

Ročník X.

newslab

časopis laboratórnej medicíny

2
2019

Detekcia a validácia subchromozómových aberácií detegovaných ako doplnkové zistenia v rámci rutinného neinvazívneho prenatálneho skríningu na najčastejšie trizómie

Detection and validation of subchromosomal aberrations detected as additional findings in routine noninvasive prenatal testing for common trisomies

Nález marker chromozómu u dieťaťa s Cat-eye syndrómom (kazuistika)

Finding of a marker chromosome in a child with Cat-eye syndrome (case study)

Experimentálna terapia kmeňovými bunkami je perspektívna v liečbe chronického diabetického vredu – prípadová štúdia

Experimental therapy with stem cells is promising in the treatment of chronic diabetic ulcer – a case study

Hamartóm zo Schwannových buniek v sliznici hrubého čreva: popis prípadu

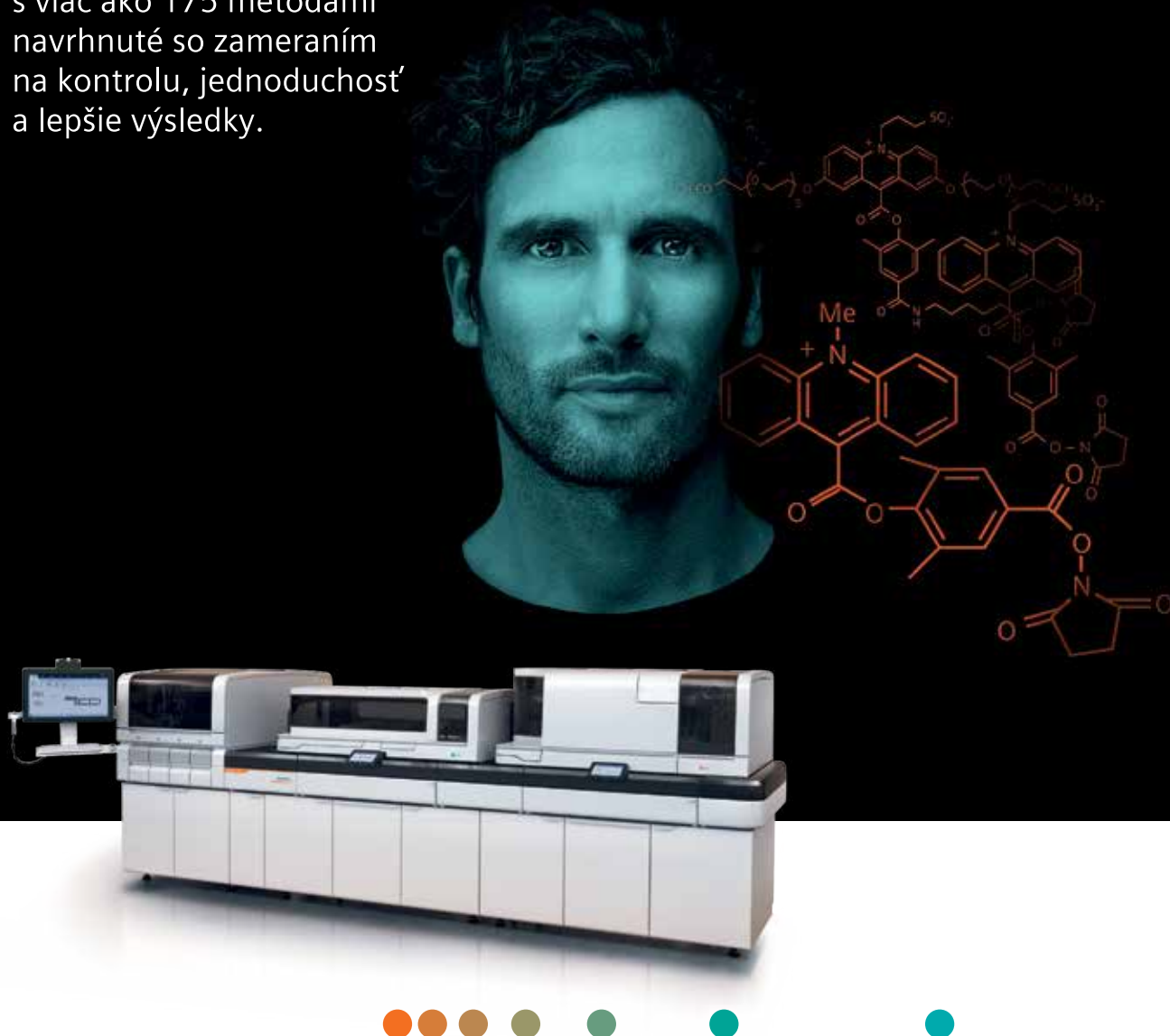
Colonic mucosal Schwann cell hamartoma with tactile corpuscle-like bodies: a case report

Náhodný záchyt toxického kmeňa *Corynebacterium diphtheriae*

Accidental capture of the toxic strain *Corynebacterium diphtheriae*

Atellica® Solution

Nové diagnostické portfólio
s viac ako 175 metódami
navrhnuté so zameraním
na kontrolu, jednoduchosť
a lepšie výsledky.



Zažite silu Atellica!

Flexibilné, škálovateľné a automatizované analyzátory Atellica Solution prinášajú širokú paletu biochemických a imunochemických testov vrátane vysokocitlivého troponínu I či 12 nových metód pre stanovenie vírusovej hepatitídy, HIV či onkologických ochorení.

Vďaka revolučnému manažmentu vzoriek poskytuje Atellica Solution diagnostikovaným pacientom ako aj klinickým pracovníkom rýchle a spoľahlivé laboratórne výsledky.

Viac informácií o rozsiahlom Atellica portfóliu môžete nájsť na

**[siemens-healthineers.com/sk/
laboratorna-diagnostika/atellica-portfolio](https://www.siemens-healthineers.com/sk/laboratorna-diagnostika/atellica-portfolio)**

SIEMENS
Healthineers

Vážení čitatelia, milí kolegovia,

po desaťročiach prežitých v laboratóriu si čoraz intenzívnejšie uvedomujem, ako veľmi sa zmenila podoba laboratórnej medicíny. Už v minulosti sa vyslovovali odvážne predpovede týkajúce sa jej budúcnosti. Mnohé z nich sa naplnili, od iných ešte očakávame, že sa stanú realitou. Futuristi predpovedali svet, v ktorom budú dominovať obrovské nadregionálne terciárne centrá alebo laboratórne siete, ktoré vzniknú ako výsledok konsolidácie a outsourcingu laboratórnych služieb. Stalo sa. Zjednotenie odborov biochémie, hematológie, transfúziológie, imunológie a sérológie (spoločný biologický materiál aj analytická základňa) je tiež skutočnosťou. Vzhľadom na starnutie ľudskej populácie sa očakáva väčšie zameranie laboratórnych služieb smerom k seniorom.

V uplynulých rokoch boli najväčším úspechmi klinickej biochémie a laboratórnej medicíny všeobecne štandardizácia kľúčových parametrov, ktorá umožnila ich porovnateľnosť a metrologickú nadväznosť výsledkov. Koncept referenčných metód a koncept biologickej variability mali za cieľ zlepšenie bezpečnosti a zdravia pacientov. Veľkými témami súčasnej laboratórnej medicíny je skúmanie pred- a postanalytických vplyvov na laboratórny výsledok a aktívna účasť na klinických a metodologických odporúčaniach v spolupráci s inými medzinárodnými odbornými spoločnosťami a autoritami. Budúcnosť medicínskych laboratórií sa ponesie v znamení znižovania laboratórnych chýb, odstraňovania nadbytočných vyšetrení a sústredenia sa na výzvy globálnej harmonizácie.

S nástupom digitálnej revolúcie vstupuje laboratórna medicína do novej arény. Sme svedkami kvantových skokov v analytických technológiách IVD výrobcov, prenikania nových progresívnych metód, ako mikrofluidika, nanotechnológie alebo stanovenie voľných cirkulujúcich nádorových DNA. Nové technológie, ktoré produkujú medicínske „big data“ (NGS, multiparametrová prietoková cytometria, veľkokapacitné proteomické či metabolomické analýzy), nás nútia prehodnotiť tradičný prístup k diagnostike a prognózovaniu. Kým v minulosti mohol človek stráviť celú svoju klinickú aj vedeckú kariéru vývojom a skúmaním len zopár analytov, dnes máme možnosť rozlúštiť neuveriteľnú komplexnosť živého organizmu. Toto všetko kladie na laboratórnych špecialistov vyššie nároky a „núti“ ich zvládnuť aspoň základy viacerých pododborov súčasne.

Automatizácia a robotizácia laboratórnej medicíny patria k najreálnejším predpovediam. Aj keď schopnosti humanoidných robotov sú zatiaľ obmedzené, treba predpokladať, že v budúcnosti „stroje“ nahradia podstatnú časť ľudskej práce. Nástup elektronických lekárskeho záznamov robí reálnym aj poskytovanie klinických konzultácií v laboratórnej diagnostike pre špecifických pacientov napriek geografickým vzdialenostiam.

Nové, prudko sa rozvíjajúce sa odvetvie POCT prináša výhody aj potenciálne hrozby. Mnohí odborníci sa domnievajú, že laboratórna medicína budúcnosti sa bude čoraz viac približovať k pacientovi pomocou prenosných zariadení a smartfónov. Jednoduchosť, flexibilita, prenosnosť, nízka cena a zabudovaný systém vnútornej kontroly predurčujú POCT technológie na monitorovanie mnohých chronických alebo infekčných ochorení.

Všetky tieto zmeny ovplyvňujú tradičnú trojúlohu laboratórnych profesionálov – laboratórne služby, edukácia a výskum. Pre jednotlivca aj pre laboratórne pracoviská je čoraz ťažšie udržať všetky tieto aktivity, najmä pre úbytok akademického personálu, a čoraz ťažšie získavať vedecké granty. Dôkazom toho je prudko klesajúci počet publikácií v odborných časopisoch, ako je napríklad *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v ktorých prvý alebo ďalší autor pochádza z prostredia laboratórnej medicíny.

Napriek technologickému pokroku a zavádzaniu stále efektívnejších diagnostických testov sa podľa prieskumov hodnota laboratórnych služieb vo vnímaní jej používateľov paradoxne celosvetovo znižuje. Tento vývoj predstavuje potenciálnu hrozbu pre laboratórnu medicínu ako akademickú disciplínu najmä preto, že ohrozuje jej kľúčovú klinickú aktivitu, ako je prenos laboratórnych dát do žiadanej klinickej informácie potrebnej pre diagnostiku a manažment pacienta.

Medicínske laboratóriá musia zmeniť svoju prevažne reaktívnu stratégiu na viac proaktívnu úlohu v starostlivosti o pacienta. Úspechy na poli automatizácie a štandardizácie metód uvoľnili ruky laboratórnym špecialistom na extraanalytické činnosti, ako je vytváranie efektívnych diagnostických algoritmov a interpretácia výsledkov. Ďalším trendom je zameranie laboratória priamo na pacienta. Personál laboratória má v súčasnosti do činenia s oveľa informovanejším pacientom vďaka dostupnosti informácií o chorobách a ich diagnostike na internetových stránkach. V mnohých krajinách sveta je legislatívne ošetrené oznamovanie laboratórnych výsledkov priamo pacientovi, ktorý ich môže konzultovať s laboratórnymi špecialistami.

V tomto rýchlo sa meniacom prostredí digitalizovanej zdravotnej starostlivosti musí aj laboratórna medicína prehodnotiť svoje pozície a prijať nové úlohy a zodpovednosti v klinickom dialógu s lekárom aj pacientom. Vhodný test v správnom čase pre správneho pacienta a jeho správna interpretácia sú aj zostanú naším každodenným cieľom a dlhodobou víziou.



MUDr. Eva Ďurovcová, PhD., klinická biochemička

LITERATÚRA

1. O'Leary J. Pathology 2026: The Future of Laboratory Medicine and Academic Pathology https://www.researchgate.net/scientific-contributions/2016035586_John_J_OLeary

2. Neumaier M, Watson ID. The end of Laboratory Medicine as we know it? <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1264>

3. Neumaier M. Diagnostics 4.0: the medical laboratory in digital health. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(3): 343-348.

Pôvodné práce

- Detection and validation of subchromosomal aberrations detected as additional findings in routine noninvasive prenatal testing for common trisomies** 69
Martina Sekelská, Anita Izsáková, Katarína Kubošová, Petra Tilandytová Erika Csekés, Žaneta Kúchová, Michaela Hýblová Renáta Lukačková, Dagmar Landlová, Peter Križan, Mária Haršányová, Jaroslav Budiš, Marcel Kucharik, Tomáš Szemes, Gabriel Minárik
- Protinádorová reakcia v mikroprostredí kolorektálneho karcinómu** 72
Erika Gaálová, Kristína Mosná, Pavel Babál, Andrea Janegová
- Experimentálna terapia kmeňovými bunkami je perspektívna v liečbe chronického diabetického vredu – prípadová štúdia** 77
Jozef Lang
- Zmeny sialyzácie proteínov v karcinóme prostaty (výsledky pilotnej štúdie)** 80
Daniela Kelleyová, Andrea Janegová

Prehľadové práce

- Úloha holotranskobalamínu v diferenciálnej diagnostike nedostatku B₁₂** 85
Eva Joppová
- Úloha imunitnej odpovede v prognóze kolorektálneho karcinómu** 90
Dávid Kocan, Pavel Babál

- Nešpecifické črevné zápaly: príčiny straty odpovede pacientov na biologickú liečbu** 94
Ingrid Lojová, Zuzana Kubiritová

- The gut microbiota affects the severity of Alzheimer's disease** 99
Ondrej Pös, Tomáš Szemes

Kazuistiky

- Náhodný záchyt toxického kmeňa *Corynebacterium diphtheriae*** 102
Martina Dobríková
- Nález marker chromozómu u dieťaťa s Cat-eye syndrómom (kazuistika)** 107
Katarína Tóthová, Alena Žákovičová, Gabriel Minárik, Dagmar Landlová, Erika Tomková, Miroslav Tomka, Ľudka Wlachovská, Gabriela Hrkčková, Peter Križan, Renáta Lukačková
- Colonic mucosal Schwann cell hamartoma with tactile corpuscle-like bodies: a case report** 111
Michal Zámečník, Jozef Kuruc

Ročník 10, 2019, číslo 2
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: október 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
doc. MUDr. Silvia Toporcerová, PhD., MBA

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

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

Výkonné redaktorky:

Mgr. Slavomíra Šindelárová
Mgr. Mária Žeglenová, PhD.

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Lucia Vecseiová

Všetky články sú plne recenzované.

Registrácia MK SR pod číslom EV 5164/15

ISSN 1338-9661 (tlačené vydanie)

ISSN 2454-0021 (online)

Časopis je indexovaný v Bibliographia medica Slovaca (BMS).

Citácie sú spracované v CiBaMed.

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.

Detection and validation of subchromosomal aberrations detected as additional findings in routine noninvasive prenatal testing for common trisomies

Martina Sekelská^{1,2}, Anita Izsáková^{1,2}, Katarína Kubošová^{1,2}, Petra Tilandyová^{1,2}, Erika Csekes^{1,2}, Žaneta Kúchová^{1,2}, Michaela Hýblová^{1,2}, Renáta Lukačková², Dagmar Landlová², Peter Križan², Mária Haršányová³, Jaroslav Budiš³, Marcel Kucharik³, Tomáš Szemes³, Gabriel Minárik^{1,2}

¹Trisomy test, Ltd., Bratislava, Slovakia

²Medirex Inc., Bratislava, Slovakia

³Geneton Ltd., Bratislava, Slovakia

Low coverage whole genome sequencing routinely used in noninvasive prenatal testing is able to detect not only most commonly screened chromosomal aneuploidies but also nontargeted subchromosomal aberrations. Aim of the work was validation of detection of nontargeted subchromosomal aberrations reported as additional findings in samples analyzed in routine noninvasive prenatal testing.

From April 2016 till December 2018, more than 9500 samples were analyzed as part of routine noninvasive prenatal testing. In tested cohort of patients 42 different subchromosomal aberrations were detected in 38 cases, in 18 cases with 18 detections confirmatory testing follow up was not available, in 6 cases with 9 detected aberrations all were confirmed by diagnostic testing and in 14 cases 15 detections were not confirmed and so evaluated as false positives. Positive predictive value of reported additional finding was therefore 37.5%.

Keywords: NIPT, Trisomy test, additional findings, low coverage whole genome sequencing, subchromosomal aberrations detection

Detekcia a validácia subchromozómových aberácií detegovaných ako doplnkové zistenia v rámci rutinného neinvazívneho prenatálneho skrínungu na najčastejšie trizómie

Celogenómovým sekvenovaním s nízkym pokrytím, ktoré sa rutinne používa v rámci neinvazívneho prenatálneho skrínungu na najčastejšie chromozómové aneuploidie, je možné necielene detegovať subchromozómové aberácie na celogenómovej úrovni.

Cieľom práce bola validácia necielenej detekcie subchromozómových aberácií reportovaných ako doplnkové zistenia vo vzorkách analyzovaných ako súčasť neinvazívneho prenatálneho skrínungu.

Od apríla 2016 do decembra 2018 bolo v rámci rutinného prenatálneho skrínungu analyzovaných vyše 9 500 vzoriek. V tomto súbore vzoriek bolo detegovaných a reportovaných 42 rôznych subchromozómových aberácií u 38 testovaných jedincov, z toho u 18 testovaných jedincov s 18 detekciami neboli dostupné výsledky konfirmačného diagnostického testovania, u 6 vzoriek s 9 detekciami boli reportované aberácie potvrdené diagnostickým testom a u 14 vzoriek s 15 detekciami ich prítomnosť u plodu nebola potvrdená následným testovaním. Pozitívna prediktívna hodnota reportovaných doplnkových nálezov bola teda 37,5%.

Kľúčové slová: NIPT, Trisomy test, doplnkové nálezy, celogenómové sekvenovanie s nízkym pokrytím, detekcia subchromozómových aberácií

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 69 – 71

Introduction

Identification of fetal DNA in maternal circulation led to redefinition of possibilities in the field of noninvasive prenatal testing (NIPT)⁽¹⁾. From the detection of qualitative fetal genetic markers (e. g. fetal gender) with advances of sequencing technologies also quantitative analysis of fetal DNA became possible (e. g. detection of chromosomal aneuploidies)^(2,3). With increase of availability of genomic sequencing, NIPT based on analysis of circulating cell-free fetal DNA focused on detection of most common chromosomal aneuploidies (trisomy 13 – T13, trisomy 18 – T18 and trisomy 21 – T21) has become integral part of prenatal genetics and in last few years different laboratories made such NIPT available worldwide. Low coverage whole genome

sequencing, the mostly used method in NIPT routine, is able to detect not only most commonly screened chromosomal aneuploidies but also different subchromosomal aberrations.

Aim of the study

Aim of the work was retrospective validation of detection of subchromosomal aberrations of fetal origin identified and reported as additional findings in routine noninvasive prenatal screening focused on most common trisomies.

Materials and methods

From July 2016 till April 2019, more than 9500 samples of pregnant women were analyzed using Trisomy test. For detection of high-risk samples low coverage whole genome

scan was used in association with in-house designed bioinformatic pipeline and proprietary biostatistical approach. In more details, peripheral blood was collected to EDTA or Streck tubes. DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit from Qiagen. Extracted DNA was quantified using Qubit dsDNA HS Assay Kit from Thermo Fisher Scientific. DNA libraries were prepared using TruSeq Nano DNA Library Prep Kit from Illumina as previously published⁽⁴⁾. For sequencing of libraries NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75 cycles) and NextSeq 500 platform from Illumina were used. Gained genomic data were analyzed by in-house bioinformatic algorithm, which calculated fetal fraction and z-scores (algorithm is patent pending - PCT/EP2016/064604).

Results and discussion

In tested cohort of patients different subchromosomal aberrations were detected. In 38 samples 42 additional findings were reported. In samples with detections fetal fraction varied between 5.1 and 19.1% (median = 10.35%). The smallest reported aberration has 1 megabase (Mb) and the largest one approx. 80 Mb (median = 14 Mb) (**Graph 1**). Aberrations were detected on chromosomes 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 15, 16, 18, 20, 21 and 22. In 18 cases confirmatory testing was refused by the patient, we were not able to get sample for confirmatory analysis or feedback from the further management of the patient was not available. In 20 cases samples from chorionic villus sampling or amniocentesis were available for confirmatory testing, that was performed by different diagnostic laboratories subsequently by karyotyping or comparative genomic hybridization (aCGH). In 4 cases 2 different aberrations were detected in parallel, in one case ring chromosome represented by two deletions of both ends of chromosome 18 was recorded (**Figure 1**). In the 20 cases (24 detected aberrations) with available material from invasive procedures 9 findings were confirmed and 15 were evaluated as false positives (**Graph 1**). According to the results of the confirmatory testing the positive predictive value (PPV) of subchromosomal aberrations detection by our test reached 37.5% (9 of 24). If currently used criteria for additional findings reporting were applied (fetal fraction above 10% and size of detected aberration above 3 Mb) PPV of our test reached 64.3% (9 of 14). Usage of this limits for future detection and reporting of additional findings will decrease the proportion of false positives. But it is necessary to add, that these cannot be completely avoided as proportion of false positives could be result of feto-placental mosaicisms, but for estimation of this proportion placental samples from these cases have to be analyzed.

Conclusions

In this prospective study the possibility of utilization of low coverage genomic sequencing for detection of subchromosomal aberrations on the whole genome level was confirmed. For proper estimations of sensitivity, specificity, NPV and PPV larger studies are needed as samples significantly differ in crucial factors that are represented by fetal fraction, position and size of detected aberrations. Hence in the real life screening utilizing this approach different chromosomal aberrations could be identified, their clinical significance should be considered in details and the positive results or

Graph 1. Correlation between subchromosomal aberration size and fetal fraction. In samples with fetal fraction above 10% (vertical dotted line) and size of detected aberration above 3 Mb (horizontal dotted line) is PPV significantly higher than in samples with fetal fraction below this limits. N/A – confirmatory analysis results not available

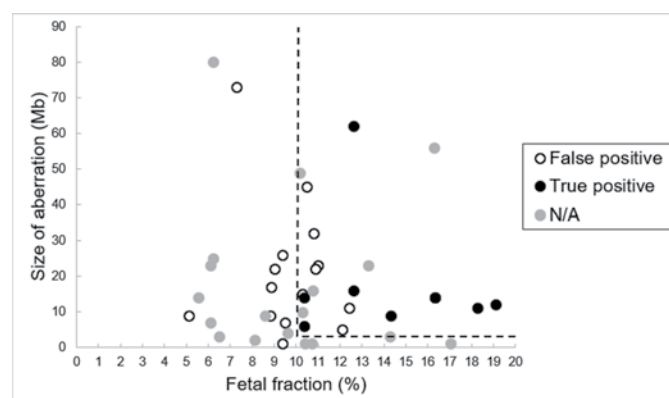
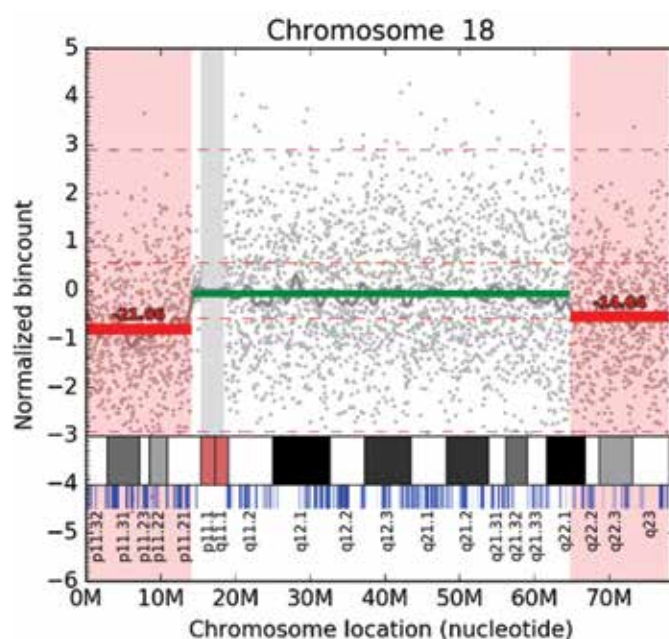


Figure 1. Two deletions on both ends of chromosome 18 confirmed by aCGH and detected as ring chromosome 18 by karyotyping after amniocentesis



detections have to be consulted with clinical geneticist or genetic counselor with appropriate experience and usage of up to date information from specialized databases, e.g. ClinVar or Decipher or relevant studies and publications. Moreover, to give clinicians supporting information we are currently preparing clinical decision supporting bioinformatical tool, that should summarize such clinically relevant information in a web-based and user-friendly interface.

Conflict of interest

Regarding this study Sekelská M., Izsáková A., Kubošová K., Tilandyová P., Csekes E., Kúchová Z., Hýblová M. and Minárik G., are employees of Trisomy test Ltd. and Medirex Inc.; Lukačková R. Landlová D. and Križan P. are employees of Medirex Inc.; Haršányová M., Budiš J., Kucharík M. and Szemes T. are employees of Geneton Ltd.

REFERENCES

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350(9076): 485-487.
2. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998; 62(4): 768-775.
3. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(42): 16266-16271.
4. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, et al. Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. PLoS One 2015; 10(12): e0144811.



RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

Medirex Inc.

Galvaniho 17/C, 821 06 Bratislava, Slovakia

e-mail: gabriel.minarik@medirex.sk



Everywhere It Matters.™

Pomáhame Vám

- ▲ zabráňovať šíreniu infekcií
- ▲ aplikovať kompletne programové riešenia
- ▲ efektívne využívať dostupné zdroje
- ▲ vzdelávať personál v oblasti hygieny

Naše produkty a služby:

- ▲ prípravky na dezinfekciu a hygienu rúk
- ▲ čistenie a dezinfekcia zdravotníckych nástrojov
- ▲ manuálne a bezdotykové dávkovače na dezinfekciu rúk
- ▲ profesionálna dezinfekcia plôch a povrchov v zdravotníctve
- ▲ sterilné krytie medicínskych prístrojov MICROTEK



NIEKTORÉ NAŠE ZNÁME ZNAČKY:

- ▲ **INCIDIN** - spoľahlivé prostriedky na povrchovú dezinfekciu
- ▲ **SEKUSEPT** - najvhodnejšie prostriedky na dezinfekciu nástrojov
- ▲ **SKINMAN** - produkty na ruky s rovnováhou medzi dezinfekčným účinkom a kožnou znášanlivosťou
- ▲ **SILONDA** - vysoká kvalita v starostlivosti o pokožku



Protinádorová reakcia v mikroprostredí kolorektálneho karcinómu

Erika Gaálová^{1,4*}, Kristína Mosná¹, Pavel Babál^{1,2}, Andrea Janegová^{1,3}

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

²MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Trnava

³Patologickoanatomické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trnava

⁴Medicyt, s. r. o., Bratislava

Kolorektálny karcinóm patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce onkologické choroby s vysokou mortalitou. Dôležitú úlohu v správaní a progresii nádoru zohráva imunitný systém a protinádorová imunitná reakcia sprostredkovaná lymfocytmi infiltrujúcimi tumor. Cieľom predloženej štúdie bolo posúdiť aktiváciu imunitného systému v nádoroch hrubého čreva so zameraním na fenotyp zápalových buniek. Hodnotili sme infiltráciu zápalových buniek v 23 vzorkách nádorov hrubého čreva. Analyzovali sme prítomnosť a hustotu infiltrácie cytotoxických (CD8+) a pomocných (CD4+) T-lymfocytov a histiocytov (CD68+) v oblastiach s nádorovým rastom aj v okolitom tkanive nepostihnutom nádorom. Vzorky boli spracované metódou microarray a farbené imunohistochemicky. Výsledky sme hodnotili kvantitatívne morfolometricky pomocou počítačovej analýzy obrazu. Predložená štúdia naznačuje, že v súvislosti so zvyšujúcim sa gradingom nádoru dochádza k poklesu intenzity protinádorovej imunitnej odpovede. Tento pokles môže byť následkom, ale aj príčinou progresie tumoru. Ovlivnenie protinádorovej imunitnej odpovede predstavuje preto veľmi zaujímavý potenciálny terapeutický prístup.

Kľúčové slová: kolorektálny karcinóm, imunitná odpoveď, nádorové mikroprostredie

An antitumoral reaction in micro-environment of colorectal cancer

Colorectal cancer is one of the most common oncological diseases with high mortality. The immune system and the tumour-related immune response mediated by tumour-infiltrating lymphocytes play an important role in tumour behaviour and progression. The presented study aimed to assess the activation of the immune system in colorectal tumours with a focus on the inflammatory cell phenotype. The inflammatory cell infiltration was evaluated in 23 colorectal cancer samples. The presence and density of infiltration of cytotoxic (CD8+) and helper (CD4+) T-lymphocytes and histiocytes (CD68+) were analyzed inside tumours as well as in the surrounding non-neoplastic tissue. The samples were processed to microarray and immunohistochemically stained. The positivity was evaluated quantitatively by computer image analysis. The present study showed that the intensity of the antitumour immune response decreases in connection with increasing tumour grading. The decrease might be due to tumour progression. But it also might be the cause of this decrease. The influencing of the anti-tumour immune response represents a very interesting potential therapeutic approach.

Keywords: colorectal carcinoma, immune response, tumor microenvironment

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 72 – 76

Úvod

Zhubné nádory hrubého čreva patria medzi najpočetnejšie malígne ochorenia vo vyspelých štátoch sveta. Slovenská republika sa nachádza na jednom z popredných miest v celosvetovom rebríčku, v Európe má po Maďarsku a Nórsku tretiu najvyššiu incidencia a je na prvom mieste v mortalite na kolorektálny karcinóm⁽¹⁾. Na vzniku kolorektálneho karcinómu sa podieľajú environmentálne aj genetické faktory. Nádorová transformácia je výsledkom postupného hromadenia genetických a epigenetických zmien, ktoré vedú k transformácii povrchového epitelu hrubého čreva a ovplyvňujú jeho biologické správanie vrátane malígneho potenciálu.

Solídne tumory vrátane nádorov hrubého čreva sú často infiltrované bunkami imunitného systému. Za spúšťanie imunitnej odpovede zodpovedajú aj antigény vzniknuté v procese nádorovej transformácie hromadením bunkových mutácií, tzv. nádorové neoantigény. Vplyv protinádorového imunitného mikroprostredia na prognózu nádorov je v súčasnosti pred-

metom štúdia mnohých vedeckých prác. Ukazuje sa, že práve mikroprostredie transformovaných nádorových buniek má význam ako prognostický faktor a podieľa sa na karcinogenéze, a to v štádiu iniciácie aj progresie nádorového rastu^(2,3).

Za normálnych okolností sa imunitný systém snaží potlačiť nádorovú progresiu buď zničením nádorových buniek, alebo inhibíciou ich rastu. Na druhej strane môže imunitný systém podporiť aj nádorovú progresiu vyselektovaním rezistentných nádorových buniek alebo sa paradoxne podieľa na vytvorení imunosupresívneho nádorového mikroprostredia. Práve schopnosť nádorových buniek kontrolovať imunitný systém a vznik imunitnej rezistencie umožňuje nádorovým bunkám uniknúť spod kontroly a podieľa sa na progresii nádorovej choroby^(2,4).

Cieľom predloženej štúdie je zhodnotiť aktiváciu imunitného systému v nádoroch hrubého čreva v závislosti od stupňa diferenciácie nádoru a v porovnaní s okolitým nádorovo nepostihnutým tkanivom hrubého čreva.

Materiály a metódy

Analyzovali sme archívne tkanivové vzorky nádorov hrubého čreva fixované formalínom a zaliaté v parafíne, pochádzajúce z terapeutických a diagnostických bioptických odberov a archivované v Ústave patologickkej anatómie LF UK v Bratislave. Vzorky boli histopatologicky posúdené a bola stanovená patologická diagnóza v zmysle platných kritérií WHO.

Základný súbor tvorilo 23 prípadov kolorektálneho karcinómu, z toho 4 prípady dobre diferencovaného (G1), 12 prípadov stredne diferencovaného (G2) a 3 prípady nízкодиференovaného (G3) adenokarcinómu a 4 prípady hlienotvorného adenokarcinómu. Samostatne sme hodnotili miesta s nádorovým rastom a okolité tkanivo nepostihnuté nádorom.

