalsarcín-2 vykazovali podobný fenotyp ako Actn3 KO myši. α -aktinín-2, ktorý je v dôsledku absencie α -aktinínu-3 upregulovaný, sa viaže na kalsarcín-2, pričom tento jav bol potvrdený aj u ľudí. Kalsarcín-2 je exprimovaný v rýchlych svalových vláknach, kde je jeho úlohou inhibícia kalcineurínu, čo je serín-treonín-fosfatáza dependentná od kalcia/kalmodulínu, ktorá sprostredkováva transkripciu pomalých oxidatívnych svalových vlákien. Deficiencia kalsarcínu-2 ruší túto inhibíciu a umožňuje spustenie transkripcie, čo vedie k fenotypu charakterizovaného zvýšenou vytrvalostnou kapacitou a posunom k pomalšiemu metabolizmu⁽²⁰⁾.

Zmeny v spracovaní vápnika ako nástroj pozitívnej selekcie

Vo svaloch prebieha spracovanie vápnika v sarkoplazmatickom retikule (SR). V porovnaní s divým typom myši u Actn3 KO myši bolo detegované troj- až štvornásobne zvýšené uvoľňovanie vápnika a jeho spätné vychytávanie v SR, pričom tieto vlákna boli rezistentnejšie na únavu pre pomalšiu mieru poklesu uvoľňovania vápnika po opakovanej stimulácii svalov. U Actn3 KO myši bola zvýšená expresia SR Ca^{2+} ATPázy 1 (SERCA1) a SR Ca^{2+} pufrujúcich proteínov kalsekvestrín a sarkolumenín. Vplyvom nadexpresie SERCA1 kanálov

dochádza k nadmernému úniku vápnika zo SR, ktorého časť je následne využitá v mitochondriách, kde zvyšuje aktivitu mitochondriálnych enzýmov. Tie môžu byť tiež stimulované kalcineurínom, ktorý bol uvoľnený z inhibície kalsarcinom-2 vplyvom nadregulácie α -aktinínu-2. Zvýšená aktivita mitochondriálnych enzýmov vedie k produkcii ATP, čo zvyšuje rezistenciu svalov proti únave. Nadmerný únik vápnika tiež vyžaduje jeho zvýšené pumpovanie SERCA1 kanálmi späť do SR, pričom na tomto transporte sa v lúmene SR podieľajú aj kalsekvestrín a sarkolumenín. Toto spätné vychytávanie spôsobuje zvýšenú hydrolyzu ATP, ktoré je vyžadované SERCA1 na jeho fungovanie, pričom dochádza ku generovaniu metabolického tepla vo svaloch. Head a kol. (2015) navrhli, že tento posun od glykolytického metabolizmu k výkonnejšej aeróbnej dráhe generujúcej teplo ako vedľajší produkt je možným vysvetlením pozitívnej selekcie XX genotypu v populácii. Počas migrácie moderných ľudí do chladnejších eurázijských klimatických podmienok sa dokázali α -aktinín-3 deficientní jedinci lepšie aklimatizovať, čo im poskytovalo výhodu na prežitie v chladnom prostredí⁽²¹⁾.

ACTN3 a šport

Množstvo výskumov bolo zameraných na štúdium vplyvu deficiencie α -aktinínu-3 na športový výkon športovcov i bežnej neatletickej populácie. V porovnaní s bežnou populáciou bol XX genotyp výrazne podreprezentovaný u vrcholových šprintérov a silových atlétov. Žiaden olympijský víťaz v silovej ani šprintárskej disciplíne neniesol XX genotyp, čo nasvedčovalo tomu, že tento genotyp nebol vhodný pre rýchle a výkonné svalové kontrakcie, čo bolo replikované vo viacerých štúdiách a metaanalýzách zahŕňajúcich elitných športovcov^(22,23). Z tohto dôvodu bol ACTN3 gén pomenovaný „rýchlostný gén“. Nízka frekvencia tohto genotypu u šprintérov koreluje so zisteniami MacArthura a kol. (2008), ktorí štúdiom na myšacom modeli zistili, že Actn3 KO svaly vykazujú dlhší, polovičný čas relaxácie než svaly exprimujúce α -aktinín-3, čo by pre aktivity ako šprint, ktoré vyžadujú rýchle repetitívne kontrakcie, bolo obmedzujúce⁽¹⁹⁾. Naopak, u elitných vytrvalostných atlétov boli zistené vyššie frekvencie výskytu genotypu XX, signifikantnosť tejto asociácie však nebola potvrdená. Niektoré výskumy uvádzajú, že zvýšená frekvencia tohto genotypu u vytrvalostných atlétov nebola zistená alebo bola jeho frekvencia dokonca podreprezentovaná v porovnaní s kontrolnou netrénovanou populáciou^(23,24).

Vyššia predispozícia jedincov s genotypom RR na podanie efektívnejšieho výkonu v rýchlostných a silových športových disciplínach môže byť tiež spojená s lepšou odpoveďou na silový tréning. Úloha α -aktinínu-3 pri generovaní vysoko-intenzívnej svalovej kontrakcie bola potvrdená aj v populácii nešportovcov, keď netrénovaní jedinci nesúci RR genotyp vyvinuli vyššiu silu než tí s XX genotypom^(23,24).

Vplyv deficiencie α -aktinínu-3 bol tiež skúmaný v súvislosti s poškodením svalov, ktoré bolo navodené cvičením, kedy dochádza k mechanickému poškodeniu svalových vlákien a následne k zápalovej reakcii. Výsledky výskumov však boli inkonzistentné. Niektoré štúdie zistili u jedincov s XX genotypom vyššie koncentrácie zápalových markerov v krvi, čo by naznačovalo protektívnu úlohu α -aktinínu-3. Iné výskumy nenašli žiadnu spojitosť medzi X alelou a poškodením svalov počas cvičenia⁽²³⁾. Podľa recentnejších štúdií prítomnosť α -aktinínu-3 môže poskytovať štruktúrnu výhodu v kostrovom svaloch spolu s inými dedičnými faktormi, ktorých interakciou dochádza k redukcii poškodenia svalových vlákien pri tréningu^(23,25).

Predpokladá sa, že okrem poškodenia svalov pri cvičení môže mať genotyp ACTN3 vplyv aj na zranenia svalov, ligamentov a kĺbov, ktoré môžu nastať vplyvom dysfunkcie kapacity svalu držať kĺb počas cvičenia, prípadne pre obmedzený rozsah pohybu kĺbu vplyvom flexibility svalov^(23,24). Vzhľadom na nejednoznačné výsledky štúdií vplyv deficiencie α -aktinínu-3 na uvedené znaky musí byť ešte objasnený. Okrem rýchlych svalových vlákien je α -aktinín-3 tiež exprimovaný v osteoblastoch. Jedinci nesúci XX genotyp mali redukovanú kostnú minerálnu hustotu⁽²⁶⁾, čo naznačuje, že tento genotyp by mohol byť asociovaný s náchylnosťou na zranenia kostí počas tréningu, doteraz však žiadna spojitosť nebola dokázaná.

Limitácie, pre ktoré sú výsledky štúdií nejednoznačné, spočívajú najmä vo veľkosti testovanej skupiny, keď je počet testovaných subjektov v skupine príliš nízky, v zahrnutí oboch pohlaví v rámci jednej testovanej skupiny, a taktiež v rozdieloch medzi kohortami, keď sú testovaní netrénovaní jedinci i profesionálni športovci z rôznych disciplín. Vo všeobecnosti však výsledky naznačujú, že jedinci nesúci genotyp XX sú náchylnejší na poškodenie svalov počas excentrických typov cvikov a vytrvalostných cvičení, pri ktorých sa používajú závažia. Majú tiež vyššiu pravdepodobnosť zranenia, nižšie hladiny minerálnej hustoty kostí a nižšie hodnoty sily svalov (prehľad rozdielov je uvedený v **tabuľke 2**). U myší bol genotyp XX asociovaný s vyššou výkonnostnou kapacitou, čo však u ľudí potvrdené nebolo^(23,24).

Záver

Z doposiaľ publikovaných štúdií ACTN3 génu je zjavné, že tento polymorfizmus môže ovplyvňovať množstvo iných znakov než iba predispozíciu na silové alebo vytrvalostné športové aktivity, a to zotavenie po cvičení, riziko poranenia svalov, ligamentov, kĺbov a kostí a tiež adaptáciu na tréning a regeneráciu po športovom výkone, čo naznačuje, že ACTN3 je viac ako len „rýchlostný gén“. Informácia o svojej genetickej predispozícii umožňuje športovcovi personalizovať tréningový plán, jeho intenzitu a zameranie, a teda i maximalizovať jeho výkon.

Tabuľka 2. Porovnanie športových znakov asociovaných s úplnou expresiou (RR genotyp) alebo absenciou (XX genotyp) α -aktinínu-3

R577X genotyp	RR genotyp	XX genotyp
Predispozícia na športové aktivity	silové a rýchlostné športy	vytrvalostné športy
Sila svalov	vyššia	redukovaná
Úloha pri poškodení svalov, ligamentov, kĺbov a kostí	potenciálne protektívna úloha pred zraneniami	potenciálna náchylnosť na zranenia

LITERATÚRA

1. Garton FC, North KN. The Effect of Heterozygosity for the ACTN3 Null Allele on Human Muscle Performance. *Med Sci Sports Exerc* 2016; 48(3): 509-520.
2. Murphy AC, Young PW. The actinin family of actin cross-linking proteins - a genetic perspective. *Cell Biosci* 2015; 5: 49.
3. Kao HY. The actinin family proteins: biological function and clinical implications. *Cell Biosci* 2015; 5: 48.
4. Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, et al. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem* 1992; 267(13): 9281-9288.
5. Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23(1): 39-46.
6. Blanchard A, Ohanian V, Critchley D. The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 1989; 10(4): 280-289.
7. Gimona M, Winder SJ. Single calponin homology domains are not actin-binding domains. *Curr Biol* 1998; 8: R674-R675.
8. Bottinelli R, Reggiani C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2000; 73(2-4): 195-262.
9. Sanchez B, Li J, Bragos R, et al. Differentiation of the intracellular structure of slow-versus fast-twitch muscle fibers through evaluation of the dielectric properties of tissue. *Phys Med Biol* 2014; 59(10): 2369-2380.
10. North KN, Beggs AH. Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996; 6: 229-235.
11. Mills M, Yang N, Weinberger R, et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet* 2001; 10(13): 1335-1346.
12. Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* 2003; 73(3): 627-631.
13. Vainzof M, Costa CS, Marie SK, et al. Deficiency of alpha-actinin-3 (ACTN3) occurs in different forms of muscular dystrophy. *Neuropediatrics* 1997; 28: 223-228.
14. North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D, et al. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. *Nat Genet* 1999; 21: 353-354.
15. Yang N, MacArthur DG, Wolde B, et al. The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39(11): 1985-1988.
16. Scott RA, Irving R, Irwin L, et al. ACTN3 and ACE genotypes in elite Jamaican and US sprinters. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(1): 107-112.
17. MacArthur DG, Seto JT, Raftery JM, et al. Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nat Genet* 2007; 39: 1261-1265.
18. Friedlander SM, Herrmann AL, Lowry DP, et al. ACTN3 allele frequency in humans covaries with global latitudinal gradient. *PLoS ONE* 2013; 8: e52282.
19. MacArthur DG, Seto JT, Chan S, et al. An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Hum Mol Genet* 2008; 17(8): 1076-1086.
20. Seto JT, Quinlan KG, Lek M, et al. ACTN3 genotype influences muscle performance through the regulation of calcineurin signaling. *J Clin Invest* 2013; 123: 4255-4263.
21. Head SI, Chan S, Houweling PJ, et al. Altered Ca²⁺ kinetics associated with alpha-actinin-3 deficiency may explain positive selection for ACTN3 null allele in human evolution. *PLoS Genet* 2015; 11(2): e1004862.
22. Eynon N, Hanson ED, Lucia A, et al. Genes for elite power and sprint performance: ACTN3 leads the way. *Sports Med* 2013; 43: 803-817.
23. Del Coso J, Hiam D, Houweling P, et al. More than a „speed gene“: ACTN3 R577X genotype, trainability, muscle damage, and the risk for injuries. *Eur J Appl Physiol* 2018.
24. Pickering C, Kiely J. ACTN3: More than Just a Gene for Speed. *Front Physiol* 2017; 8: 1080.
25. Del Coso J, Valero M, Salinero JJ, et al. Optimum polygenic profile to resist exertional rhabdomyolysis during a marathon. *PLoS One* 2017; 12(3): e0172965.
26. Yang N, Schindeler A, McDonald MM, et al. alpha-Actinin-3 deficiency is associated with reduced bone mass in human and mouse. *Bone* 2011; 49(4): 790-798.
27. Houweling P, Papadimitriou I, Seto J, et al. Is evolutionary loss our gain? The role of ACTN3 p. Arg577Ter (R577X) genotype in athletic performance, ageing, and disease. *Hum Mutat* 2018; 39(12): 1774-1787.