Hodnotili sme infiltráciu tkaniva zápalovými bunkami so zameraním na cytotoxické T-lymfocyty (CD8+), pomocné T-lymfocyty (CD4+) a histiocyty (CD68+). Ich prítomnosť bola hodnotená imunohistochemicky; v krátkosti odparafínované preparáty boli prepláchnuté 5 minút v PBS (vo fyziologickom soľnom roztoku pufrovanom fosfátmi s 10 mM, pH 7,4). Tkanivové epitopy boli následne demaskované procesom revitalizácie s použitím Dako PT Link (Agilent, Santa Clara, CA, USA); rezy boli inkubované v roztoku TRIS-EDTA (10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 9) pri teplote 98 °C počas 20 minút. Preparáty boli následne inkubované 60 minút s myšacou monoklonálnou protilátkou proti CD8 (ready to use, Agilent, Santa Clara, CA, USA), proti CD4 (ready to use, DAKO, Carpinteria, USA) a proti CD68 (ready to use, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Po 3-násobnom prepláchnutí v PBS, boli preparáty inkubované 30 minút s polymérom Histofine proti myšacím proteínom (Nichirei Biosciences, Japonsko) a po opakovanom 3-násobnom prepláchnutí v roztoku PBS farbené 5 minút diaminobenzidínom

(DAB+, DAKO, Carpinteria, USA). Preparáty boli následne krátko dofarbené hematoxylínom, aby sa zvýraznili jadrá buniek.

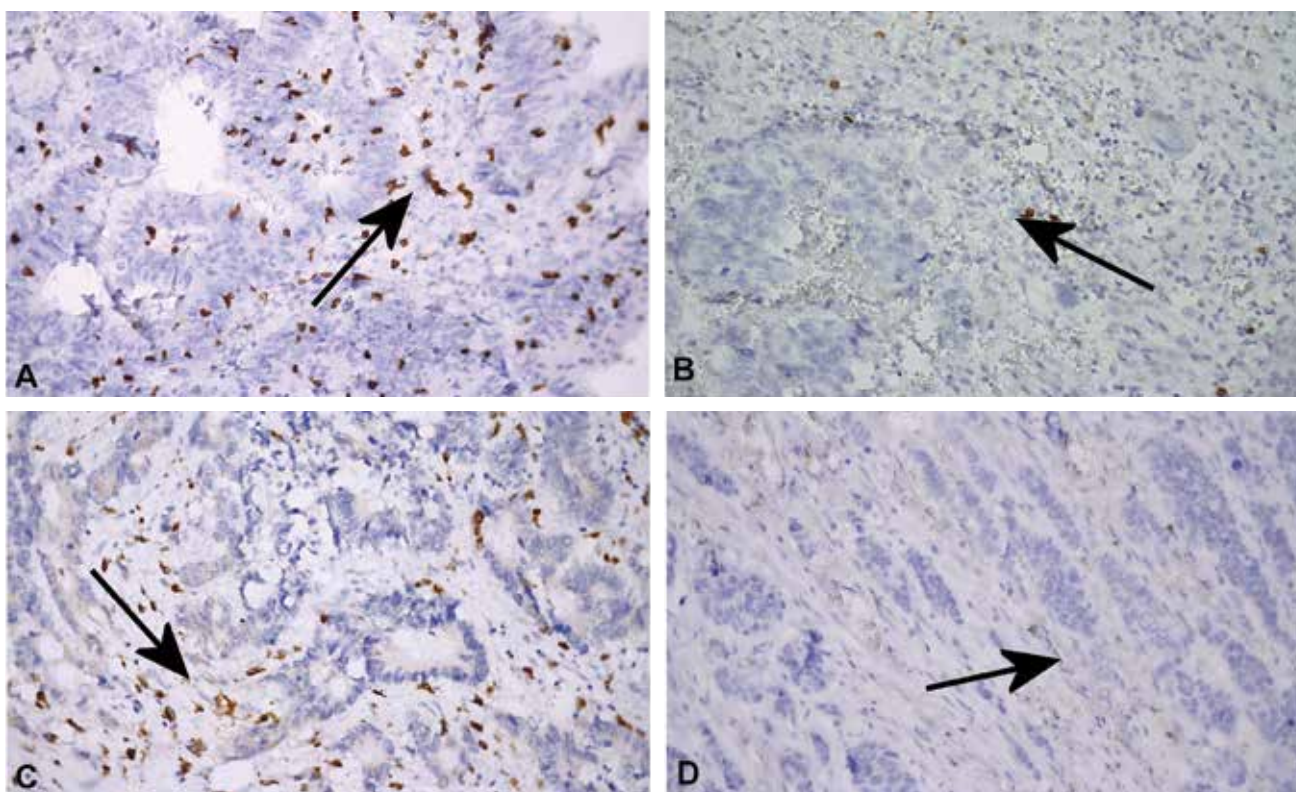
Preparáty boli hodnotené vo svetelnom mikroskope. Miera infiltrácie tkaniva zápalovými bunkami s príslušným fenotypom bola hodnotená kvantitatívne v 3 náhodných poliach s použitím histomorfometrického softvéru ImageJ, v. 1,51 g⁽⁵⁾ a vyjadrená ako percento proti celkovej ploche. Výsledky boli vyhodnotené štatisticky použitím štatistického softvéru Graph Pad Prism s použitím one-way ANOVA testu s následným Turkey post-testom, hodnoty $p < 0,05$ boli považované za významné.

Výsledky

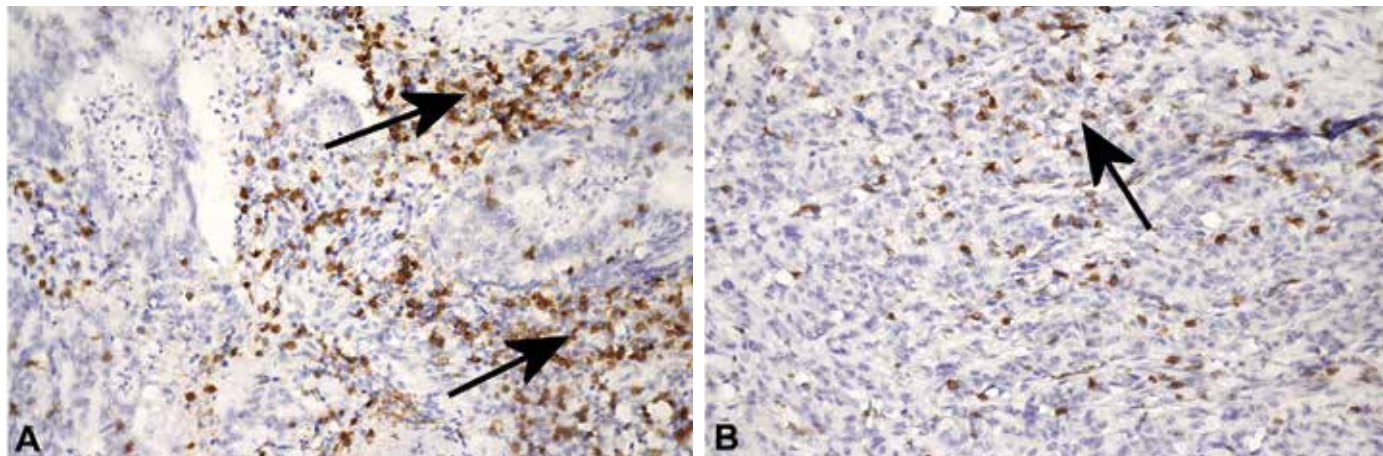
V nádoroch hrubého čreva aj v okolitom nepostihnutom tkanive pozorujeme prítomnosť CD8+ cytotoxických T-lymfocytov, CD4+ pomocných T-lymfocytov (**obrázok 1**) aj CD68+ histiocytov (**obrázok 2**), s dominanciou CD68+ buniek. So stúpajúcim gradingom nádoru sme v našom súbore pozorovali významný pokles CD4+ ($1,6 \pm 0,43\%$ v G1 verus $0,33 \pm 0,08\%$ v G2, verus $0,42 \pm 0,17\%$ v G3, G1/G2 $p < 0,001$, G1/G3 $p < 0,05$) aj pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov ($3,1 \pm 0,38\%$ v G1 verus $1,7 \pm 0,3\%$ v G2 verus $0,61 \pm 0,14\%$ v G3, G1/G2 $p < 0,05$, G1/G3 $p < 0,01$). Pokles CD68+ histiocytov ($5,3 \pm 0,46\%$ v G1 verus $4,1 \pm 0,51\%$ v G2 verus $3,44 \pm 0,67\%$ v G3, G1/G2 $p = 0,05$) bol na hranici významnosti (**graf 1**).

Nepozorovali sme žiadne zmeny v podiele jednotlivých typov lymfocytov v okolitom tkanive nepostihnutom nádorom (**graf 2**). Nepozorovali sme odlišný profil zápalových buniek v súvislosti s mucinóznou diferenciáciou nádoru, tá dosahovala úroveň približne rovnakú ako nádory so strednou diferenciáciou (G2).

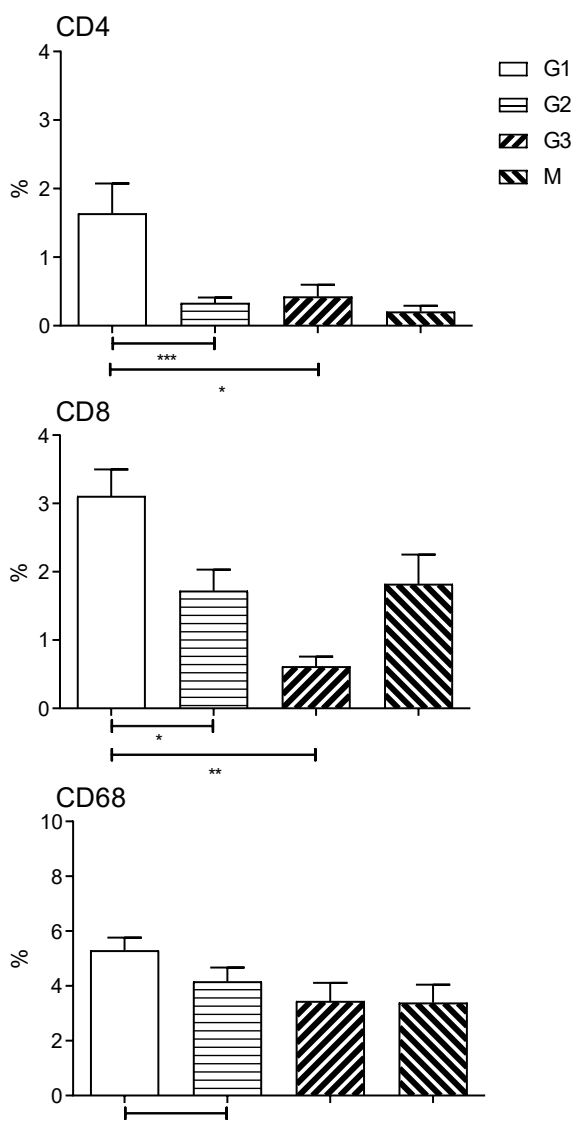
Obrázok 1. Infiltrácia adenokarcinómu hrubého čreva CD8+ cytotoxickými a CD4+ pomocnými T-lymfocytmí. So stúpajúcim gradingom nádoru pozorujeme významný pokles CD8+ cytotoxických a CD4+ pomocných T-lymfocytov (šípka) v tkanive adenokarcinómu hrubého čreva; G1 adenokarcinóm (A, resp. C), G3 adenokarcinóm (B, resp. D), IHC-Px, DAB, 200x



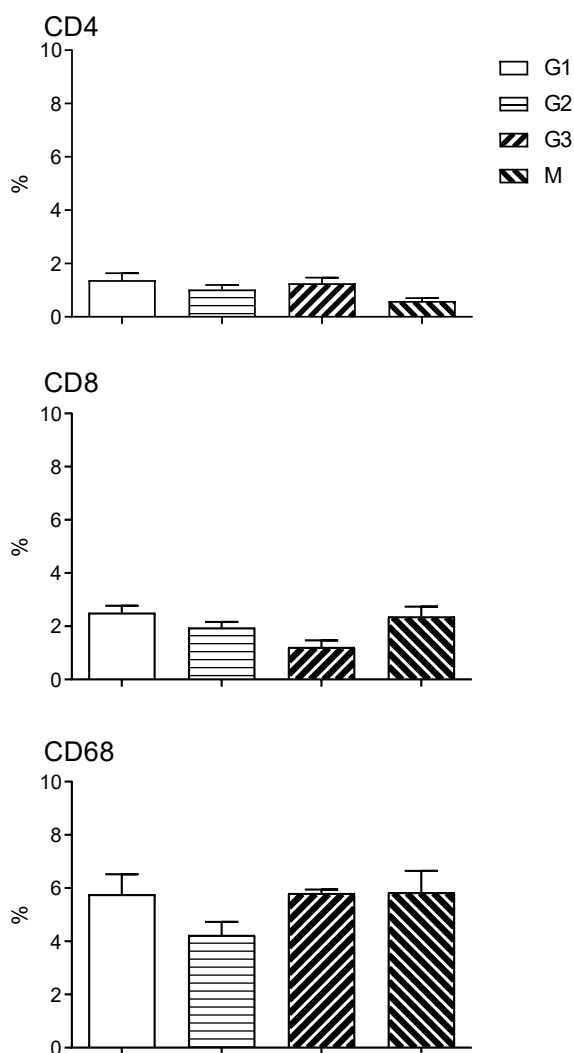
Obrázok 2. Infiltrácia adenokarcinómu hrubého čreva CD68+ histiocytmi. So stúpajúcim gradingom nádoru pozorujeme pokles CD68+ histiocytov (šípka) v tkanive adenokarcinómu hrubého čreva, ktorý je na hranici signifikantnosti; G1 adenokarcinóm (A), G3 adenokarcinóm (B), IHC-Px, DAB, 200x



Graf 1. Prítomnosť zápalových buniek v nádore hrubého čreva v závislosti od gradingu. So stúpajúcim gradingom nádoru sme v našom súbore pozorovali signifikantný pokles CD4+ pomocných T-lymfocytov, CD68+ histiocytov aj pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov. * $p < 0,05$, * $p < 0,01$, uvedené % $\pm$ SEM



Graf 2. Prítomnosť zápalových buniek v okolitom tkanive nepostihnutom nádorom, v závislosti od gradingu pôvodného nádoru, uvedené % $\pm$ SEM



Diskusia

Kolorektálny adenokarcinóm patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce gastrointestinálne malignity s vysokou mortalitou napriek dostupnej liečbe. Ukazuje sa, že samotný staging založený na TNM klasifikácii kolorektálneho karcinómu nie je dostatočne presný z hľadiska predikcie prognózy pri všetkých štádiách choroby⁽⁶⁾. Súčasný výskum vedie k hľadaniu prognostických markerov, ktoré by lepšie stratifikovali pacientov. Prospešné by mohlo byť aj hodnotenie pacientov založené na imunologickom profile nádorového mikroprostredia⁽⁷⁾.

Počet vedeckých dôkazov podporujúcich význam imunitnej odpovede pri nádorových chorobách neustále rastie⁽³⁾. Súčasná terapeutická metóda používaná v liečbe kolorektálneho karcinómu (cytotoxická chemoterapia, anti-EGFR protilátky, anti-angiogénne molekuly) čiastočne súvisia s imunomodulujúcimi mechanizmami a imunoterapia preukázala svoj potenciál aj v prípadoch, keď zlyháva klasická liečba⁽⁸⁻¹⁰⁾. Kolorektálny karcinóm je známy tvorbou vysokoimunogénnych nádorových neoantigénov a je sprevádzaný zvýšenou infiltráciou tkaniva zápalovými bunkami, ktorú sme pozorovali aj v našej štúdii. Tento mechanizmus je mimoriadne zaujímavý najmä v prípade nádorov s mikrosatelitovou instabilitou (MSI), kde vznikajú presne definované nádorové neoantigény v dôsledku známych molekulárnych dráh zasiahnutých mutáciou (tzv. frameshift peptidy)⁽¹¹⁾.

Lymfocyty infiltrujúce tumor (TIL) a makrofágy asociované s nádorom (TAM) sú lokalizované v zápalovom infiltráte okolo nádorových ostrovcov a taktiež v perinádorovej TAM patria medzi dominantné zápalové bunky v nádorovej stróme. Správajú sa ako modulátory mikroprostredia pomocou vylučovania cytokínov, chemokínov, rastových faktorov a angiogénnych faktorov⁽¹²⁾. To súhlasí aj s dominanciou CD68+ zápalových buniek v nádorovom tkanive nami pozorovanou. Úloha TAM v nádore je dvojité. TAM môžeme deliť do dvoch podskupín: M1 makrofágy zabezpečujú protinádorovú

odpoveď a cytotoxicitu a M2 makrofágy, ktoré, naopak, potlačením protinádorovej imunitnej odpovede podporujú nádorovú progresiu^(13,14). Z TIL majú kľúčovú úlohu cytotoxické T-lymfocyty CD8+, ktoré môžu rozpoznať nádorové antigény prezentované APC bunkami. Cytotoxické T-lymfocyty sa následne aktivujú pomocou kostimulátorových molekúl a syntetizujú a vylučujú cytotoxické proteíny podieľajúce sa na priamej deštrukcii nádorových buniek. Vysoká hustota CD8+ lymfocytov v nádorovom tkanive je spojená s lepšou prognózou choroby⁽¹²⁾.

Je zaujímavé, že v našom súbore sme pozorovali pokles CD8+ lymfocytov aj ostatných pozorovaných zápalových buniek v závislosti od rastúceho gradingu a stúpajúcej agresivity tumoru. Môže to podporovať predstavu o imunosupresívnom pôsobení nádorového mikroprostredia⁽⁴⁾, ktoré môže byť dôležitým faktorom progresie choroby aj pri vzniku vzdialených metastáz⁽¹⁵⁾. Viaceré štúdie preukázali, že imunitná odpoveď koreluje s lepším prežívaním pacientov s kolorektálnym karcinómom^(16,17).

Predložená štúdia naznačuje, že v súvislosti so zvyšujúcim sa gradingom nádoru dochádza k poklesu intenzity protinádorovej imunitnej odpovede. Tento pokles môže byť následkom, ale aj príčinou progresie tumoru. Práve ovplyvnenie protinádorovej imunitnej odpovede môže predstavovať potenciálne zaujímavý terapeutický prístup.

Podakovanie: Štúdia bola realizovaná s podporou projektu APVV-14-0318 „Analýza mikroRNA a charakterizácia expresie vybraných proteínov v cirkadiálnom kontexte ako prognostický biomarker pre kolorektálny karcinóm“. Štúdia bola parciálne realizovaná ako súčasť práce výskumného centra vybudovaného vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj preprojekt: „Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES“, ITMS 26210120041, spolufinancovaná zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. ECIS – European Cancer Information System. 2019; European Union.
2. Curtis NJ, Primrose JN, Thomas GJ, et al. The adaptive immune response to colorectal cancer: from the laboratory to clinical practice. *Eur J Surg Oncol* 2012; 38(10): 889-96.
3. de la Cruz-Merino L, Henao Carrasco F, Vicente Baz D, et al. Immune microenvironment in colorectal cancer: a new hallmark to change old paradigms. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 174149.
4. Naidoo J, Page DB, Wolchok JD. Immune modulation for cancer therapy. *Br J Cancer* 2014; 111(12): 2214-9.
5. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004; 11(7): 36-42.
6. Liu Q, Luo D, Cai S, et al. P-TNM staging system for colon cancer: combination of P-stage and AJCC TNM staging system for improving prognostic prediction and clinical management. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 2303-2314.
7. Nearchou A, Pentheroudakis G. The significance of tumor-associated immune response in molecular taxonomy, prognosis and therapy of colorectal cancer patients. *Ann Transl Med* 2016; 4(14): 271.
8. Pernot S, Terme M, Voron T, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3738-50.
9. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015; 5(1): 43-51.
10. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010; 28(19): 3167-75.
11. Kloor M, von Knebel Doeberitz M. The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer. *Trends in Cancer* 2016; 2(3): 121-133.
12. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, et al. Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2017; 1867(1): 1-18.
13. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 2017.
14. Grizzi F, Basso G, Borroni EM, et al. Evolving notions on immune response in colorectal cancer and their implications for biomarker development. *Inflamm Res* 2018; 67(5): 375-389.

15. Donahue T, Lee CY, Sanghvi A, et al. Immunosuppression is an independent prognostic factor associated with aggressive tumor behavior in cutaneous melanoma. J Am Acad Dermatol 2015; 73(3): 461-6.

16. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. Clin Cancer Res 2009; 15(20): 6412-20.

17. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, et al. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. Gastroenterology 2009; 137(4): 1270-9.

MUDr. Erika Gaálová

Medicyt, s. r. o.

Galvaniho 17/C, P.O.Box 145, 820 16 Bratislava

e-mail: erika.gaalova@medicyt.sk



Bio G
MEDICÍNSKA TECHNIKA



Experimentálna terapia kmeňovými bunkami je perspektívna v liečbe chronického diabetického vredu – prípadová štúdia

Jozef Lang

Nemocničná, a. s., Nemocnica Malacky

Diabetes mellitus patrí medzi časté choroby v populácii, býva spájaný so závažnými komplikáciami. Práve vasikulárne a neuropatické komplikácie sú zodpovedné za morbiditu aj mortalitu diabetických pacientov a sú sprevádzané vysokými nákladmi na liečbu. Diabetická noha patrí medzi najzávažnejšie komplikácie, ktoré často vedú k strate končatiny. V súčasnosti dostupná bežná liečba často nie je úplne úspešná. Hľadanie nových metód terapie chronických diabetických vredov je dôležitým cieľom súčasného výskumu. Sľubnou metódou liečby diabetického vredu sa ukazuje využitie mezenchymálnych kmeňových buniek. Napriek viacerým klinickým štúdiám doposiaľ neexistujú jednoznačné odporúčania pre prax. Prezentujeme prípadovú štúdiu, ktorej cieľom bolo overiť možnosti využitia experimentálnej terapie kmeňovými bunkami v liečbe diabetického vredu v podmienkach Slovenskej republiky. Úspešnosť využitej liečby otvorila možnosti širšej klinickej štúdie, ktorá v súčasnosti prebieha. **Kľúčové slová:** diabetes mellitus, diabetická noha, mezenchymálne kmeňové bunky

Experimental therapy with stem cells is promising in the treatment of chronic diabetic ulcer – a case study

Diabetes mellitus is a frequent disease in the population associated with serious complications. The vascular and neuropathic complications are significantly responsible for the morbidity and mortality of diabetic patients and accompanied by high treatment expenses. The diabetic foot is one of the most severe complications that often lead to limb loss. The currently available routine treatment is often not sufficiently effective. The search for new methods of chronic diabetic ulcer therapy is an important task of contemporary research. The use of mesenchymal stem cells has proven to be a promising method of treating diabetic foot. Despite several clinical studies, there are still no clear recommendations for practice. We present a case study, in which the aim was to verify the possibilities of using experimental stem cell therapy in the treatment of diabetic ulcer in the Slovak Republic. The success of the applied treatment has opened up the possibilities of a broader clinical study that is currently underway.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic foot, mesenchymal stem cells

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 77 – 79

Úvod

Diabetes mellitus patrí k závažným metabolickým chorobám s vysokým výskytom v populácii. Prevalencia diabetu mellitu v Slovenskej republike sa za posledných 30 rokov takmer stonásobila. V Európe patríme ku krajinám s najvyšším výskytom tejto choroby⁽¹⁾. Aj keď sú k dispozícii možnosti farmakologickej liečby, s ohľadom na rastúcu incidenciu diabetu a predlžovanie života diabetikov sa hlavnou hrozbou stávajú chronické komplikácie diabetu. Tie sú sprevádzané vysokými nákladmi na liečbu a v neposlednom rade sú zodpovedné za zvýšenú mortalitu diabetických pacientov. Jedným z hlavných a najdôležitejších cieľov manažmentu diabetu je preto prevencia vzniku a progresie vaskulárnych a neuropatických komplikácií.

Chronické komplikácie vznikajú v súvislosti s postihnutím cievného riečiska pri dlhodobom neuspokojivo kontrolovanej hyperglykémii. Na ich rozvoji sa podieľa aj porucha metabolizmu lipidov, arteriálna hypertenzia, inzulínová rezistencia a obezita, ktoré sú spolu zahrnuté do jednotky zvanej metabolický syndróm. Kardiovaskulárne riziko je u pacientov s diabetom dvoj- až štvornásobne vyššie v porovnaní s celkovou populáciou. Diabetická makroangiopatia vedie k akcelerácii aterosklerózy veľkých a stredne veľkých tepien. Pri diabetickom mikroangiopatii vznikajú komplexné funkčné

a štrukturálne zmeny vedúce k diabetickému nefropatii, retinopatii a neuropatii. Štúdie ukazujú, že v čase diagnostiky diabetu má už 10 % pacientov diabetickú nefropatiu, 6 % diabetickú retinopatiu, až 52 % diabetickú neuropatiu⁽²⁾. Celkovo sa mikrovaskulárne komplikácie u asymptomatických pacientov s novozisteným diabetom vyskytujú takmer v tretine prípadov⁽³⁾.

Medzi časté komplikácie pokročilého diabetu patrí aj diabetická noha. Tá je podľa WHO definovaná ako infekcia, ulcerácia a/alebo deštrukcia tkanív nohy v dôsledku neuropatie a/alebo angiopatie s ischemiou. Napriek pokrokom v diagnostike a liečbe diabetických komplikácií je liečba chronických vredov náročná, nie vždy úspešná a viac ako jedna tretina prípadov vedie k potrebe amputácie postihnutých končatín⁽⁴⁾. Diabetická noha má závažný medicínsky dosah, ovplyvňuje kvalitu života pacientov a možnosti pracovného a spoločenského uplatnenia. Má zásadný vplyv na zvýšenie finančných a personálnych nárokov na zdravotný systém a ovplyvňuje sociálne prostredie pacienta.

Štandardná liečba diabetických vredov nohy podľa súčasných liečebných protokolov zahŕňa najmä odľahčovanie nohy, chirurgické vyčistenie rany a obnovenie prekrvenia. Klinický efekt takejto liečby je limitovaný a komplikovaný časťami recidívami. Hľadanie nových metód terapie chronických

diabetických vredov je dôležitým cieľom súčasného výskumu. Ako jedna zo sľubných metód sa ukazuje liečba diabetickej nohy kmeňovými bunkami⁽⁵⁾. Kmeňové bunky sú schopné ovplyvniť abnormálne zmenené mechanizmy hojenia a porušenu signalizáciu buniek v diabetických ranách a podporovať hojenie. Liečba je založená na mezenchymálnych kmeňových bunkách a na predpoklade, že tieto bunky produkujú modulatory, ktoré ovplyvňujú zápalovú reakciu aj rastové faktory potrebné na regeneráciu tkanív. Mechanizmus účinku týchto buniek spočíva v tom, že priamo tlmia zápalový proces znížením sekrécie prozápalových a zvýšením produkcie protizápalových cytokínov. Mezenchymálne kmeňové bunky vylučujú niekoľko rastových faktorov, a tým podporujú proliferáciu fibroblastov v rane, angiogézu a ukladanie kolagénu^(6,7). V súčasnosti sa uznáva aj ich antimikrobiálna aktivita⁽⁸⁾.

Cieľom predloženej prípadovej štúdie bolo overiť možnosti využitia experimentálnej terapie kmeňovými bunkami v liečbe diabetickeho vredu v podmienkach Slovenskej republiky.

Prípadová štúdia

Prezentujeme prípadovú štúdiu 51-ročnej ženy s diagnózou diabetes mellitus 2. typu a s diabeticou ulceráciou na ľavej nohe pod MTTP V zhybom v trvaní 3 roky, liečenou štandardnými liečebnými postupmi požívanými v terapii chronických vredov (odľahčenie končatiny, chirurgické vyčistenie rany, lokálna a celková ATB liečba, vlhké preväzové techniky, kompenzácia diabetu).

Pred aplikáciou kmeňových buniek boli pacientke urobené štandardné laboratórne odbery, bolo realizované vyšetrenie MRI na vylúčenie osteomyelitídy skeletu, ster z rany na bakteriologické vyšetrenie a excízia z okraja vredu na histologické vyšetrenie.

Použité kmeňové bunky pochádzali z pupočníkovej krvi, ktorá sa odobrala prvoroďičkám rodiacim cisárskym rezom. Vzorky buniek boli spracované do 4 hodín po odbere. Tehotné darkyne boli testované na prenosné choroby HBV, HCV, HIV a syfilis, CMV (s negatívnymi výsledkami na testované infekcie). Izolované bunky boli kultivované a otestované na prítomnosť baktérií, húb a endotoxínov.

Mezenchymálne kmeňové bunky boli pacientke aplikované ako dve liečebné dávky vo forme niekoľkých injekcií do rany a do bezprostrednej oblasti rany. Interval medzi dvoma podaniami bol týždeň. V priebehu každej liečby sa podali bunky v objeme 2,5 ml s počtom buniek 2×10^8 injekčne.

Pacientka bola sledovaná v intervaloch 1, 2 a 3 mesiace po aplikácii mezenchymálnych kmeňových buniek, s viditeľným zmenšovaním kožného defektu, s postupnou reepitelizáciou rany (**obrázok 1**) aj s redukciou bakteriálneho osídlenia rany. Došlo k vymiznutiu masívnej kolonizácie rany *Staphylococcus aureus*. Z výsledkov realizovanej histológie bol evidentný vplyv na akceleráciu angiogézy, tvorbu granulačného tkaniva s jeho vyzrievaním.

Diskusia

Mezenchymálne kmeňové bunky predstavujú skupinu multipotentných buniek s vysokým potenciálom v regeneratívnej medicíne. Získavajú sa najmä z pupočníkovej krvi a z humánnej placenty. Bunky majú potenciál diferenciácie na väčšinu mezodermálnych buniek^(9,10), a tým môžu prispieť

Obrázok 1. Vzhľad ulcerácie pred začatím liečby, 1 a 2 mesiace po aplikovaní mezenchymálnych kmeňových buniek



k efektívnejšej tvorbe granulačného tkaniva, lepšiemu hojeniu rán aj k efektívnejšej revaskularizácii tkaniva⁽¹¹⁾.

Prezentovaná štúdia dokumentuje pozitívny účinok aplikácie mezenchymálnych kmeňových buniek v liečbe diabetickej nohy, a to už v priebehu 1 mesiaca. Podobné výsledky prezentovali aj iní autori^(12,13). Podávanie mezenchymálnych

kmeňových buniek malo pozitívny účinok na podporu revascularizácie hojaceho sa diabetickeho vredu a tvorbu granulačného tkaniva. Diabetes vedie k predĺženiu a zväčšeniu zápalovej fázy a k poruchám vaskularizácie⁽¹⁴⁾. Práve porucha tvorby granulačného tkaniva, a to najmä jeho vyzrievania, sprevádzaná zníženou produkciou kolagénu, sa v experimentoch ukazuje ako dôležitý faktor pri zhoršovaní hojenia rán pri diabete⁽¹⁵⁾.

Publikované vedecké práce ukazujú, že podávanie mezenchymálnych kmeňových buniek je sprevádzané aj silným antimikrobiálnym účinkom, ktorý je čiastočne mediovaný vylučovaním chemokínov, lokálnych mediátorov imunitnej reakcie a ďalších antimikrobiálne pôsobiacich peptidov. Ukazuje sa, že mezenchymálne kmeňové bunky majú pozitívny protizápalový účinok v experimentálnych modeloch sepsy v in vitro, ako aj in vivo experimentoch⁽⁸⁾. Už tieto výsledky predurčujú ich možný pozitívny účinok v liečbe chronických, ťažko sa hojajúcich rán. Práve súčasná produkcia rastových faktorov s vplyvom na angiogénu a významný antimikrobiálny účinok predstavujú veľmi zaujímavú kombináciu s ohľadom na využitie v liečbe ťažko sa hojajúcich diabetickech vredov predkolenia⁽⁵⁾.

Štúdium možností využitia mezenchymálnych kmeňových buniek je v súčasnosti predmetom intenzívneho výskumu. Podľa databázy klinických skúšok spravovanej americkým Národným inštitútom zdravia (clinicaltrials.gov) odštartovalo, prebieha alebo v nedávnej minulosti prebehlo viacero klinických štúdií aplikácie kmeňových buniek u pacientov

s diabetom mellitom, z toho 31 štúdií sa týka priamo diabetickej nohy. Podľa metaanalýzy 6 klinických štúdií Guo et al.⁽¹⁶⁾ konštatujú, že aplikácia kmeňových buniek zlepšila proces hojenia, a to aj pri léziách väčších ako 5 cm², aj vo vekovej skupine nad 70 rokov. Analýza však poukázala na viaceré limitácie týchto štúdií. Doposiaľ nebol vytvorený vhodný jednotný protokol odporúčanej liečby. Napriek viacerým už ukončeným klinickým štúdiám chýbajú ucelené závery a odporúčania, ktoré by bolo možné priamo aplikovať do praxe. Spoločným menovateľom realizovaných štúdií je taktiež aplikácia samostatných kmeňových buniek.