Mgr. Martina Pečimonová

Geneton, s. r. o.

Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

e-mail: martina.pecimonova@geneton.sk

Diabetes: Cybernetic point of view

Matúš Rebro, Marián Tárník, Eva Miklovičová, Ján Murgaš

Institute of Robotics and Cybernetics

Faculty of Electrical Engineering and Information Technology

Slovak University of Technology in Bratislava, Slovak Republic

Cybernetic modeling and simulation find more and more use in non-technical areas like medicine. The aim of this paper is to summarize and present some of the applications of cybernetics for diabetes. One of the applications comes from control systems theory in the form of algorithm for automated insulin administration for type 1 diabetes patients while mathematical models of insulin-glucose system can be used for verification of this algorithm via simulations. Another use of the mathematical modeling can be found in prediction of glycemia evolution on the basis of data from continuous glucose monitoring for both type 1 and type 2 patients.

Keywords: diabetes mellitus, glycemia, dynamical model, simulation, prediction

Diabetes z pohľadu kybernetiky

Kybernetické modely a ich simulácia nachádzajú čoraz väčšie uplatnenie v netechnických oblastiach ako medicína. Cieľom tohto článku je zhrnutie a prezentácia niektorých aplikácií kybernetiky pre diabetes. Jedna z aplikácií pochádza z teórie riadenia vo forme algoritmu pre automatické dávkovanie inzulínu pre pacientov s diabetom prvého typu, zatiaľ čo matematické modely inzulínovo-glukózového systému môžu byť použité na verifikáciu takéhoto algoritmu pomocou simulácií. Ďalšie uplatnenie matematického modelovania možno nájsť pri predikcii priebehu glykémie na základe dát z kontinuálneho merania glukózy pre diabetikov prvého aj druhého typu.

Kľúčové slová: diabetes mellitus, glykémia, dynamický model, simulácia, predikcia

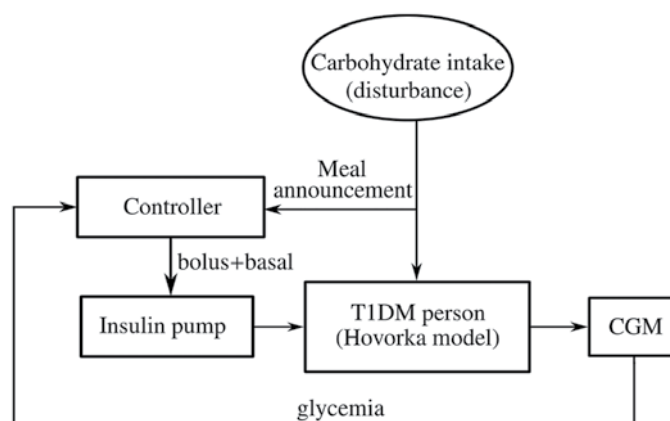
NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 47 – 49

Introduction

Diabetes mellitus can be described as a group of metabolic diseases, which if unchecked can cause chronic hyperglycemia. Two most common types of this disease are type 1 diabetes mellitus (T1DM) and type 2 diabetes mellitus (T2DM). The first one is caused by absolute insulin deficiency and thus the patients are dependent on external insulin administration and regular checks of blood glucose concentration. The second one is caused by relative insulin deficiency and/or insulin resistance, whereas in this case, therapy consists of lifestyle changes and in late stages oral antidiabetics and insulin therapy.

In both T1DM and T2DM, the dynamics of glucose and insulin concentrations is modeled. In case of T1DM such models can be used together with continuous glucose monitoring (CGM) device and insulin pump to predict the future glycemia and/or to design control algorithm for insulin administration. Connection of glycemia measurement system (CGM) and insulin pump with control algorithm (which can be implemented in the insulin pump device itself) creates closed loop control system where controlled output is the glycemia and system input is the insulin administration, see **Figure 1**. Carbohydrate intake can be viewed as a disturbance which is measurable (it can be estimated how much carbohydrates is in the meal) and thus can serve as an additional input to the control algorithm which can further improve glycemia regulation. Connection of the CGM device with insulin pump and control algorithm is often called artificial pancreas⁽¹⁾ because of the its goal to mimic the pancreas in healthy man.

Figure 1. Automated insulin administration scheme

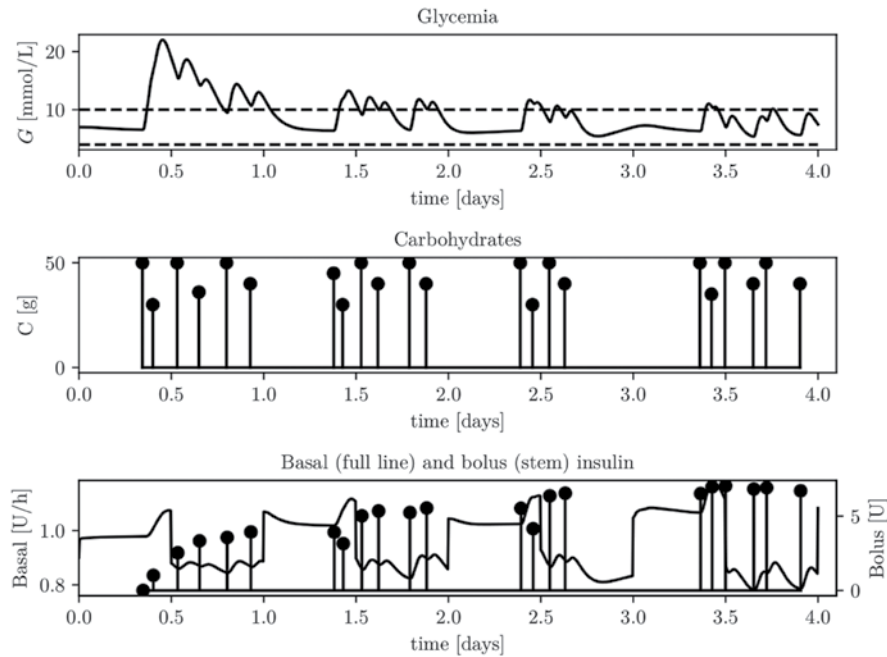


Generally, the control algorithm is designed via simpler linear models, which can only approximate behavior of insulin-glucose system for only small deviations from basal (steady) state. These models, although not so accurate in prediction, can be directly used in wide range of control design approaches. More complex, physiological models are used for evaluation and verification of these algorithms via simulations.

Adaptive control in T1DM

Insulin-glucose system in T1DM subject can be viewed in control systems theory as dynamical system with one output (glycemia) and one input (insulin administration).

Figure 2. Simulation of adaptive control of glycemia in T1DM subject



The carbohydrate intake from food can be then viewed as disturbance input. The goal of the control system design is to keep the glycemia in some healthy range. This glycemia range is often chosen to be around 4-10 mmol/L or in other words, between hypoglycemia and hyperglycemia with more emphasis on avoiding the hypoglycemic state.

Since it is reasonable to assume that the insulin-glucose system can vary from person to person and also change its behavior over time, the adaptive control is considered as a control algorithm for glycemia⁽²⁾. In control systems theory this means that we assume that the parameters of model of the controlled system are unknown and are prone to change.

The control design can be divided into two steps^(3,4). The first step is to design the control in the absence of disturbances. This means we design the algorithm to keep glycemia in basal state or in its close proximity via continuous basal insulin administration. The second step is to design the algorithm for bolus insulin administration, which should compensate the postprandial glycemia rise. This algorithm also uses the information about carbohydrate intake from patient to calculate the bolus dosage and can adapt over time even when the carbohydrate amounts are not exactly known.

For performance assessment the simulations of nonlinear dynamical model such as for example Hovorka model⁽⁵⁾ can be used. Results of such simulation can be seen in **Figure 2** (note the obvious increase in bolus dosage as a result of adaptation process). Parameters of this model are identified on CGM data of T1DM subjects. This way we have glycemia response simulator for one specific subject. We can artificially create simulators of more subjects by altering the model parameters via small random changes and thus creating so called virtual subjects⁽⁴⁾. Control algorithm can be then further tested for its robustness via simulations of multiple virtual subjects. These results can be further evaluated by the means of control variability grid analysis⁽⁶⁾.

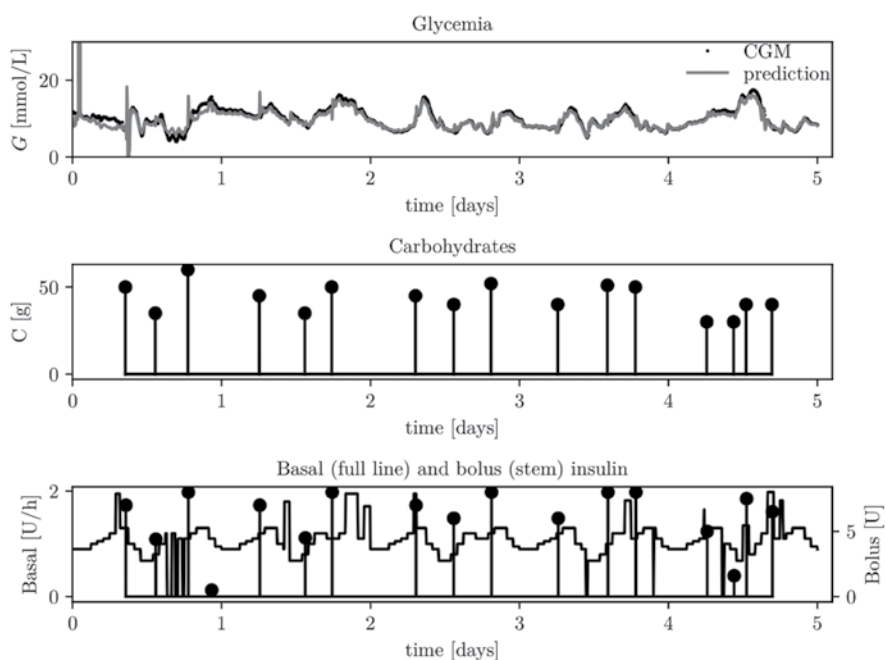
Short-term glycemia prediction

Another use of simpler models of insulin-glucose dynamics can be found in short-term glycemia prediction on the basis of CGM data. Motivation behind the glycemia prediction is to set up algorithm for early hypoglycemic or hyperglycemic event warning for T1DM patient and also possibly for T2DM patient⁽⁷⁾. If we want to use simple linear models for prediction of glycemia, we have to take into consideration some unmodeled dynamics either of exogenous (physical activity) or endogenous (effects of other hormones) nature. Since we would possibly find many different sets of model parameters for different patients, which could also vary in time, it would be also good to incorporate some adaptation mechanism into prediction algorithm. Stochastic linear models such as ARX (Autoregressive with exogenous inputs) and ARMAX (Autoregressive moving average with exogenous inputs) together with recursive least squares algorithm are able to predict glycemia with prediction horizon of up to 1 hour. Prediction accuracy and performance metric is more detailedly described in⁽⁸⁾. Prediction algorithm uses present and past measured glycemia data and data about carbohydrate intake and insulin administration and is able to learn or adapt model parameters in approximately 1 day (see **Figure 3**).

Conclusion

Cybernetic dynamical models can be used in diabetes modeling for simulation, prediction and control design. Simple linear models, although not that accurate, can be used to design control algorithms for artificial pancreas while more complex models are used to verify the functionality of these algorithms via simulation experiments. Using the continuous glucose measurements and self-monitoring data can be also used together with simple linear stochastic models for accurate short-term glycemia prediction with online parameter identification algorithm, which can adapt the model parameters for specific patient.