Výsledky realizovanej prípadovej štúdie potvrdzujú perspektívne pozitívne vplyvy podávania mezenchymálnych kmeňových buniek v liečbe diabetickech ulcerácií. Zaujímavá by mohla byť súčasná aplikácia ďalších podporných liečebných metód vrátane larválnej, prípadne fágovej terapie. V súčasnosti pokračujeme v ďalšom výskume, ktorý by zahŕňal aj tieto metódy.

Štúdia bola realizovaná s podporou projektu APVV-17-0526 „Využitie mezenchymálnych kmeňových buniek v kombinácii s ďalšími podpornými biologickými postupmi v liečbe chronického diabetickeho vredu“ a je súčasťou práce výskumného centra vybudovaného 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. European health for all database (HFA-DB). 2018; WHO Regional Office for Europe, Division of Information, Evidence, Research and Innovation: Copenhagen, Denmark.
2. Heydari I, Radi V, Razmjou S, et al. Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2010; 2(1): 61-63.
3. Gupta A, Gupta AK, Singh TP. Occurrence of complications in newly diagnosed type 2 diabetes patients: a hospital based study. *J Indian Med Assoc* 2013; 111(4): 245-7.
4. Margolis DJ, Allen-Taylor L, Hoffstad O, et al. Diabetic Neuropathic Foot Ulcers. The association of wound size, wound duration, and wound grade on healing 2002; 25(10): 1835-1839.
5. Blumberg SN, Berger A, Hwang L, et al. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 96(1): 1-9.
6. Wu Q, Chen B, Liang Z. Mesenchymal Stem Cells as a Prospective Therapy for the Diabetic Foot. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 4612167.
7. Leyla Turker S, Isil A. Challenge of Mesenchymal Stem Cells Against Diabetic Foot Ulcer. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2015; 10(6): 530-534.
8. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Front Immunol* 2017; 8: 339.
9. Schuh EM, Friedman MS, Carrade DD, et al. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. *Am J Vet Res* 2009; 70(12): 1526-35.
10. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5): 1669-75.
11. Tran TC, Kimura K, Nagano M, et al. Identification of human placenta-derived mesenchymal stem cells involved in re-endothelialization. *J Cell Physiol* 2011; 226(1): 224-35.
12. Sener LT, Albeniz I. Challenge of Mesenchymal Stem Cells Against Diabetic Foot Ulcer. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015; 10(6): 530-4.
13. Cao Y, Gang X, Sun C, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 9328347.
14. Tengrup I, Hallmans G, Agren MS. Granulation tissue formation and metabolism of zinc and copper in alloxan-diabetic rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1988; 22(1): 41-5.
15. Yue DK, Swanson B, McLennan S, et al. Abnormalities of granulation tissue and collagen formation in experimental diabetes, uraemia and malnutrition. *Diabet Med* 1986; 3(3): 221-5.
16. Guo J, Dardik A, Fang K, et al. Meta-analysis on the treatment of diabetic foot ulcers with autologous stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 228.

MUDr. Jozef Lang

Nemocničná, a. s.

Nemocnica Malacky

e-mail: jozeflang@gmail.com

Zmeny sialyzácie proteínov v karcinóme prostaty (výsledky pilotnej štúdie)

Daniela Kelleyová¹, Andrea Janegová^{1,2*}

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

²Patologickoanatomické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trnava

Úvod: Karcinóm prostaty je jedna z najčastejších foriem rakoviny u mužov s neustále stúpajúcou incidenciou aj v dobre rozvinutých krajinách. Napriek dostupnej diagnostike a liečbe predstavuje u mužov tretiu najčastejšiu príčinu úmrtia na nádorovú chorobu. V diagnostike zohráva kľúčovú úlohu hodnotenie sérovej hladiny prostatického špecifického antigénu, vyšetrenie má však nízku senzitivitu a špecificitu. V súčasnosti neexistuje spoľahlivá neinvazívna metóda a diagnózu karcinómu prostaty treba potvrdiť biopsicky. Abnormálna glykozylácia bunkových štruktúr je dôležitou súčasťou nádorovej transformácie. Cieľom prezentovanej štúdie bolo posúdiť zmeny glykozylácie pri nádorovej transformácii v tkanive prostaty.

Metodika: Analyzovali sme 24 prípadov chorobných zmien prostaty, zahrňujúcich prípady benígnej hyperplázie prostaty aj adenokarcinómu prostaty s rôznym Gleasonovým skóre; 3 + 4, 4 + 4 a 4 + 5. Na hodnotenie zmien glykozylácie bola využitá lektínová histochemia využívajúca lektíny špecifické pre kyselinu sialovú, a to Maackia amurensis leukoagglutínin (MAL), pre jej α -2,3 väzbu a Sambucus nigra leukoagglutínin (SNA) pre α -2,6 väzbu. Zmeny boli hodnotené semikvantitatívne a následne pomocou morfometrickej analýzy.

Výsledky: Nádorová transformácia v tkanive prostaty sa spája so zmenami glykozylácie bunkových štruktúr. V súvislosti s nádorovou transformáciou v prostate sme pozorovali výrazný pokles sialyzácie bunkových glykokonjugátov, a to tak v α -2,6, ako aj α -2,3 väzbe. Tento pokles bol výraznejší v prípadoch adenokarcinómov s vyšším Gleasonovým skóre.

Záver: Zmeny glykozylácie môžu ovplyvniť funkčné vlastnosti nádorových buniek vrátane prežívania, invazivity a metastatického potenciálu. Hodnotenie expresie kyseliny sialovej v tkanive prostaty môže mať význam v diagnostike nádorov prostaty aj pre lepšie pochopenie ich malígneho potenciálu.

Kľúčové slová: adenokarcinóm prostaty, kyselina sialová, glykokonjugáty, lektíny, neuraminidázy, sialyltransferázy, prognostické markery

Changes in sialylation of proteins in prostatic carcinoma (results of the pilot study)

Introduction: Prostatic carcinoma is one of the most common forms of malignancy in men with an increasing incidence even in well-developed countries. Despite available diagnostic and treatment methods, it is the third leading cause of cancer death in males. Prostatic specific antigen levels in serum play a key role in diagnosis, but the examination has low both sensitivity and specificity. There are currently no reliable non-invasive diagnostic methods, and the diagnosis of prostate cancer needs to be confirmed by biopsy. Abnormal glycosylation of cell structures is important part of the neoplastic transformation process. The presented study aims to evaluate the changes of glycosylation pattern in neoplastic transformation of prostatic tissue.

Methods: 24 cases of prostate tissue were analyzed, including cases of benign prostatic hyperplasia as well as prostatic adenocarcinoma with varying Gleason score; 3 + 4, 4 + 4 and 4 + 5. Lectin histochemistry using sialic acid-specific lectins specific for α -2,3 linkage (Maackia amurensis leukoagglutinin - MAL) and α -2,6 linkage (Sambucus nigra leukoagglutinin - SNA) was used. Changes were evaluated semi-quantitatively and subsequently by morphometric analysis.

Results: Changes of tissue glycosylation pattern accompany neoplastic transformation in prostatic tissue. In connection with tumour transformation in the prostate, we observed a significant decrease in sialylation of cellular glycoconjugates in both α -2,6 and α -2,3 linkage. This decrease was more pronounced in cases of adenocarcinomas with a higher Gleason score.

Conclusion: The changes of glycosylation pattern may affect the functional properties of neoplastic cells, including the survival, invasiveness and metastatic potential of cells. Evaluation of sialic acid expression in prostatic tissue may be of importance in the diagnosis of prostate tumours as well as in improving the comprehension of their malignant potential.

Keywords: prostatic adenocarcinoma, sialic acid, glycoconjugates, lectins, neuraminidase, sialyltransferase, prognostic markers

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 80 – 84

Úvod

Karcinóm prostaty je jedna z najčastejších foriem rakoviny u mužov. Štatistiky uvádzajú celosvetovo viac ako jeden milión nových prípadov ročne. Na Slovensku je incidencia karcinómu prostaty u mužov na druhom mieste po karcinóme hrubého čreva a má stúpajúci trend. V období rokov 2000 – 2010 sa jeho incidencia takmer zdvojnásobila (**obrázok 1**). Napriek dostupnej diagnostike a liečbe predstavuje u mužov tretiu najčastejšiu príčinu úmrtia na nádorovú chorobu⁽¹⁾.

Hlavnými rizikovými faktormi karcinómu sú vek, rodinná anamnéza a rasa. V skorých štádiách sú pacienti často asymptomatickí alebo majú len nešpecifické príznaky súvisiace s problémami s močením. Medzi príznaky pokročilej choroby patrí napríklad bolesť a patologické zlomeniny kostí v súvislosti so vznikom metastáz, fyzické vyčerpanie a strata hmotnosti. V súčasnosti je snaha o včasnú diagnostiku karcinómu prostaty prostredníctvom preventívnych vyšetrení. V diagnostike sa primárne využíva najmä laboratórne hodnotenie sérovej hladiny prostatického špecifického antigénu (PSA). Viaceré štúdie sledujúce účinok skríningových vyšetrení na prognózu pacientov (napr. PLCO) však nepreukázali jednoznačný benefit vyšetrenia PSA. Štúdie poukazujú na výrazne nízku senzitivitu a/alebo špecifickosť vyšetrenia hladiny PSA pre stanovenie diagnózy nádorov prostaty v závislosti od stanovenej cut-off hodnoty (1,1 ng/ml PSA zodpovedá senzitivite 83,4 % a špecifickosti 38,9 %, hodnota 4,1 ng/ml senzitivite 20,5 % a špecifickosti 93,8 %)⁽²⁾. Možné sú falošne pozitívne a falošne negatívne výsledky. Aj u mužov s nízkou hladinou celkového PSA sa môže vyskytnúť rakovina vysokého stupňa. Momentálne neexistuje fixná a spoľahlivá hraničná hodnota hladiny PSA v sére, ktorá by odlíšila neagresívny karcinóm od agresívneho⁽³⁾.

Slabá prediktívna hodnota vyšetrenia PSA viedla k nadmernej diagnostike chorobných zmien prostaty⁽⁴⁾. Na základe prebehnutých štúdií vrátane ERSPC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer) konštatovala pôvodne Európska urologická spoločnosť (European Association of Urology), že nie sú jednoznačne splnené predpoklady na široký skríning nádorov prostaty v celej populácii

a odporúčala realizovať/ponúknuť vyšetrenie len pacientov po predchádzajúcom adekvátnom poučení s ohľadom na riziko^(5,6). Vzhľadom na rast incidencie choroby v súčasnosti prebiehajú rozsiahle diskusie o potrebe celopopulačného skriningu karcinómu prostaty. Aj z toho dôvodu má význam hľadanie nových diagnostických postupov a markerov využiteľných v diagnostike. Európska urologická spoločnosť vyzvala Európsku komisiu na intenzívnejšiu podporu a financovanie tohto výskumu.

Nový marker v diagnostike by mohla predstavovať kyselina sialová. Kyselina sialová je monosacharid, ktorý je procesom sialyzácie exprimovaný na terminálnych častiach glykoproteínov na povrchu buniek. Sialové kyseliny sa nachádzajú na N- aj O-viazaných glykánach, často pripojených k základnému galaktózovému zvyšku, najčastejšie prostredníctvom α -2,6 alebo α -2,3 glykozidovej väzby⁽⁷⁾. Tento monosacharid je dôležitý v interakciách medzi bunkami navzájom aj medzi bunkami a okolitým mikroprostredím. Hrá zásadnú úlohu v stabilizácii glykoproteínovej štruktúry a pri určovaní povrchových charakteristík buniek^(8,9).

Zmenená sialyzácia často sprevádza malígnu transformáciu, podieľa sa na zvýšenej agresivite a raste nádorov. Nádorové bunky získavajú nové vlastnosti, ktoré im umožňujú uniknúť imunitnému systému organizmu, ovplyvňujú schopnosť invázie do okolitého tkaniva a metastázovania. V mnohých nádoroch bola preukázaná zmena sialyzácie proteínov v súvislosti s biologickým správaním nádoru a prognózou pacienta. Sialyzácia ovplyvňuje apoptózu⁽¹⁰⁾, neovaskularizáciu⁽¹¹⁾ v nádore, má vplyv na rezistenciu proti chemoterapii a rádioterapii^(12,13). Zmenu hladín kyseliny sialovej možno dokázať aj v sére pacientov. Bol zistený rozdiel v sérových hladinách kyseliny sialovej u pacientov s benígnymi léziami a malígnymi nádormi⁽⁹⁾.

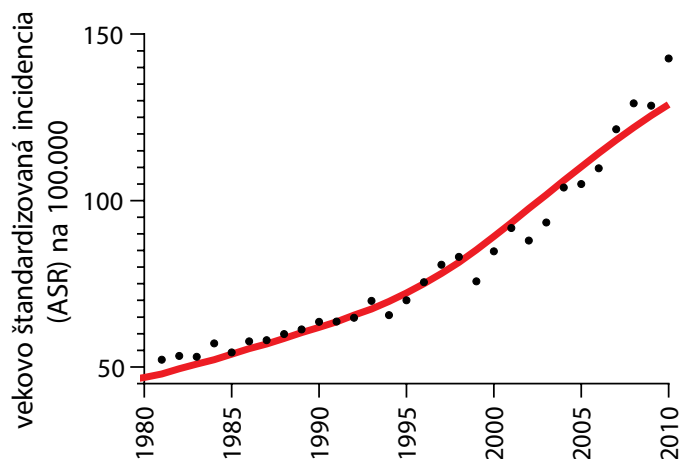
Hodnotenie sialylácie by preto mohlo predstavovať zaujímavý prognostický, prípadne diagnostický marker s ohľadom na možné využitie aj v tekutej biopsii. Cieľom predloženej štúdie bolo preto posúdiť zmeny sialylácie glykokonjugátov vo vzťahu k nádorovej transformácii v tkanive prostaty.

Metodika

Základom štúdie sa stali archívne mikroskopické preparáty tkaniva prostaty fixované formalínom a zaliate v parafíne zo zdrojov Ústavu patologickej anatómie Lekárskej fakulty UK. Podľa stanovených patologických diagnóz sme vybrali celkovo 24 vzoriek. Sústredili sme sa na prípady nenádorových zmien prostaty (6 pacientov), adenokarcinómu prostaty s rôznym Gleasonovým skóre; 3 + 4 (6 pacientov), 4 + 4 (6 pacientov) a 4 + 5 (6 pacientov).

Tie sme opakovane histopatologicky zhodnotili podľa publikovaných WHO kritérií. Z vybraných preparátov sme zhotovili po dva paralelné rezy a histochemicky sme ich farbili pomocou dvoch typov lektínov. Použili sme aglutinín *Sambucus nigra* (SNA) špecifický pre α -2,6 väzbu a leukoaglutinín *Maackia amurensis* (MAL) špecifický pre α -2,3 väzbu sialovej kyseliny. Odparafínované preparáty boli preplachované 5 minút v PBS (vo fyziologickom soľnom roztoku pufrovanom fosfátmi s 0,5 % BSA, 0,05 % NaN_3 , 0,005 % Tween, pH 7,2). Preparáty sme inkubovali 90 minút v roztoku /ml biotinylovaného SNA a MAL (Vector, Carpinteria, CA) pri izbovej teplote. Po trojnásobnom prepláchnutí v PBS sme preparáty inkubovali

Obrázok 1. Incidencia karcinómu prostaty na Slovensku. Na Slovensku pozorujeme neustále stúpajúcu incidenciu karcinómu prostaty u mužov. Za posledných 30 rokov sa jeho incidencia strojnásobila. Zdroj ECIS⁽¹⁾



30 minút s komplexom streptavidinperoxidáza a po opakovanom prepláchnutí minútu farbili roztokom diaminobenzidínu. Preparáty boli následne dofarbené hematoxylínom.

Preparáty sme hodnotili vo svetelnom mikroskope, sústreďovali sme sa na posúdenie cytoplazmovej a luminálnej membránovej pozitivity hodnoteného markera. Hodnotená bola celá plocha preparátu, pre každé hodnotené pole bolo stanovené Gleasonovo skóre a každé pole bolo následne hodnotené samostatne. Nálezy sme vyjadrili semikvantitatívne s využitím semikvantitatívneho skóre nasledovne:

- 0 negatíva
- 0,5 slabá, resp. nepravidelná pozitivita
- 1 dobre hodnotiteľná pravidelná pozitivita
- 2 silná pravidelná pozitivita
- 3 veľmi silná pravidelná pozitivita

V ďalšom kroku sme intenzitu pozitivy kvantifikovali s použitím histomorfometrického softvéru ImageJ, v. 1.52p^(14,15) a vyjadrili ako skóre DAB intenzity (SDI), kde 0 je minimálna teoretická intenzita, 1 maximálna teoretická intenzita. Semikvantitatívne skóre DAB pozitivy (SDP) je vyjadrené ako priemer jednotlivých hodnotení $\pm$ SEM. Výsledky boli vyhodnotené štatisticky použitím štatistického softvéru Graph Pad Prism s použitím Kruskalovho-Wallisovho neparametrického testu, hodnoty $p < 0,05$ boli považované za signifikantné.

Výsledky

V tkanive prostaty sme pozorovali prítomnosť glykokonjugátov tak s α -2,3, ako aj s α -2,6 väzbou kyseliny sialovej, pričom dominovala najmä jej α -2,6 väzba. Pozorovali sme rozdiely pozitivy glykokonjugátov v súvislosti s nádorovou transformáciou v tkanive a v závislosti od gradingu nádoru.

V tkanive normálnej prostaty dominovala najmä veľmi silná cytoplazmová (SDP $2,83 \pm 0,08$) a luminálna membránová (SDP $2,62 \pm 0,11$) pozitivita α -2,6 viazanej sialovej kyseliny

(**obrázok 2**) a prevažne pravidelná luminálna (SDP $1,92 \pm 0,19$) pozitivita α -2,3 viazanej sialovej kyseliny (**obrázok 3**). Cytoplazmová pozitivita α -2,3 sialyzovaných glykokonjugátov bola slabá. Ložiská s prostatickou intraepitelovou neopláziou vykazovali mierny pokles pozitivy sialyzovaných glykokonjugátov, ktorý však nebol signifikantne odlišný v porovnaní s tkanivom normálnej prostaty.

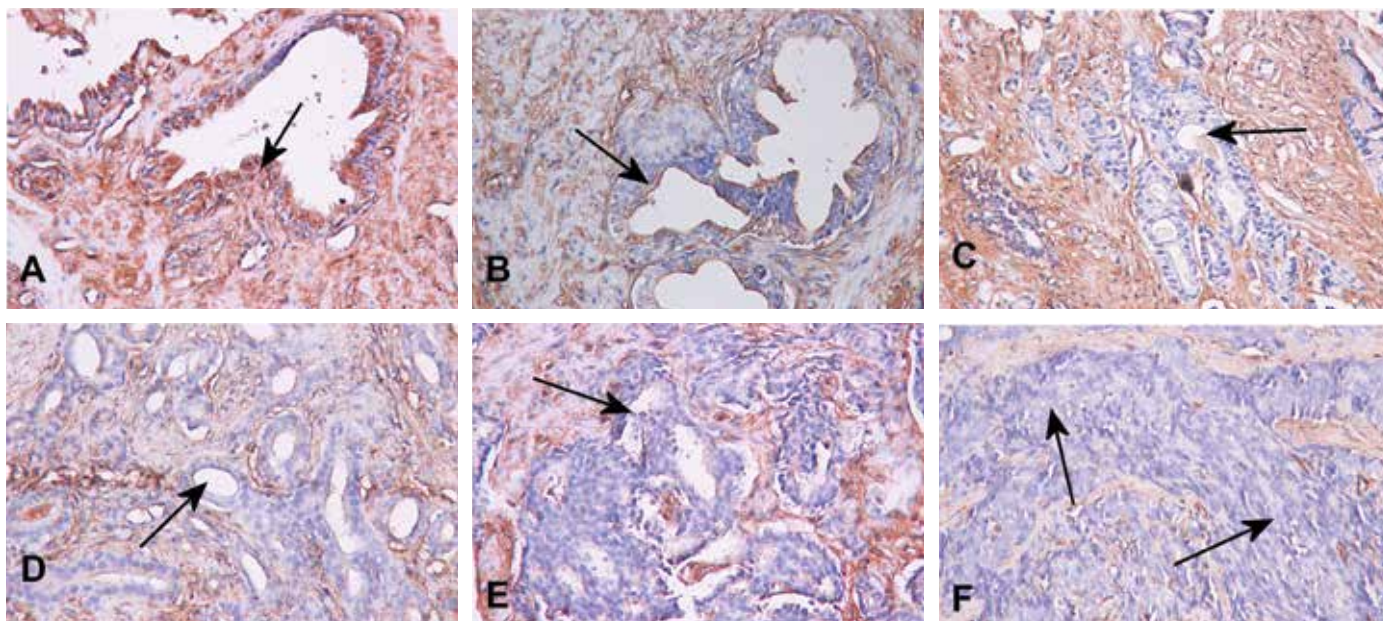
V súvislosti s nádorovou transformáciou dochádza k signifikantnému poklesu cytoplazmovej (SDP $1,81 \pm 0,07$ v prípade Gleasonovho skóre 3, $1,07 \pm 0,010$ v prípade Gleasonovho skóre 4 a $0,9 \pm 0,10$ v prípade Gleasonovho skóre 5) a luminálnej membránovej (SDP $1,33 \pm 0,06$ v prípade Gleasonovho skóre 3, $1,04 \pm 0,04$ v prípade Gleasonovho skóre 4) pozitivy α -2,6 sialyzovaných glykokonjugátov. Pokles bol výraznejší v prípade nádorov s vyšším Gleasonovým skóre a bol potvrdený aj morfometrickou kvantifikáciou (**obrázok 4**).

Pozorovali sme taktiež pokles cytoplazmovej pozitivy α -2,3 viazanej sialovej kyseliny, ktorý bol významnejší iba v prípadoch nádorov s vyšším Gleasonovým skóre. V prípade cytoplazmovej pozitivy sme zistili signifikantný rozdiel pri nádoroch s Gleasonovým skóre 4 a 5 (SDP $0,44 \pm 0,06$ a $0,32 \pm 0,06$) v porovnaní s normálnym tkanivom prostaty (SDP $0,75 \pm 0,15$). Rozdiel sa ukázal výraznejší pri morfometrickom hodnotení, kde signifikantný pokles α -2,3 viazanej sialovej kyseliny bol pozorovaný v prípadoch karcinómov prostaty s rôznym Gleasonovým skóre, rovnako aj v prípadoch prostatickej intraepitelovej neoplázie (**obrázok 5**). Nádorová transformácia sa nespájala so signifikantnými zmenami luminálnej membránovej pozitivy α -2,3 sialyzovaných glykokonjugátov.

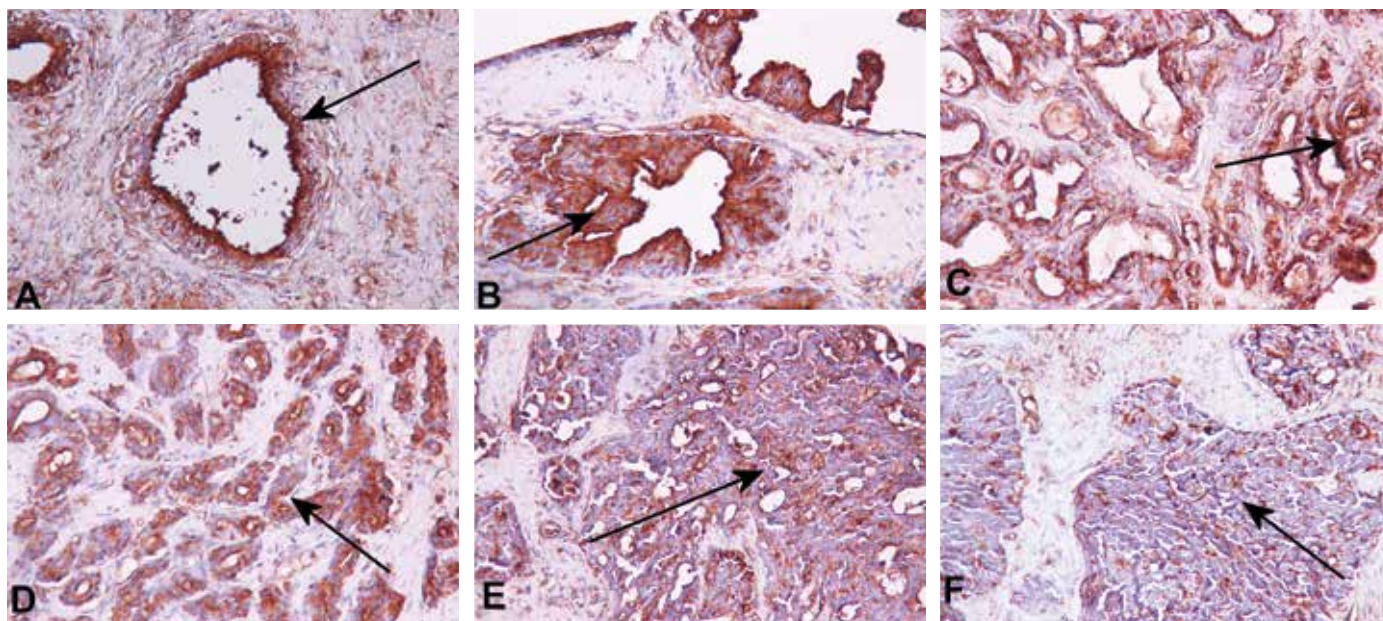
Diskusia

Preukázali sme zmeny sialyzácie glykokonjugátov v súvislosti s nádorovou transformáciou v prostate. Zmeny jej koncentrácie boli hodnotené vo vzorkách z biopsie s využitím dvoch typov lektínov. Lektín Sambucus nigra (SNA), izolovaný

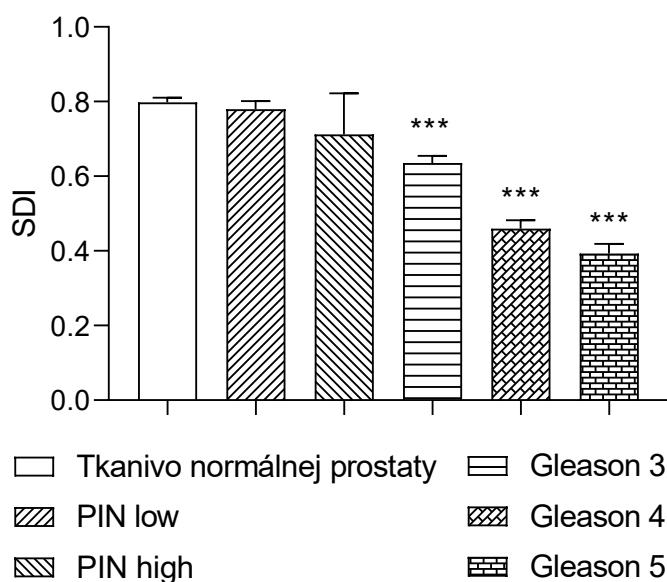
Obrázok 2. Expresia sialyzovaných glykokonjugátov v α -2,3 väzbe. V tkanive prostaty pozorujeme len slabú expresiu α -2,3 viazanej kyseliny sialovej. V súvislosti s jej nádorovou transformáciou dochádza k jej poklesu, ktorý je najvýraznejšie viditeľný v nádorových ložiskách s vyšším Gleasonovým skóre. A normálne tkanivo prostaty, B prostatická intraepitelová neoplázia, C a D adenokarcinóm prostaty Gleason 3, E adenokarcinóm prostaty Gleason 4, F adenokarcinóm prostaty Gleason 5. Lektínová histochemia, MAL, Streptavidín-Px, DAB, 200x



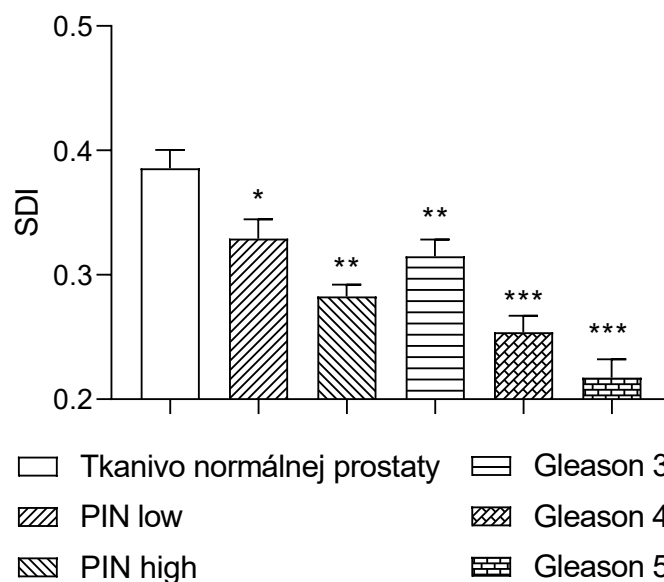
Obrázok 3. Expresia sialyzovaných glykokonjugátov v α -2,6 väzbe. V tkanive prostaty pozorujeme silnú a pravidelnú cytoplazmovú a luminálnu membránovú expresiu α -2,6 viazanej kyseliny sialovej. Počas nádorovej transformácie dochádza k jej poklesu, ktorý je signifikantnejší v nádorových ložiskách s vyšším Gleasonovým skóre. A normálne tkanivo prostaty, B prostatická intraepitelová neoplázia, C a D adenokarcinóm prostaty Gleason 3, E adenokarcinóm prostaty Gleason 4, F adenokarcinóm prostaty Gleason 5. Lektínová histochemia, SNA, Streptavidín-Px, DAB, 200x



Obrázok 4. Morfometrická analýza intenzity expresie glykokonjugátov v α -2,6 väzbe. Pokles expresie sialyzovaných glykokonjugátov v α -2,6 väzbe v prípade malígnych nádorov prostaty bol preukázaný aj morfometricky. SDI, skóre DAB intenzity



Obrázok 5. Morfometrická analýza intenzity expresie glykokonjugátov v α -2,3 väzbe. Pokles expresie sialyzovaných glykokonjugátov v α -2,3 väzbe v prípade malígnych nádorov a v ložiskách dysplastických zmien v tkanive prostaty bol výraznejšie hodnotiteľný pomocou morfometrickej analýzy obrazu. SDI, skóre DAB intenzity



z kôry bazy, sa prednostne viaže na kyselinu sialovú pripojenú ku koncovej galaktóze na väzbu α -2,6 a lektín Maackia amurensis (MAL) sa viaže na kyselinu sialovú viazanú α -2,3 väzbou. Takéto hodnotenie s diferencovaním typu jej terminálnej väzby doposiaľ nebolo v dostupnej literatúre dokumentované. Pri hodnotení boli pozorované rozdiely medzi benígnymi procesmi a malígnymi karcinómami.

V tkanive prostaty sme preukázali prítomnosť α -2,3 aj α -2,6 sialyzovaných glykokonjugátov s dominanciou α -2,6 väzby. Pozorovali sme výrazný pokles sialyzácie najmä v α -2,6 väzbe v súvislosti s nádorovou transformáciou v prostate, a to cytoplazmovej aj luminálnej membránovej pozitivity. Sialyzácia v α -2,6 väzbe sa nemení pri dysplastických zmenách v prostatickej intraepitelovej neoplázii. Tento nález bol

potvrdený aj morfometricky. Sialyzácia v α -2,3 väzbe je v tkanive prostaty menej výrazná, pokles v súvislosti s dysplastickými zmenami a nádorovou transformáciou je preto ťažšie pozorovateľný a hodnotiteľný a bol preukázaný najmä pomocou morfometrickej analýzy obrazu.

V tejto súvislosti sú zaujímavé nálezy Meany et al.⁽¹⁶⁾, ktorí pozorovali zvýšenú sialyzáciu PSA v sére u pacientov s karcinómom prostaty. Zvýšená hladina kyseliny sialovej v sére môže byť zaujímavý pomocný marker v prípade, ak nie je PSA dostatočne výpovedné⁽¹⁷⁾ a je nezávislým prognostickým faktorom karcinómu prostaty vrátane vzniku vzdialených metastáz⁽¹⁸⁾ a agresivity nádoru⁽¹⁹⁾. Predpokladáme preto, že nami pozorovaný pokles sialyzácie proteínov v tkanive prostaty súvisí s jej zvýšeným uvoľňovaním do séra.