Figure 3. 1-hour glycemia prediction for T1DM using ARMAX model with online parameter identification and CGM data



Acknowledgment: The paper is one of the outcomes of the research work for the project entitled „Research center for severe diseases and related complications“, „ITMS: 26240120038“. „This project is being co-financed by the European Union. We support research activities in Slovakia“.

Pod'akovanie: Článok je jedným z výstupov výskumnej práce projektu s názvom Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií, ITMS projektu: 26240120038. „Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ. Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku.“

REFERENCES

1. Cobelli C, Renard E, Kovatchev B. Artificial pancreas: Past, present, future. *Diabetes* 2011; 60(11): 2672-2682.
2. Turksoy K, Cinar A. Adaptive control of artificial pancreas systems - a review. *Journal of Healthcare Engineering* 2014; 5(1): 1-22.
3. Rebro M, Tárnik M, Murgaš J. A simulation study on adaptive control design performance for t1dm via individualized model. In *ICCC 2016: 17th International carpathian control conference*. Tatranská Lomnica, Slovak Republic. May 29 - June 1.
4. Rebro M, Tárnik M, Murgaš J. Adaptive control with heuristic disturbance rejection in t1dm: A performance assessment. In *IFAC 2017 The 20th World Congress of the International Federation of Automatic Control*.
5. Hovorka R, Canonico V, Chassin LJ, et al. Nonlinear model predictive control of glucose concentration in subjects with type 1 diabetes. *Physiol Meas* 2004; 25: 905-920.
6. Magni L, Raimondo DM, Man CD, et al. Evaluating the efficacy of closed-loop glucose regulation via control-variability grid analysis. *J Diabetes Sci Technol* 2008; 2(4): 630-635.
7. Maurizi AR, Pozzilli P. Do we need continuous monitoring in type 2 diabetes? *Diabetes Metab Res Rev* 2013; doi:10.1002/dmrr.2450
8. Rebro M, Tárnik M, Murgaš J. Glycemia prediction accuracy of simple linear models with online parameter identification. *International Review on Modelling and Simulations* 2016; 9(5).



Ing. Matúš Rebro
 Institute of Robotics and Cybernetics
 Faculty of Electrical Engineering and Information Technology
 Slovak University of Technology in Bratislava
 Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic
 e-mail: matus.rebro@stuba.sk

LIQUID-BASED CYTOLÓGIA (LBC)

DÔLEŽITÁ SÚČASŤ PREVENTÍVNEJ GYNEKOLOGICKEJ PREHLIADKY

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

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

www.zenskeveci.com/cytologia

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



Vývoj komplexných chromozómových prestavieb u pacienta s ALL

Gabriela Veselá, Andrea Blahová, Alexandra Oravcová, Kristína Lengyelová, Alena Žákovičová, Kristína Juríková, Lenka Cicmanová-Palčová, Lucia Žideková, Ľubica Majerová, Renata Lukačková
Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

V príspevku opisujeme zaujímavý prípad 63-ročného pacienta s diagnózou akútna lymfoblastová leukémia. Cytogenetickými metódami sme vyšetrovali karyotyp a identifikovali sme variantnú formu t(9;22) s chromozómom 2. Po 6 mesiacoch sme zaznamenali navyše dic(7;9). Pacientovi sme detegovali karyotyp 45, XY, dic(7;9) (p11;p11), der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23), ktorý je spojený so zlou prognózou. Napriek tomuto faktoru je náš pacient po liečbe v remisii.

Kľúčové slová: akútna lymfocytová leukémia, cytogenetika, FISH, *BCR-ABL*, dicentrický chromozóm

Development of complex chromosome rearrangements in a patient with ALL

In the report, we describe an interesting case of 63-year old man with diagnosis of acute lymphoblastic leukaemia. We examined karyotype with cytogenetic methods and identified variant of t(9;22) with the chromosome 2. After 6 months, furthermore, we noticed dic(7;9). We determine the karyotype of the patient 45, XY, dic(7;9) (p11;p11), der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23), which is linked with poor prognosis. Despite this fact, our patient is in remission after the treatment.

Keywords: acute lymphocytic leukaemia, cytogenetics, FISH, *BCR-ABL*, dicentric chromosome

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 51 – 55

Úvod

Akútna lymfoblastová leukémia (ALL) je ochorenie, ktoré vzniká malígnou transformáciou kmeňovej hematopoetickej bunky lymfoidnej línie a následne dochádza ku klonálnej proliferácii lymfoidných prekursorov so zastavením diferenciácie na rôznych stupňoch diferenciácie lymfoidných blastov⁽¹⁾. Incidencia ochorenia má dva vrcholy, prvý je vo veku 4 až 5 rokov s incidenciou 5,3 na 100 000 obyvateľov a druhý vrchol sa nachádza okolo 50. roku života s incidenciou 2,3 na 100 000 obyvateľov za rok⁽²⁾.

Klasifikácia WHO delí ALL na B- a T-ALL podľa zasiahnutej bunkovej línie. Líniu B-ALL ďalej rozdeľuje na základe genetických zmien ako nešpecifikovanú alebo s rekurentnými genetickými abnormalitami (t(9;22)(q34.1;q11.2), t(v;11q23.3), t(12;21)(p13.2;q22.1), hyperdiploidia, hypodiploidia, t(5;14)(q31.1;q32.3), t(1;19)(q23;p13.3)⁽³⁾.

Stanovenie chromozómových aberácií má pri leukémii veľký význam pre prognózu a podanie správnej liečby. Typické chromozómové aberácie sa líšia v závislosti od veku pacienta a tiež bunkovej línie. ALL je najčastejšia malignita detských pacientov a vyskytujú sa pri nej typické aberácie ako t(12;21), t(1;19) a hyperploidia, ktoré sú u dospelých s touto diagnózou pozorované len zriedka⁽⁴⁾. Naopak, u dospelých ALL predstavuje len 20 % všetkých leukémií⁽⁵⁾.

Okolo 70 % dospelých s ALL má leukemické bunky s chromozómovými abnormalitami. Najčastejšiu aberáciu predstavuje t(9;22). Pri t(9;22) dochádza k zlomu a výmene častí dlhých ramien 9. a 22. chromozómu, čím vzniká fúzny gén *BCR-ABL*. Fúzny proteín produkovaný z tohto génu je aktívny onkoproteín s tyrozínkinázovou aktivitou, ktorý dáva leukemickým bunkám proliferáciu výhodu. Podľa konkrétneho miesta zlomu a procesovania mRNA môže vznikáť hybridný proteín *BCR-ABL* s veľkosťou 210 kDa (p210), 190 kDa (p190) a 230 kDa (p230). Pacienti s B-ALL majú prítomný p190 (skôr

u detí) alebo p210 (častejšie u dospelých). Klinické znaky u pacientov s B-ALL p190 a p210 boli veľmi podobné, mierne horší klinický výsledok bol pozorovaný u pacientov s p210⁽⁶⁾.

Translokácia t(9;22) existuje v dvoch formách – v jednoduchej a variantnej. V jednoduchej sa na nej zúčastňujú len dva chromozómy 9 a 22, a variantná zahŕňa okrem spomínaných chromozómov aj ďalší. Tyrozínkinázové inhibitory ako liečivá vhodné pri klasickej t(9;22) sú účinné aj pre variantné formy^(7,8).

Pri akútnych leukémiách je často zaznamenaná nadexpresia génu *WT1*. Gén *WT1* sa nachádza na krátkom ramene 11. chromozómu v oblasti 11p13. Ako transkripčný faktor má dôležitú úlohu pri kontrole proliferácie, diferenciácie a pri apoptóze. Stupeň jeho expresie je obzvlášť významný pri hematopoéze, keď je gén exprimovaný v nezrelých bunkách, a až po jeho poklese môže dôjsť k maturácii krvných elementov^(9,10). Samotný gén *WT1* predstavuje nešpecifický marker, keďže sa nespája len s jedným typom leukémie, avšak slúži ako terapeutický cieľ a znak na monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby⁽⁹⁾.

Prognóza ALL sa odvíja od viacerých faktorov a zhoršuje sa s opakovanými atakmi leukémie na jedinca. Šancu na kompletnú remisiu znižuje vek pacienta, znížená tolerancia liečby a vyšší počet leukocytov.

Kazuistika

Muža vo veku 63 rokov v počiatku anamnézy v dôsledku epidermoidného karcinómu pravej podnebnéj mandle sledoval jeho spádový onkológ. Pacient podstúpil chemoterapiu a rádioterapiu, čo pravdepodobne následne vyvolalo myeloproliferatívnu neopláziu (MPN) s neprítomným filadelfským chromozómom (Ph). Od roku 2009 je vedený v hematologickej ambulancii s diagnózou esenciálna trombocytémia. V roku 2014 mu bola diagnostikovaná sekundárna myelofibróza.

O 3 roky, v roku 2017, bol u pacienta zaznamenaný prechod do B-bunkovej ALL. Na základe prítomnosti 21 % patologickej populácie B-lymfoblastov a na základe imunofenotypu (prítomné znaky CD10, CD19, TdT a neprítomný CD117) bola u pacienta potvrdená B-ALL.

Vzorky kostnej drene (KD) a periférnej krvi (PK) sme v našom laboratóriu prvýkrát vyšetrili v októbri 2017. Na základe genetickej analýzy boli zaznamenané patologické nálezy spojené s nepriaznivou prognózou. Leukémia u pacienta progredovala, na čo bola podaná silná liečba, ktorá viedla k hemotoxickému šoku a bol zaznamenaný zhoršený hematokryt. **Na obrázku 1** je znázornený vývoj liečby u pacienta. Prognóza je momentálne priaznivá, pretože pacient sa nachádza v stave remisie bez blastov.

Metódy

Cytogenetická analýza bola uskutočnená na vzorkách kostnej drene, spracovaných podľa štandardných cytogenetických postupov po 24-hodinovej kultivácii. Preparáty boli farbené Wrightovým roztokom. Následne bolo hodnotených 20 metafáz vo svetelnom mikroskope, ak to kvalita vzorky umožnila, a karyotyp bol zapísaný podľa *International system for human cytogenetic nomenclature* (ISCN)⁽¹²⁾.

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) sa uskutočnila na vzorkách KD alebo PK spracovaných podľa štandardných

postupov. Na detekciu aberácií na chromozómoch 2, 7, 9 a 22 boli použité špecifické lokusové sondy a celochromozómové sondy (WCPs). Prehľad sond je opísaný **v tabuľke 1**. Vo fluorescenčnom mikroskope bolo hodnotených 200 jadier.

Molekulová analýza bola uskutočnená pomocou metódy RT-PCR. Na detekciu génov *WT1* a *BCR-ABL* bol použitý kitQiagen (Dy nex).

Výsledky

Vzorka pacienta bola vyšetrovaná v našom laboratóriu doposiaľ štyrikrát. Prvé vyšetrenie KD a PK sa uskutočnilo v októbri roku 2017 po prechode do ALL. Prehľad vyšetrení a ich výsledkov sa nachádza **v tabuľke 2**.

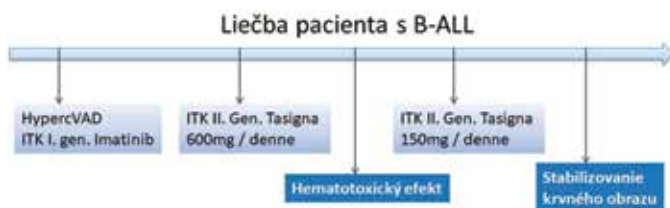
Cytogenetické a FISH vyšetrenie

Cytogenetickou analýzou sme pri prvom vyšetrení odhalili variantnú formu translokácie t(9;22) chromozómu, keď okrem chromozómov 9, 22 je do translokácie zahrnutý aj tretí – chromozóm 2. Došlo k inzercii časti krátkych ramien chromozómu 2 do chromozómu 9 v oblasti 9q34. Stanovili sme karyotyp 46, XY, der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23) (**obrázok 2**).

Chromozómové aberácie pozorované na karyotype (**obrázok 2**) sme potvrdili FISH metódou. V 97 % jadier bola prítomná *BCR-ABL* fúzia (**obrázok 3**). Pomocou celochromozómových sond WCP 2 a WCP 9 sme odhalili inzerciu krátkych ramien chromozómu 2 do dlhých ramien chromozómu 9 (**obrázok 4**).