Sialylácia glykokonjugátov je výsledkom rovnováhy medzi enzýmami viažucimi kyselinu sialovú na glykokonjugáty a enzýmami, ktoré ju uvoľňujú z jej väzby. Je preto možné, že zmeny akumulujúce sa v bunkách počas nádorovej transformácie môžu viesť k zmenám rovnováhy medzi sialyltransferázami a neuraminidázami v tkanive. Za fyziologických okolností je v tkanive prostaty exprimovaná najmä lyzozomálna sialidáza NEU1⁽²⁰⁾. Cytozolická sialidáza NEU2 a membránovo viazaná NEU3 nie sú v tkanive prostaty opisované v detegovateľnom

množstve⁽²⁰⁾. Bolo však dokázané značné zvýšenie expresie neuraminidázy NEU3 v prostatickom karcinóme, ktoré viedlo k zrýchleniu progresie nádoru, prevažne pre narušenú bunkovú signalizáciu na bunkovom povrchu⁽²¹⁾. Experimentálna inhibícia neuraminidáz prostredníctvom siRNA sa dáva do súvisu s poklesom prežívania nádorových buniek prostaty a so znížením ich metastatického potenciálu⁽²²⁾.

Hodnotenie expresie kyseliny sialovej priamo v tkanive prostaty tak môže mať hodnotný prínos v diagnostike malígnych nádorov v prostate. Môže mať význam pre lepšie pochopenie ich malígneho potenciálu. Očakávame, že práve komplexný pohľad na expresiu sialyzovaných proteínov, sialyltransferáz a neuraminidáz v nádore prostaty môže odkryť nové zaujímavé potenciálne terapeutické ciele v prostate.

Podakovanie: Štúdia bola realizovaná s podporou projektu VEGA 1/0191/17 „Diagnostický a prediktívny význam zmien zloženia glykokonjugátov asociovaných s nádorovou transformáciou prostaty“. Štúdia bola parciálne realizovaná ako súčasť práce výskumného centra vybudovaného vďaka podpore v rámci OP Výskuma vývoj pre projekt: „Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií“, ITMS 26240120038, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

LITERATÚRA

1. ECIS. European Cancer Information System. Estimates of cancer incidence and mortality in 2018, for all countries. 2016 1. 9. 2019]; <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>.
2. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009; 360(13): 1310-9.
3. Llop E, Ferrer-Batalle M, Barrabes S, et al. Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes. *Theranostics* 2016; 6(8): 1190-204.
4. Ferrer-Batalle M, Llop E, Ramirez M, et al. Comparative Study of Blood-Based Biomarkers, alpha2,3-Sialic Acid PSA and PHI, for High-Risk Prostate Cancer Detection. *Int J Mol Sci* 2017; 18(4).
5. Kilpelainen TP, Tammela TL, Malila N, et al. The Finnish prostate cancer screening trial: analyses on the screening failures. *Int J Cancer* 2015; 136(10): 2437-43.
6. Roobol MJ, Kerkhof M, Schroder FH, et al. Prostate cancer mortality reduction by prostate-specific antigen-based screening adjusted for nonattendance and contamination in the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). *Eur Urol* 2009; 56(4): 584-591.
7. Pihikova D, Pakanova Z, Nemcovic M, et al. Sweet characterisation of prostate specific antigen using electrochemical lectin-based immunosensor assay and MALDI TOF/TOF analysis: Focus on sialic acid. *Proteomics* 2016; 16(24): 3085-3095.
8. Samraj AN, Laubli H, Varki N, et al. Involvement of a non-human sialic Acid in human cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 33.
9. Goswami K, Nandeesha H, Koner BC, et al. A comparative study of serum protein-bound sialic acid in benign and malignant prostatic growth: possible role of oxidative stress in sialic acid homeostasis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007; 10(4): 356-9.
10. Huang S, Day TW, Choi MR, et al. Human beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (ST3Gal III) attenuated Taxol-induced apoptosis in ovarian cancer cells by downregulating caspase-8 activity. *Mol Cell Biochem* 2009; 331(1-2): 81-8.

11. Chen JY, Tang YA, Huang SM, et al. A novel sialyltransferase inhibitor suppresses FAK/paxillin signaling and cancer angiogenesis and metastasis pathways. *Cancer Res* 2011; 71(2): 473-83.
12. Dawson G, Moskal JR, Dawson SA. Transfection of 2,6 and 2,3-sialyltransferase genes and GlcNAc-transferase genes into human glioma cell line U-373 MG affects glycoconjugate expression and enhances cell death. *J Neurochem*. 2004; 89(6): 1436-1444.
13. Schultz MJ, Swindall AF, Wright JW, et al. ST6Gal-I sialyltransferase confers cisplatin resistance in ovarian tumor cells. *J Ovarian Res* 2013; 6(1): 25.
14. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004; 11(7): 36-42.
15. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676-82.
16. Meany DL, Zhang Z, Sokoll LJ, et al. Glycoproteomics for prostate cancer detection: changes in serum PSA glycosylation patterns. *J Proteome Res* 2009; 8(2): 613-9.
17. Michalakakis K, Ilias I, Triantafyllou A, et al. Detection of prostate cancer by sialic acid level in patients with non-diagnostic levels of prostate-specific antigen. *Maturitas* 2012; 73(4): 325-30.
18. Zhang C, Yan L, Song H, et al. Elevated Serum Sialic Acid Levels Predict Prostate Cancer As Well As Bone Metastases. *J Cancer* 2019; 10(2): 449-457.
19. Tkac J, Gajdosova V, Hroncekova S, et al. Prostate-specific antigen glycoproteomics as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer. *Interface Focus* 2019; 9(2): 20180077.
20. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347(6220): 1260419.
21. Hata K, Tochigi T, Sato I, et al. Increased sialidase activity in serum of cancer patients: Identification of sialidase and inhibitor activities in human serum. *Cancer Sci* 2015; 106(4): 383-9.
22. Li X, Zhang L, Shao Y, et al. Effects of a human plasma membrane-associated sialidase siRNA on prostate cancer invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416(3-4): 270-6.

MUDr. Andrea Janegová, PhD.

Ústav patologickej anatómie
Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
Špitálska 24, 813 72 Bratislava
e-mail: andi.janegova@gmail.com

Úloha holotranskobalamínu v diferenciálnej diagnostike nedostatku B₁₂

Eva Joppová

Hematológia a transfúziológia, Medirex, a. s., Košice

Vitamín B₁₂, kobalamín, je esenciálny pre bunkový metabolizmus, syntézu DNA a myelinizáciu nervových vlákien. Najčastejšie neurologické prejavy deficitu kobalamínu sú nešpecifické a môžu byť ireverzibilné. Štandardným skriningovým testom pre hodnotenie nedostatku kobalamínu je stanovenie celkovej sérovej koncentrácie vitamínu B₁₂. Vyšetrenie holotranskobalamínu – aktívnej frakcie B₁₂ je senzitívnejším a špecifickejším ukazovateľom jeho včasného deficitu. Hlavnou klinickou výhodou testu je potvrdenie alebo vylúčenie diagnózy deficitu vitamínu B₁₂ u pacientov s celkovými hodnotami B₁₂ v sivej zóne, so selektívnymi fluktuáciami haptokorínu alebo pri poruchách metabolizmu kobalamínu na intracelulárnej úrovni.

Kľúčové slová: vitamín B₁₂, kobalamín, holotranskobalamín, haptokorín

Role of holotranscobalamin in differential diagnostics of the deficiency of vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂, cobalamin is essential for the cell metabolism, DNA synthesis and myelination of nerve fibres. The most frequent neurological manifestations of cobalamin deficiency are non-specific and may be irreversible. A standard test for the screening of cobalamin deficiency is the assay of total serum vitamin B₁₂ concentration. Measurement of holotranscobalamin – the active form of vitamin B₁₂ has better sensitivity and specificity in the detection of its deficiency at early stages. Its key advantage for clinical practice is the ability of the test to confirm or rule out the diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency in patients who present with borderline levels of total B₁₂, with selective haptocorrin fluctuations or with cobalamin metabolism disorders at the intracellular level.

Keywords: vitamin B₁₂, cobalamin, holotranscobalamin, haptocorrin

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 85 – 89

Úvod

Kobalamín je nevyhnutný pre transformáciu metyltetrahydrofolátu na tetrahydrofolát, a tým pre správnu syntézu deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), tvorbu erytrocytov a správnu funkciu nervového systému (predovšetkým tvorbu myelínových obalov). Nedostatok môže viesť k širokému spektru hematologických, neurologických či neuropsychiatrických zmien, ktoré sú včasnou diagnostikou a liečbou reverzibilné. Kobalamín (cobalamin, Cbl) alebo vitamín B₁₂ je jeden z vitamínov rozpustných vo vode, obsiahnutý hlavne v živočíšnych produktoch. Denný príjem tvorí približne 3 – 30 µg a potrebné denné množstvo 2 – 4 µg. Zvýšená spotreba je v období rastu, tehotenstva, dojčenia a pri hojení rán⁽¹⁾. Kobalamín je syntetizovaný iba mikroorganizmami, rastliny a vyššie živočíchy túto schopnosť nemajú. Najväčším zdrojom Cbl sú baktérie v hrubom čreve živočíchov vrátane človeka, kde sa však Cbl už nevstrebáva, aj keď denná produkcia by stačila na liečbu klinicky deficientných pacientov, ako to vo svojej štúdii potvrdila Callenderová. Deficit Cbl u vegánov s klinickými prejavmi nedostatku vitamínu B₁₂ nahradila vodným extraktom ich vlastnej stolice. Najviac Cbl obsahujú živočíšne proteíny. Mäso z parenchýmových orgánov je najbohatším zdrojom, ďalej ryby, mlieko, mliečne produkty a vajecný žltok. Cbl v potrave je odolný proti vareniu pri vysokej teplote, ale ľahko konvertuje do inaktívnych analógov pôsobením kyseliny askorbovej. Cbl je výnimočne dobre uskladňovaný v koenzýmovej forme v tkanivách. Celkové množstvo v tele je približne 2 – 5 mg u dospelých, z čoho asi 1 mg je v pečeni^(1,2).

Perorálne prijatý kobalamín sa vstrebáva z prijatej potravy veľmi zložitým a ľahko narušiteľným mechanizmom, čo môže byť zdrojom mnohých porúch vstrebávania. Kobalamín je v živočíšnych bielkovinách viazaný peptidickou väzbou, z ktorej je uvoľňovaný v kyslom prostredí žalúdka kyselinou chlorovodíkovou a proteolytickými enzýmami. Kyslé prostredie je nevyhnutné pre tvorbu vnútorného faktora (intrinsic factor, IF), bez ktorého dochádza k neefektívnej proteolyze, odkiaľ pochádza deficit vitamínu B₁₂ pri hypochlorhydrii a pravidelnom užívaní inhibítorov protónovej pumpy.

Po uvoľnení Cbl z peptidickej väzby sú pre správnu reabsorpciu Cbl potrebné väzbové proteíny:

a) haptokoríny (HC, kódované TCN1 génom), ktoré majú vysokú afinitu ku Cbl pri nízkom pH v žalúdku, okrem žľúdočnej šťavy sú tiež v slinách a ďalších telesných tekutinách a ich funkcia okrem väzby Cbl je ochranná – pred denaturáciou Cbl v žalúdku;

b) vnútorný faktor – Cbl viažuci glykoproteín (kódovaný génom GIF), produkovaný parietálnymi bunkami fundu žalúdka, ktorý má vysokú afinitu k Cbl pri vyššom pH, v alkalickom prostredí v tenkom čreve a duodéne. IF viaže len aktívnu formu kobalamínu – metylkobalamín, adenosylkobalamín, kyanokobalamín, akvakobalamín^(3,4,5).

Haptokoríny majú silnú väzbovú afinitu ku kobalamínu pri nízkom pH v žalúdku, a preto žalúdok opúšťa hlavne kobalamín naviazaný na HC (HC-Cbl), odtiaľ postupuje do duodéna a horných častí jejuna. Tu vplyvom alkalického pH a pankreatických proteáz dochádza k parciálnemu uvoľneniu Cbl z HC

a môže sa tak vo zvýšenej miere viazať na IF (možná príčina deficitu B₁₂ pri pankreatickej a črevnej insuficiencii). V zásaditom prostredí duodéna teda vzniká prevažne komplex Cbl-IF⁽⁴⁾. Kobalamín môže byť absorbovaný aktívnym transportom alebo pasívnou difúziou. Aktívnym transportom je absorbovaná väčšina Cbl. Komplex Cbl-IF je vychytávaný špecifickými kubilínovými receptormi na povrchu buniek tenkého čreva za prítomnosti Ca²⁺ a neutrálneho pH. Kubilínový receptor (kódovaný CUBN génom) viaže iba komplex Cbl-IF; voľný Cbl, ani IF nie sú schopné väzby na tento receptor. Kubilín tvoria α-podjednotky a hydrofóbne β-podjednotky a na to, aby Cbl prešiel do bunky, musí vytvoriť funkčný komplex s amnionless proteínom, ktorý umožní prechod ligandu do bunky. Pre správnu funkciu a prenos ligandu do bunky je potrebný aj ďalší receptor – megalínový. Kubilín a megalín sú prítomné v tenkom čreve, v obličkách a v žltkovom vaku okolo vyvíjajúceho sa embrya. Kubilín bez megalínu nie je schopný reabsorbovať proteíny, i keď megalín má túto schopnosť^(4,6,7). Pasívnou difúziou prechádza len okolo 1 – 3 % prijatého Cbl a uplatňuje sa hlavne pri vyšších dávkach Cbl (nad desiatky až stovky mikrogramov). Týmto spôsobom absorbovaný vitamín sa objavuje v krvi za niekoľko minút a je to mechanizmus využívaný hlavne u pacientov s pernicióznou anémiou^(4,5).

Transport kobalamínu v plazme riadia R proteíny (transkobalamíny), v literatúre tiež označované R binders, „R viazače“, aby sa odlíšili od R proteínov, ktoré viažu kobalamín v žalúdku⁽³⁾. Pred naviazaním kobalamínu na transkobalamín dochádza k jeho premene na metylové a adenosylové formy. Metylová forma tvorí 60 – 80 % celkového kobalamínu v plazme a adenosylová forma do 20 %. V malom množstve sú zastúpené aj iné formy kobalamínu, kyanokobalamín a hydroxykobalamín⁽⁸⁾. Hlavným transportným proteínom aktívnej formy Cbl v plazme je transkobalamín II. Transkobalamín II je tvorený rôznymi tkanivami, hlavne endotelovými bunkami, má biologický polčas 90 minút a viaže len funkčné analógy kobalamínu. Komplex Cbl-IF prechádza endocytózou do cytoplazmy enterocyту, kde je vplyvom lyzozómov vnútorný faktor degradovaný a Cbl sa viaže na transkobalamín, čím vzniká aktívna forma vitamínu B₁₂ – holotranskobalamín (holoTC). HoloTC opúšťa enterocyt cez bazolaterálnu membránu a vstupuje do portálnej krvi. Absorpcia aktívnym transportom prebieha v terminálnej časti ilea a trvá okolo 3-4 hodín. HoloTC tvorí len 10 – 30 % celkového vitamínu B₁₂, je to však aktívna, biologicky dostupná forma vitamínu B₁₂. HoloTC má biologický polčas 5-6 minút^(5,8). Druhým transportným proteínom je haptokorín (HC), transkobalamín I. HC je α-glykoproteín tvorený v špecifických granulách granulocytov. Vo veľkom množstve je prítomný v slinách, materskom mlieku a slzách. Biologický polčas má 9-10 dní. HC naviazaním Cbl tvorí holohaptokorín (holoHC), ktorý tvorí 70 – 90 % cirkulujúceho Cbl, odtiaľ vysoké hodnoty vyšetřovaného B₁₂ v sére. HC viaže všetky formy Cbl, aj nefunkčné, avšak komplex holoHC nedokáže prestupovať do buniek, pretože na bunke nie sú špecifické receptory, ktoré by rozpoznali tento komplex. HoloHC môže vstupovať do buniek vďaka nešpecifickým receptorom (asiaglykoproteínom) v pečeni po desialyzácii molekuly haptokorínu^(3,9). Holohaptokorín predstavuje tzv. zásobnú formu, ktorej funkcia nie je presne známa, avšak Cbl v tejto forme je viazaný veľmi pevne, uvoľňuje sa pomaly a môže trvať aj

niekoľko rokov, kým absorpcia v čreve ustane a začne sa manifestný deficit aktívnej formy kobalamínu. Môže trvať 3 – 6 rokov, kým sa množstvo holoHC (celkového B₁₂) zníži pod 200 pmol/l. Len holoTC, ktorý je rýchlo vychytávaný bunkami, predstavuje aktuálne hladiny aktívnej formy B₁₂ s poklesom hneď po zhoršení intestinálnej absorpcie. Hodnoty vitamínu B₁₂ v sére 150 – 300 pmol/l považujeme za sivú zónu, keď je diagnosticky výhodnejšie stanovenie aktívnej formy vitamínu B₁₂ – holoTC^(4,5,8). Receptory pre holotranskobalamín sú prítomné na všetkých bunkách, aj keď prednostne je holoTC vychytávaný hlavne v pečeni, kostnej dreni a ďalších tkanivách. Tým sa kobalamín stáva dostupným pre všetky bunky v tele, ktoré syntetizujú DNA alebo ribonukleovú kyselinu (RNA). HoloTC prechádza do buniek endocytózou. Metabolický obrat komplexu s aktívnym Cbl dosahuje maximálne 6 nmol/deň, holohaptokorínu 0,1 nmol/deň. Receptor pre holotranskobalamín v obličkách využíva na absorpciu vitamínu megalín, v iných tkanivách nie je megalín súčasťou receptora pre holoTC. V obličkách je holoTC reabsorbovaný z glomerulového filtrátu a nepatrné množstvo je cez bazálnu membránu tubulárnych buniek vylúčené do moču^(8,10). Úloha transkobalamínu III zatiaľ nie je úplne známa, pravdepodobne plní transportnú funkciu pre Cbl z periférnych tkanív späť do pečene. Podobne ako transkobalamín I viaže všetky formy vitamínu aj nefunkčné analógy⁽⁸⁾.

Približne 60 – 70 % kobalamínu prijatého z potravy je vylučované z organizmu žlčou a močom, v podobe voľného vitamínu, aktívne formy si telo necháva. U pacientov s narušenou absorpciou vitamínu sú tieto straty až 100 %, v závislosti od množstva funkčného IF. V pečeni je Cbl naviazaný na HC, prechádza do žlče, následne do čreva a tu je spracovaný ako Cbl prijatý z potravy. Veľká časť Cbl je vylučovaná žlčou, 0,5 – 5 µg Cbl za deň je zo žlče vylučované do čreva, no okolo troch štvrtín sa späťne reabsorbuje prostredníctvom enterohepatálneho cyklu, čo prispieva k udržiavaniu vysokých telesných zásob vitamínu. Zvyšná štvrtina je vylúčená stolico. Glomerulovou filtráciou vylúčené množstvo Cbl nie je až také výrazné (< 0,25 µg/deň), predsa je niekedy považovaná za hlavnú cestu exkrécie vitamínu. V obličkách sú receptory pre komplex holoTC, ktoré bránia nadmernému úniku vitamínu močom. Stopové množstvo Cbl je vylučované kožou^(6,8,11).

Holotranskobalamín – aktívna forma vitamínu B₁₂ prechádza do buniek periférnych tkanív endocytózou sprostredkovanou receptormi. Kobalamín v metabolických procesoch ľudského organizmu plní funkciu koenzýmov v týchto formách: metylkobalamín a adenosylkobalamín. Cbl je koenzýmom pre tieto enzýmy: metionínsyntázu a L-metylmalonyl-koenzým A (CoA) mutázu. Metylkobalamín je kofaktorom pre metionínsyntázu (alebo tiež homocysteínmetyltransferázu), katalyzuje premenu homocysteínu (Hcy) na metionín prostredníctvom cyklov metylácie a demetylácie Cbl. Pre správny priebeh metylácie je nevyhnutná spolupráca vitamínu B₁₂ a kyseliny listovej. Deficit jedného vitamínu tak môže maskovať deficit druhého⁽⁸⁾. Vzniknutý metionín je esenciálnou aminokyselinou pre metyláciu proteínov, DNA a RNA; ďalej je donorom metylovej skupiny pri syntéze kreatínu, fosfolipidov a acetylcholínu. Deficit Cbl vedie k zablokovaniu aktivity enzýmu, zníženej tvorbe aminokyseliny metionínu a hromadeniu homocysteínu. Adenosylkobalamín je kofaktorom pre L-metylmalonyl-CoA mutázu v mitochondriách.

Podieľa sa hlavne na metabolizme mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov dôležitých pre správnu syntézu myelínových obalov nervovej bunky. Pri deficite Cbl dochádza k hromadeniu metylmalonátu CoA a metylmalónovej kyseliny. Typickým znakom je metylmalónová acidúria, hlavne po zvýšenom príjme mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov. Hromadenie metylmalónovej kyseliny sa negatívne odrazí v metabolizme glukózy, glutámovej kyseliny a inhibícií cyklu dikarboxylových kyselín. Zvýšená tvorba metylmalonylu CoA narúša tvorbu mastných kyselín, čoho následkom vznikajú vetvené mastné kyseliny. Nedostatok adenozykobalamínu prispieva k tvorbe patologického myelínu, ktorý svojou fragilitou priamo podmieňuje demyelinizáciu nervových vlákien^(4,5,11).

Príčinou vzniku a rozvoja klinických prejavov a laboratórnych známk deficitu Cbl je porušená funkcia enzýmov, ktorých funkcia je závislá od Cbl. Ako bolo spomenuté, je to metionínsyntáza a metylmalonyl-CoA mutáza. Hlavným znakom je narušené delenie buniek, pre chybnú syntézu DNA, aj keď reakcie, pre ktoré je Cbl nevyhnutný, priamo neovplyvňujú syntézu DNA. Tento patomechanizmus objasnila až po rokoch hypotéza folátovej pasce. Princíp folátovej pasce spočíva v tom, že pri nedostatku Cbl sa hromadí nevyužitý N5-metyltetrahydrofolát, ktorý sa nepremieňa na aktívnu formu. Nedostatok tetrahydrofolátu naruší syntézu purínových báz, tým tvorbu DNA, a teda aj základnú funkciu bunky – delenie. Zmeny v koncentrácii folátu súvisia pravdepodobne s neschopnosťou udržať si folát, pretože bunky nie sú schopné udržať N5-metyltetrahydrofolát, ktorý sa nepremenil na aktívnu formu – tetrahydrofolát⁽⁵⁾. Folátová pasca je problémom pri diferenciálnej diagnostike megaloblastovej anémie, pretože príčinou tejto anémie môže byť deficit aj Cbl, aj kyseliny listovej. Kontroverzná preto bola fortifikácia potravín, pretože kyselina listová zlepšuje megaloblastovú anémiu (cez obnovu syntézy DNA a delenie buniek), no môže maskovať deficit Cbl. Folátová pasca je teda tiež dôvodom, prečo sa nedá spoliehať len na zmenené hematologické parametre v rámci diagnostiky príčiny makrocytovej anémie. Obraz megaloblastovej anémie sa dá vysvetliť folátovou pascou a hoci za príčinu neurologických ťažkostí sa považuje kobalamínový deficit, patomechanizmus vzniku týchto ťažkostí zatiaľ nie je úplne objasnený^(5,10).

Poruchy metabolizmu Cbl môžeme rozdeliť do dvoch veľkých skupín, a to: 1. deficit Cbl v organizme a 2. deficit enzýmov, ktoré sa podieľajú na intracelulárnom metabolizme Cbl. Deficit Cbl v organizme vzniká v dôsledku: nedostatočného príjmu Cbl v potrave, porušeným vstrebávaním alebo transportom Cbl. Zdrojmi vitamínu B₁₂ v strave sú primárne mäsové a mliečne výrobky. V typickej strave západného typu je jeho denný príjem obvykle vyšší než odporúčaný denný príjem. Nedostatkom Cbl sú ohrození hlavne starší ľudia s jednostrannou stravou aj chronickí alkoholici a striktní vegáni⁽¹¹⁾. Absorpciu Cbl negatívne ovplyvňuje nedostatočná sekrécia pankreatickej šťavy, Zollingerov-Elisonov syndróm, Imerslundov-Gräsbeckov syndróm, zápalové ochorenia žalúdočnej alebo črevnej sliznice, parazitárne a bakteriálne ochorenia gastrointestinálneho traktu, chirurgické zásahy v oblasti žalúdka a čreva, dlhodobé užívanie antacid, autoimunitné ochorenia s tvorbou protilátok proti IF alebo proti komplexu IF-Cbl a ďalšie. V porušenom transporte Cbl v organizme

zohrávajú úlohu mutácie génu pre holoTC, vrodený deficit transkobalamínu, poškodenie štruktúry holoTC či vrodené poruchy funkcie lyzozómov, ktoré vedú k nadmernému hromadeniu Cbl v lyzozómoch^(1,3).

Klinické prejavy nedostatku či porušeného metabolizmu kobalamínu závisia od príčiny, dĺžky trvania a veku pacienta, kedy porucha vznikne. V detskom veku sa neurologické prejavy manifestujú väčšinou pred hematologickými, čo platí aj u starších pacientov, u ktorých často až psychiatrické príznaky môžu predbehnúť zmeny v krvnom obraze. U dospelých pacientov s poruchou vstrebávania Cbl býva často prvým rozpoznávaným príznakom makrocytová anémia^(12,13). Pri poruchách metabolizmu kobalamínu na intracelulárnej úrovni v enzýmoch CblA, CblB a čiastočne aj CblD k rozvoju makrocytovej anémie nedochádza z dôvodu neprítomnosti deficitu metylkobalamínu. Uvádza sa, že až 40 % pacientov má prítomné neurologické prejavy nedostatku vitamínu B₁₂ skôr ako zmeny v hematologických parametroch. Tzv. neuroanemický syndróm okrem obrazu anémie dotvárajú rôzne neurologické prejavy, ako parestézie, poruchy hlbokaj citlivosti, zníženie reflexov, závraty. U starších pacientov sú častejšie psychiatrické prejavy: apatia, spavosť, emočná nestálosť, dezorientácia, zmätenosť, demencia a v niektorých prípadoch až depresívna psychóza. U pediatrických pacientov sa najčastejšie vyskytujú zmeny svalového tonusu – hypotonický syndróm, zaostávanie v psychomotorickom vývine, extrapyramídové príznaky, myoklonické kŕče či atrofia zrakového nervu. U časti pacientov sa môžu objaviť aj gastrointestinálne ťažkosti: nechutenstvo, nauzea, vracanie, hnačka a typické zmeny na jazyku – tzv. Hunterov jazyk (vyhladenie papíl jazyka s pálením na hrote a na okrajoch). Nedostatok kobalamínu môže byť príčinou infertility a hypothyroidizmu^(13,14). Hematologické zmeny, ktoré nás upozornia na možný nedostatok kobalamínu sú: makrocytová anémia, leukopénia, hypersegmentácia neutrofilov a trombocytopenia. Z biochemických markerov: znížená alebo normálna koncentrácia celkového vitamínu B₁₂, pokles holotranskobalamínu, zvýšená kyselina metylmalónová v moči, zvýšený homocysteín, zvýšený konjugovaný bilirubín. Avšak ani normálne koncentrácie vitamínu B₁₂ a holoTC nevylučujú porušený metabolizmus Cbl pri súčasne zvýšenej koncentrácii Hcy v plazme a/alebo kyseliny metylmalónovej v moči, je potrebné diferenciálne diagnosticky vylúčiť poruchu metabolizmu Cbl na intracelulárnej úrovni⁽¹⁵⁾. Na základe výsledkov môžeme predpokladať príčinu deficitu Cbl a určiť ďalší diagnostický postup (tabuľka 1).

Selektívne fluktuácie vitamínu B₁₂

Štandardné metódy stanovujú zároveň neaktívnu a aktívnu frakciu vitamínu B₁₂. To znižuje ich senzitivitu a špecifitu pri diagnostike deficitu kobalamínu, pretože selektívne fluktuácie holoHC môžu skresliť reálny stav aktívnej frakcie vitamínu. Tieto fluktuácie sú pozorované pri dedičných deficitoch haptokorínu, v tehotenstve a neutropenických stavoch, keď pacienti majú celkové množstvo B₁₂ znížené, ale netrpia deficitom B₁₂. Naopak, selektívne zvýšenie holoHC s funkčným deficitom Cbl sa vyskytuje pri ochoreniach pečene, zlyhaní obličiek a niektorých malígnych ochoreniach. Stanovenie holoTC, ktorý nie je ovplyvnený fluktuáciami holoHC, je teda senzitívnejším a špecifickejším ukazovateľom funkčného

Tabuľka 1. Diferenciálna diagnostika porúch metabolizmu B₁₂⁽¹⁴⁾

	Celkové B ₁₂	HoloTC	Hcy	MMA	Makrocytová anémia	Test vstrebávania
Deficit v strave	↓	↓	↑	↑	áno	N
Porucha vstrebávania	↓	↓	↑	↑	áno	patol
Deficit CubR	↓	↓	↑	↑	áno	patol
Deficit TCII	N, ↓	↓	↑	↑	áno	N
DMP Cbl A, B, D1	N	N	N	↑	nie	N
DMP Cbl E, G, D2	N	N	↑	N	áno	N
DMP Cbl C, F, D	N	N	↑	↑	áno	N

CubR – kubilínový receptor; **TCII** – transkobalamín; **DMP** – dedičná metabolická porucha; **HoloTC** – holotranskobalamín; **Hcy** – homocysteín; **MMA** – kyselina metylmalónová; **N** – norma; **patol.** – patologický

deficitu vitamínu B₁₂^(16,17,18). Očakávané hodnoty pre holoTC u zdravých jedincov sú 35 – 171 pmol/l. Dolná a horná hranica pre referenčné rozmedzie holoTC v plazme sa pohybuje od 19 do 42 pmol/l, resp. 134 – 157 pmol/l⁽¹⁹⁾. Súčasné multicentrické štúdie navrhujú hraničnú hodnotu pre holoTC 32 pmol/l pre skrining deficitu kobalamínu založený na hodnote kyseliny metylmalónovej > 0,45 μmol/l. Pracovná skupina tvoriaca odporúčania (Guidelines Writing Group) odporúča, aby si jednotlivé laboratória zadefinovali ich vlastné referenčné hodnoty v závislosti od používaného konkrétneho testu pre holoTC alebo implementuje výrobcom odporúčané referenčné rozhranie podľa štúdie, na ktorej bol test vykonaný⁽²⁰⁾. V laboratórnej spoločnosti Medirex je hraničnou hodnotou pre holoTC vyšetřovaný v sére 35 pmol/l⁽²¹⁾. Fyziologické referenčné rozhranie koncentrácie vitamínu B₁₂ v sére je 156 – 672 pmol/l, hodnoty 150 – 300 pmol/l považujeme za tzv. sivú zónu⁽²²⁾. Za vysokú koncentráciu sérového vitamínu B₁₂ považujeme hodnoty nad 701 pmol/l, čo podľa biologických štandardov zodpovedá hornej hranici biologickej normality pri neprítomnosti akéhokoľvek príznaku alebo klinickej anomálie. Vysoké koncentrácie kobalamínu môžu byť vysvetlené týmito patofyziologickými mechanizmami⁽¹⁶⁾: priamy vzostup Cbl v plazme nadbytočným príjmom alebo podaním, uvoľnením zo zásob organizmu, vzostupom transkobalamínov nadbytočnou produkciou alebo nedostatočným klírensom, kvantitatívnym nedostatkom alebo absenciou afinity Cbl k transkobalamínu. Na rozdiel od deficitu kobalamínu patofyziologické pozadie a klinické dôsledky vysokých koncentrácií Cbl v sére boli doteraz veľmi málo študované. V súčasnosti sa predpokladá, že vysoké koncentrácie Cbl môžu byť indikátorom funkčného deficitu s klinickými dôsledkami paradoxne podobnými nedostatku Cbl. Zvýšená väzbovosť Cbl k haptokorínu (holoHC tvorí hlavnú časť cirkulujúceho Cbl) vedie k sekundárne zvýšenej koncentrácii Cbl, má však za následok potenciálne nižšiu väzbovú schopnosť Cbl k transkobalamínu, a tým aj znížený prísun aktívnej formy do buniek. Tento funkčný deficit Cbl so zvýšením homocysteínu a/alebo kyseliny metylmalónovej sa môže objaviť, aj keď počiatočná príčina tohto stavu nie je v deficite Cbl^(16,18). Okrem tohto mechanizmu funkčný deficit Cbl môže byť zapríčinený zlyhaním vychytávania Cbl zo séra poškodenou pečeňou a/alebo unikaním holoHC z pečeneového tkaniva do plazmy⁽²³⁾. Vysoké koncentrácie Cbl sú významne spojené s hematologickými malignitami, alkoholizmom, u pacientov s obličkovými, autoimunitnými a bronchopulmonálnymi ochoreniami^(16,17,18,24). Pri chronickej myelocytovej leukémii je deficit Cbl maskovaný, pretože granulocyty vo zvýšenej miere produkujú haptokorín, a tak zostáva hladina Cbl navonok

v norme. Z ďalších hematologických ochorení je to primárny hypereozinofilný syndróm a akútna promyelocytová leukémia. Lymfoproliferatívne ochorenia sú zriedka príčinou vysokého Cbl, okrem mnohopočetného myelómu, kde môžu byť pozorované aj vysoké, aj nízke koncentrácie Cbl⁽¹⁸⁾. Vysoké koncentrácie Cbl v sére môžu byť sprievodným nálezom pri týchto nádoroch: hepatocelulárny karcinóm, sekundárne pečenevé nádory, nádory prsníka, žalúdka, pankreasu. V prípadoch metastatického postihnutia pečene sú to až extrémne vysoké hodnoty Cbl. Primárnym mechanizmom v procese zvýšenia sérového Cbl v prípade pečenevých nádorov je znížený hepatálny klírens holohaptokorínu a zvýšené plazmatické koncentrácie transkobalamínov v dôsledku zvýšeného rozpadu hepatocytov. Zdá sa, že pokles hepatálneho klírensu je spôsobený slabou vaskularizáciou pečene a redukcii počtu haptokorínových receptorov na povrchu nádorových hepatocytov. V prípade iných solídnych nádorov by mohli vysoké koncentrácie Cbl súvisieť s nadmernou syntézou transkobalamínov alebo so zvýšením haptokorínu v dôsledku indukcie hyperleukocytózy^(18,24). Vysoké koncentrácie Cbl môžu byť v dôsledku akútnej, chronickej hepatitídy či cirhózy pečene, kde hodnoty Cbl môžu byť až päťkrát vyššie ako horná hranica referenčného rozhrania, pričom stupeň zvýšenia Cbl koreluje so stupňom závažnosti cirhózy^(16,24). Renálna insuficiencia predstavuje bežnú a veľmi dôležitú výnimku v interpretácii ukazovateľov stavu kobalamínu. Napriek normálnym či vysokým koncentráciám celkového vitamínu B₁₂ a/alebo holoTC títo pacienti majú často zvýšené sérové koncentrácie kyseliny metylmalónovej a homocysteínu. Pravdepodobnou príčinou je narušená bunková absorpcia holoTC, ktorá vedie k vnútrobunkovému deficitu B₁₂. Možným vysvetlením je úloha obličiek vo filtrácii transkobalamínu a vo výslednej sekundárnej akumulácii holoTC⁽²⁵⁾. Falošne zvýšené sérové koncentrácie kyseliny metylmalónovej a homocysteínu v rámci rôznych klinických stavov sú hlavným obmedzením týchto parametrov. Oba parametre totiž korelujú so sérovými koncentraciami kreatinínu a stúpajú už pri miernej stupni renálnej insuficiencie. Táto dôležitá výnimka vnáša určitú neistotu do využitia holoTC ako markera stavu Cbl u obličkových pacientov a starších ľudí so subklinickým stupňom obličkového poškodenia. Laboratórna diagnostika deficitu Cbl u obličkových pacientov vyžaduje väčšiu pozornosť pri súčasnom vzostupe kyseliny metylmalónovej a holoTC. Hermann a Obeid vo svojej štúdii u pacientov s obličkovou dysfunkciou a u starších pacientov so stredným stupňom obličkového poškodenia odporúčajú vylúčenie deficitu Cbl jedine po substitučnej liečbe Cbl. Ak sa predpokladá deficit Cbl u obličkového pacienta a po liečbe Cbl dôjde k signifikantnému

poklesu kyseliny metylmalónovej (približne o 250 nmol/l), poukazuje to na deficit Cbl. Zvyšný vzostup kyseliny metylmalónovej je dôsledkom obličkovej dysfunkcie⁽²⁶⁾. V tehotenstve je pozorovaný pokles Cbl v sére. Počas fyziologického tehotenstva dochádza k tomuto poklesu o 30 % hlavne v treťom trimestri. V niektorých longitudinálnych štúdiách zdravé ženy vykazovali mierny vzostup v biochemických parametroch nedostatku Cbl (kyselina metylmalónová a homocysteín) v treťom trimestri poukazujúci na funkčný vnútrobunkový deficit Cbl. Koncentrácia holoTC však ostala nezmenená. Pokles v Cbl je vysvetľovaný hlavne poklesom haptokorínu, čo podporuje názor, že holoTC je lepším markerom na hodnotenie kobalamínového statusu u tehotných. Hodnoty Cbl v sére v rozhraní 110 – 148 pmol/l počas tehotenstva môžu byť fyziologické, no sú potrebné ďalšie biochemické testy na potvrdenie jeho deficitu⁽²⁷⁾.