Pri kontrolnom vyšetrení po 6 mesiacoch sa napriek liečbe v patologickom klone okrem predchádzajúcich zmien objavila aj sekundárna aberácia v podobe dic(7;9). Pacient nemal ani jeden zdravý 9. chromozóm. Karyotyp pacienta (**obrázok 5**) sme určili ako 45, XY, dic(7;9)(p11;p11), der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23).

Obrázok 1. Vývoj liečby u nášho pacienta s B-ALL



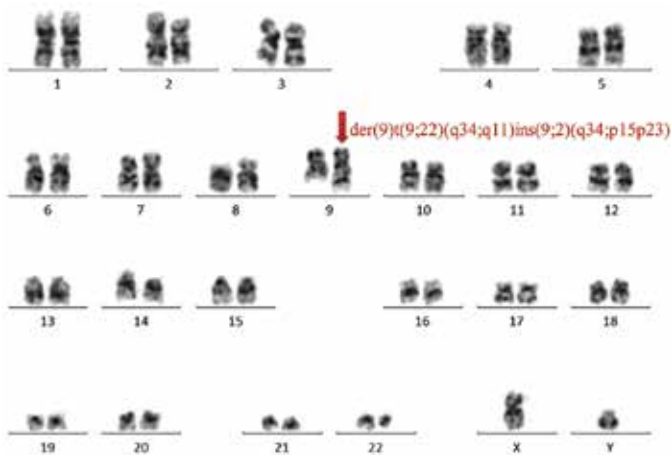
Tabuľka 1. Prehľad sond použitých na FISH analýzu

Typ	Názov	Výrobca	Farebné spektrum	Poznámka
lokusovo-špecifické sondy	XL BCR/ABL1 plus Translocation/Dual Fusion Probe	MetaSystems	ABL spectrum orange, BCR spectrum green	BCR-ABL
	Translocation/Dual ZytoLight® SPEC CDKN2A/CEN 9 Dual Color Probe	Zytovision	CDKN2A/CDKN2B spectrum green, D9Z1 spectrum orange	p16/c9
	XL 7q22/7q36 Deletion Probe	MetaSystems	D7Z1 spectrum aqua, 7q22(KMT2E) spectrum orange, 7q36(EZH2) spectrum green	c7/7q22/7q36
celochromozómové sondy (WCPs)	XCP 2 Green	MetaSystems	spectrum green	WCP2
	XCP 7 Orange	MetaSystems	spectrum orange	WCP7
	XCP 9 Green, XCP 9 Orange	MetaSystems	spectrum orange, spectrum green	WCP9

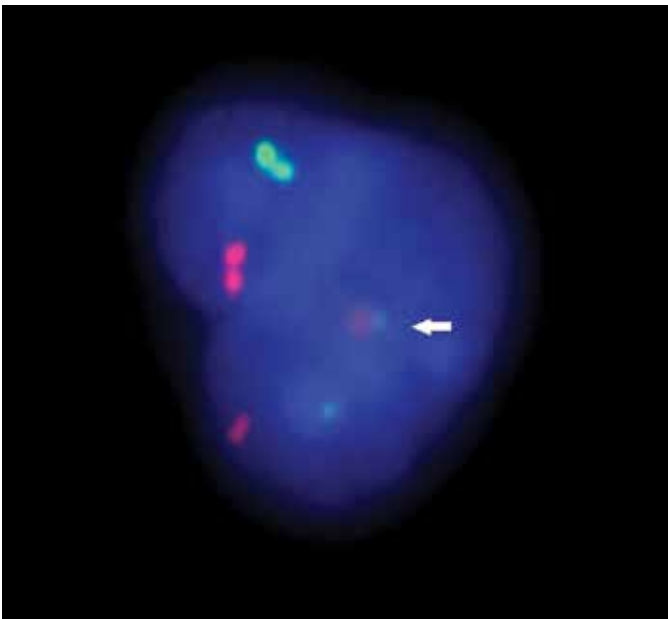
Tabuľka 2. Výsledky genetickej analýzy

Dátum	Cytogenetická analýza	FISH analýza	Molekulová analýza
10/2017	46,XY,der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23)[14]/46,XY[6]	BCR-ABL pozit. variantná t(9;22;2): 97%	BCR-ABL p210 NCN=1.366, WT1 NCN=0.057
4/2018	45,XY,dic(7;9)(p11;p11), der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23)[15]/46,XY[5]	BCR-ABL pozit. variantná t(9;22;2): 97% delécia 9p16: 60% c7/7q22/7q36 negat.	BCR-ABL p210 NCN=3.380, WT1 NCN = 0.09
6/2018	Periférna krv	BCR-ABL pozit. v dvoch klónoch 1. jednoduchá translokácia t(9;22): 12%, 2. variantná translokácia t(9;22;?): 8% 9p16/c9 negat.	BCR-ABL p210 NCN=0.319, WT1 NCN=0.0024
8/2018	Neúspešná kultivácia	BCR-ABL negatívne	BCR-ABL p210 (NCN nemožné určiť), WT1 negat.

Obrázok 2. Karyotyp 46, XY, der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23)



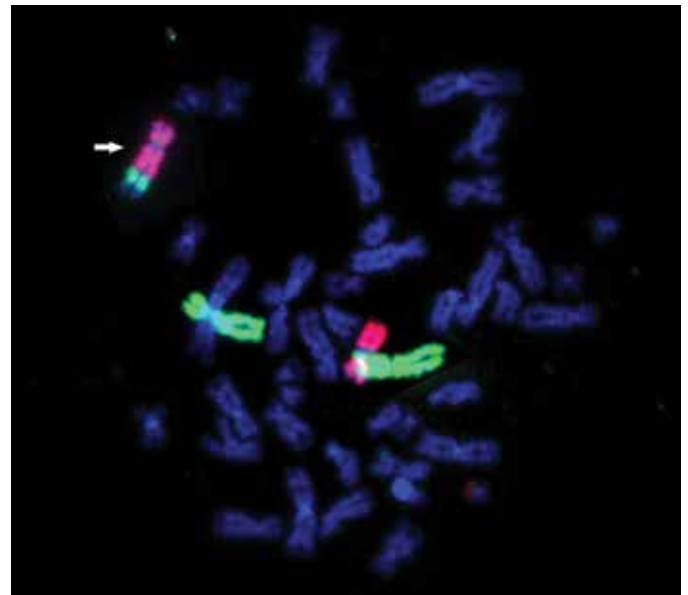
Obrázok 3. FISH – variantná prestavba BCR-ABL. Na analýzu bola použitá sonda XL BCR/ABL1 plus Translocation/Dual Fusion Probe, ABL v spektre orange, BCL v spektre green. (Fúzia BCR-ABL je znázornená šípkou, druhá recipročná fúzia chýba v dôsledku inzercie chromozómu 2 do chromozómu 9. Červenou je značený ABL z 9. a zelenou BCR z 22. chromozómu.)



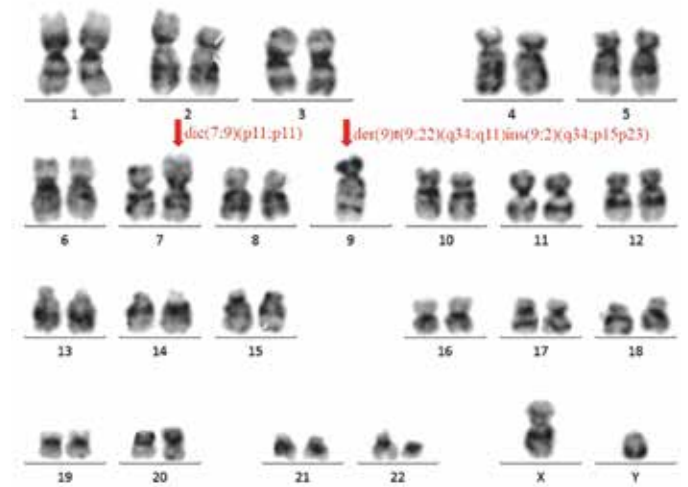
FISH vyšetrenie potvrdilo dic(7;9) pomocou špecifických lokusových sond c7/7q22/7q36 a 9c/9p16 (**obrázok 6**). Centroméry chromozómu 7 (**obrázok 7a**) a 9 boli obe prítomné, na základe čoho sme potvrdili dicentrický chromozóm. Špecifickou lokusovou sondou sme zároveň detegovali deléciu krátkeho ramena chromozómu 9 v oblasti p16 (**obrázok 7b**), čo nám nepriamo potvrdzuje prítomnosť dicentra zloženého z dlhých ramien chromozómov 7 a 9 a zároveň nám umožňuje uskutočňovať ďalšie vyšetrenia na interfázových jadrách a sledovať monozómiu 9p.

Nasledujúca kontrola (6/2018) sa uskutočnila z periférnej krvi pomocou FISH analýzy. Bola odhalená prítomnosť 2 klonov translokácie 9;22 – klasický – postihujúci len dva chromozómy, 9 a 22, a klon s variatnou translokáciou der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2) (rovnakou ako pri prvom náleze).

Obrázok 4. FISH – inzercia časti chromozómu 2 (zelený signál) do 9. chromozómu (červený signál). Na analýzu boli použité sondy XCP 2 Green a XCP 9 Orange. (Šípka označuje derivovaný chromozóm, ktorý má v spodnej časti modrou zobrazenú časť 22, ktorá vznikla po t(9;22).)



Obrázok 5. Karyotyp 45, XY, dic(7;9)(p11;p11), der(9)t(9;22)(q34;q11)ins(9;2)(q34;p15p23)



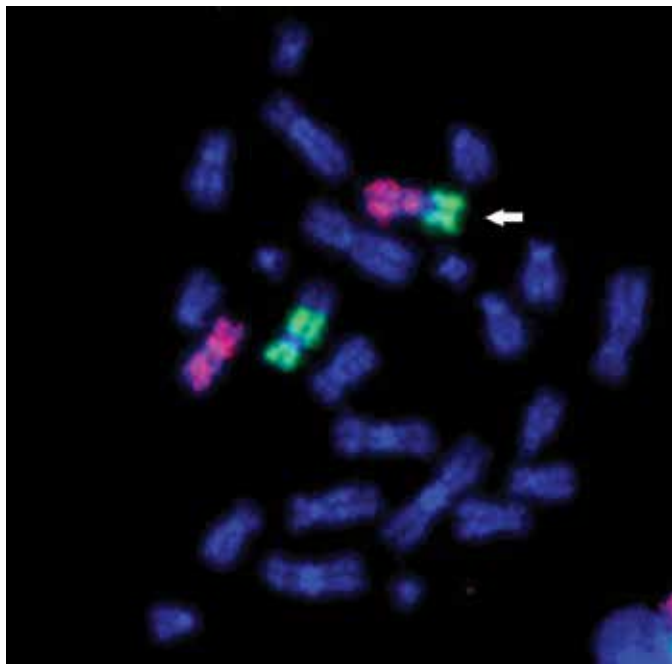
Posledná kontrola (8/2018) sa uskutočnila zo vzorky kostnej drene. Cytogenetická analýza nebola možná pre neúspešnú kultiváciu a FISH analýza potvrdila negatívny výsledok na prítomnosť t(9;22).

Molekulová analýza

Molekulovou analýzou bol u pacienta detegovaný fúzny transkript BCR-ABL p210 pri všetkých vyšetreniach. Hladina jeho expzie sa v danom čase menila a najvyššia hodnota bola zaznamenaná pri druhej kontrole (4/2018), následne už prítomnosť fúzneho transkriptu rapidne klesala (**graf 1**). Fúzny gén možno kvantifikovať pomocou NCN, čo predstavuje pomer počtu kópií fúzneho génu k počtu kópií kontrolného génu (**tabuľka 2**).

Pacientovi bol analyzovaný stav expície génu WT1. Fyziologická hodnota zo vzorky kostnej drene je 0,01 – 0,04, v periférnej krvi je to 0,002. Nadexpresia génu WT1 bola pozitívna pri prvých dvoch vyšetreniach a podobne ako pri ostatných výsledkoch bolo možné pozorovať zhoršenie stavu pacienta práve pri druhom, keď hladina expície v kostnej dreni stúpila z 0,057 na 0,09. Následne pacient začal reagovať na liečbu a jeho stav sa zlepšil.

Obrázok 6. FISH – *dic(7;9)* s použitím sond XCP 7 Orange a XCP 9 Green (červenou je značený chromozóm 7 a zelenou chromozóm 9, šípka ukazuje na chromozóm, ktorý vznikol fúziou dlhých ramien oboch chromozómov)

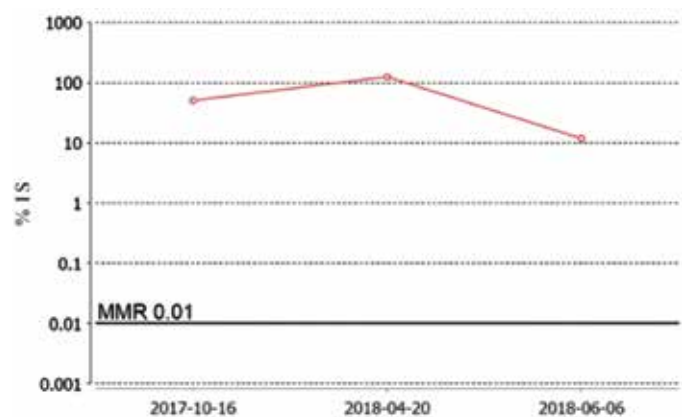


Diskusia

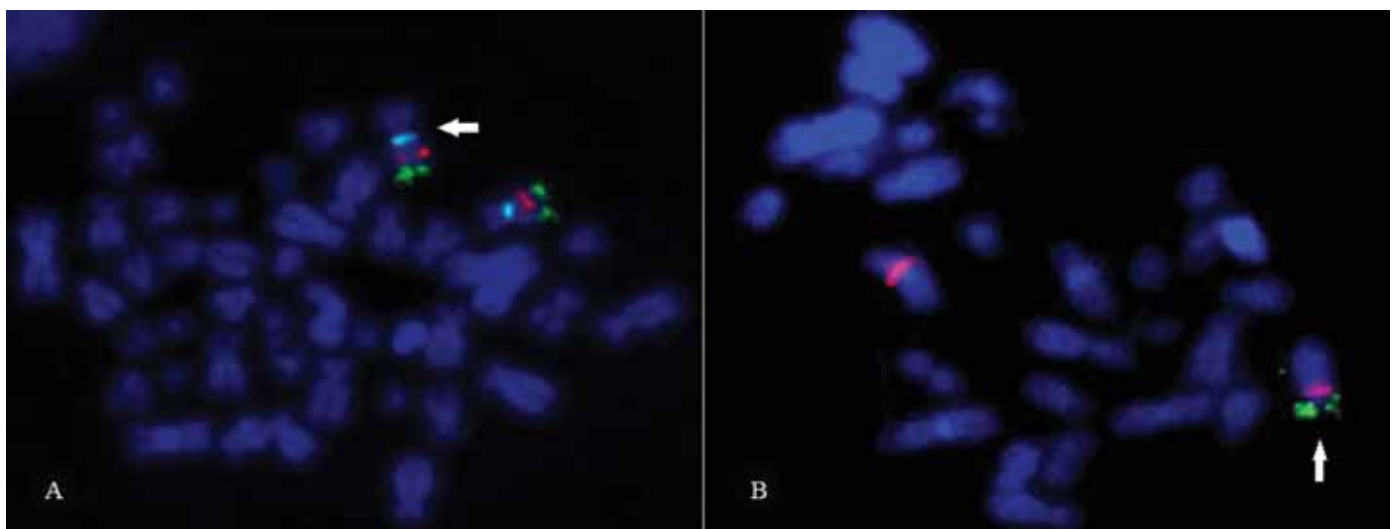
Pacientovi bola stanovená diagnóza B-ALL. Pre B-ALL je typická prítomnosť znakov CD10, CD19 a TdT a zároveň neprítomnosť CD117⁽¹⁾, čo koreluje s našimi výsledkami, u pacienta boli totiž imunologickou fenotypizáciou prítomné znaky CD10 (92 %), CD19 (100 %) a TdT (93 %).

Najčastejšou chromozómovou aberáciou pri ochorení B-ALL u dospelých je t(9;22). Táto aberácia, či už klasická, alebo variantná, je pri B-ALL spojená so zlou prognózou. Názory na biologickú funkciu klasickej a variantnej formy sa rôznia. Isté štúdie naznačujú, že pacienti s variantnou formou majú horšie výsledky, avšak existujú aj protichodné názory, podľa ktorých takéto translokácie nemajú vplyv na výsledok liečby a prežívanie^(13,14). Na základe analýzy genetických výsledkov sa možno domnievať, že pacient mal pôvodne klasickú t(9;22), ktorá bola detegovaná pri pozitívnej reakcii pacienta na liečbu, keď došlo k poklesu buniek s patologickým klonom z 97 % a 20 %.

Graf 1. Graf vývoja fúzneho génu BCR-ABL stanoveného molekulárnou analýzou v danom čase



Obrázok 7. FISH – potvrdenie dicentrického chromozómu. **Obrázok 7a** znázorňuje dve zdravé centroméry (svetlomodrou) a dlhé ramenná chromozómu 7 (šípka znázorňuje aberantný chromozóm). Použitá bola sonda XL 7q22/7q36 Deletion Probe vo farebných spektrách D7Z1 spektrum aqua, 7q22(KMT2E) spektrum orange, 7q36(EZH2) spektrum green. **Obrázok 7 b** zobrazuje sondu Translocation/Dual ZytoLight® SPEC CDKN2A/CEN 9 Dual Color Probe vo farebnom spektre CDKN2A/CDKN2B spektrum green, D9Z1 spektrum orange. Na obr. B sú dve centroméry chromozómu 9 (červený signál) a zelený signál z oblasti krátkeho ramena 9p16 je prítomný len raz (znázornený šípkou), tým sme potvrdili, prítomnosť *dic(7;9)* tvoreného dlhými ramenami týchto chromozómov.



Pri druhom kontrolnom vyšetrení (4/2018) pribudol k pôvodnému nálezu $\text{dic}(7;9)$. V patologickom klone sa u pacienta nenachádzal ani jeden 9. chromozóm, ktorý by nebol poznačený chromozómovou prestavbou. Krátke ramená 7p a 9p obsahujú tumorózne supresorové gény a podľa hypotézy ich strata vedie k leukemogénéze. Samotná prítomnosť $\text{dic}(7;9)$ pri diagnóze B-ALL ovplyvňuje prognózu, pričom závisí najmä od veku pacienta. Detský pacient má podľa literatúry priaznivú prognózu a dospelý, naopak, nepriaznivú. Pri dospelých pacientoch sa za najúspešnejšiu liečbu považuje transplantácia kostnej drene, ak to celkový zdravotný stav pacienta dovoľuje^(15,16,17).

Okolo 70 % dospelých pacientov s ALL a $\text{t}(9;22)$ má aj sekundárne chromozómové aberácie. Najčastejšie ide o $+\text{der}(22)\text{t}(9;22)$, $+21$, abnormality 9p, vysokú hyperploidiu (viac ako 50 chromozómov), $+8$, -7 , $+X$, zmeny na 8. chromozóme, nadbytok časti 1q alebo stratu 7p. Prognóza sa líši v závislosti od konkrétnej sekundárnej aberácie⁽¹⁴⁾.

V štúdií Pan a kol. (2006) mali 4 zo 7 pacientov súčasne obe spomenuté chromozómové aberácie. Traja pacienti boli liečení chemoterapiou a jeden podstúpil transplantáciu kostnej drene, dĺžka ich prežitia bola od 8 do 14,5 mesiaca⁽¹⁷⁾.

LITERATÚRA

1. http://www.hematology.sk/docs/ALL_2017.pdf
2. Sant M, Allemani C, Tereanu C et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010; 116: 3724–3734.
3. <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia-acute-lymphocytic-all/acute-lymphocytic-leukemia/classification-of-acute-lymphocytic-leukemia/?region=on>
4. Kolenová A, Kaiserová E. Akútne leukémie v detskom veku. *Pediatr. Prax* 2012; 13(4): 161-165.
5. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal* 2017; 7: e577.
6. Gleissner B, Gokbuget N, Bartram CR, et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 2002; 99(5): 1536-43.
7. Piccaluga PP, Paolini S, Martinelli G. Tyrosinekinase inhibitors for the treatment of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2007; 110(6): 1178-1186.
8. Sawalha Y, Advani AS. Management of older adults with acute lymphoblastic leukemia: challenges and current approaches. *International Journal of Hematologic Oncology* 2018; 7(1).
9. Busse A, Gokbuget N, Siehl JM, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and impact on clinical outcome. *Ann Hematol* 2009; 88: 1199-1205.

Zlepšenie stavu nášho pacienta napriek zlej prognóze si odôvodňujeme vhodnou liečbou, ktorá bola pacientovi podaná v správnom čase. Dôležité je naďalej sledovať pacienta a v skorom štádiu podchytiť relaps.

Záver

Komplexná prestavba chromozómov bola pozorovaná u 63-ročného pacienta, ktorý prekonal prechod Ph negatívnej MPN na Ph pozitívnu B-bunkovú ALL. Pacient podstúpil chemoterapiu, na ktorú zareagoval hemotoxickým šokom, preto mu musela byť znížená dávka liečiv. Po následnom stabilizovaní krvného obrazu sa stav pacienta zlepšil a momentálne je v stave remisie. Pre predchádzajúci cytogenetický nález s nepriaznivou prognózou je pre nás tento prípad zaujímavý a napriek stavu remisie je naďalej nutné pacienta pravidelne monitorovať.

Podakovanie: Rada by som sa touto cestou poďakovala všetkým kolegom, ktorí spolupracovali na vyšetrení pacienta, a MUDr. Hatalovej za osobnú konzultáciu.

10. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, et al. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO Journal* 2001; 20(8): 1897-1909.
11. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon: WHO 2017. 202p.
12. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Paris: Karger 2016.
13. Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, et al. Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood* 2011; 117: 6793-6800.
14. Wetzler M, Dodge RK, Mrózek K, et al. Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a study of the Cancer and Leukaemia Group B. *British Journal of Haematology* 2004; 124: 275-288.
15. Thomas X, Olteanu N, Charrin C, et al. Acute lymphoblastic leukemia in the elderly: The Edouard Herriot Hospital Experience. *Am J Hematol* 2001; 67(2): 73-83.
16. Raimondi SC, Zhou Y, Mathew S, et al. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2003; 98(12): 2715-22.
17. Pan J, Xue Y, Wu Y, et al. Dicentric (7;9)(p11;p11) is a rare but recurrent abnormality in acute lymphoblastic leukemia: a study of 7 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 169(2006): 159-63.

Mgr. Gabriela Veselá

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: gabrielasvesela@gmail.com

Primárny liposarkóm pankreasu – kazuistika a prehľad literatúry

Kristína Mikuš-Kuracinová^{1,2}, Helena Gavurová², Monika Sekerešová²

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

²Oddelenie patológie, Fakultná nemocnica Nitra

Adenokarcinóm pankreasu predstavuje 85 % všetkých nádorov pankreasu a len 1 % zo všetkých nádorov pankreasu je tvorených nádormi mäkkých tkanív. Liposarkóm patrí medzi najčastejšie mäkkotkanivové nádory a predstavuje 20 % všetkých mezenchýmových malignít v dospelosti. Sarkómy z tukového tkaniva sa vyskytujú hlavne v oblasti retroperitonea a končatín, zriedkakedy vo viscerálnej oblasti. V literatúre bolo opísaných celkovo desať prípadov primárneho liposarkómu pankreasu od roku 1979. V našom článku opisujeme prípad 34-ročného muža, ktorý sa sťažoval na náhle vzniknutú bolesť brucha. CT vyšetrenie potvrdilo rozsiahly tumorózny proces v epigastriu s aktívnym krvácaním do tumoru. Na základe bioptického vyšetrenia bol nález uzavretý ako primárny liposarkóm pankreasu, myxoidný typ s následnou kompletnou chirurgickou excíziou nádoru.