Záver

Štandardné metódy stanovujú súčasne neaktívnu a aktívnu frakciu vitamínu B₁₂ v sére. Holohaptokorín tvorí 70 – 90 % cirkulujúceho vitamínu B₁₂, no predstavuje biologicky neaktívnu, inertnú formu. Len 10 – 30 % z celkového vitamínu B₁₂ tvorí

holotranskobalamín, biologicky dostupná aktívna forma kobalamínu. Vyšetrenie holotranskobalamínu je preto senzitivnejším a špecifickejším ukazovateľom reálneho deficitu kobalamínu v organizme, nielen v rámci diferenciálnej diagnostiky makrocytovej anémie z nedostatočného príjmu či absorpcie kobalamínu, neurologických prejavov bez známkov makrocytovej anémie, či porušeného metabolizmu kobalamínu na intracelulárnej úrovni, ale tiež selektívnych znížení holohaptokorínu pri dedičných deficitoch haptokorínu, v tehotenstve, neutropenických stavoch, ale aj selektívnych zvýšení holohaptokorínu pri ochoreniach pečene a niektorých malígnych ochoreniach.

Použité skratky:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Cbl – kobalamín

CoA – koenzým A

HC – haptokorín

Hcy – homocysteín

holoTC – holotranskobalamín

holoHC – holohaptokorín

IF – vnútorný faktor

RNA – ribonukleová kyselina

LITERATÚRA

1. Oh R, Brown L. Vitamin B12 Deficiency. *Am Fam Physician* 2003; 67(5): 979-986.
2. Callender ST, Denborough MA. A family study of pernicious anaemia. *Br J Haematol* 1957; 3(1): 88-106.
3. Combs GF Jr., McClung JP. Vitamin B12. In: Combs GF, Jr., ed. *The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 5th ed. Academic Press 2017: 431-452.
4. Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull* 2008; 29(2): 5-16.
5. Shane B. Folate, vitamin B12 and vitamin B6. In: Stipanuk MH, ed. *Biochemical, physiological, molecular aspects of human nutrition*, 2nd ed. New York: Saunders 2006: 693-732.
6. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(4): F562-73.
7. Verroust PJ, Christensen EI. Megalin and cubilin – the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(11): 1867-1871.
8. Gropper SAS, Smith J.L, Groff, J.L. *Advanced nutrition and human metabolism*. 5th ed. Australia: Wadsworth/Cengage Learning, 2009.
9. Hyánek, J. Aktivní vitamín B12 (holotranskobalamín) a diagnostický význam jeho stanovení [online]. *Výživa a potraviny*. 2011. <http://www.vy-zivaspol.cz/aktivni-vitamin-b12-holotranskobalamín-a-diagnosticky-vy-znam-jeho-stanovení/> [cit. 20. 04. 2019].
10. Nečas, E. *Obecná patologická fyziologie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2009; 377.
11. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 29; 3: 17040.
12. Honzik T, Adamovicova M, Smolka V, et al. Clinical presentation and metabolic consequences in 40 breastfed infants with nutritional vitamin B(12) deficiency. What have we learned? *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14(6): 488-95.
13. Dali-Youcef N, Andrès E. An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM* 2009; 102(1): 17-28.
14. Fabriciová K., Behúlová D, Škodová J, et al. Poruchy metabolizmu vitamínu B₁₂. *Pediatr Prax* 2012; 13(4): 166-170.

15. Zwickler T, Lindner M, Aydin HI, et al. Diagnostic work-up and management of patients with isolated methylmalonic acidurias in European metabolic centres. *J Inher Metab Dis* 2008; 31(3): 361-367.
16. Andrès E, Serraj J, Zhu J, et al. The pathophysiology of elevated vitamin B12 in clinical practice. *QJM: An International Journal of Medicine* 2013; 106(6): 505-515.
17. Arendt JFB, Nexø E. Cobalamin related parameters and disease patterns in patients with increased serum cobalamin levels. *PLoS One* 2012; 7(9): e45979.
18. Chiche L, Jean R, Romain F, et al. Clinical implications of high cobalamin blood levels for internal medicine. *Rev Med Interne* 2008; 29(3): 187-194.
19. Sobczyńska-Malefora A, Gorska R, Pelisser M, et al. An audit of holotranscobalamin („Active“ B12) and methylmalonic acid assays for the assessment of vitamin B12 status: application in a mixed patient population. *Clin Biochem* 2014; 47(1-2): 82-86.
20. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM, et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014; 166(4): 496-513.
21. Nexø, E., Hoffmann- Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): 359-365.
22. Axis-Shield. Clinical utility – correlation between active-B12 and total B12. [online]. Active-B12. 2014. Dostupné na: <https://www.active-b12.com/clinical-utility/>. [cit. 20. 04. 2019].
23. Solomon, LR: Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 2007; 21(3): 113-130.
24. Ermens AA, Vlasveld LT, Lindemans J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clin Biochem* 2003; 36(8): 585-590.
25. Obeid R, Kuhlmann M, Kirsch C, et al. Cellular uptake of vitamin B12 in patients with chronic renal failure. *Nephron Clin Pract* 2005; 99: 42-48.
26. Herrmann W, Obeid R. Holotranscobalamin – An Early Marker for Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *European Haematology* 2009; 3(1): 7-11.
27. Greibe E, Andreasen BH, Lildballe DL, et al. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11): 1877-1882.



MUDr. Eva Joppová, PhD.

Hematológia a transfúziológia, Medirex, a. s.
Magnezitárska 2/C, 040 01 Košice
e-mail: eva.joppova@medirex.sk

Úloha imunitnej odpovede v prognóze kolorektálneho karcinómu

Dávid Kocan, Pavel Babál

Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Aplikovanie imunoterapie v jednom z najčastejších onkologických ochorení, kolorektálnom karcinóme (CRC), nie je v súčasnosti jednoznačne stanovené. Predkladaná práca sa zaoberá problematikou imunohistochemického stanovenia expresie kontrolného bodu imunitnej odpovede PD-1/PD-L1 (programmed cell death-1/programmed cell death-ligand-1) a jeho významom pre prognózu tohto ochorenia. Základnou otázkou je účinnosť imunoterapie inhibítormi kontrolných bodov po stanovení miery expresie PD-1/PD-L1 a konfrontovanie doteraz publikovaných poznatkov o efektívite liečby CRC s efektivitou imunoterapie u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) a ďalšími histologickými typmi solídnych nádorov. Viaceré práce poukazujú, že na posúdenie efektivity stanovenia expresie PD-1/PD-L1 a šandardizácie imunoterapie je potrebné zahrnúť ďalšie faktory – prediktory pre odhad terapeutickú odpovede imunoterapie pri CRC. V rámci objektivizácie je nutné ďalšie sledovanie efektivity v klinických štúdiách s väčším súborom pacientov a väčším súborom unifikovaných premenných. Podrobnejšia stratifikácia súboru pacientov je vhodná aj preto, aby bolo možné preukázať opodstatnenie imunoterapie na účely získania súhlasu pre konkrétny typ imunoterapeutika.

Kľúčové slová: kolorektálny karcinóm, imunoterapia, PD-1/PD-L1, kontrolný bod imunity, prognóza

The role of the immune response in the prognosis of colorectal cancer

Application of immunotherapy in one of the most frequent oncological diseases, colorectal cancer (CRC), has not been defined up today. The review reflects the status of immunohistochemical determination of the expression of immune response checkpoint PD-1/PD-L1 (programmed cell death-1/programmed cell death-ligand-1) and its significance for the prognosis of this disease. The available data on CRC immunotherapy are compared with the current results regarding immunotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) and other types of solid tumours. Several studies imply that for the effectivity of assessment of PD-1/PD-L1 expression determination and immunotherapy standardization, additional predictive factors for the therapeutic response of CRC immunotherapy should be included. Monitoring the effectivity of CRC immunotherapy in clinical studies with large sets of patients and the inclusion of defined variables is required. More specific stratification of patient sets is important in support for the substantiation of immunotherapy approval of particular immunotherapeutic agents.

Keywords: colorectal cancer, immunotherapy, PD-1/PD-L1, immune checkpoint, prognosis

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 90 – 93

Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) predstavuje v súčasnosti závažný epidemiologický problém z hľadiska morbidita a mortality tohto onkologického ochorenia v slovenskej populácii. Na túto skutočnosť reaguje aj implementovaný Národný onkologický program Slovenskej republiky, ktorý zahŕňa od roku 2019 populačný skrining CRC u osôb medzi 50. a 70. rokom života, s cieľom zlepšenia kontroly, sekundárnej prevencie a nadväzujúcej liečby tohto nádorového ochorenia. Práve v rámci ďalšieho overovania terapeutických možností v súčasnosti prebieha diskusia o účinnosti a efektívite imunoterapie tzv. checkpoint inhibítormi u pacientov s CRC.

Mechanizmy protinádorovej imunitnej odpovede

Imunitné odpovede proti nádorom majú spoločné črty s odpoveďou na cudzorodé antigény vrátane infekčných agensov. Vrodené mechanizmy imunity rozpoznávajú špecifické tumorové antigény na povrchu buniek nádoru mechanizmom, ktorý je podobný rozlíšeniu antigénov cudzorodých pre telo. NK-bunky rozpoznávajú nedostatok MHC-I molekúl na povrchu buniek nádoru a zapájajú sa do imunitných odpovedí aktívnym odstraňovaním týchto buniek a aktiváciou

subpopulácií buniek prostredníctvom uvoľňovania cytokínov. Takto aktivované makrofágy a dendritické bunky fagocytujú nádorové bunky a následne prezentujú ich antigény na svojom povrchu, čím aktivujú špecifickú cytolytickú odpoveď sprostredkovanú T-bunkami. Tieto efektorové T-bunky sa klonálne šíria s cieľom úplného odstránenia nádoru. Nádorové bunky preto v reakcii na imunitnú odpoveď podstupujú proces selekcie smerom k bunkám, ktoré majú schopnosť uniknúť imunitnému dohľadu prostredníctvom týchto mechanizmov: znížená imunogenita, expresia vysokoimunopresívneho mikroprostredia a stimulácia mikroprostredia bohatého na faktory podporujúce získavanie živín, angiogenéza a prestavba medzibunkovej hmoty⁽¹⁾.

Malígne bunky – mechanizmy úniku spod imunitného dohľadu

Nádorové bunky uplatňujú viacero stratégií, na základe ktorých sa snažia uniknúť kontrole imunitného systému. Dosiahnu to najmä maskovaním svojho špecifického nádorového antigénu, ktorý by bol rozpoznateľný imunitným systémom. Ďalej imunogenita nádorovo transformovaných buniek je účinne znižovaná mutáciami v génoch kódujúcich

nádorové antigény. Možno pozorovať aj pokles, respektíve stratu MHC molekúl nevyhnutných pre prezentáciu nádorových antigénov T-lymfocytom. Samotné celulárne zložky imunity sú využívané nádorovými bunkami. Aktivácia T-lymfocytov je sprostredkovaná cez TCR-receptor (**obrázok 1**), ktorý interaguje s antigénom naviazaným na molekulu MHC na bunkách prezentujúcich antigén. Tento signál zaisťuje špecifitu odpovede, ale na samotnú aktiváciu T-lymfocytov nepostačuje. Ako tzv. kostimulačný signál slúži interakcia molekuly CD28 a receptora B7 na APC. Nedostatočná sila kostimulačného signálu spôsobí funkčnú inaktivitu (anergiu) týchto buniek imunity. Anergénne T-lymfocyty nemajú schopnosť produkovať aktivačné cytokíny, čo bráni ich dozrievaniu na efektorové bunky. Rozsah imunitnej odpovede je tiež závislý od interakcie ďalších receptorov a ligandov, ktoré amplifikujú alebo, naopak, tlmi procesy aktivácie T-lymfocytov. Signifikantnou inhibičnou dráhou, ktorá navodzuje inaktivitu lymfocytov je PD-1/PD-L1 a ktorá je považovaná za kontrolný bod imunitného systému, tzv. checkpoint, a vo všeobecnosti táto dráha ochraňuje pred vznikom autoimunitných ochorení. Zvýšená aktivita inhibičnej PD-1/PD-L1 dráhy môže vyvolať funkčné postihnutie efektorových T-lymfocytov a spôsobiť ich vyčerpanie, tzv. exhausting. Takéto T-lymfocyty následne nie sú schopné špecifickej cytotoxikkej odpovede a cielenej deštrukcie buniek⁽²⁾.

PD-1 receptor a jeho expresia

PD-1 je transmembránový glykoproteín patriaci do rodiny proteínov CD28/B7 regulujúci aktivitu T-lymfocytov. Nachádza sa predovšetkým na aktivovaných T- a B-lymfocytoch, NK-bunkách, dendritických bunkách a na lymfocytoch infiltrujúcich tumor (TIL). Najdôležitejšiu funkciu zastáva ako inhibičný receptor na T-lymfocytoch. Aktivovaný T-lymfocyt exprimuje PD-1 na svojom povrchu po rozpoznaní antigénu a produkuje interferóny, ktoré indukujú expresiu PD-1 v rôznych tkanivách. Viazanie PD-1 s jeho ligandom limituje aktivitu T-bunky⁽³⁾.

Ligandy PD-L1 a PD-L2 a ich expresia

Ligand receptora programovanej bunkovej smrti PD-L1, taktiež označovaný CD274 alebo B7-H1, je transmembránový

proteín, ktorý hrá podstatnú úlohu v blokáde imunitných mechanizmov pri procesoch ako kancerogenéza, autoimunitné ochorenia, ale aj gravidita. Identifikovaný bol na CD4+ a CD8+ T-bunkách, dendritických bunkách, makrofágoch, T-regulačných lymfocytoch, epitelových bunkách, endoteli, na bunkách imunitne privilegovaných miest, ako je fetoplacentárna bariéra, a na väčšine nádorových buniek. Nádorové tkanivo často vykazuje zvýšenú hladinu PD-L1, ktorú nachádzame v lokálne ohraničených oblastiach na povrchu buniek a je pravdepodobné, že napomáha vznik nádorovej tolerance⁽⁴⁾.

Klinický význam stanovenia kontrolného bodu PD-1/PD-L1 v CRC

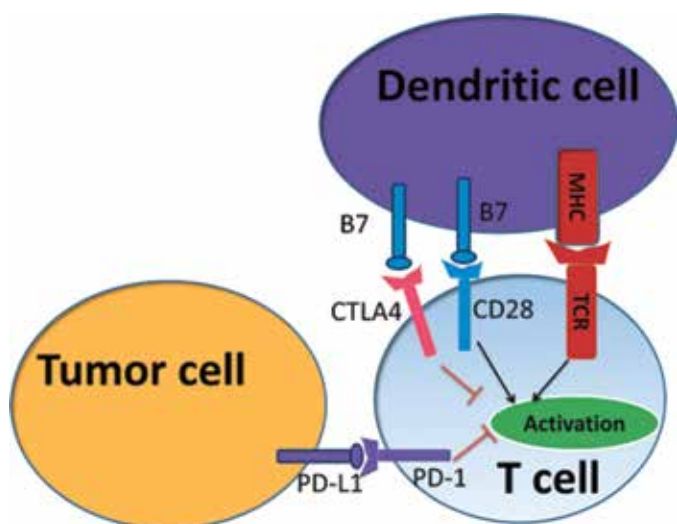
Cielená imunoterapia vyvíjaná s cieľom selektívnej inhibície PD-1/PD-L1 kontrolného bodu imunity sa snaží potenciovať schopnosť organizmu rozpoznať a deštruovať nádorové bunky, a tým prináša nový prístup v liečbe pre vybraných pacientov s CRC. V súčasnosti je na trhu 5 monoklonálnych protilátok proti PD-1/PD-L1, ktoré registruje U.S. Food and Drug Administration (FDA), respektíve European Medicines Agency (EMA), s cieľom indikácií imunoterapie v klinickom skúšaní a demonštruje ich účinnosť zlepšenou terapeutickou reakciou. Ide o atezolizumab, avelumab, durvalumab, nivolumab a pembrolizumab. Hoci skúmanie efektivity tohto typu imunoterapie sa rapídne vyvíja, nejasným zostáva definovanie úrovne a rozsahu exprese PD-L1 vo vzorkách nádorov, ktorá by pomohla lepšie identifikovať pacientov, ktorí budú najviac profitovať z daného spôsobu liečby. Práve takto sú kreované testy na detekciu exprese PD-L1 na nádorových bunkách a/alebo bunkách imunity nachádzajúcich sa v mikroprostredí nádoru⁽⁵⁾.

Overman a spol.⁽⁶⁾ publikovali výsledky druhej fázy štúdie CheckMate 142 (NCT02060188), v ktorej bola študovaná efektivita a bezpečnosť terapie nivolumabu v kombinácii s ipilimumabom u pacientov s metastatickým mismatch-repair deficitným CRC alebo CRC s chromozómovou instabilitou (dMMR/MSI-H). Výsledky ukázali, že nivolumab a ipilimumab potencujú prežívanie bez progresie (PFS) a celkové prežívanie (OS) v 12-mesačnom sledovaní a sú sľubnou novou liečebnou modalitou pre pacientov s dMMR/MSI-H mCRC.

Štúdia s označením NCT01988896 hodnotila účinok kombinácie atezolizumabu a kobimetinibu vo fáze Ib pri metastatickom CRC. Do štúdie boli zahrnutí jedinci s refraktérnym CRC proti chemoterapii a pacienti s lokálne pokročilým metastatickým CRC. Testovaná terapeutická kombinácia ukázala priaznivý bezpečnostný profil a objektívna odpoveď pozorovaná u pacientov s MSS/MSI-low metastatickým CRC priniesla benefit z tejto novej terapeutickkej kombinácie v subpopulácii pacientov refraktérnych na chemoterapiu⁽⁷⁾.

Toh a spol.⁽⁸⁾ hodnotili potenciál imunoterapie na základe dostupných publikácií z medicínskych databáz, posudzujúc PD-1/PD-L1 v nádorovom mikroprostredí. Prostredníctvom klinických štúdií, ktoré hodnotili PD-1 inhibítory, sa snažili verifikovať predpoklad, že imunoterapia s použitím PD-1 inhibítora je vhodná aj pre CRC. Z ich zistení vyplýva, že imunoterapia s využitím PD-1 inhibítora prináša potenciálny benefit u pacientov s MSI-H CRC, nejestvuje však jednoznačný dôkaz, že tento typ terapie je vhodný a prináša benefit pre pacientov s MSS CRC. Ďalším limitom, ktorý autori pomenovali,

Obrázok 1. Signalizačná dráha kontrolného bodu imunity u nádorových buniek⁽¹⁸⁾



bolo, že neboli zahrnuté do porovnania štúdie s metastatickým CRC⁽⁸⁾. Silnú protinádorovú aktivitu pembrolizumabu u liečených pacientov s MSI-H CRC potvrdili ďalšie štúdie⁽¹⁰⁾.

Koganemaru a spol.⁽⁹⁾ posudzovali prognostický význam PD-L1 expresie u pacientov v III. štádiu CRC a hlavným cieľom bolo vyhodnotiť vzťah medzi PD-L1 statusom, nádorovým mikroprostredím a klinickopatologickými charakteristikami III. štádia. Na stanovenie PD-L1 bola použitá monoklonálna protilátka SP142 a ako hranica pre skórovanie nízkej, respektíve vysokej expresie bolo stanovených 5 % pozitívnych buniek. Pacienti s vysokou úrovňou expresie PD-L1 na nádorových bunkách mali signifikantne kratší čas prežívania bez choroby oproti pacientom s vysokou úrovňou detegovanej expresie PD-L1 na bunkách infiltrujúcich tumor (TIMC), kde bol trend opačný. Čo sa týka posúdenia PD-L1 expresie vo vzťahu ku klinickopatologickej charakteristike, nádory s vysokou mierou expresie PD-L1 boli spájané s väčším počtom metastáz v lymfatických uzlinách a pokročilejším TNM-stagingom. Autori teda dospeli k záveru, že vysoká úroveň expresie PD-L1 na nádorových bunkách je preukázateľne asociovaná so zlou prognózou, naproti tomu vysoká úroveň expresie PD-L1 na TIMC je asociovaná s dobrou prognózou⁽⁹⁾.

Imunohistochemické stanovenie expresie PD-L1

V rámci hodnotenia expresie PD-1/PD-L1 prostredníctvom IHC je PD-L1 jedným z najdôležitejších a zároveň najviac študovaným membránovým ligandom. Súhlas vydaný FDA liečiť pacientov s metastatickým NSCLC pembrolizumabom, pričom indikácia tejto terapie je založená na IHC testovaní práve PD-L1 expresie, viedol k exponenciálnemu nárastu v testovaní metódou IHC prostredníctvom viacerých PD-1/PD-L1 protilátok. Súhrnne sú dostupné viaceré anti-PD-L1 protilátky a IHC metodiky: Dako 22C3, Dako 28-8, Ventana SP263, Ventana SP142. Terapeutickým cieľom je buď PD-1 receptor na nádorových bunkách (pembrolizumab a nivolumab), alebo PD-L1 ligand na T-bunkách (durvalumab a atezolizumab). Chyby pri spracovaní vzoriek, heterogenita nádoru alebo testovanie vzoriek tkanív získaných v čase diagnózy, uprednostnené pred testovaním v čase progresie alebo relapsu, môže podhodnotiť alebo, naopak, nadhodnotiť percentuálny podiel nádorových buniek vykazujúcich PD-L1 expresiu. Úroveň expresie PD-L1 je dynamická a môže sa meniť po cielenej liečbe a/alebo chemoterapii, respektíve rádioterapii⁽¹¹⁾.

Ostatné typy nádorov a ich reakcia na liečbu immune checkpoint inhibítormi

Ipilimumab, teda anti-CTLA-4 protilátka (CTLA4ab), bol povolený FDA s cieľom liečby metastatického melanómu v roku 2011. Následne bol udelený súhlas pre anti-PD-1 protilátky (PD1ab) pembrolizumab a nivolumab v roku 2014. Okrem uvedeného liečba s PD1ab je v súčasnosti využívaná pre viaceré pokročilé malignity: NSCLC, urotelové malignity, renálne karcinómy (RCC), skvamózne karcinómy hlavy a krku (SCCHN), karcinóm žalúdka, hepatocelulárny karcinóm a klasický Hodgkinov lymfóm (cHL). Monoklonálne protilátky namierené proti PD-L1 (PD-L1ab) atezolizumab (s využitím pri urotelovom karcinóme a NSCLC), durvalumab (urotelový karcinóm), avelumab (karcinóm z Merkelových buniek a urotelový karcinóm) taktiež registrovala FDA. V roku 2017 FDA tiež udelila súhlas viazaný s biomarkerom v podobe

preukázaného mismatch repair deficitu (dMMR) pre pembrolizumab u pacientov s neresekovateľnými alebo metastatickými solídnymi nádormi a pre CRC s vysokou mierou mikrosatelitovej instability (MSI-H) alebo dMMR. Napriek enormnému pokroku v nasadzovaní imunoterapeutík v rámci onkologickej terapie odpoveď na ňu sa líši v jednotlivých typoch nádorov a jednotlivými skupinami pacientov. Pri melanóme PD1ab monoterapiu môže dosahovať odpoveď na úrovni medzi 26 – 32 % a pri kombinácii PD1ab a CTLA4ab dosahuje odpoveď na úrovni viac ako 60 %. Vybrané podskupiny pacientov dosahujú pretrvávajúcu terapeutickú reakciu pri PD1ab monoterapii a nevyžadujú kombinovanú imunoterapiu, a teda sú v značnej miere chránení pred nežiaducimi účinkami tejto liečby. Tieto skutočnosti poukazujú na potrebu nájsť relevantné biomarkery, ktoré pomôžu identifikovať skupinu pacientov, pre ktorých tento typ liečby bude benefitom, a zároveň pre pacientov primárne rezistentných⁽¹²⁾.

Hodgkinov lymfóm

Genetické zmeny v rámci lokusu pre PD-L1/PD-L2 (9p24.1) vymedzujú biologické správanie cHL. Expresia PD-L1 na Reedovej-Sternbergových bunkách cHL a zároveň PD-L1 expresia v mikroprostredí lymfómu vyúsťujú do neefektívnej protinádorovej odpovede a predstavujú tak cHL vhodným cieľom pre blokádu PD-1. PD1ab nasadené v monoterapii sú efektívne a dobre tolerované pacientmi s relabujúcim alebo refraktérnym (rel/ref) cHL, pričom väčšina pacientov vykazovala objektívnu odpoveď (približne dve tretiny pacientov) a medián trvania odpovede bol 16,6 mesiaca. Na základe týchto údajov bol nivolumab a pembrolizumab schválený FDA na účely liečby pokročilého rel/ref cHL⁽¹³⁾.

Nádory z germinatívnych buniek testes

Na podklade objavu nových biomarkerov asociovaných s imunitou boli realizované aj štúdie na potvrdenie úlohy signalizácie PD-1/PD-L1 v germinatívnych nádoroch testes (GCT). Seminómy aj nonseminómové GCT vykazovali významnú expresiu PD-L1⁽¹⁴⁾. Pacienti s nízkou úrovňou expresie PD-L1 mali značne lepšie PFS a OS. Naproti tomu expresia PD-L1 na lymfocytoch infiltrujúcich tumor (TIL) poskytovala vysokú predikciu výsledku v obrátenom zmysle. Nádory s vysokou PD-L1 expresiou na TIL mali preukázateľne lepšiu prognózu ako tie s nízkou PD-L1 expresiou na TIL⁽¹⁵⁾.

Glioblastóm

Glioblastóm predstavuje najčastejší primárny malígny tumor mozgu, vykazujúci črty imunosupresie v nádorovom mikroprostredí, pričom pre rekurentný nádor nie je dostupná štandardná liečba. V štúdií NCT01375842 sa sledovala bezpečnosť a efektivita liečby atezolizumabom (anti-PD-L1 protilátka) pri rekurentnom glioblastóme. Dlhšie prežívanie bolo spojené so zvýšeným podielom CD4+ T-buniek v nádoroch. Tieto údaje naznačujú, že biomarkery ako CD4+ T-lymfocyty a hypermutovaný status nádoru môžu pomôcť k selekcii pacientov, ktorí môžu potenciálne profitovať z liečby atezolizumabom⁽¹⁶⁾.

Malígny melanóm a nádory uropoetického traktu

I. fáza štúdie NCT02836795 sledovala bezpečnosť, tolerabilitu a biologickú aktivitu JS001 IgG4 humanizovanej

monoklonálnej anti-PD-1 protilátky pri pokročilom melanóme a nádoroch uropoetického traktu, ktoré boli refraktérne proti štandardnej systémovej terapii. Klinická reakcia bola okrem iného korelovaná s PD-L1 expresiou na nádorových bunkách a prítomnosťou TIL. Monoklonálna protilátka JS001 bola dobre tolerovaná a preukazovala sľubnú antitumoróznú aktivitu v urotelovom a renálnom karcinóme, rovnako aj v akrálnych a mukózných melanómoch predtým nepreskúmaných⁽¹⁷⁾.

Záver

Na základe súčasného stavu znalostí nemožno jednoznačne určiť efektivitu stanovovania PD-1/PD-L1 proteínov pre predikciu terapeutického účinku imunoterapie a pre ďalšie prežívanie pacientov s CRC. Dostupný je len početnosťou malý súbor pacientov v doterajších klinických štúdiách, kde bola sledovaná účinnosť imunoterapie vo vzťahu k stanovennej miere expresie PD-1/PD-L1. Nebola určená hranica (cutoff) pre úroveň vysokej miery expresie týchto proteínov, či už na nádorových bunkách, alebo bunkách imunity

vo vzorke CRC. Nemožno spoľahlivo posúdiť, či indikovaná imunoterapia prináša benefit v podobe celkového prežívania či prežívania bez progresie. Ukazuje sa, že na účely štandardizácie je potrebné zahrnúť ďalšie prediktory odhadu terapeutického odpovede imunoterapie pri CRC. Pozitívnym prediktorom sa javí MSI-H status, keďže súbor pacientov s overeným MSI-H statusom, zdá sa, najviac profituje z anti-PD-1/PD-L1 terapie. Zároveň je vhodné rozšíriť súbor definovaných premenných v rámci stratifikácie pacientov (vek pacientov, klinické štádium, RAS status, MSS vs MSI-H status, imunoscóre). Je dôležité určiť, či bude prebiehať testovanie expresie iba na nádorových bunkách alebo bude hodnotená aj expresia na TIL, pričom sa vychádza z faktu, že úroveň expresie PD-1 koreluje s úrovňou expresie PD-L1. Ďalší výskum ukáže, aké bude postavenie imunoterapie v manažmente CRC, t. j., či pôjde o kombináciu s chemoterapeutikami alebo externou rádioterapiou, alebo bude nasadená ako druholíniová liečebná modalita.