Kľúčové slová: liposarkóm, pankreas, mäkkotkanivové nádory, myxoidný liposarkóm

Primary pancreatic liposarcoma – the case report and literature review

Adenocarcinoma of pancreas presents 85% of all pancreatic tumors, and only 1% of all pancreatic tumors are soft tissue tumors. Liposarcoma is the most common soft tissue sarcoma and accounts for 20% of all mesenchymal malignancies in adulthood. The tumor occurs most frequently in limbs and retroperitoneum, rarely in the visceral region. There was reported ten cases of primary liposarcoma of pancreas since 1979. We described a case of 34-year old male with sudden abdominal pain. CT confirmed an extensive epigastric tumorous process with bleeding into the tumor, with presumed tumor origin in the pancreas. Biopsy confirmed a primary liposarcoma of pancreas – myxoid type, with an achieved subsequent complete surgical excision of the tumor.

Keywords: liposarcoma, pancreas, soft tissue tumors, myxoid liposarcoma

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 56 – 59

Úvod

Pankreas je žľazový orgán s exokrinnou aj endokrinnou funkciou. Nádory pankreasu delíme na základe histogenézy na epitelové a mezenchýmové. Nádory pankreasu epitelového pôvodu, kam patrí aj adenokarcinóm, predstavujú 85 % zo všetkých pankreatických nádorov⁽¹⁾, zatiaľ čo nádory z ostatných štruktúr pankreasu predstavujú 5 – 15 % nádorov, z toho mezenchýmové nádory tvoria len necelé 1 %⁽²⁾. Nádory pankreasu vychádzajúce z tukového tkaniva patria medzi veľmi vzácne tumory.

Liposarkóm patrí medzi najčastejšie mäkkotkanivové nádory dospelého veku, tvorí 20 % z tejto skupiny nádorov, typicky postihuje mäkké tkanivá končatín a retroperitonea. Primárne retroperitoneálne nádory predstavujú 0,1 – 0,2 % zo všetkých malignít⁽³⁾. Podľa dostupnej literatúry sa liposarkóm vyskytuje u oboch pohlaví rovnako bez vekovej predikcie. Retroperitoneálne liposarkómy rastú pomaly a bez špecifických klinických príznakov. Nález viscerálneho liposarkómu je veľmi zriedkavý^(4,5). Pacienti sa obvyčajne sťažujú na brušný diskomfort, nechutenstvo a chudnutie, bez elevácie nádorových markerov⁽⁶⁾. Podľa dostupných literárnych zdrojov bolo opísaných len desať prípadov liposarkómu pankreasu od roku 1979^(1-3,7-12), z toho sedem v anglickom jazyku^(1-3,6-8,12) (**tabuľka 1**). Prvý prípad spomenul Elliott et al. v roku 1980⁽⁷⁾.

Kazuistika

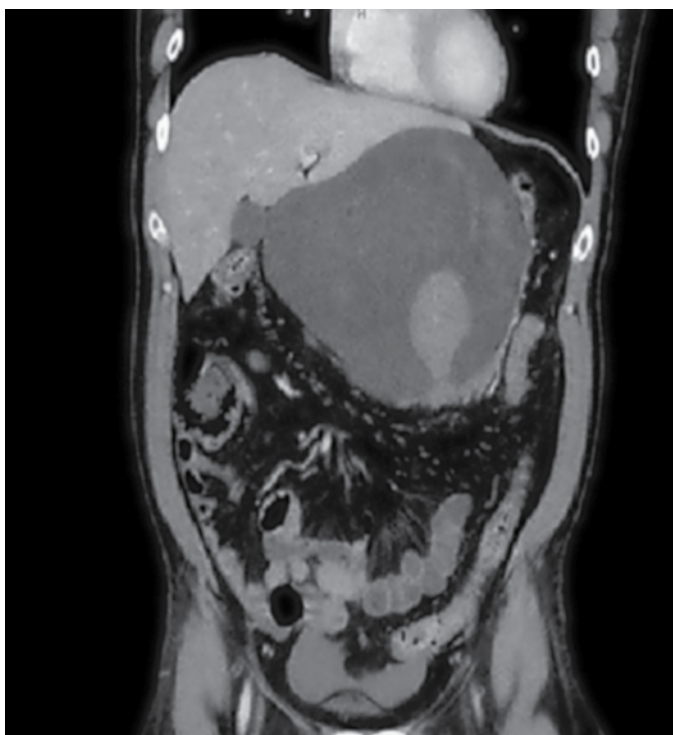
Opisujeme prípad 34-ročného muža, u ktorého sa z plného zdravia náhle objavili po jedle bolesti brucha a brušný diskomfort. CT vyšetrenie odhalilo v epigastriu veľký tumorózny proces solídno-cystického charakteru s aktívnym krvácaním do tumoru, bez možnosti určenia primárneho ložiska (**obrázok 1**). Podľa operačného záznamu išlo o nádor tela pankreasu s prerastaním do malej predstery a k priečne- mu hrubému črevu. Nádor bol fragilnej, mäkkej konzistencie, s ložiskami nekrózy a krvácaní, veľkosti 30 x 25 x 25 cm a celkovej hmotnosti 1 800 g (**obrázok 2**). Z anamnézy pacienta bol zaujímavý údaj o exstirpácii myxoidného liposarkómu z pravého stehna v minulosti.

V tumore boli prítomné ložiská krvácania a diskkrétne nekrózy. Išlo o neostro ohraničený nádor infiltrujúci pankreatické tkanivo, so zavzatím ductov a Langerhansových ostrovcov, nález svedčil o primárnom tumore tukového tkaniva tela pankreasu. V mikroskopickom obraze bol nádor tvorený lipoblastmi vzhľadu signet-ring buniek, v okrajoch lézie s multivakuolizovanými lipoblastmi, zachytené boli aj ľahko atypické stromálne bunky a okrúhle primitívne bunky (asi 1 %). Nádorová populácia bola vnorená v nadbytočnej myxoidnej stróme, s tvorbou mukoidných jazierok až cystickej degenerácie. Prítomná bola prominentná vaskulatúra s tenkými stočenými kapilármi, vzhľadu „chicken wire“. Nádorové

Tabuľka 1. Prehľad prípadov primárneho liposarkómu pankreasu popísaných v anglickom jazyku

	Autor	Pohlavie	Vek	Klinické príznaky	Origo nádoru	veľkosť	Typ liposarkómu
1	Elliot et al., 1980 [7]	žena	59	brušný dyskomfort	telo pankreasu	16 cm	pleomorfný typ
2	Dodo et al, 2005 [1]	muž	76	bolesť brucha, anorexia, strata hmotnosti	telo a chvost pankreasu	9 cm	dobře diferencovaný s ložiskami dediferenciácie
3	Kuramoto et al., 2013 [8]	muž	24	brušný dyskomfort	telo pankreasu	25 cm	myxoidný typ
4	Kim et al., 2014 [2]	žena	78	asymptomatický	telo pankreasu	N/A	dobře diferencovaný
5	Machado et al., 2016 [6]	muž	42	bolesť brucha	hlava pankreasu	6,8 cm	dediferencovaný high grade
6	Matthews et al., 2016 [12]	žena	65	asymptomatický	telo pankreasu	4	dobře diferencovaný
7	Jing-Yong Xu et al., 2018 [3]	muž	69	bolesť brucha a chrbta	hlava pankreasu	7,3 cm	dediferencovaný typ (myxoidný/pleomorfný)
8	náš prípad, 2018	muž	34	náhla príhoda brušná	telo pankreasu	25 cm	myxoidný typ

Obrázok 1. CT scan brušnej dutiny



bunky vykazovali S100, vimentin, p16 pozitivitu, boli negatívne pre p53, CD34, SMA, HMB45 a s počtom mitóz (PHH3): 4 mitózy na 10 HPF, s proliferáčnou aktivitou (Ki-67): asi 25 % (obrázky 3 – 8).

Na základe histomorfologického a imunohistochemického vyšetrenia bol nález uzavretý ako primárny myxoidný liposarkóm tukového tkaniva tela pankreasu, podľa FNCLCC (The French Federation of Comprehensive Cancer Centers) skóre 4 (diferenciácia tumoru 2, nekrózy 1, mitózy 1), grade 2, staging pT2b, pNX, pMX.

Diskusia

Primárny liposarkóm pankreasu je extrémne zriedkavý tumor doteraz opísaný v desiatich prípadoch zastúpený u oboch pohlaví a v širokom vekovom zastúpení (24 – 78 rokov). Pacienti sa väčšinou sťažovali na brušný dyskomfort s bolesťou žalúdka^(3,7,8), na anorexiu a stratu hmotnosti⁽³⁾, a v troch prípadoch pacienti nemali žiadne klinické ťažkosti^(1,12). V našom prípade bol tumor objavený pri vyšetrení pre náhle vzniknutú bolesť brucha. Pri diagnostike môžu byť ná-

Obrázok 2. Tumor pankreasu - makroskopicky

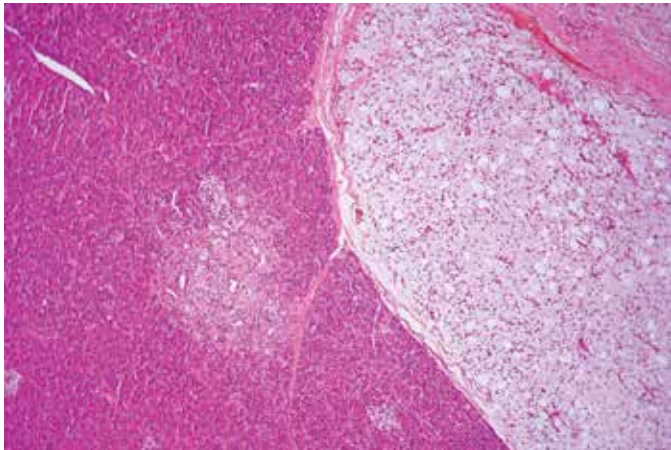


pomocné zobrazovacie vyšetrovacie metódy (MRI, CT), no liposarkóm je často na nerozoznanie od iných typov sarkómov⁽¹³⁾. Prítomnosť tukového tkaniva vnútri nádoru môže nasmerovať k diagnóze liposarkómu.

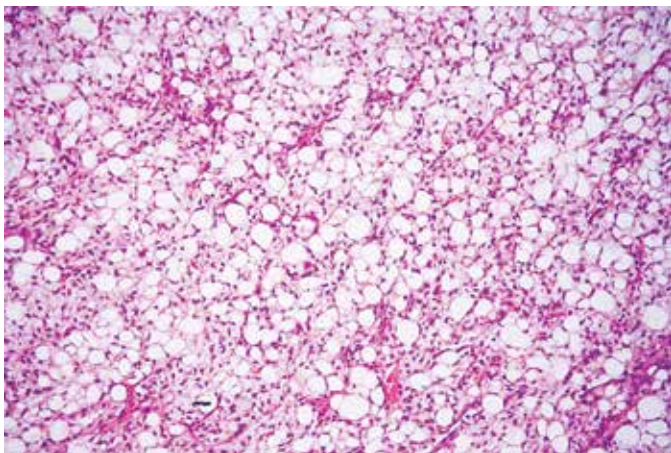
WHO klasifikáciu mäkkotkanivových nádorov z roku 2013⁽¹⁴⁾ o rok neskôr upravil Doyle et al.⁽¹⁵⁾ a zmeny sa týkali aj klasifikácie nádorov z tukového tkaniva. Na základe spomínaných klasifikácií sú nádory z tukového tkaniva rozdelené z hľadiska biologického správania na tri skupiny: benigne, intermediárne a maligne. Na základe morfológických vlastností a cytogenetických aberácií WHO delí liposarkómy do štyroch skupín: dobre diferencované a dediferencované liposarkómy (WDLPS a DDLPS), myxoidný liposarkóm (MLS) a pleomorfný liposarkóm (PLS)⁽¹⁵⁾. Histologická klasifikácia je založená najmä na morfológických znakoch nádoru v základnom farbení H & E. Amplifikácia a overexpresia MDM 2 je charakteristická pre dobre diferencované a dediferencované liposarkómy, na ktorých diagnostiku nám môže pomôcť FISH metóda aj imunohistochemia⁽⁶⁾.

Myxoidný liposarkóm predstavuje 15 – 20 % zo všetkých liposarkómov a tvorí 5 % zo všetkých mäkkotkanivových nádorov⁽¹⁴⁾. Typicky postihuje hlboké mäkké tkanivá končatín, zriedkakedy sa nachádza retroperitoneálne alebo subkutánne⁽¹⁴⁾. Na základe histomorfologických znakov myxoidný liposarkóm delíme na low grade a high grade. Vo väčšine prípadov je však myxoidný typ liposarkómu všeobecne považovaný za low grade nádor s pomalým rastom, s nízkym metastatickým potenciálom a s progresívnou deštrukciou pankreatického tkaniva^(2,6). Tieto nádory majú celkovo lepšiu prognózu v porovnaní s dediferencovanými alebo pleomorfnými typmi liposarkómu, označovanými ako high grade nádory, ktoré sa vyznačujú vysokým metastatickým

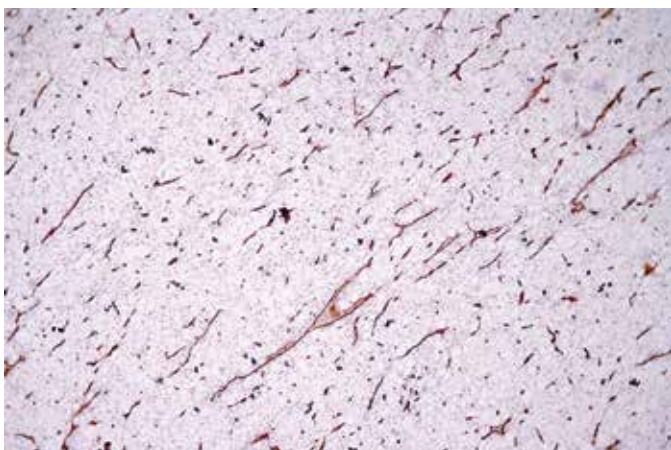
Obrázok 3. Liposarkóm pankreasu, HE, 200x



Obrázok 4. Liposarkóm pankreasu, HE, 400x



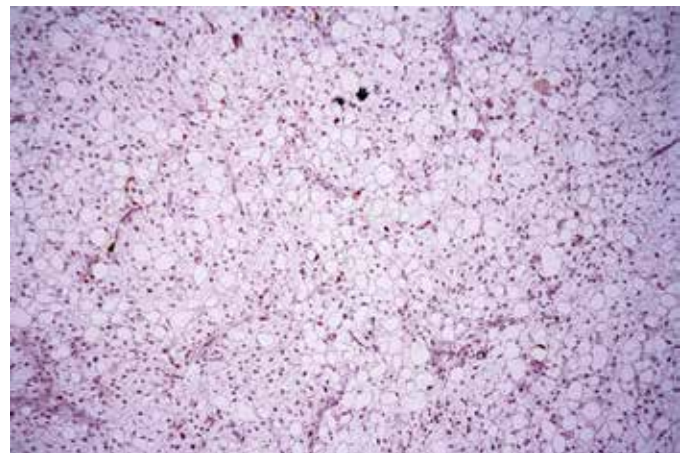
Obrázok 5. CD34, 200x



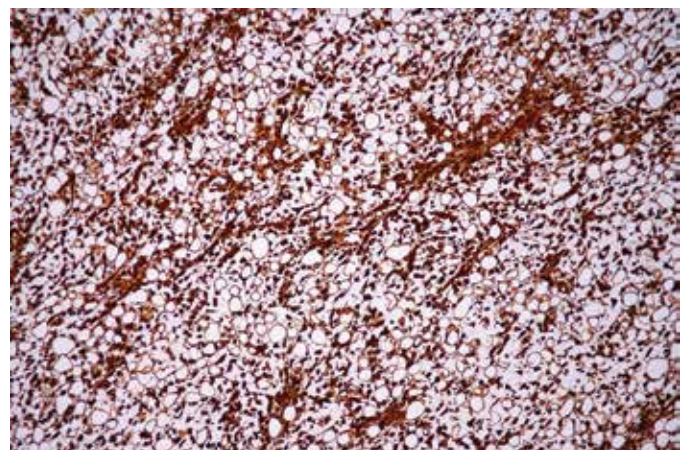
Obrázok 6. Ki-67, 200x



Obrázok 7. S100, 200x



Obrázok 8. Vimentín, 200x



potenciálom a agresívnym správaním. Dva hlavné faktory, ktoré ovplyvňujú prognózu pacienta, sú stupeň diferenciácie nádoru a rozsah chirurgickej resekcie. Podľa dostupných údajov je päťročné prežítie po kompletnej chirurgickej resekcii medzi 41 – 50 %^(3,11). Len v jednom z ôsmich prípadov bola opísaná rekurencia nádoru po 44 mesiacoch po chirurgickej excízii⁽⁸⁾.

Záver

Pankreatický myxoidný liposarkóm predstavuje raritný nádor pankreasu a faktorom ovplyvňujúcim prognózu je hlavne primeranosť chirurgickej resekcie v čase prvého zachytenia nádoru. Prezentovaný prípad je zaujímavý prítomnosťou dvoch myxoidných liposarkómov v dvoch rôznych lokalitách. Nedá sa vylúčiť možnosť, že exstirpovaný nádor zo stehna bol metastázou primárneho liposarkómu pankreasu.

LITERATÚRA

1. Kim JY, et al. Primary mesenchymal tumors of the pancreas: single-center experience over 16 years. *Pancreas* 2014; 43(6): p. 959-68.
2. Jing-Yong Xu JD, Tan Guo, Jian Chen. Liposarcoma within uncinate process of pancreas revealing valuable multidisciplinary therapy: a case report and review of the literature. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine (IJCEM)* 2018; 11(9): p. 8802-10243.
3. Dodo IM, et al. Successful outcome following resection of a pancreatic liposarcoma with solitary metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(48): p. 7684-5.
4. Kransdorf MJ, et al. Imaging of fatty tumors: distinction of lipoma and well-differentiated liposarcoma. *Radiology* 2002; 224(1): p. 99-104.
5. Lee SY, et al. Retroperitoneal liposarcomas: the experience of a tertiary Asian center. *World J Surg Oncol* 2011; 9: p. 12.
6. Machado MC, et al. Primary liposarcoma of the pancreas: A review illustrated by findings from a recent case. *Pancreatology* 2016; 16(5): p. 715-8.
7. Elliott TE, Albertazzi VJ, Danto LA. Pancreatic liposarcoma: case report with review of retroperitoneal liposarcomas. *Cancer* 1980; 45(7): p. 1720-3.
8. Kuramoto K, et al., Education and imaging. Hepatobiliary and pancreatic: large pancreatic liposarcoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28(12): p. 1800.
9. Choux R, et al. Liposarcoma of the pancreas. Study of a case including ultrastructure]. *Ann Anat Pathol (Paris)* 1979; 24(3): p. 251-9.
10. Amano H, et al. A case of pancreatic liposarcoma (author's transl)]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1981; 78(7): p. 1475-9.
11. Milano C, et al. Liposarcoma of the pancreas. Report of a clinical case and review of the literature]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1988; 18(2): p. 133-8.
12. Matthews M, et al. Well differentiated liposarcoma, sclerosing type, of the pancreas a case report. *Exp Mol Pathol* 2016; 101(3): p. 320-322.
13. O'Regan KN, et al. Imaging of liposarcoma: classification, patterns of tumor recurrence, and response to treatment. *AJR Am J Roentgenol* 2011; 197(1): p. W37-43.
14. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumours, IARC WHO Classification of Tumours. WHO 2013; 5(5): 468.
15. Doyle LA. Sarcoma classification: an update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer* 2014; 120(12): p. 1763-74.



MUDr. Kristína Mikuš-Kuracinová, PhD.

Ústav patologickej anatómie

Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

e-mail: kristina.kuracinova@gmail.com

KLIENSKA ZÓNA

VŠETKO, ČO POTREBUJETE, V JEDNEJ DÁVKE



- osobné konto prispôbené na mieru
- dostupnosť informácií 24 hodín/7 dní v týždni
- online výsledky laboratórnych vyšetrení
- dôležité správy o legislatívnych usmerneniach v zdravotníctve

- okamžité informácie o novinkách a aktualitách
- jednoduchý spôsob registrácie na odborné podujatia
- možnosť zapojiť sa do vedeckých štúdií
- a mnoho ďalších výhod

Črevná mikróflóra – čo znamená pre nás a čo pre ňu môžeme znamenať my?

Ján Radvánszky

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

NewsLab, 2019; roč. 10 (1): 61 – 62

Na úvod sa rovno priznám, že tentoraz môj príspevok nie je úplne originálnym dielom vytvoreným len pre aktuálne vydanie časopisu NewsLab. Jeho podkladom je moja rovnomená prednáška, ktorá odznela v roku 2017 v rámci podujatia Noci výskumníkov v Bratislave. Dôvodom môjho návratu k zdanlivo „staršej“ téme v tejto pravidelnej rubrike venovanej „novinkám“ však nie je len všeobecný fakt, že o črevnom mikrobióme sa hovorí čoraz viac, ale konkrétne dve štúdie uverejnené v jednom a tom istom vydaní časopisu *Nature* v októbri 2018, ktoré zaujali moju pozornosť. Obidve práce reportovali výsledky štúdie TEDDY (*The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*), ktorá bola venovaná otázkam, ako skoré fázy života a vonkajšie vplyvy v tomto období formujú detský črevný mikrobióm⁽¹⁾, a zároveň ako sú zmeny v zložení mikróflóry a vo funkciách ňou poskytovaných asociované s rizikom ochorení, v tomto prípade diabetu⁽²⁾. Čo považujem za veľmi zaujímavý výsledok, je, že v „ochrane“ pred ochorením pravdepodobne dôležitejšiu úlohu než taxonomické umiestnenie mikroorganizmu zohráva samotný gén (resp. jeho produkt), ktorý ho poskytuje nášmu organizmu. To je totiž v krásnom súlade s dávnejším názorom, že dôležité je, aby napriek dynamike v druhovom zložení zostala zachovaná rovnováha v „ekologickej“ úlohe črevnej mikróflóry, napr. v konkrétnej metabolickej aktivite, ktorú treba zabezpečiť. To znamená, že keď treba zaistiť určitú funkciu, je viac-menej jedno, ktorý organizmus to zabezpečí. Dôležité je, aby bol nejaký organizmus schopný to zabezpečiť. Cieľom tohto príspevku však nemal byť opis týchto dvoch publikácií, ale skôr snaha o vzbudenie záujmu ohľadne významu nášho črevného mikrobiómu. Podľa môjho pôvodného prísľubu sa aj teraz budem snažiť odvolávať na čitateľné príspevky pre tých, ktorých téma zaujme, avšak nechce sa im čítať tvrdú vedeckú literatúru.

Ale poďme pekne poporiadku. Určite nie je žiadna novinka pre nikoho z čitateľov, že v našich črevách existuje veľmi komplexná mikróflóra, tvoriaca náš črevný mikrobióm. Podľa klasickej predstavy sa tráviaca sústava začína kolonizovať postupne po pôrode a jej plne funkčné zloženie sa vytvorí okolo druhého až tretieho roku života. Pred pôrodom by mal byť plod chránený pred infekciami placentou, čo znamená, že kým sa niečo nepokazí, plod by mal byť sterilný. Ako mnoho iných ortodoxných predstáv aj táto čelí v poslednom období určitým výzvam, keďže moderné metódy umožnili identifikáciu bakteriálnej DNA aj v placente. Tento nález korešpondoval napr. s nálezom odlišností medzi mikrobiómovou kolonizáciou novorodencov v prvom týždni ich života a mikróflórou vagíny ich matiek pri pôrode⁽³⁾. Pre úplnosť však treba spomenúť, že aj tieto nové výsledky čelia kritike, ako to býva zvykom pri všetkých nových výsledkoch búrajúcich existujúce

dogmy. V súčasnosti sme vo fáze, keď čakáme, ktorú z nich potvrdia výsledky pribúdajúcich štúdií.

V každom prípade, keď je už jeho zloženie ustálené, je komplexita ľudského črevného mikrobiómu naozaj obrovská. Nechýbajú tu ani vírusy, ani zástupcovia archeí, baktérií a eukaryot. Naozaj pestré ekologické spoločenstvo, ktoré je navyše extrémne dynamické, pričom sa tu dajú nájsť asi všetky typy spolunažívania organizmov známych z bežných ekologických vied, či už z hľadiska vzťahu medzi zložkami mikrobiómu a hostiteľského organizmu, alebo z hľadiska vzájomných vzťahov medzi jednotlivými zložkami nášho črevného mikrobiómu. A z tohto bodu je naozaj doslova na dosah výrok, podľa ktorého je vplyv črevného mikrobiómu na náš zdravotný stav obrovský. S mikrobiómom je to však ako so všetkým iným, treba sa snažiť brať súvislosti s rozumom⁽⁴⁾.