Podakovanie: Práca vznikla s podporou grantu APVV-14-0318.

LITERATÚRA

1. Markman JL, Shiao SL. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 2015; 6(2): 208-223. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2014.077.
2. Zatloukalová P, Pjehová M, Babčanová S, a spol. The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway in Antitumor Immune Response. *Klinická onkologie* 2016; 29(Suppl 4): 4S72-4S77. doi:10.14735/amko20164S72.
3. Zak KM, Kite R, Przetocka S, et al. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* (London, England: 1993) 2015; 23(12): 2341-2348. doi:10.1016/j.str.2015.09.010.
4. Wang Z, Zhang C, Liu X, et al. Molecular and clinical characterization of PD-L1 expression at transcriptional level via 976 samples of brain glioma. *Oncoimmunology* 2016; 5(11). doi:10.1080/2162402X.2016.1196310.
5. Udall M, Rizzo M, Kenny J, et al. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagnostic Pathology* 2018; 13. doi:10.1186/s13000-018-0689-9.
6. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability – high colorectal cancer (CheckMate 142): results of an open-label, multicentre, phase 2 study: results of an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet Oncology* 2017; 18(9): 1182-1191. doi:10.1016/S1473-0455(17)30422-9.
7. Bendell JC, Bang Y-J, Chee CE, et al. A phase Ib study of safety and clinical activity of atezolizumab (A) and cobimetinib (C) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology* 2018; 36(Suppl 4): 560-560. doi:10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.560.
8. Toh JWT, de Souza P, Lim SH, et al. The Potential Value of Immunotherapy in Colorectal Cancers: Review of the Evidence for Programmed Death-1 Inhibitor Therapy: Review of the Evidence for Programmed Death-1 Inhibitor Therapy. *Clinical Colorectal Cancer* 2016; 15(4): 285-291. doi:10.1016/j.clcc.2016.07.007.
9. Koganemaru S, Inoshita N, Miura Y, et al. Prognostic value of programmed death-ligand 1 expression in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer Science* 2017; 108(5): 853-858. doi:10.1111/cas.13229.
10. Diaz LA, Marabelle A, Delord J-P, et al. Pembrolizumab therapy for microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer (CRC) and non-CRC. *Journal of Clinical Oncology* 2017; 35(Suppl 15): 3071-3071. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3071.
11. Marginean EC, Melosky B. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? Part II-The Challenge of Programmed Death Ligand-1 Testing and Its Role in Microsatellite Instability-High Colorectal Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2018; 142(1): 26-34. doi:10.5858/arpa.2017-0041-RA.
12. Buder-Bakhaya K, Hassel JC. Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment - A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Frontiers in Immunology* 2018; 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01474.
13. Herrera AF. Where does PD-1 blockade fit in HL therapy? *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2018/11/30; 2018(1): 213-220. doi:10.1182/asheducation-2018.1.213.
14. Chovanec M, Cierna Z, Miskovska V, et al. Prognostic role of programmed-death ligand 1 (PD-L1) expressing tumor infiltrating lymphocytes in testicular germ cell tumors. *Oncotarget* 2017; 28; 8(13): 21794-21805.
15. Chovanec M, Albany C, Mego M, et al. Emerging Prognostic Biomarkers in Testicular Germ Cell Tumors: Looking Beyond Established Practice: Looking Beyond Established Practice. *Frontiers in Oncology* 2018; 8. doi:10.3389/fonc.2018.00571.
16. Lukas RV, Rodon J, Becker K, et al. Clinical activity and safety of atezolizumab in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology* 2018; 140(2): 317-328. doi:10.1007/s11060-018-2955-9.
17. Tang B, Yan X, Sheng X, et al. Safety and clinical activity with an anti-PD-1 antibody JS001 in advanced melanoma or urologic cancer patients. *Journal of Hematology & Oncology* 2019; 12(1): 7. doi:10.1186/s13045-018-0693-2.
18. Guan J, Lim KS, Mekhail T, et al. Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in the Programmed Death Receptor-1 (PD-1)/PD-L1 Blockade. A Key Player Against Various Cancers. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2017; 141(6): 851-861. doi: 10.5858/arpa.2016-0361-RA.



prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.
Ústav patologickej anatómie LF UK
Sasinkova 4, 813 72 Bratislava
e-mail: pavel.babal@fmed.uniba.sk

Nešpecifické črevné zápal: príčiny straty odpovede pacientov na biologickú liečbu

Ingrid Lojová¹, Zuzana Kubiritová^{1,2}

¹Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

²Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Nešpecifické črevné zápal patria medzi autoimunitné ochorenia gastrointestinálneho traktu, ktoré sa vyznačujú chronickým zápalom. Predpokladá sa, že v patogenéze ide o prepojenie imunologických, mikrobiologických a genetických faktorov, pričom veľkú úlohu zohráva taktiež prostredie. Výskyt tohto ochorenia neustále stúpa a konvenčná terapia nie je dostatočne účinná, preto sa do praxe začali zavádzať liečivá nazývané biologická terapia. Tie na rozdiel od konvenčných terapeutík nepôsobia systémovo, ale sú cielené proti špecifickým cytokínom, ktoré sa zúčastňujú na zápalových procesoch. Biologická liečba je účinnou stratégiou v liečbe viacerých autoimunitných ochorení, ktorá umožňuje navodiť a udržať remisiu ochorenia a tiež významne zlepšiť kvalitu života pacientov s Crohnovou chorobou a ulceróznou kolitídou. Isté percento pacientov však vôbec nereaguje alebo po čase stratí odpoveď na tento typ liečby. Táto práca poskytuje stručný prehľad príčin, pre ktoré môže dochádzať k stratám odpovede na biologickú terapiu, konkrétne na anti-TNF terapiu.

Kľúčové slová: biologická liečba, jednonukleotidové polymorfizmy, nešpecifické črevné zápal, strata odpovede na anti-TNF- α liečbu, TNF- α

Inflammatory bowel disease: causes of the loss of patient's response to biologic therapy

Inflammatory bowel diseases are autoimmune diseases of the gastrointestinal tract characterized by chronic inflammation. Currently, it is supposed that in the pathogenesis, there is a link between immunological, microbiological, genetics, and also environmental factors. The incidence of inflammatory bowel diseases is increasing, and conventional therapy is not fully effective. Therefore new methods of treatment have been introduced, summarily referred to as biological therapy. These drugs, in contrast with conventional therapy, does not act systemically, but they are rather targeted against specific cytokines, which are involved in inflammatory processes. Biological treatment is an effective strategy for treating multiple autoimmune diseases, which can induce and even maintain the remission of the disease, and the quality of life of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis can be significantly improved. However, a certain percentage of patients do not respond or lose response to this type of treatment over time. This paper provides a brief overview of the reasons for loss of clinical response among patients receiving biologics, namely to anti-TNF therapy.

Keywords: biological therapy, single nucleotide polymorphisms, inflammatory bowel diseases, nonresponse to anti-TNF- α , TNF- α

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 94 – 98

Úvod

Nešpecifické črevné zápal (IBD, *Inflammatory bowel disease*) sú autoimunitné ochorenia, ktoré patria do skupiny idiopatických črevných zápalov a zahŕňajú 2 formy: Crohnovu chorobu (*Crohn disease*, CD) a ulceróznou kolitídu (*ulcerative colitis*, UC). CD postihuje ktorúkoľvek časť gastrointestinálneho traktu, zatiaľ čo pri UC je postihnuté len hrubé črevo a oblasť konečníka. Obe tieto ochorenia predstavujú závažný medicínsky problém s celosvetovo rastúcou incidenciou⁽¹⁾ (**obrázok 1**).

Medzi symptómy pacientov, ktorí trpia IBD, patria najmä hnačky, bolesti brucha, krvavá stolica a vracanie. U mnohých boli pozorované poruchy funkcie črevnej epiteliálnej bariéry a mikrobiálna dysbióza⁽³⁾. V súčasnosti toto ochorenie nie je vyliečiteľné, terapia však pozostáva z liečby symptómov s cieľom indukovať a následne udržať stav remisie, a teda zlepšiť kvalitu života pacienta. Využíva sa kombinácia rôznych liekov, predovšetkým aminosalicyláty, imunomodulačné

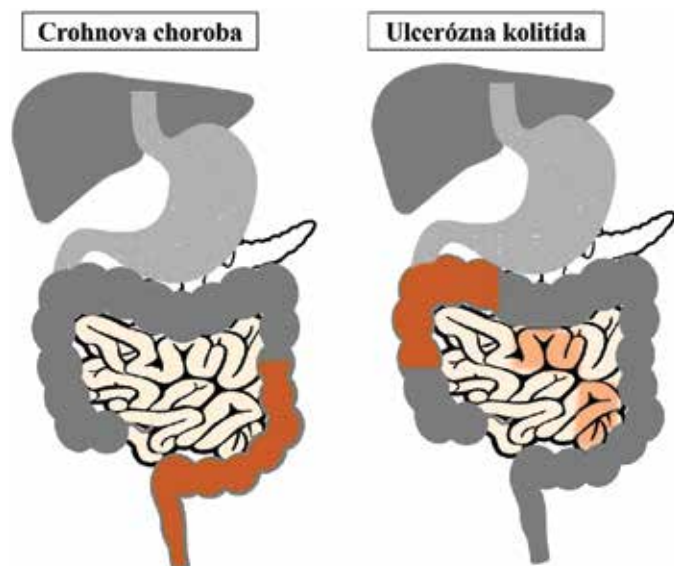
látky a kortikosteroidy, pričom v mnohých prípadoch je potrebné aj podanie antibiotík či chirurgický zákrok.

Spomínané medikamenty pôsobia systémovo a vyznačujú sa rôznymi nevýhodami, ako je napríklad dlhý čas nástupu protizápalového účinku alebo závažné nežiaduce účinky. Aj na základe týchto poznatkov bola vytvorená biologická terapia, ktorej látky pôsobia lokálne a cielenie inhibujú molekuly, ktoré sa podieľajú na zápalových procesoch. Patria tu predovšetkým schválené terapie proti TNF (faktor nekrotizujúci tumor, *tumor necrosis factor*), ale aj látky blokujúce napríklad integríny (natalizumab, vedolizumab) či interleukíny IL – (12/23) (ustekinumab). Napriek tomu, že ide o účinné lieky, existuje pomerne veľa pacientov, ktorí na túto liečbu nereagujú vôbec alebo stratia odpoveď počas liečby^(4,5). Práve preto je potrebné a zaujímavé zistiť, aké konkrétne genetické zmeny existujú medzi pacientmi, ktorí majú na túto terapiu pozitívnu odpoveď, a tými, ktorí vykazujú stratu odpovede.

Anti-TNF-alfa biologická liečba

Na základe poznatkov z veľkých asociačných štúdií (GWAS, *genome-wide association studies*), ktoré sa zaoberali identifikáciou rizikových lokusov pre zápalové črevné ochorenia, sa podarilo identifikovať biologické dráhy a poruchy v konkrétnych génoch, ktoré sa týkajú zápalového procesu⁽⁶⁾. Vďaka tomu bolo možné vytvoriť liečivá, ktoré cielene inhibujú konkrétne molekuly. Jednou takouto molekulou je aj prozápalový cytokín TNF. TNF je známy tým, že podporuje zápalovú odpoveď pri rôznych ochoreniach vrátane reumatoidnej artritídy, ankylozujúcej spondylitídy, CD, UC a psoriázy, pričom bolo dokázané, že príznaky týchto porúch sa zlepšujú pri liečbe inhibítormi TNF.

Obrázok 1. Nešpecifické črevné zápaly. Schéma znázorňuje časť tráviacej sústavy s dôrazom na rozdielny výskyt zápalu medzi dvoma formami IBD. Oranžové oblasti znázorňujú zápal a sivé oblasti zdravé tkanivo. Vľavo je znázornené postihnutie CD, kde môžeme vidieť, že poškodená je oblasť tenkého aj hrubého čreva, zatiaľ čo vpravo je znázornené postihnutie UC a defektnou oblasťou je len hrubé črevo⁽²⁾.



V rámci biologickej liečby sa v súčasnosti na liečbu IBD používajú štyri anti-TNF molekuly: infliximab, adalimumab, certolizumab pegol a golimumab^(7,8) (**obrázok 2**). Mechanizmus pôsobenia anti-TNF prebieha dvoma rôznymi spôsobmi. Prvý mechanizmus pôsobí na základe indukcie apoptózy T-buniek. Tento mechanizmus účinku je spoločný pre infliximab, adalimumab a certolizumab⁽²⁶⁾. V druhom mechanizme sa anti-TNF viaže na transmembránový TNF, pričom je Fc časť protilátky rozpoznávaná Fc receptormi, ktoré sa nachádzajú na monocytoch. Tento mechanizmus je špecifický pre anti-TNF molekuly, ktoré obsahujú Fc oblasť, preto je v prípade certolizumabu nemožný⁽²⁷⁾.

Strata odpovede na biologickú liečbu

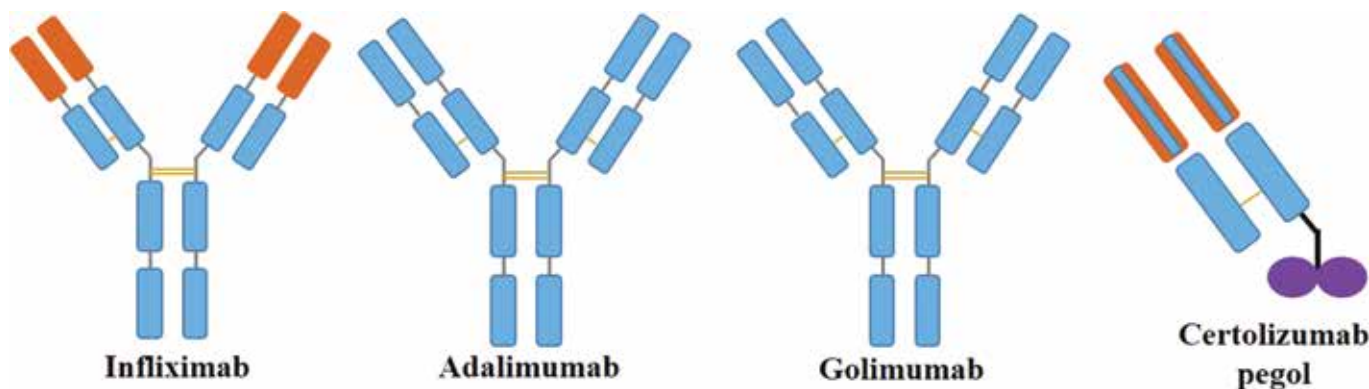
Antagonisty TNF- α sú účinné lieky, ktoré zlepšujú kvalitu života pacientov s IBD, znižujú počet operácií a hospitalizácií. Napriek tomu približne 10 – 30 % pacientov nereaguje na indukčnú terapiu (primárna strata odpovede) a 23 – 46 % stratí odpoveď počas liečby (sekundárna strata odpovede)^(4,5). Pri liečbe IBD pacientov je dôležité určiť, či príčinou zlyhania liečby je primárna alebo sekundárna strata odpovede, kvôli tomu, aby sa prípadne mohla zvoliť iná forma terapie a aby sa optimalizovala pozitívna klinická odpoveď.

Primárna a sekundárna strata odpovede

Podľa klinickej definície je primárna strata odpovede (PNR, *primary non-response*) na anti-TNF- α liečbu definovaná ako nedostatočné zlepšenie klinických príznakov a symptómov po indukčnej liečbe⁽¹²⁾. Sekundárna strata odpovede (LOR, *secondary loss of response*) opisuje pacientov, ktorí reagovali na liečbu počas indukčnej fázy, ale následne stratili odpoveď počas udržiavacej fázy alebo ich odpoveď bola znížená, respektíve trvala krátko⁽¹³⁾.

Mechanizmy, ktoré sú spojené s PNR a LOR na anti-TNF liečbu v IBD zatiaľ nie sú úplne známe a opísané, ale predpokladá sa, že medzi hlavné príčiny toho, prečo dochádza k strate odpovede na liečbu, patrí: farmakokinetické a farmakodynamické zlyhanie, imunogenicita, dávkovací režim pri liečbe a príčinou môže byť aj samotná charakteristika ochorenia (fenotyp, lokalizácia ochorenia, závažnosť ochorenia)⁽¹⁴⁾.

Obrázok 2. Štruktúra protilátok. Infliximab pozostáva z konštantnej a variabilnej oblasti. Konštantná oblasť je celá humanizovaná (označená modrou farbou) a variabilná oblasť obsahuje myšiaciu (oranžovú) časť a humanizovanú (modrú) oblasť. Obe oblasti sú prepojené disulfidovými väzbami⁽⁹⁾. Adalimumab a golimumab majú konštantnú aj variabilnú oblasť označenú modrou farbou, čo znamená, že sú celé humanizované⁽¹⁰⁾. Certolizumab pegol pozostáva z humanizovaného Fab fragmentu, ktorý je prepojený s 2 molekulami PEG⁽¹¹⁾.



Farmakokinetické zlyhanie

Farmakokinetika je proces, ktorý opisuje reakciu organizmu na liek. Sleduje uvoľňovanie z liekovej formulácie, absorpciu, distribúciu, chemické zmeny, metabolizmus a spôsob vylúčenia z tela⁽¹⁵⁾. Pri farmakokinetickom zlyhaní dochádza k zníženiu hladín liečiva alebo úplnému vymiznutiu protilátok. Pri takomto zlyhaní totiž nastáva zrýchlený neimúnny klírens lieku prostredníctvom systémovej cirkulácie v tkanive. Neimúnny klírens môže byť spôsobený taktiež únikom liečiva cez sliznicovú membránu do ulcerovanej časti sliznice, čo následne vedie k výraznej strate elektrolytov a proteínov vrátane anti-TNF^(16,17).

Farmakodynamické zlyhanie

Farmakodynamika sa zaoberá účinkom lieku na organizmus a sleduje biochemický, fyziologický a molekulárny efekt na telo, mechanizmus účinku, vzťah medzi koncentráciou a účinkom a vedľajšie účinky^(18,19). U pacientov s IBD je farmakodynamické zlyhanie charakterizované ako nedostatok zlepšenia symptómov v dôsledku prechodu ochorenia na dráhu, ktorá nie je riadená TNF. Napriek tomu, že koncentrácia liečiva v plazme je dostatočná, nedochádza k tvorbe protilátok a liečba nemá žiaden klinický efekt. V liečbe sú potom účinné iné ako anti-TNF látky, napríklad antiintegrínové protilátky, ktoré blokujú adhéziu leukocytov na kapilárnu stenu⁽¹⁴⁾.

Imunogenicitá

Imunogenicitá je schopnosť látky (ako je napríklad anti-gén) vyvolať imunitnú odpoveď v živom organizme. Pri zlyhaní v dôsledku imunogenicity je detegovaná vysoká koncentrácia protilátok proti liečivu a nulová koncentrácia liečiva, pričom farmakoterapia ostáva bez klinickej odpovede. V takomto prípade je potrebná zmena liečiva. Strata odpovede na inhibitory TNF v dôsledku vytvorenia neutralizujúcich protilátok proti lieku a subterapeutických koncentrácií liečiva je veľkým problémom v manažmente pacientov s IBD a vyskytuje sa aj pri primárnej, aj sekundárnej strate odpovede⁽²⁰⁾.

Genetické pozadie biologickej terapie

Je známe, že genetické varianty v géne *TPMT* ovplyvňujú účinnosť liečiv zo skupiny imunomodulátorov, konkrétne azatioprínu. Pacienti nesúci konkrétne varianty v tomto géne sa delia na pomalých, intermediárnych a rýchlych metabolizérov, na základe čoho nereagujú na liečbu, prípadne u nich dochádza k závažným vedľajším účinkom pri užívaní tohto typu lieku⁽²¹⁾. Preto sa pred nasadzovaním tiopurínov vyšetruje aj genotyp tohto génu. Predpokladá sa, že genetické pozadie pacientov môže ovplyvňovať aj reakcie jednotlivých pacientov na biologickú liečbu. Skúmaním genetického pozadia biologickej terapie a zápalových dráh, ktoré súvisia s IBD a vedú k expresii TNF, sa zaoberali viaceré štúdie⁽²²⁾. Boli v nich identifikované polymorfizmy, ktoré sú asociované so stratou odpovede, ale aj také, ktoré majú priaznivý účinok v súvislosti s reakciou na liečbu. Prostredníctvom identifikácie polymorfizmov a ich biologických vplyvov možno zistiť, ktorí pacienti budú z liečby príslušným agensom profitovať a, naopak, ktorí budú potrebovať iný typ liečiva. V súčasnosti je identifikácia takýchto polymorfizmov a zisťovanie ich

funkčných vplyvov v štádiu výskumu a v praxi sa zatiaľ tieto gény nevyšetrujú.

Jednonukleotidové polymorfizmy asociované s odpoveďou na anti-TNF terapiu

V doteraz uskutočnených štúdiách, ktoré sa venovali tejto problematike, boli identifikované viaceré jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) ovplyvňujúce odpoveď pacientov na anti-TNF liečbu. Sumárny prehľad týchto polymorfizmov spolu s lokalizáciou v génome, so zápisom variantu, s frekvenciou minoritnej alely a biologickým účinkom je uvedený v **tabuľkách 1 a 2**.

V dostupnej literatúre týkajúcej sa študovania reakcií IBD pacientov na liečbu pomocou inhibítorov TNF- α sa nám podarilo nájsť 30 polymorfizmov, ktoré boli asociované s negatívnou alebo pozitívnou odpoveďou na anti-TNF liečbu. Konkrétne 17 z nich je asociovaných so stratou odpovede, 16 poukazovalo na pozitívnu odpoveď a 3 polymorfizmy sa nachádzali v oboch týchto skupinách, čiže vykazovali aj pozitívnu, aj negatívnu odpoveď na biologickú liečbu.

Tieto štúdie a ich výsledky naznačujú, že polymorfizmy spojené s vysokou aktivitou napríklad TLR5 u pacientov s CD a taktiež polymorfizmy spôsobujúce vysoké hladiny IL-12 a IL-18 u pacientov s UC boli asociované so stratou odpovede na biologickú liečbu. Na druhej strane, polymorfizmy v génoch, ktoré sú zapojené do regulácie NF- κ B dráhy (*NFKBIA*), signálnej dráhy TNF- α (*TNFRSF1A*) a ďalších cytokínových dráh (*IL18* a *JAK2*) sú asociované s pozitívnou odpoveďou na anti-TNF terapiu⁽²⁵⁾.

Napríklad v asociácii s pozitívnou odpoveďou na biologickú liečbu u pacientov s CD bolo identifikovaných sedem SNP (rs3804099, rs1816702, rs11465996, rs4149570, rs2430561⁽²³⁾, rs187238, rs12343867⁽²⁵⁾) (**tabuľka 2**), ale u pacientov s CD boli identifikované aj polymorfizmy asociované s negatívnou odpoveďou na biologickú liečbu, a to rs352139⁽²³⁾, rs5744174⁽²⁴⁾, rs8126756⁽²⁵⁾ (**tabuľka 1**).

Polymorfizmy rs4848306, rs10499563⁽²³⁾, rs696⁽²⁵⁾ vykazovali zase u pacientov s UC pozitívnu odpoveď (**tabuľka 2**), no ďalších 12 identifikovaných polymorfizmov rs4696480, rs4251961, rs2569190, rs11465996, rs6927172, rs2275913⁽²³⁾, rs4612666, rs1554973, rs11938228⁽²⁵⁾, rs2234711, rs17250932, rs3212217⁽²⁴⁾ bolo asociovaných so stratou odpovede pri UC (**tabuľka 1**).

Celkovo v súbore IBD pacientov boli v asociácii s pozitívnou odpoveďou na biologickú liečbu identifikované polymorfizmy rs187084, rs3804099, rs11465996, rs7222094, rs4149570, rs4848306, rs10499563, rs2430561⁽²³⁾, rs1946518, rs12343867, rs696, rs10754558⁽²⁵⁾, rs3212217⁽²⁴⁾ (**tabuľka 2**). A naopak, v asociácii s negatívnou odpoveďou na biologickú liečbu u pacientov s IBD bolo identifikovaných týchto 7 polymorfizmov: rs352139, rs1554973, rs6927172, rs361525, rs2275913⁽²³⁾, rs4612666, rs4251961⁽²⁵⁾ (**tabuľka 1**).

Polymorfizmus rs5030728 je zaujímavý tým, že v závislosti od testovaného modelu (dominantný, recesívny, homozygotný, heterozygotný) a zároveň v kombinácii s typom ochorenia (IBD, CD, UC) bol na jednej strane asociovaný s pozitívnou reakciou na liečbu a na strane druhej so stratou odpovede^(23,25) (**tabuľka 1, tabuľka 2**).

Tabuľka 1. Vybrané polymorfizmy asociované so stratou odpovede na biologickú liečbu u pacientov s IBD (upravené a prevzaté od 23, 24, 25)

Polymorfizmus	Lokalizácia na chromozóme	Zápis (dbSNP: current build 152, Október 2, 2018)	Funkcia rizikovej alely	Frekvencia minoritnej alely (TOPMED)
rs5744174 (TLR5)	1q41	g.223111186 A > G	936 T > C zvyšuje hladiny IL-1 B, IL-6, IFN- γ , CCL20	G = 0,38704
rs4612666 (NLRP3)	1q44	g.247435768 T > C	rs4612666T znižuje expresiu NLRP3	T = 0,36432
rs4251961 (IL1RN)	2q14.1	g.113116890 T > C	rs4251961C znižuje IL-1RA level	C = 0,29007
rs352139 (TLR9)	3p21.2	g.52258372 T > C	-1486C a 1174G znižujú expresiu TLR9 (v prípade haplotypu)	T = 0,48670
rs4696480 (TLR2)	4q31.3	g.154607126 T > A	neznáma	A = 0,45202
rs11938228 (TLR2)	4q31.3	g.154621946C > A	neznáma	A = 0,31858
rs2569190 (CD14)	5q31.3	g.140633331 A > G	-159AA zvyšuje hladinu CD14	A = 0,44928
rs3212217 (IL12B)	5q33.3	g.159328122C > G	-10993G > C zvyšuje hladinu IL-12	G = 0,26946
rs2275913 (IL17A)	6p12.2	g.52186235G > A	197 A zvyšuje expresiu IL17A	A = 0,26905
rs692717 (TNFAIP3)	6q23.3	g.137681038C > G	rs6927172G zvyšuje expresiu TNFAIP3	G = 0,15424
rs2234711 (IFNGR1)	6q23.3	g.137219383 A > G	-56 T > C znižuje expresiu	G = 0,43811
rs361525 (TNF)	6p21.33	g.2874604G > A	-238 A znižuje expresiu TNF	A = 0,04947
rs11465996 (LY96)	8q21.11	g.73989727C > G	-1625G zvyšuje hladiny MD-2, TNF- α	G = 0,24521
rs1554973 (TLR4)	9q32-33	g.120480812 T > C	neznáma	C = 0,38042
rs5030728 (TLR4)	9q32-33	g.117712004G > A	neznáma	A = 0,22667
rs17250932 (TBX21)	17q21.32	g.47731941 T > C	-1514 T > C znižuje hladinu T-beta hladinu IFN- γ	C = 0,15441
rs8126756 (IFNGR2)	21q22.11	g.33403138 T > C	neznáma	C = 0,25582

Tabuľka 2. Vybrané polymorfizmy asociované s pozitívnou odpoveďou na biologickú liečbu u pacientov s IBD (upravené a prevzaté od 23, 24, 25)

Polymorfizmus	Lokalizácia na chromozóme	Zápis (dbSNP: current build 152, Október 2, 2018)	Funkcia rizikovej alely	Frekvencia minoritnej alely (TOPMED)
rs10754558 (NLRP3)	1q44	g.159328122C > G	29940 C > G zvyšuje expresiu NLRP3	G = 0,36239
rs4848306 (IL1B)	2q14.1	g.112840530G > A	-3737 A znižuje transkripciu IL1B	A = 0,40041
rs187084 (TLR9)	3p21.2	g.52227015 A > G	-1486C a 1174G znižuje expresiu TLR9 (v prípade haplotypu)	G = 0,37494
rs1816702 (TLR2)	4q31.3	g.154609523 T > C	rs1816702T zvyšuje hladinu receptora	T = 0,19827
rs3804099 (TLR2)	4q31.3	g.153703504 T > C	597C znižuje hladiny TNF- α , IL-1 B a IL-6	C = 0,40371
rs3212217 (IL12B)	5q33.3	g.159328122C > G	-10993G > C zvyšuje hladinu IL-12	G = 0,26946
rs10499563 (IL6)	7p15.3	g.22720869 T > C	-6331C znižuje expresiu IL6	C = 0,21564
rs11465996 (LY96)	8q21.11	g.73989727C > G	-1625G zvyšuje hladiny MD-2, TNF- α	G = 0,24521
rs12343867 (JAK2)	9p.24.1	g.5074189 T > C	rs12343867C znižuje expresiu	C = 0,24528
rs5030728 (TLR4)	9q32-33	g.117712004G > A	neznáma	A = 0,22667
rs1946518 (IL18)	11q.23.1	g.112164735 T > G	-607AA znižuje hladinu IL-18	T = 0,40404
rs4149570 (TNFRSF1A)	12p13.31	g.6342424 A > T	-609 T zvyšuje expresiu TNFRSF1A	A = 0,31197
rs2430561 (IFNG)	12q15	g.68158742 T > A	874 A znižuje hladinu IFN- γ	A = 0,35429
rs7222094 (MAP3K14)	17q21.31	g.45290287 T > C	homozygotný variant rs7222094CC znižuje NIK aktivitu	T = 0,44469
rs187238 (IL18)	11q.23.1	g.112164265C > G	-137C znižuje hladinu IL-18	G = 0,24402
rs696 (NFKB1A)	14q13.2	g.35401887C > T	2758 A zvyšuje expresiu NFKB1A	T = 0,44319

Záver

K strate odpovede na biologickú liečbu u pacientov trpiacich IBD, ale aj inými autoimunitnými ochoreniami dochádza z rôznych príčin. Ukázalo sa, že aj prítomnosť konkrétnych SNP u pacientov môže výrazne ovplyvňovať reakcie na podanú terapiu. Prostredníctvom skúmania genetického pozadia biologickej terapie boli doteraz identifikované viaceré polymorfizmy, ktoré sú asociované so stratou odpovede, ale aj také, ktoré majú priaznivý účinok na pacientov s IBD. Pomocou

týchto SNP možno zistiť, ktorí pacienti budú z liečby príslušným agensom profitovať, a naopak, ktorí budú potrebovať iný typ liečiva. Identifikácia polymorfizmov má význam nielen v prípade anti-TNF liečby, ale tiež v prípade akýchkoľvek iných terapií, a samozrejme, pri stanovení rizika a predispozície vzniku rôznych ochorení, a to predovšetkým v dnešnej dobe, keď sa genomická medicína usiluje o dosiahnutie personalizovanej medicíny.