Vieme, že fyziologický črevný mikrobióm pre nás znamená ochranu proti patogénom, a to napr. priamou kompetíciou alebo vylučovaním antimikrobiálnych látok. Novinkou nie je ani to, že pomáha aj v spracovaní potravy, poskytuje rôzne nutrienty, vitamíny a metabolity. Ale čo považujem za špeciálne dôležité, je, že črevný mikrobióm sa intenzívne zapája do správneho vývinu a správneho fungovania imunitného systému, a zároveň ovplyvňuje aj náš nervový systém. Práve to sú témy, na ktoré by som chcel upozorniť vo zvyšnej časti tohto textu. Pri tom je však dôležité zrekapitulovať aj to, čo znamenáme my pre náš črevný mikrobióm. Sme totiž preň prostredím, kde môže žiť a prosperovať. Poskytujeme vhodné a najmä konštantné fyzikálne prostredie, a to vo forme slizkej mukózy a celkovej architektúry čreva, vhodnej teploty, vlhkosti a pH. Zabezpečujeme preň neustály prísun živín a v neposlednom rade antimikrobiálne látky pôsobiace na prípadné kompetitívne druhy mikroorganizmov, čím dokážeme zvýhodňovať určité konkrétne druhy a potláčať iné. Ovplyvňujeme teda diverzitu mikrobiómu, čiže druhové zloženie, aj celkovú abundanciu jednotlivých organizmov. A práve pre tieto zložité interakcie je mnohokrát dysbióza, čiže narušenie rovnováhy črevnej mikróflóry, nielen sprievodným, ale aj vyvolávacím faktorom mnohých ochorení, fyziologických aj emocionálnych stavov. Mnoho vedeckých výsledkov poukazuje dokonca na to, že existujú jedinci, ktorí sú závislí od prítomnosti črevných parazitov, aby ich imunitný systém fungoval správne. Hlíst a iných črevných parazitov sme sa totiž zbavili až v poslednom storočí nástupom vylepšených hygienických možností. Problém spočíva v tom, že počas miliónov rokov evolúcie sme spolu nažívali aj s týmito črevnými parazitmi, čomu sa prispôbil i náš organizmus, konkrétne náš imunitný systém. Vyzerá to tak, že správne fungovanie imunitného systému viacerých z nás sa stalo doslova závislým od niektorých látok vylučovaných týmito organizmami

a ich absencia vedie k chybám imunitného systému. Takéto chyby môžu spočívať napríklad v regulácii ostatnej časti črevného mikrobiómu, a tak viesť k ochoreniam, ako sú zápalové črevné ochorenia. V tomto kontexte sa čoraz viac skloňuje výraz helmintoterapia, čiže liečba pomocou hlíst. Zistilo sa totiž, že keď niektorým pacientom vrátime tieto parazity, symptómy ich ochorenia sa stratia alebo sa aspoň zmiernia. Podobne ako každá iná terapia, aj táto však funguje iba na určitej podskupine pacientov s vybranými ochoreniami⁽⁶⁾.

Ale v čom spočíva táto úzka vzájomná prepojenosť? Podľa aktuálnych vedomostí je odpoveďou na túto otázku *nervus vagus*, čiže blúdivý nerv. Nerv majúci aj aferentné, aj eferentné vlákna, čiže zbierajúci informácie aj odovzdávajúci rozkazy. Tento nerv prakticky zabezpečuje nielen všetky mimovôľové pochody tráviacej sústavy spojené s trávením, ale aj obojsmernú signalizáciu stresovej odpovede organizmu. K jeho funkciám môžeme pridať navyše vzájomnú priamu komunikáciu mikroorganizmov s mozgom hostiteľa. Tým sa nám dostáva na dosah ďalší výrok, podľa ktorého mentálne zdravie môže byť ovplyvnené zložením črevnej mikroflóry a zároveň črevná mikroflóra môže byť formovaná mentálnym zdravím. Toto sa dá zistiť aj z bežného života: keď má človek tráviace problémy, nemáva veľmi dobrú náladu a určite každý pozná takých ľudí, ktorí od stresu dostanú hnačku. Notoricky známy je príklad sérotonínu, populárneho hormónu šťastia, ktorý je produkovaný hlavne v gastrointestinálnom trakte. Dokázalo sa, že existujú bakteriálne kmene priamo podporujúce tvorbu sérotonínu. Cieľá spomínaná komunikácia môže viesť ku konkrétnym fyzickým prejavom, ako sú napríklad gastrointestinálne problémy, bolesti a depresia, ktoré sú typickými prejavmi syndrómu dráždivého čreva, ktorého symptómy u niektorých pacientov ustúpia pri užívaní probiotík. A keď k dráham zabezpečeným blúdivým nervom priberieme aj reguláciu zápalu, čomu hovoríme zápalový reflex zabezpečený čревно-mozgovou osou, tak sa veľmi rýchlo dostaneme od syndrómu dráždivého čreva k autoimunitným ochoreniam, ako sú spomínané zápalové črevné ochorenia. Tie sa úzko spájajú s črevnou dysbiózou. Vytvára sa nám teda obraz celkom intenzívnej a komplikovanej vzájomnej komunikácie a prepojenosti mikroflóry, mentálneho stavu a fyzických ochorení. Výsledkom je, že našu dobre známu čревно-mozgovú os, sprostredkovanú blúdivým nervom, môžeme s najväčšou pravdepodobnosťou začať považovať za mikrobiómovo-čревно-mozgovú os⁽⁶⁾.

REFERENCIE

1. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* 2018; 562(7728): 583-588.
2. Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, et al. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature* 2018; 562(7728): 589-594.
3. Willyard C. Could baby's first bacteria take root before birth? *Nature* 2018; 553(7688): 264-266.
4. Radvánszky J. Črevný mikrobióm je stále veľkou záhadou. *Vyšetrenie sk. Rozhovory – Z pohľadu vedy. Uverejnené on-line 27. 11. 2017.*

Ako však z toho všetkého môžeme profitovať v našom každodennom živote? Ideálnym stavom je, keď sa vedecké poznatky dokážu prekloniť do bežného života každého z nás alebo aspoň do klinickej starostlivosti o niektorých z nás. V tomto smere o probiotikách a prebiotikách počul naozaj už asi každý. Všetky majú potenciál vylepšiť črevný mikrobióm a zasiahnúť tak do klinickej starostlivosti. Existujú však aj exotickéjšie, ba na prvý pohľad až bizarné možnosti na dosiahnutie tohto cieľa. Napr. spomínaná helmintoterapia, kde sa podávajú črevné parazity pacientom, najčastejšie vo forme purifikovaných vajčiek⁽⁵⁾. Nemôžeme nespomenúť ani tzv. fekálnu transplantáciu, pri ktorej sa mikrobióm z čreva zdravého človeka preniesie priamo do čreva človeka s črevnou dysbiózou, a to konkrétne výplachom črevného obsahu a jeho prenesením do čreva iného pacienta⁽⁷⁾. Tieto postupy však prirodzene nemusíme nutne považovať za nápady na definitívnu terapiu. Skôr ako odrazové mostíky na identifikáciu pacientov, u ktorých fungujú, s následným hľadaním konkrétnych faktorov a zložiek spúšťajúcich žiaduce reakcie organizmu. Potom sa tieto zložky môžu teoreticky využiť v terapii už v purifikovanom alebo syntetizovanom stave. Takéto látky označujeme za postbiotiká, čiže látky obsiahnuté v organizmoch tvoriacich mikrobióm, prípadne látky vylučované týmito organizmami. Ale keď blúdivý nerv v tejto problematike zohráva takú významnú úlohu, tak popri exotických máme aj futuristickejšie možnosti využitia vedomostí, a to napr. vo forme pravidelnej umelej stimulácie blúdivého nervu elektrickým šokom, konkrétne pomocou implantovaných zariadení vydávajúcich krátke elektrické impulzy do daného nervu po externej aktivácii priloženým magnetom⁽⁸⁾. Len pre zaujímavosť, tieto „lieky“ sa nenazývajú farmaceutiká, ale elektroceutiká.

Téma by sa dala prirodzene rozpracovať na mnoho a mnoho strán, sľuboval som však do tejto rubriky krátke texty, ktoré si človek môže prečítať hoci aj pri káve. Na záver mi teda dovoľte už len jedinú myšlienku. Aby sme vedeli, akým smerom treba modifikovať zloženie črevného mikrobiómu, musíme ho najskôr vedieť charakterizovať, a to u každého jedinca v reálnom čase. Aký je jeho aktuálny stav, či sa nachádza v rovnováhe, prípadne či bola táto rovnováha narušená. Metodických možností máme čoraz viac a sú čoraz dostupnejšie, majú však aj svoje limity. Prísľuby budúcnosti, možno ani nie takej ďalekej, sú pritom veľmi lákavé. To je však už téma na ďalší príbeh.

5. Savage N. Q & A: Joel Weinstock. Worm charmer. *Nature* 2016; 540(7634): S103.
6. Eisenstein M. Microbiome: Bacterial broadband. *Nature* 2016; 533(7603): S104-6.
7. Drew L. Microbiota: Reseeding the gut. *Nature* 2016; 540(7634): S109-S112.
8. Fox D. The electric cure: The shock tactics set to shake up immunology. *Nature* 2017; 545(7652): 20-22.



RNDr. Ján Radvánszky, PhD.

Ústav klinického a translačného výskumu
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava
e-mail: jan.radvanszky@savba.sk

ZDRAVIE PLODU NIE JE HÁDANKA

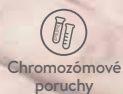
Počas starostlivosti o tehotnú ženu musia lekár i pacientka často prekonať momenty, ktoré môžu vzbudzovať obavy a narušiť tak pokojný priebeh tehotenstva. V **MEDIREX GROUP** plne chápeme potreby vás lekárov a vašich pacientok.

VYUŽITE VÝHODY NÁŠHO TRISOMY TESTU:

- vysoká spoľahlivosť
- najnižšia cena na trhu
- slovenský produkt vyvinutý slovenskými vedcami
- test vykonávaný v slovenských laboratóriách
- vyšetrenie z krvi (nie zo vzorky získanej amniocentézou)
- najrýchlejšie výsledky už do 5 dní

V PRÍPADE POZITIVITY TESTU

- komplexná genetická diagnostika
- následná genetická ambulánna starostlivosť



Chromozómové poruchy



Cena vyšetrenia



Stanovenie výsledkov



Vyšetrenie indikuje



TRISOMY test

TRISOMY test

Downov syndróm (trizómia 21)
Edwardsov syndróm (trizómia 18)
Patauov syndróm (trizómia 13)
Pravdepodobné pohlavie plodu

350 €

5 pracovných dní

gynekológ alebo
lekársky genetik



TRISOMY test XY

TRISOMY test XY

Downov syndróm (trizómia 21)
Edwardsov syndróm (trizómia 18)
Patauov syndróm (trizómia 13)
Chromozómové pohlavie plodu
Turnerov syndróm (monozómia X)
Klinefelterov syndróm (XXY)
XYY syndróm (XYY)
XYY syndróm (XYY)
XXX syndróm (XXX)

390 €

5 pracovných dní

gynekológ alebo
lekársky genetik



TRISOMY test +

TRISOMY test +

Downov syndróm (trizómia 21)
Edwardsov syndróm (trizómia 18)
Patauov syndróm (trizómia 13)
Chromozómové pohlavie plodu
Turnerov syndróm (monozómia X)
Klinefelterov syndróm (XXY)
XYY syndróm (XYY)
XXX syndróm (XXX)
DiGeorgeov syndróm (22q11)
Praderov-Williho a Angelmanov syndróm (15q11)
Cri-du-chat syndróm (5p15)
Syndróm delécie 1p36
Wolfov-Hirschhornov syndróm (4p16.3)

450 €

5 pracovných dní

lekársky genetik

www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