LITERATÚRA

1. http://www.24hmb.com/voimages/web_image/upload/file/20140606/76761402057831265.pdf
2. <https://inflammatoryboweldisease.net/types-of-ibd/ulc>
3. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, et al. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Int J Inflam* 2014; 7: 113-120.
4. Sherman M, Tsynman DN, Kim A, et al. Sustained improvement in health-related quality of life measures in patients with inflammatory bowel disease receiving prolonged anti-tumor necrosis factor therapy. *J Dig Dis* 2014; 15(4): 174-179.
5. Roda G, Jharap B, Neeraj N, et al. Loss of response to anti-TNFs: definition, epidemiology, and management. *Clin Transl Gastroenterol* 2016; 7(1): e135.
6. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2017; 49(2): 256-261.
7. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, et al. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001; 121(5): 1088-1094.
8. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Fedorak RN, et al. Onercept for moderate-to-severe Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(7): 888-893.
9. https://ki.se/en/cns/infliximab-remicade?_ga=2.53474475.209084293.1538337985-1676560418.1538337985
10. https://ki.se/en/cns/adalimumab-humira?_ga=2.95204511.209084293.1538337985-1676560418.1538337985
11. https://ki.se/en/cns/certolizumab-pegol-cimzia?_ga=2.133559309.209084293.1538337985-1676560418.1538337985
12. Sprakes MB, Ford AC, Warren L, et al. Efficacy, tolerability, and predictors of response to infliximab therapy for Crohn's disease: a large single centre experience. *J Crohns Colitis* 2012; 6(2): 143-153.
13. Allez M, Karmiris K, Louis E, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: definitions, frequency and pharmacological aspects. *J Crohns Colitis* 2010; 4(4): 355-366.
14. Ding NS, Hart A, De Cruz P. Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease—algorithm for practical management. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 43(1): 30-51.
15. Harris P, Nagy S, Vardaxis N, et al. *Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing and Health Professions-Australian & New Zealand Edition-eBook*. Elsevier Health Sciences 2004. 2208 p.
16. Brandse JF, van den Brink GR, Wildenberg, ME, et al. Loss of infliximab into feces is associated with lack of response to therapy in patients with severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2015; 149(2): 350-355.
17. Nattiv R, Wojcicki JM, Garnett EA, et al. High-dose infliximab for treatment of pediatric ulcerative colitis: a survey of clinical practice. *World J Gastroenterol* 2012; 18(11): 1229.
18. Singh NN, Ellis CR. *Pharmacological therapies* 1998; 267-293.
19. Duffus J. Glossary for chemists of terms used in toxicology. *Pure and applied chemistry* 1993; 65(9): 2003-2122.
20. Afif W, Loftus EV, Faubion WA, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(5): 1133-1139.
21. Wu AH. Drug metabolizing enzyme activities versus genetic variances for drug of clinical pharmacogenomic relevance. *Clinical proteomics* 2011; 8(1): 12.
22. Bek S, Nielsen JV, Bojesen AB, et al. Systematic review: genetic biomarkers associated with anti-TNF treatment response in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 44(6): 554-567.
23. Bank S, Andersen PS, Burisch J, et al. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J* 2014; 14(6): 526-534.
24. Bank S, Andersen PS, Burisch J, et al. Genetically determined high activity of IL-12 and IL-18 in ulcerative colitis and TLR5 in Crohns disease were associated with non-response to anti-TNF therapy. *Pharmacogenomics J* 2017; 18(1): 87-97.
25. Bank S, Julsgaard M, Abed OK, et al. Polymorphisms in the NF κB, TNF-α, IL-1β, and IL-18 pathways are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2019 49(7): 890-903.
26. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14+ macrophages. *Gastroenterology* 2011; 141(6): 2026-2038.
27. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. Mechanism of action of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2016; 10(8): 989-997.



Mgr. Zuzana Kubiritová

Ústav klinického a translačného výskumu,
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava
e-mail: kubiritova.zuzka@gmail.com

The gut microbiota affects the severity of Alzheimer's disease

Ondrej Pös^{1,2}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

¹Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia

²Geneton Ltd., Bratislava, Slovakia

³Comenius University Science Park, Bratislava, Slovakia

Current treatment methods and modern medicines keep people alive ever longer, however the longer we live, the more age-related diseases we can face to. A typical disease of such type is dementia. The most common cause of dementia is Alzheimer's disease (AD) a multifactorial disease, thus environmental factors, in addition to genetics, have a significant impact on its development. Several studies suggest, that one of such factors is the gut microbiome. In this review we discuss the potential impact of gut microbiota in the development of AD and the mechanisms of bacteria-related neurodegenerative processes.

Keywords: Alzheimer's disease, microbiome, neurodegenerative processes

Črevný mikrobióm ovplyvňuje závažnosť Alzheimerovej choroby

Súčasná metóda liečby a moderné liečivá udržiavajú ľudí nažive čoraz dlhšie, s tým však prichádzajú aj ďalšie s vekom spojené ochorenia. Typickým ochorením tohto typu je demencia. Najčastejšou príčinou demencie je Alzheimerova choroba (AD), multifaktoriálne ochorenie, takže okrem genetiky majú významný vplyv na jej vývoj faktory životného prostredia. Viaceré štúdie naznačujú, že jedným z týchto faktorov je črevný mikrobióm. V tomto prehľade sa zameriame na potenciálny vplyv črevného mikrobiómu pri rozvoji AD a mechanizmy, ktorými môžu baktérie iniciovať neurodegeneratívne procesy.

Kľúčové slová: Alzheimerova choroba, mikrobióm, neurodegeneratívne procesy

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 99 – 101

Introduction

Neurological disorders are the third most common cause of death in the Slovakia accounting for nearly 3600 deaths in 2017. According to GHDx database Alzheimer's disease (AD) and other dementias are responsible for 83,5% of this mortality. In 2017 there were approximately 45 million patients with Alzheimer's dementia worldwide⁽¹⁾. It is estimated, there is a new case in the world every three seconds⁽²⁾. Most of caregivers for AD patients come from family members suffering significant emotional and physical difficulties which has a devastating effect on these persons. Moreover, health care for AD patients is very expensive, therefore it is one of the most expensive diseases in the world⁽³⁾.

AD is a neurodegenerative disease with a multifactorial etiology, based on genetic and environmental risk factors, that affects the brain. Many epidemiological studies suggest that one of the factors that significantly increases the risk of AD is obesity⁽⁴⁾. Obese patients have deficits in learning, memory and cognitive perception compared to patients who are not obese⁽⁵⁾. Although, there are several studies that controvert these findings⁽⁶⁾, the most publications suggest, that obesity has a negative impact on neurodegenerative diseases.

Effect of gut microbiota on the central nervous system

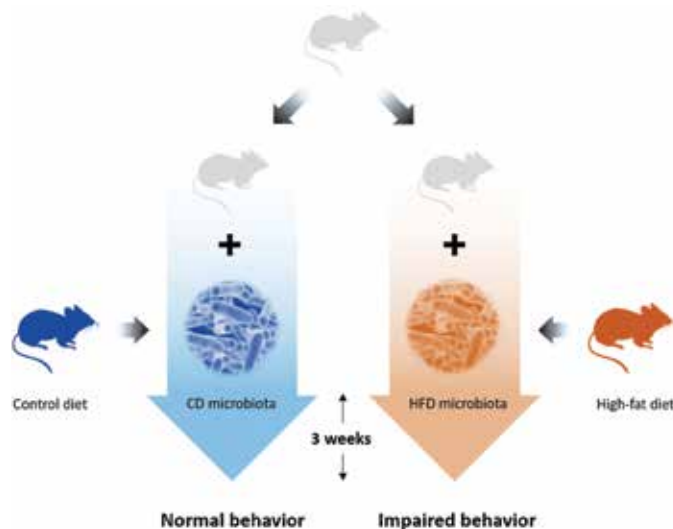
There are findings that obesity increases the risk of AD independently of its accompanying phenomena such as hypertension, dyslipidemia, diabetes and others⁽⁴⁾. It suggests the existence of other mechanism by which obesity affects the development of the disease. It is known, that a specific type of intestinal microbiome is associated with the obesity, and number of emerging studies exploring the

potential effect of gut microbiome on the central nervous system (CNS) is increasing⁽⁷⁾. Animal studies have shown that germ-free (GF) mice had increased motor activity and reduced anxiety behavior compared to mice with normal intestinal microbiome. In addition, this phenotype was normalized after colonization of GF mice with normal microbes. After colonization of GF mice, their behavior was more similar to mice with normal microbiome. This experiment confirms that the intestinal microflora can influence the development of mammalian brain, and consequently their adult behavior⁽⁸⁾.

Study by Bruce-Keller et al. provide a clearer answer, if the intestinal microbes associated with obesity damages the CNS (**Figure 1**). Two groups of mice of the same origin were prepared. One group of mice was colonized with intestinal microbiota from High-Fat Diet (HFD) subjects. The second group consisted of mice colonized with microbiome obtained from subjects on a control diet. After 3 weeks, phenotypic differences were observed between the two groups. Mice colonized with HFD-associated microbiota have been shown to have significantly impaired exploratory, cognitive, and stereotypical behaviors. This is the first experiment that demonstrates that intestinal microbiota associated with a fat diet damages the physiology and function of the brain independently of obesity. Mice were not altered in any way and there was no adiposity or metabolic syndrome⁽⁹⁾.

Although it has been confirmed that the gut microbiome affects the CNS, the mechanism by which bacteria affect the behavior of the host is still unclear. Several theories have been described in this connection, but further studies are needed to verify them.

Figure 1. Scheme of experiment by Bruce-Keller et al. Transplantation of microbiota shaped by high fat diet (HFD), but not control diet (CD), caused significant disruptions in exploratory, cognitive, and stereotypical behavior in mice.



Direct interaction with CNS

There is theory about a direct interaction of the intestinal microbiota with the CNS of the host through the vagus nerve, which directly connects the intestine with the brain. Bacteria have been found to synthesize neuroactive agents such as catecholamines, histamine, and other components that can stimulate host neurophysiology. However, bacteria can not only produce but also recognize these substances, suggesting that there may be two-way communication between the host and the microbiome. In other words, the microbiota affects the host, and the host may affect the microbiota⁽¹⁰⁾.

Extracellular amyloid proteins

Amyloids are protein aggregates, with a β -sheet structure, formed by amyloid fibers produced by incorrect protein folding or misfolding. More than 60 proteins that produce amyloid fibers have been described⁽¹¹⁾. Several of them have been shown to have some function in the human body, such as protecting melanocytes from toxicity. Also, some peptide hormones have amyloid-like structure during their storage in secretory granules⁽¹²⁾. In several studies, accumulation of amyloid fibers in some organs has been associated with neurodegenerative disorders, including AD⁽¹²⁻¹⁴⁾. Bacteria that occur in the human digestive tract have also been found to produce extracellular amyloid proteins that are biochemically similar to amyloid structures associated with neurodegenerative diseases. Amyloids have been detected in naturally occurring bacterial populations of Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria and Firmicutes⁽¹³⁾. In bacteria, these proteins serve as molecular scaffolds that hold bacteria together and play a role in biofilm formation, e.g. the extracellular amyloid protein called Curli, produced in *Escherichia coli*⁽¹⁵⁾.

It seems that bacterial amyloids may induce neurodegeneration in the human body by multiple mechanisms. One of them is the so-called cross-seeding⁽¹⁶⁾. It is the ability of amyloids to produce seeds that can spread to new tissues and then multiply. In this way, amyloids could induce misfolding of neural proteins and consequently the development of AD⁽¹⁷⁾.

Inflammation

Immune activation and inflammation are associated with almost all neurodegenerative diseases. Many studies even suggest, inflammation has a causal role in the pathogenesis of AD⁽¹⁸⁾. Bruce-Keller et al. showed that HFD-associated microbiota increases systemic and brain inflammation in mice. They found Toll-Like Receptor 2 (TLR2) overexpression in lymphocytes⁽⁹⁾. TLR plays an important role in protection of the host from invading microbes. Studies suggest that the TLR2/TLR1 complex can recognize amyloids produced by Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria. Activation of microglial TLR2 induces cytokine production, inflammation, phagocytosis and innate immune defense responses that directly impact CNS homeostasis and drive neuropathology⁽¹⁹⁾. It is remarkable that microbial amyloids induce pro-inflammatory cytokines IL-17 A and IL-22, the same cytokines that are often associated with AD⁽²⁰⁾.

Protective effect of diet in the prevention of Alzheimer's disease

It is now well known that diet has an important role in shaping the intestinal microbiota. Different dietary habits and/or access to food cause significant differences in the taxonomic composition of the intestinal microbiota between some populations⁽²¹⁾. Several epidemiological studies suggest that certain types of diet have a protective effect on cognitive perception and reduce the risk of dementia. Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) and a Mediterranean diet (MD) were found to have been associated with a slower rate of cognitive decline in elderly⁽²²⁾. Subsequently, the hybrid Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) diet, combining a MD and a DASH diet, was created. The MIND diet emphasizes the dietary components associated with neuroprotection and prevention of dementia. It was shown, such diet significantly reduced the incidence of cognitive disorders and the risk of AD⁽²³⁾. The microbiota associated with the MIND diet has not been described yet, but several studies focus on the MD, which was also associated with a lower risk of Alzheimer's disease. These studies suggest, the MD promotes the microbiota with a health benefit for the human body⁽²¹⁾. Based on these results, we assume that the MIND diet should also promotes the composition of the microbiota reducing the risk of AD.

Conclusions

AD is a relatively common disease that brings many complications not only for the patients themselves, but also for family members and the financial budget. Therefore, the disease is being given great attention and scientists are attempting to devise new therapeutic approaches. This review suggests that certain types of diet are associated with a particular gut microbiota that can affect the CNS. Several mechanisms, how bacteria may drive neuropathology e.g. direct interaction with hosts CNS, amyloid proteins production or stimulation of inflammation, have been described. Based on these findings, modulation of gut microbiota through dietary approaches, probiotics or antibiotics intervention and fecal microbiota transplantation could reduce the prevalence and severity of AD.

REFERENCES

1. GBD Results Tool | GHDx [Internet]. [cited 14 May 2019]. Available: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
2. World Alzheimer Report 2018 | Alzheimer's Disease International [Internet]. 20 Sep 2018 [cited 14 May 2019]. Available: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>
3. Facts and Figures. In: Alzheimer's Disease and Dementia [Internet]. [cited 14 May 2019]. Available: <https://alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>
4. Prickett C, Brennan L, Stolwyk R. Examining the relationship between obesity and cognitive function: a systematic literature review. *Obes Res Clin Pract* 2015; 9: 93-113.
5. Kharabian Masouleh S, Arélin K, Horstmann A, et al. Higher body mass index in older adults is associated with lower gray matter volume: implications for memory performance. *Neurobiol Aging* 2016; 40: 1-10.
6. Kim S, Kim Y, Park SM. Body Mass Index and Decline of Cognitive Function. *PLoS One* 2016; 11: e0148908.
7. Scheperjans F. Can microbiota research change our understanding of neurodegenerative diseases? *Neurodegener Dis Manag* 2016; 6: 81-85.
8. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior [Internet]. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011. pp. 3047-3052. doi:10.1073/pnas.1010529108
9. Bruce-Keller AJ, Michael Salbaum J, Luo M, et al. Obese-type Gut Microbiota Induce Neurobehavioral Changes in the Absence of Obesity [Internet]. *Biological Psychiatry*. 2015. pp. 607-615. doi:10.1016/j.biopsych.2014.07.012
10. Lyte M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003726.
11. Mok KH, Pettersson J, Orrenius S, Svanborg C. HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 1-7.
12. Rapsinski GJ, Newman TN, Oppong GO. CD14 Protein Acts as an Adaptor Molecule for the Immune Recognition of Salmonella Curli Fibers [Internet]. *Journal of Biological Chemistry* 2013; pp. 14178-14188. doi:10.1074/jbc.m112.447060
13. Schwartz K, Boles BR. Microbial amyloids – functions and interactions within the host [Internet]. *Current Opinion in Microbiology* 2013; pp. 93-99. doi:10.1016/j.mib.2012.12.001
14. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society [Internet]. *The Lancet Neurology* 2016; pp. 455-532. doi:10.1016/s1474-4422(16)00062-4
15. Hufnagel DA, Tükel C, Chapman MR. Disease to dirt: the biology of microbial amyloids. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003740.
16. Friedland RP. Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration [Internet]. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. pp. 349-362. doi:10.3233/jad-142841
17. Oskarsson ME, Paulsson JF, Schultz SW. In Vivo Seeding and Cross-Seeding of Localized Amyloidosis [Internet]. *The American Journal of Pathology* 2015; pp. 834-846. doi:10.1016/j.ajpath.2014.11.016
18. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [Internet]. *The Lancet Neurology* 2015; pp. 388-405. doi:10.1016/s1474-4422(15)70016-5
19. Hill JM, Lukiw WJ. Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci* 2015; 7: 9.
20. Zhang J, Ke K-F, Liu Z, et al. Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of $\alpha\beta 1$ -42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One* 2013; 8: e75786.
21. Filippis FD, De Filippis F, Pellegrini N, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome [Internet]. *Gut* 2016; pp. 1812-1821. doi:10.1136/gutjnl-2015-309957
22. Tangney CC, Li H, Wang Y, et al. Relation of DASH- and Mediterranean-like dietary patterns to cognitive decline in older persons [Internet]. *Neurology* 2014; pp. 1410-1416. doi:10.1212/wnl.0000000000000884
23. Morris MC, Tangney CC, Wang Y, et al. MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2015; 11: 1007-1014.



Mgr. Ondrej Pös

Vedecký park Univerzity Komenského
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
e-mail: pos1@uniba.sk

Náhodný záchyt toxického kmeňa *Corynebacterium diphtheriae*

Martina Dobríková

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s., Košice

Diftéria patrila v minulosti k hlavným príčinám detskej chorobnosti a úmrtnosti. Toxické kmene *Corynebacterium diphtheriae* stále cirkulujú vo svete vrátane Európy, Severnej a Južnej Ameriky, Indie, Afriky, Južnej Ázie a východného Stredomoria. Po zavedení očkovania sa celosvetovo podarilo znížiť počty prípadov ochorenia. Avšak vplyv na rozvinutie ochorenia má i strata imunity po očkovaní, zhoršovanie socioekonomických podmienok, pokles preočkovanosti populácie, či „antivakcinačný“ trend. V súčasnosti by lekári mali brať do úvahy aj možnosť jej zavlečenia migrujúcim obyvateľstvom a utečencami z oblastí s endemickým výskytom, hlavne z rozvojových krajín, kde je vyššie percento bezpríznakového nosičstva v populácii. Vzhľadom na nárast migrácie a turizmu je potrebné udržať vysokú preočkovanosť a dôsledne monitorovať toto ochorenie.

Kľúčové slová: *Corynebacterium diphtheriae*, diftéria, toxický kmeň, očkovanie

Accidental capture of the toxic strain Corynebacterium diphtheriae

In the past diphtheria belonged to one of the main causes of childhood morbidity and mortality. Toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* are still present worldwide, including Europe, North and South America, India, Africa, South Asia and the Eastern Mediterranean. After the introduction of vaccination, worldwide cases of the disease have been reduced. However, the loss of immunity after vaccination, deterioration of socio-economic conditions and a decrease in vaccination rate or „anti-vaccination“ trend can also have an impact on disease development. Nowadays, the clinicians should consider the possibility of spreading toxigenic strains from areas with endemic prevalence, especially from developing countries with a higher percentage of asymptomatic carriage in the population and its connection with migration and refugees. Due to the increase of migration and tourism, it is necessary to maintain a high vaccination rate and to monitor diphtheria consistently.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, diphtheria, toxic strain, vaccination

Newsrab, 2019; roč. 10 (2): 102 – 105

Úvod

Epidemiológia

V predvakcinačnej ére bola diftéria jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich infekčných ochorení u detí s vysokou úmrtnosťou. Po vytvorení toxoidovej vakcíny v r. 1923 a následne po zavedení povinného očkovania v roku 1946 sa toto ochorenie podarilo prakticky celosvetovo eliminovať⁽¹⁾. Avšak na konci 80. rokov vypukla vo veľkých mestách v Rusku rozsiahla epidémia, ktorá sa do roku 1995 rozšírila do všetkých postsovietskych krajín. Celkovo bolo zaznamenaných 157 000 prípadov s 5 000 úmrtiami. Príčinami boli jednak environmentálne faktory, ako migrácia obyvateľstva a pokles socioekonomických podmienok, ale aj chyby v očkovaní a v zásobovaní očkovacími látkami⁽²⁾. Väčšina z nakazených pacientov dosiahla vek viac ako 15 rokov. Kľúčové bolo spojenie dvoch faktorov, a to veľký počet neimunizovaných dospelých a nedostatočná vakcinácia u detí. Medzi pacientov s ťažkým priebehom patrili dospelí vo veku 40 až 49 rokov, u ktorých sa v ich detskom veku vakcinácia DTP (diphtheria – tetanus – pertussis) ešte len zavádzala. U mladších pacientov sa predpokladá, že zlyhala tzv. imunologická pamäť, k čomu prispel aj vekový posun preočkovania, zo 6 na 9 rokov. Po celoplošnej imunizácii obyvateľov s odlišným režimom aplikácie vakcíny sa dosiahlo zníženie výskytu ochorenia koncom roka 2001 na 12 % a následne na 0,2 % koncom roka 2015⁽³⁾.

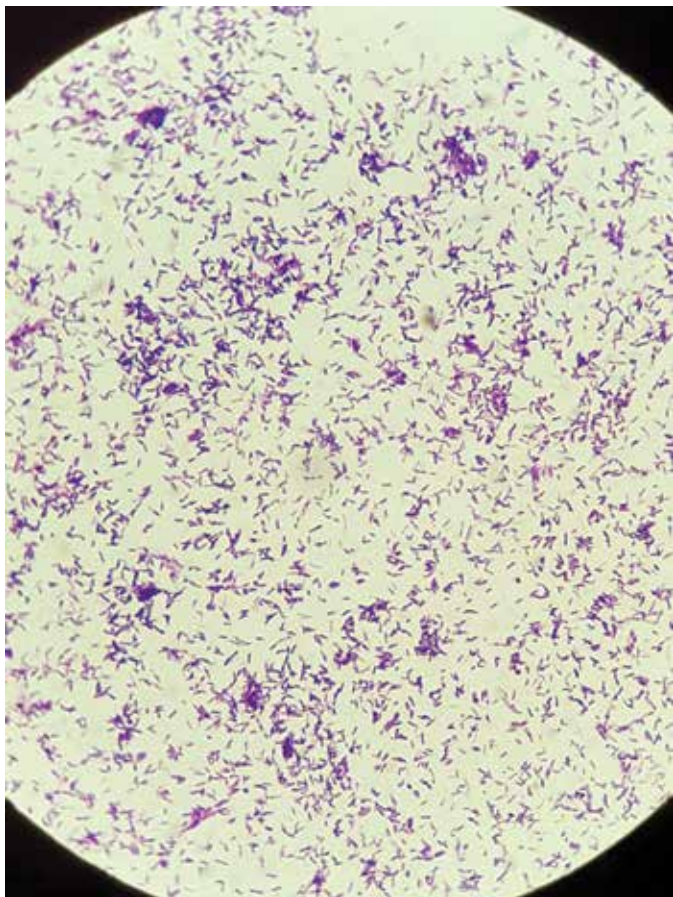
V súčasnosti sa úmrtnosť na diftériu napriek adekvátnej liečbe pohybuje medzi 5 – 10 % u detí mladších ako 5 rokov a u osôb nad 40 rokov dosahuje až 20 %. U neliečených pacientov je úmrtnosť až u polovice prípadov⁽²⁾. Odhaduje sa, že celosvetovo sa ročne vyskytuje približne 5 000 prípadov ochorení⁽³⁾. Na Slovensku bol posledný prípad ochorenia zaznamenaný v roku 1980⁽⁴⁾.

Pôvodca ochorenia a jeho klinické prejavy

Pôvodcom nákazy je výlučne ľudský patogén *Corynebacterium diphtheriae*, grampozitívna fakultatívne anaeróbna, pleomorfna baktéria (**obrázok 1**). Mikroskopicky je charakteristická palisádovitým usporiadaním s metachromatickými granulami v cytoplazme, ktoré možno dokázať farbením podľa Alberta alebo Neissera. Rastie na bežných pôdach s prímiesou krvi alebo séra s tvorbou hemolýzy (**obrázok 2**). Podľa vzhľadu kolónií rozlišujeme štyri biotypy: gravis, mitis, intermedius a belfanti⁽⁵⁾. Na selektívno-diagnostických pôdach so soľami telúru tvorí v dôsledku jeho redukcie čiernohnedé kolónie so sivou zónou (**obrázok 3**).

Nosičstvo tejto baktérie v nosohltane alebo na koži sa vyskytuje približne u 3 – 5 % ľudí, avšak v populácii s dostatočnou hygienou a postvakcinačnou imunitou zriedkavo vyvoláva ochorenie. Baktéria môže prežívať týždne v prachu a na kontaminovaných predmetoch. Zdrojom nákazy je chorý človek, ktorý sa infikuje vdychovaním kontaminovaného vzduchu. Ochorenie s inkubačnou dobou 2 až 5 dní môže

Obrázok 1. *Corynebacteriae diptheriae*: farbenie podľa Grama



Obrázok 2. *Corynebacteriae diptheriae* na krvnom agare



postihovať všetky mukózne sliznice, avšak *Corynebacterium diptheriae* prevažne infikuje respiračný trakt a častá je i kožná forma⁽⁵⁾. Klinický obraz závisí od stavu imunity hostiteľa a miesta vstupu infekcie. Môže prebiehať od asymptomatickej kolonizácie cez mierne respiračné ochorenie až po fulminantnú diftériu s rozvojom myokarditídy, polyneuritídy a toxickej nefritídy⁽⁶⁾. Najčastejším miestom vstupu baktérie do organizmu sú horné dýchacie cesty, kde sa tvoria typické pseudomembrány z fibrínu, nekrotických buniek a leukocytov (**obrázok 4**). Pseudomembrány vznikajúce na sliznici

Obrázok 3. *Corynebacteriae diptheriae* na Claubergovej pôde s obsahom telúru



Obrázok 4. Difterické pseudomembrány v tonzilách



zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Dirty_white_pseudomembrane_classically_seen_in_diphtheria_2013-07-06_11-07.jpg

dýchacích ciest sa môžu uvoľniť so vznikom mechanickej obštrukcie s následným dusením a zakrvácaním. Ochorenie je sprevádzané výrazným zdurením lymfatických uzlín a vysokou teplotou. Kožná forma diftérie sa vyskytuje prevažne v tropických krajinách, pričom klinický obraz varíruje od kožných eflorescencií až po chronické nehojace sa vredy. Baktérie sa postupne uvoľňujú z lézií, ktoré slúžia ako rezervoár pri šírení infekcie. Infekciozita pacienta s kožnou formou trvá dlhšie ako pri respiračnej forme. Táto forma diftérie postihuje prevažne ľudí s nižším socioekonomickým statusom.

Hlavným faktorom patogenity je difterický toxín, kódovaný tox génom, ktorý sa šíri prostredníctvom beta-bakteriofágu⁽⁷⁾. Na molekulovej úrovni je toxín zložený z dvoch podjednotiek (polypeptid A a B). Polypeptid B sa viaže na cytoplazmatickú membránu bunky a umožňuje polypeptidu A prechod do cytoplazmy s následnou blokádou proteosyntézy na ribozómoch⁽⁵⁾. Produkcia toxínu sa *in vitro* dokazuje precipitačnou reakciou s protilátkami, tzv. Elekovým testom a *in vivo* na morčatách. PCR test slúži len na dôkaz prítomnosti génu, nie však tvorby toxínu⁽²⁾.

Terapia a prevencia diftérie

V priebehu dvadsiatich rokov 19. storočia bola diftéria klinicky vyčlenená od iných foriem angíny. V roku 1883 Klebs dokázal, že *Corynebacterium diphtheriae* je vyvolávateľom diftérie, o rok neskôr ju Loeffler vykultivoval z nazofaryngeálnej dutiny. V roku 1888 Roux a Yersin dokázali, že hlavným faktorom patogenity je difterický exotoxín⁽⁷⁾. V roku 1923 bola vynájdená vakcína proti záškrtu, ktorá sa vo veľkom začala používať v USA a ostatných industrializovaných krajinách⁽³⁾.

Liečbou akútnej infekcie je podanie antitoxínu a antibiotickej liečba. Antitoxín neutralizuje voľný cirkulujúci toxín, avšak nepôsobí na toxín naviazaný na bunky⁽³⁾. Antibiotická liečba eliminuje baktérie, a tým zabraňuje ďalšej produkcii toxínu. Liekmi voľby sú penicilín a erytromycín⁽⁹⁾. U pacientov s alergiou na penicilín alebo netolerujúcich erytromycín sa odporúča rifampicín a klindamycín. Po 48 hodinách antibiotickej terapie sa pacient už nepovažuje za infekčného⁽¹⁰⁾.

Imunitu možno získať očkovaním alebo prekonaním ochorenia spôsobeného toxickým kmeňom. Očkovanie nechráni pred osídlením samotnou baktériou, ale bráni vzniku a rozvoju ochorenia. Podľa štatistík výraznejší ústup ochrany po očkovaní nastáva po štyridsiatke, najohrozenejší sú päťdesiatnici⁽¹¹⁾. Očkuje sa difterickým toxoidom, čo je toxín upravený formalínom, pri ktorom dochádza k strate toxicity a zachovaniu imunogenity. Toxoid vyvoláva tvorbu neutralizujúcich protilátok. Hladiny neutralizačných protilátok možno stanoviť z periférnej krvi. V minulosti sa používal kožný Shickov test, pri ktorom sa intradermálne podávalo malé množstvo difterického toxoidu so sledovaním erytému a zdurenia v mieste vpichu.

Prvá dávka očkovacej látky sa podáva deťom v kombinácii s očkovacou látkou proti ďalším piatim ochoreniam (tetanus, čierny kašeľ, vírusová hepatitída B, hemofilové invazívne infekcie, detská obrna). Základné očkovanie sa skladá z troch dávok vakcíny, podaných v 3., 5. a 11. mesiaci veku dieťaťa. Na dosiahnutie ochrannej hladiny protilátok až do dospelosti je potrebné preočkovanie detí v 6. a 13. roku života. Dvojkombináciou očkovacej látky proti tetanu a záškrtu sa preočkovávajú dospelé osoby každých 15 rokov⁽¹²⁾.

Kazuistika

Pri kultivačnom vyšetrení materiálu z horných dýchacích ciest (výter z nosa) u 14-ročného pacienta s diagnózou akútnej sínusitídy bol začiatkom decembra v roku 2018 zachytený a identifikovaný metódou hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF, Bruker, Nemecko) kmeň *Corynebacterium diphtheriae*. Pre verifikáciu identifikácie a zistenie produkcie toxínu bol kmeň dňa 11. 12. 2018 zaslaný do Národného referenčného centra pre diftériu (NRC) v Košiciach. Toxicita kmeňa bola testovaná na bunkovej línii Vero, čo sú bunkové línie

získané z epiteliálnych buniek obličiek opíc druhu makak. S výsledkom kultivačného vyšetrenia bol oboznámený obvodný pediater a regionálny epidemiológ. Vyšetrením kvalitatívnej antibiotickej (ATB) citlivosti difúznym diskovým testom (**obrázok 5**) sa zistila citlivosť kmeňa na sledované antibiotiká, t. j. penicilín, klindamycín, ciprofloxacín, gentamicín, tetracyklín a linezolid (**tabuľka 1**).

Dňa 27. 12. 2018 bol doručený výsledok vyšetrenia z NRC pre diftériu s potvrdenou identifikáciou: *Corynebacterium diphtheriae* biotyp *gravis*, s produkciou toxínu.

Od obvodného pediatra a epidemiológa bola doplnená sociálna, rodinná a cestovateľská anamnéza. Ide o 14-ročného chlapca rómskeho pôvodu s rázštepom podnebia, u ktorého dochádza k častým recidívam akútnej sínusitídy. V našom laboratóriu boli u tohto pacienta opakovane kultivačne identifikované *Streptococcus pyogenes* a *Moraxella catharralis* s dobrou citlivosťou na testované antibiotiká. Na základe poskytnutých informácií od pediatra je pacient riadne očkovaný podľa očkovacieho kalendára, čomu zodpovedá aj plne ochranná hladina protilátok doplnená vyšetrením v NRC pre diftériu s hodnotou 0,65536 IU/ml. Pacient býva v obci Brekov (okres Humenné) s dvoma sestrami, rodičmi a so starou matkou v dobrých sociálnych podmienkach. Do Humenného dochádza k svojmu obvodnému pediatri. Kontakt s migrantmi epidemiológ nepovažuje za možný zdroj infekcie, keďže pacient nepochádza priamo z Humenného a cesta na stanicu sa nenachádza v blízkosti azylového centra. Kontakty v škole v Strážskom epidemiológ neprešetroval vzhľadom na chýbajúce klinické symptómy typické pre diftériu, ktoré sa nezistili ani pri otorinolaryngologickom a neurologickom vyšetrení. V cestovateľskej anamnéze pacient neudáva pobyt na Ukrajine, uvádza však vycestovanie s rodinou do Spojeného kráľovstva pred štyrmi rokmi. Kultivačné vyšetrenia ostatných členov rodiny boli negatívne. Matka a stará matka sa nepodrobili vyšetreniu z dôvodu nespokupráce. Napriek

Obrázok 5. Antibiotická citlivosť diskovou difúznou metódou



Tabuľka 1. Citlivosť kmeňa *Corynebacterium diphtheriae* na antibiotiká diskovým difúznym testom, podľa EUCAST 2019⁽¹³⁾

ATB	výsledok	ATB	výsledok
penicilín	C	gentamicín	C
klindamycín	C	tetracyklín	C
ciprofloxacín	C	linezolid	C

C – citlivý

tomu, že kultivačné vyšetrenie sestier pacienta bolo negatívne, epidemiológovia predpokladajú, že ide o nosičský kmeň získaný v školskom prostredí. Kontrolné kultivačné vyšetrenia pacienta po preliečení antibiotikami boli opakovane negatívne.

Diskusia

U viacerých náchylných osôb sa vyvinie skôr prechodné nosičstvo v nazofaryngu ako samotné ochorenie, o čom svedčí opisovaný prípad. Bez pôsobenia antibiotík prežíva väčšina mikroorganizmov v nosohltane približne dva týždne, pričom chronickí nosiči môžu vylučovať *Corynebacterium sp.* až 6 mesiacov. Asymptomatické nazofaryngeálne nosičstvo je pravdepodobne vzhľadom na lepší skriningový program viac zdokumentované v endemických regiónoch ako v oblastiach, kde sa diftéria vyskytuje len sporadicky. Avšak aj pri podozrení na diftériu môže byť laboratórna diagnostika obtiažna. Je to zapríčinené tým, že *Corynebacterium diphtheriae* je ťažko rozpoznateľná na bežnom krvnom či čokoládovom agare. Navyše výtery z dýchacích ciest od asymptomatických nosičov môžu obsahovať len malé množstvo baktérií, ktoré sú po kultivácii prekryté bežnou bakteriálnou flórou horných dýchacích ciest⁽¹⁴⁾. Preto sa táto baktéria bežne nezachytáva, čo môže skresľovať reálny epidemiologický stav na Slovensku.

Imunita indukovaná vakcínou v priebehu života klesá a pri nedostatočnom preočkovaní počet vnímavých osôb stúpa. Na základe sérologickej štúdie bolo zistené, že 20 – 60 % svetovej populácie má protilátky proti diftérii pod minimálnou ochrannou hladinou⁽¹⁵⁾. V prípade, že dôjde k nárastu počtu takto náchylných obyvateľov, existuje reálne nebezpečenstvo vypuknutia epidémie. Aby sa tomu zabránilo, je nevyhnutná dobrá a rýchla spolupráca klinických lekárov, epidemiológov a sociálnych pracovníkov. Tí by mali kooperovať v rýchlej diagnostike a manažmente jednotlivých prípadov ochorenia, vo vyšetrení osôb, ktoré boli v kontakte s pacientom a imunizácii vybraných skupín obyvateľstva s cieľom predísť sekundárnym nákazám⁽¹⁶⁾.

Hrozbou pre zdravie populácie okrem toxických kmeňov sú kmene, ktoré nesú tox gén, avšak neprodukujú toxín.

K expresii tohto génu nedochádza v dôsledku delécie alebo inzercie nukleotidu na A podjednotke⁽¹⁷⁾. Za určitých okolností môže byť bakteriofág neaktívny (vysoká koncentrácia železa), respektíve nemusí dôjsť k expresii tox génu (inzercia bakteriálnej DNA v géne difterického toxínu). Po expozícii lyzátnych dvoch iných netoxigénnych kmeňov sa môže stať takýto kmeň toxigénnym v dôsledku rekombinácie jeho DNA. To znamená, že prítomnosť netoxigénnych kmeňov v populácii predstavuje reálne nebezpečenstvo pre ich možnú konverziu na toxigénne kmene⁽¹⁸⁾.

Ďalším zdrojom nebezpečnej infekcie môžu byť druho- príbuzné patogény zvierat, akými sú *Corynebacterium pseudotuberculosis* a *Corynebacterium ulcerans*. Oba druhy môžu obsahovať beta-bakteriofág s tox génom, ktorý je schopný lyzovať všetky tri druhy a následne infikovať netoxické kmene *Corynebacterium diphtheriae*.

V súčasnosti okrem toxických kmeňov, ktoré môžu byť do našej krajiny zavlečené z endemických regiónov vrátane krajín východnej Európy, narastá výskyt netoxických, ale invazívnych kmeňov napriek vysokej zaočkovanosti. Takéto kmene sú schopné vyvolať endokarditídu, artritídu, bakteriémiu či osteomyelitídu. Na rozdiel od toxických kmeňov za vyššiu invazivitu netoxických kmeňov nie sú zodpovedné bakteriofágy nesúce gén, ale génové lokusy na chromozóme baktérie. Preto je potrebné sledovanie molekulových zmien v cirkulujúcich kmeňoch, v ktorých môže narastať invazivita a patogenita. Na základe týchto poznatkov by bolo možné následne vyvinúť novú vakcínu proti netoxickým, avšak invazívnym kmeňom⁽¹⁹⁾.

Záver

Zachytený kmeň *Corynebacterium diphtheriae* izolovaný z nazofaryngu maloletého pacienta bol identifikovaný NRC pre diftériu ako toxický. Na základe diagnózy a epidemiologickej analýzy bol tento prípad vyhodnotený ako výskyt asymptomatického nosičstva. Vzhľadom na to, že ide o rizikového pacienta s rázštepom podnebia, s pravdepodobným kontaktom s osobami z endemických oblastí a možnou klesajúcou postvakcinačnou imunitou, je vhodné sledovať tohto pacienta aj v budúcnosti.

LITERATÚRA

1. Karzon DT, Edwards KM. Diphtheria outbreaks in immunized population, N Engl J Med 1988; 318: 41-43.
2. Tejpratap SP T. Diphtheria, Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition) 2013; 402-406.
3. https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/april/1_Final_report_Clarke_april3.pdf
4. <http://www.uvzs.sk/en/index.php/documents/12-importance-of-vaccination>
5. Forbes BA. „Did I Hear You Correctly? The Organism Identified Was *Corynebacterium diphtheriae*?” Clinical Microbiology Newsletter 2017; 39(5): 35-41.
6. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, et al. The pathology of diphtheria. J Infect Dis 2000; 181(1): 116-120.

7. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, et al. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing, Infection, Genetics and Evolution 2014; 21: 54-57.
8. Murphy JR. *Corynebacterium diphtheriae*. In: Baron EJ. Medical microbiology. Galveston, TX: University of Texas Medical Branch at Galveston 1996: 1-13.
9. American Academy of Pediatrics. Diphtheria. In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, eds. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases, 28th edn. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics; 2009: 280-283.
10. Weinbaum C. Diphtheria. In: Hamborsky J, Kroger A, Wolfe C, editors. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 13th ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2015. 10717p.

11. Galazka A. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. J Infect Dis 2000; 181 (1): 2-9.
12. <http://www.uvzsr.sk/kalendar/>
13. <http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast>
14. Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, et al. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. J Infect Dis 2000; 181(1): 138-145.
15. Galazka AM. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. J Infect Dis 2000; 181(1): 2-9.
16. Galazka AM, Robertson SE, Oblapenko GP. Resurgence of diphtheria. Eur J Epidemiol 1995; 11: 95-105.
17. Zakikhany K, Neal S, Efstratiou A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United Kingdom, 2003-2012. Eurosurveillance 2014; 19(22): 1-7.
18. Bednář M et al., *Lekárska mikrobiologie*. 1. vydanie. Praha: Triton 1996. 560p.
19. Zasada AA, Baczevska-Rej M, Wardak S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. International Journal of Infectious Diseases 2010; 14(10): 907-e912.

MUDr. Martina Dobříková, PhD.

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s.

Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice

e-mail: martina.dobrikova@medirex.sk

All you need in Life Science

GENOMICS

PROTEOMICS

CELL BIOLOGY

vwrTM
part of avantor



Nález marker chromozómu u dieťaťa s Cat-eye syndrómom (kazuistika)

Katarína Tóthová¹, Alena Žákovičová¹, Gabriel Minárik¹, Dagmar Landlová¹, Erika Tomková¹, Miroslav Tomka¹, Luďka Wlachovská², Gabriela Hrčková³, Peter Križan¹, Renáta Lukačková¹

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

²Oddelenie patologických novorodencov, 1. detská klinika, DFNSP a LF UK, Bratislava

³Pracovisko genetickej diagnostiky Detskej kliniky LF UK a DFNSP, Bratislava

Cat-eye syndróm (CES) je vzácne genetické ochorenie. Zdraví jedinci s normálnym karyotypom majú dva normálne akrocentrické chromozómy 22, ktoré sa skladajú z krátkeho ramena 22p, centroméry a dlhého ramena 22q. U jedincov postihnutých CES je krátke rameno a časť dlhého ramena chromozómu 22 prítomné v štyroch kópiách. Touto parciálnou tetrazómiou regiónu 22p-22q11.21 vzniká malý nadpočetný bisatelitový marker chromozóm. V zriedkavých prípadoch je tento región prítomný v 3 kópiách (parciálna trizómia). Podľa miesta zlomu na chromozóme 22 rozlišujeme 2 typy CES. Prejavy vo fenotype varíujú, u každého postihnutého sú však prítomné 3: preaurikulárne výrastky, atrezia anu a kolobóm dúhovky. V našej kazuistike sa zaoberáme prípadom novorodenca s Cat-eye syndrómom 1. typu.

Kľúčové slová: Cat-eye syndróm, bisatelitový marker chromozóm, genetická diagnostika

Finding of a marker chromosome in a child with Cat-eye syndrome (case study)

Cat-eye syndrome (CES) is a rare genetic disease. Individuals with normal karyotype have two normal acrocentric chromosomes 22, which are composed of a short arm 22p, centromere and long arm 22q. In individuals with CES, the short arm and a small region of the long arm of chromosome 22 are present in four copies. Resulting in partial tetrasomy of region 22p-22q11.21 that appears as small supernumerary bisatellited marker chromosome. In a small proportion of cases with CES, this region is present in three copies (partial trisomy). CES is divided into two types depending on the breakpoint site. The symptoms vary widely, but all individuals are characterised by the presence of three symptoms: preauricular pits, anal atresia and iris coloboma. Here we report a case of a newborn patient with Cat-eye syndrome type 1.

Keywords: Cat-eye syndrome, bisatellited marker chromosome, genetic diagnostics

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 107 – 110

Úvod

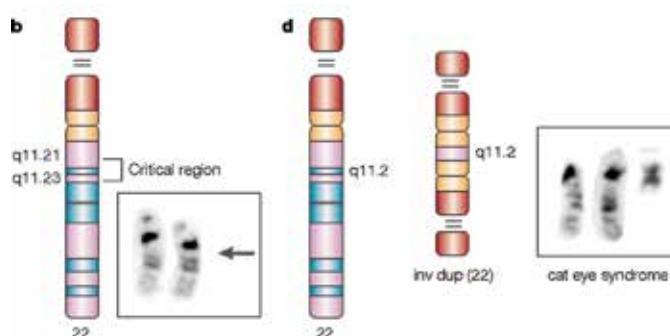
Cat-eye syndróm, nazývaný aj Schmidov-Fraccarov syndróm (OMIM 115470), je vzácne genetické ochorenie, ktorého prevalencia je 1 : 50 000 – 1 : 150 000. Ochorenie bolo nazvané podľa typického tvaru mačacieho oka⁽¹⁾.

Zdravý jedinec má dva normálne akrocentrické chromozómy 22⁽²⁾. U pacientov postihnutých CES je prítomný malý nadpočetný bisatelitový marker chromozóm inv dup(22pter-22q11) (SSMC – small supernumerary marker chromosome) (**obrázok 1**). SSMC sú malé chromozómy s abnormálnou štruktúrou, ktoré sa konvenčnou cytogenetickou metódou nedajú identifikovať. Veľkosťou sú rovnaké alebo menšie ako 20. chromozóm⁽³⁾. U pacientov s CES vzniká následkom parciálnej tetrazómie regiónu 22p-22q11.21, v zriedkavých prípadoch následkom parciálnej trizómie alebo intrachromozómovej triplicácie tohto regiónu⁽⁴⁾. Existujú 2 typy marker chromozómu, ktoré sa delia na základe bodu zlomu. Pri 1. type (častejší) bod zlomu zahŕňa iba región CESC (Cat-eye syndrome critical region), kým pri 2. type okrem CESC región kritický pre DiGeorge syndróm⁽⁵⁾.

Pre pacientov s CES sú typické 3 klinické prejavy: preaurikulárne výrastky, atrezia anu a kolobóm dúhovky. Môžu sa

tiež pridružiť ďalšie príznaky ako abnormality obličiek, srdca, intelektuálne postihnutie a zaostávanie v raste⁽⁶⁾. Ochorenie vo väčšine prípadov vzniká sporadicky pri dozrievaní vajíčka alebo spermie. Len v zriedkavých prípadoch ide o získaný genetický syndróm. V takom prípade je jedinec prenášač asymptomatický s nadpočetným marker chromozómom v mozaikovej forme, ktorý sa môže preniesť na potomkov⁽⁷⁾.

Obrázok 1. Mechanizmus vzniku nadpočetného bisatelitového marker chromozómu (SSMC)



Diagnostika CES sa začína na základe charakteristických prejavov a symptómov po narodení dieťaťa. Genetické testovanie sa vykonáva s cieľom potvrdenia diagnózy. Genetická analýza zahŕňa cytogenetické vyšetrenie karyotypu, fluorescenčnú in situ hybridizáciu (FISH) a komparatívnu genómovú hybridizáciu (arrayCGH). V niektorých prípadoch môže byť CES diagnostikovaný v prenatalnom období, ak sa na ultrazvuku zachytia podozrivé nálezy. Vtedy sa genetiky vyšetrí plodová voda, v skorších štádiách gravidity choriové klky. Liečbu postihnutých jedincov manažuje tím lekárov z rôznych medicínskych odborov, pretože sú postihnuté rôzne systémy. Prognóza pacientov s CES varíruje a závisí od prítomných symptómov⁽⁸⁾.

Kazuistika

Prezentujeme prípad mesačného chlapčeka hospitalizovaného na Neonatálnej klinike intenzívnej medicíny LF UK a NÚDCH. Pacient mal nasledujúce príznaky: kolobóm dúhovky aj cieiovky (**obrázok 2**), atréziu anu a rekta, preaurikulárne výrastky (**obrázok 3**), bilaterálnu poruchu sluchu, foramen ovale apertum a ductus arteriosus patens. Na rtg. bol zistený rázštep hrudného stavca a štrukturálne zmeny stavcov drierkovej oblasti, na ultrazvuku obličiek bilaterálna dilatácia odvodného systému I. – II. stupňa.

Chlapec sa narodil v termíne z 3. tehotenstva nepríbuzných rodičov s potvrdenou trizómiou 21. chromozómu v rodinnej anamnéze. 1. dieťa je zdravé, 2. tehotenstvo bolo

ukončené pre potvrdenú voľnú trizómiu 21. chromozómu. Tretie tehotenstvo prebiehalo fyziologicky. Vzhľadom na vek matky a pozitívnu rodinnú anamnézu, druhotrimestrový skríning ukázal zvýšené riziko (1 : 55) trizómie 21. chromozómu. Vek bol vyšší u matky (42) aj u otca (43) dieťaťa, čo sa spája so zvýšeným rizikom vzniku *de novo* mutácie. Podľa metodického pokynu SSLG (Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky)⁽⁹⁾ pre prenatalnú genetickú diagnostiku u tehotnej bola na základe pozitívneho druhotrimestrového skríningu, veku aj pozitívnej rodinnej anamnézy indikovaná prenatalná genetická diagnostika, ktorú však odmietla. Využila možnosť neinvazívneho prenatalného testovania (NIPT) založeného na analýze cirkulujúcej DNA z krvi tehotných žien, Trisomy test PLUS. Testom neboli odhalené aneuploidie chromozómov 13, 18, 21, aneuploidie pohlavných chromozómov ani významné mikrodélacie zodpovedné za vybrané mikrodelené syndrómy sledované Trisomy testom PLUS. Ako náhodný nález bola pozorovaná duplikácia úseku z 22. chromozómu v rozsahu 1,12 Mb (na rozhraní oblastí 22q11.1-q11.21), tá však nebola reportovaná s ohľadom na validovaný detekčný limit metódy Trisomy test PLUS na úrovni 3 Mb.

Metódy

Po genetickej konzultácii bola vzorka periférnej krvi pacienta odoslaná na naše oddelenie s podozrením na diagnózu CES. Využili sme viaceré dostupné genetické vyšetrovacie metódy, ktoré nám dopomohli k upresneniu diagnózy.

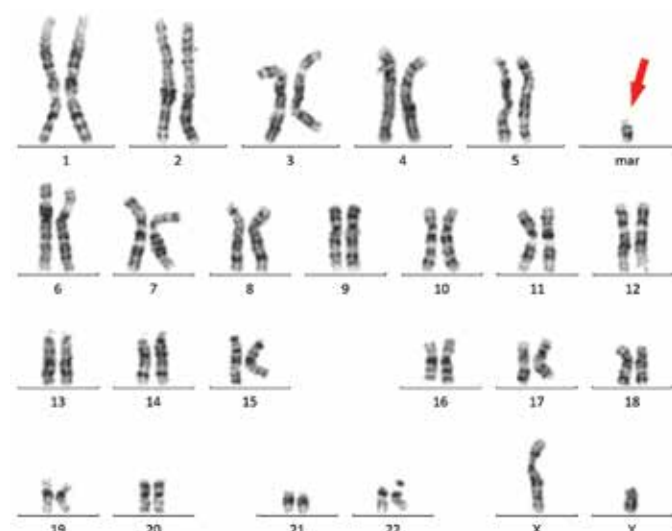
Obrázok 2. Kolobóm dúhovky acieiovky



Obrázok 3. Preaurikulárny výrastok



Obrázok 4. Karyotyp 47,XY,+mar



Cytogenetickým vyšetrením karyotypu (**obrázok 4**) zo vzorky periférnej krvi sme zachytili nadpočetný marker chromozóm (47,XY,+mar). Pre podozrenie na CES sme tento výsledok na potvrdenie diagnózy doplnili FISH analýzou použitím sondy XL Acro-p (MetaSystems) hybridizujúcej ku krátkym ramenám akrocentrických chromozómov (**obrázok 5**). Zistili sme nadpočetný marker chromozóm, ktorý pozostáva z dvoch akrocentrických regiónov. Na potvrdenie, že ide o úsek z 22. chromozómu, sme použili sondu Vysis DiGeorge Region Probe – LSI TUPLE 1 SO/LSI ARSA SG (Abbot), ktorá hybridizuje k DiGeorge kritickému regiónu 22q11. Výsledok bol negatívny. Až metódou arrayCGH sme zachytili tetrazómiu chromozómovej oblasti 22q11.1-q11.21 vo veľkosti 1,5 Mb, ktorá je typická pre Cat-eye syndróm (**obrázok 6**). Tým sme potvrdili, že nadpočetný marker chromozóm tvoria dve kópie kritického regiónu pre CES. Tento región zahŕňa 22 génov (XKR3, IL17RA, CECR2, SLC25A18, ATP6V1E1, BID, MICAL3, PEX26, TUBA8, USP18, psiTPTE22, HSFY1P1, GAB4, CECR7, CECR6, CECR5, CECR4, CECR1, BCL2L13, MIR3198, MIR648, FLJ41941), ktorých duplikáciu interpretuje databáza Decipher ako patogénne. Diagnóza CES bola potvrdená. Následne sme vyšetrili karyotyp obidvoch rodičov s fyziologickým výsledkom. U pacienta sa tento marker chromozóm objavil *de novo*.

Diskusia

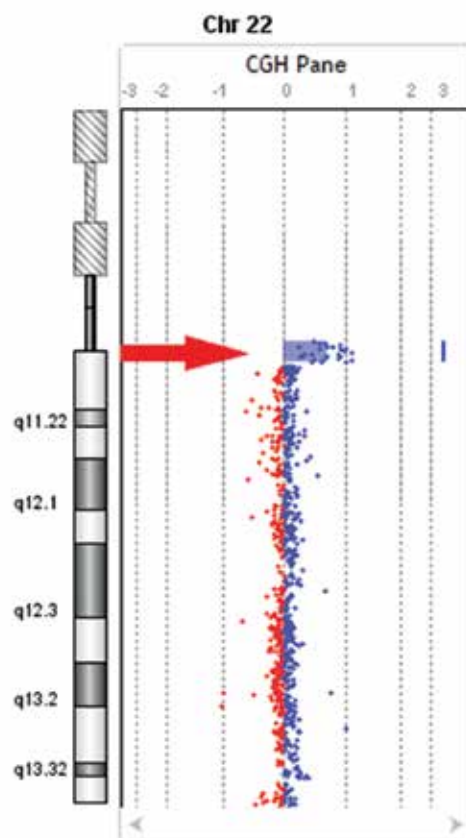
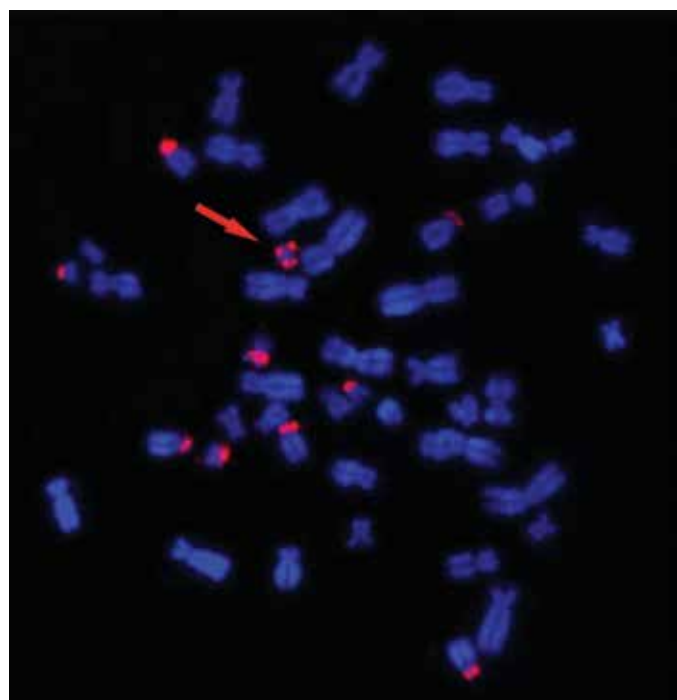
Cat-eye syndróm je zriedkavé genetické ochorenie, ktorého incidencia je 1 : 50 000 – 1 : 150 000 živonarodených detí. Pacienti vo väčšine prípadov majú dobrú prognózu prežívania^(1,2). Typickými symptómami ochorenia sú kolobóm dúhovky, análne malformácie a preaurikulárne výrastky v oblasti ucha. Ďalšími prejavmi CES sú anomálie postihujúce

oči, uši, kardiovaskulárny systém a urogenitálny trakt. Všetky opisované symptómy boli prítomné aj u nášho probanda. Pretože išlo o novorodenca, intelektuálne postihnutie nebolo možné zatiaľ presne určiť. Nadpočetný marker chromozóm vzniká väčšinou sporadicky^(6,7), čo dokazuje aj v našom prípade fyziologický karyotyp u oboch rodičov s normálnym fenotypom. U obidvoch bolo vyšetrených 50 metafáz, takže mozaikovú formu nadpočetného marker chromozómu sme s vysokou pravdepodobnosťou vylúčili.

V práci opisujeme vzácny prípad Cat-eye syndrómu, ktorý sme na našom oddelení zachytili prvýkrát. Po cytogenetickej analýze karyotypu a následnej FISH sme identifikovali malý nadpočetný bisatelitový marker chromozóm (sSMC) v každej vyšetrenej metafáze. V literatúre sa opisuje, že vzniká tetrazómiou regiónu 22q11.1-q11.21⁽²⁾, čo sme v našom prípade tiež potvrdili metódou arrayCGH. Tento úsek sa nachádza tesne pod regiónom, kde hybridizuje FISH sonda pre kritickú oblasť DiGeorge syndrómu. Podľa dostupnej literatúry⁽⁵⁾ práve tento región je zodpovedný za vznik CES. Tak sa nám podarilo rozlíšiť, o ktorý typ CES ide. U malého pacienta sme potvrdili 1. typ CES. Prenatálne bola síce metódou NIPT detegovaná duplikácia na 22. chromozóme v oblasti 22q11.1-q11.21, tá však pre svoju veľkosť (1,12 Mb), ktorá bola výrazne menšia ako validovaný detekčný limit metodiky (3 Mb), nebola reportovaná. V súčasnosti prebieha validácia a zavedenie novej komplexnejšej verzie Trisomy testu, ktorého súčasťou bude nástroj na podporu klinickej interpretácie neštandardných nálezov

Obrázok 6. ArrayCGH – detegovaná tetraploidia chromozómovej oblasti 22q11.1-q11.21 veľkosti 1,5 Mb zahŕňajúca 22 génov spatogénnym efektom. Oblasť centroméry a krátkeho ramena 22. chromozómu nie je pokrytá próbami, preto nerovnováhu uvedených oblastí nemožno zachytiť

Obrázok 5. FISH – sonda XL Acro-p (MetaSystems) hybridizuje skrátkami ramenami všetkých ľudských akrocentrických chromozómov. Na obrázku vidieť nadpočetný marker chromozóm s prítomnosťou 2 akrocentrických regiónov



detegovaných v rámci NIPT na úrovni celého genómu. Vďaka zavedeniu tohto podporného nástroja do rutínnej praxe by mali byť reportovateľné aj v súčasnosti nereportované detegované aberácie so zreteľom na ich potenciálne patogénny vplyv na vývoj plodu. Tehotná odmietla invazívny odber plodovej vody a vybrala si metódu NIPT, ktorá riziko trizómie 21. chromozómu vylúčila. Ak by bola vykonaná PGD, diagnóza CES by mohla byť jednoznačne zistená už v prenatalnom štádiu. Na uvedenom prípade chceme demonštrovať potrebu kombinácie rôznych genetických a molekulárnych metód umožňujúcich stanovenie príčiny veľmi zriedkavých genetických porúch,

LITERATÚRA

1. Berends MJ, Tan-Sindhunata G, Leegte B, van Essen AJ. Phenotypic variability of cat-eye syndrome. *Genetic Counseling* 2001; 12(1): 23-34.
2. <https://rarediseases.org/rare-diseases/cat-eye-syndrome/>
3. Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* 2004; 107: 55-67.
4. Knijnenburg J, van Bever Y, Hulsman LOM, et al. A 600 kb triplication in the cat eye syndrome critical region causes anorectal, renal and preauricular anomalies in a three-generation family. *European Journal of Human Genetics* 2012; 20(9): 986-989.
5. McTaggart KE, Budarf ML, Driscoll DA, et al. Cat-eye syndrome chromosome breakpoint clustering: identification of two intervals also associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1998; 81(3-4): 222-228.

v tomto prípade reprezentovaných mikroduplikačným syndrómom spôsobujúcim Cat-eye syndróm.

Záver

Cat-eye syndróm je vzácne genetické ochorenie postihujúce hlavne oči, uši a tráviaci trakt. Použitím rôznych molekulárnogenetických metód bolo možné postnatálne identifikovať kauzálnu chromozómovú aberáciu u probanda vykazujúceho symptómy tohto veľmi zriedkavého genetického ochorenia, ku ktorému je v literatúre opísaných celosvetovo len zhruba 100 prípadov.

6. Jedraszak G, Receveur A, Andrieux J, et al. Severe psychomotor Delay in a Sever Presentation of Cat-Eye Syndrome. *Hindawi Publishing Corporation, Case Reports in Genetics* 2015.
7. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB & Expert=195
8. <https://www.omim.org/entry/115470>
9. <https://www.sslg.sk/index.php/dokumenty/metodicke-pokyny/71-indikovanie-prenatalnych-genetickych-testov-vvch-2>

RNDr. Katarína Tóthová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
e-mail: katarina.tothova@medirex.sk

FARBIACI A MONTOVACÍ AUTOMAT HISTOCORE SPECTRA

Leica
BIOSYSTEMS



baria

- plnoautomatický farbiaci a montovací systém od prvého kroku vloženia skiel až po zamontovanie
- automatické pokračovanie procesu pri výpadku el. prúdu
- automatické rozoznávajúce farbiaceho procesu bez zásahu užívateľa



- lpetrusova@baria.sk
- +421 948 633 493
- www.baria.cz

Colonic mucosal Schwann cell hamartoma with tactile corpuscle-like bodies: a case report

Michal Zámečník^{1,2}, Jozef Kuruc³

¹Agel, a. s., Laboratory of Surgical Pathology, Nový Jičín, Czech Republic

²MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava, Slovak Republic

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

A rare case of colonic mucosal Schwann cell hamartoma with tactile corpuscle-like bodies is described. It was a 4 mm polyp removed by colonoscopy in a 67-yr-old female patient without personal/family history of inherited syndrome. The lesion contained vague fascicles of bland Schwann cells and several tactile corpuscle-like bodies. Immunohistochemically, it expressed strongly S100 protein and SOX10, and it was negative for CD34, EMA, alpha-smooth muscle actin, CD99, CD56, chromogranin A, synaptophysin, c-kit, DOG1, and calretinin. This case supports an opinion that mucosal Schwann cell hamartoma and mucosal tactile corpuscle-like bodies of the gastrointestinal tract share a common histogenesis and that they represent a morphologic spectrum of a single entity.

Keywords: colon, mucosal Schwann cell hamartoma, tactile corpuscle-like bodies, immunohistochemistry

Hamartóm zo Schwannových buniek v sliznici hrubého čreva: popis prípadu

Popísaný je prípad hamartómu zo Schwannových buniek hrubého čreva, s tvorbou meissneroidných teliesok. Jednalo sa o 67-ročnú ženu, ktorá nemala klinické známky ani rodinnú anamnézu svedčiacu pre dedičný syndróm s neuronálnymi proliferáciami (neurofibromatóza, MEN, adenomatózna polypóza). Pri kolonoskopii bol odstránený 4 mm-ový polyp sigmy. Histologicky obsahoval vretenobunkovú štruktúru Schwannových buniek, s málo početnými meissneroidnými telieskami. Imunohistochemicky bola lézia silne pozitívna na S100 proteín a SOX10. Negatívne boli CD34, EMA, alfa-hladkosvalový aktín, desmín, CD99, CD56, chromogranín A, synaptofyzín, c-kit, DOG1 a kalretinín. Prípad podporuje v nedávnej literatúre prezentovaný názor, že mukózne hamartómy zo Schwannových buniek a meissneroidné telieska sliznice GIT-u majú spoločnú histogénezu a reprezentujú morfológické spektrum jedinej lézie.

Kľúčové slová: hrubé črevo, mukózne hamartómy zo Schwannových buniek, meissneroidné telieska, imunohistochemia

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 111 – 113

Introduction

In 2009, Gibson and Hornick described a novel and rare colonic Schwann cell lesion that differs from already well-known neural lesions of the gastrointestinal tract, such as neurofibroma, schwannoma, ganglioneuroma, perineurioma and mucosal neuroma⁽¹⁾. They termed it mucosal Schwann cell hamartoma (SCH). Subsequently, additional cases were published⁽²⁻⁴⁾. In the same year, Myisidis et al. described in gastric mucosa another neurogenic lesion which consists of tactile-like corpuscles⁽⁵⁾. A few similar cases found in colonic mucosa and in other gastrointestinal locations were described afterwards⁽⁶⁻¹⁰⁾. Quite recently, Cereilo Munoz et al. added further 9 cases and they labeled the lesion „tactile corpuscle like bodies of the mucosa“⁽¹¹⁾. In this study, the authors shortly mention a possibility that tactile corpuscle like bodies could represent a variant of SCH. This is supported by one published case of SCH by Ferro de Beca et al. who described „tactoid body features“ in the lesion⁽¹²⁾. We would like to demonstrate an additional SCH that contains tactile corpuscle like bodies. This observation supports further the opinion that SCH and tactile corpuscle like bodies are closely

interrelated from histogenetic point of view and that both lesions may represent a morphologic spectrum of a single entity.

Case report

A 4-mm-sized polyp of the sigmoid colon was found in a colonoscopy of a 67-year-old female who has no significant family history of other neuronal lesions or inherited syndromes. The reason for colonoscopy was positive fecal occult blood test and anemia.

Histologically, the polyp showed a poorly circumscribed proliferation of bland appearing spindle cells in the lamina propria, separating the crypt architecture (**Figure 1**). The cells formed small plexiform nests and short ill-defined fascicles. Some of the nests showed concentric and lamellated arrangement of the cells, resembling closely that of Wagner-Meissner tactile body (**Figure 1c**). Nuclear atypia, pleomorphism, or mitoses were not observed. A few colonic crypt of the lesion were hyperplastic, with serrated morphology. On immunohistochemical staining, the spindle cells displayed a strong and diffuse positivity for S-100 protein

Figure 1. Histological features of Schwann cell hamartoma with tactile corpuscle-like bodies. **(a, b)** Bland appearing Schwann cell proliferation in the mucosa forms ill-defined cell nests and fascicles. **(c)** At high power, some of the cell nests showed resemblance to Wagner-Meissner body.

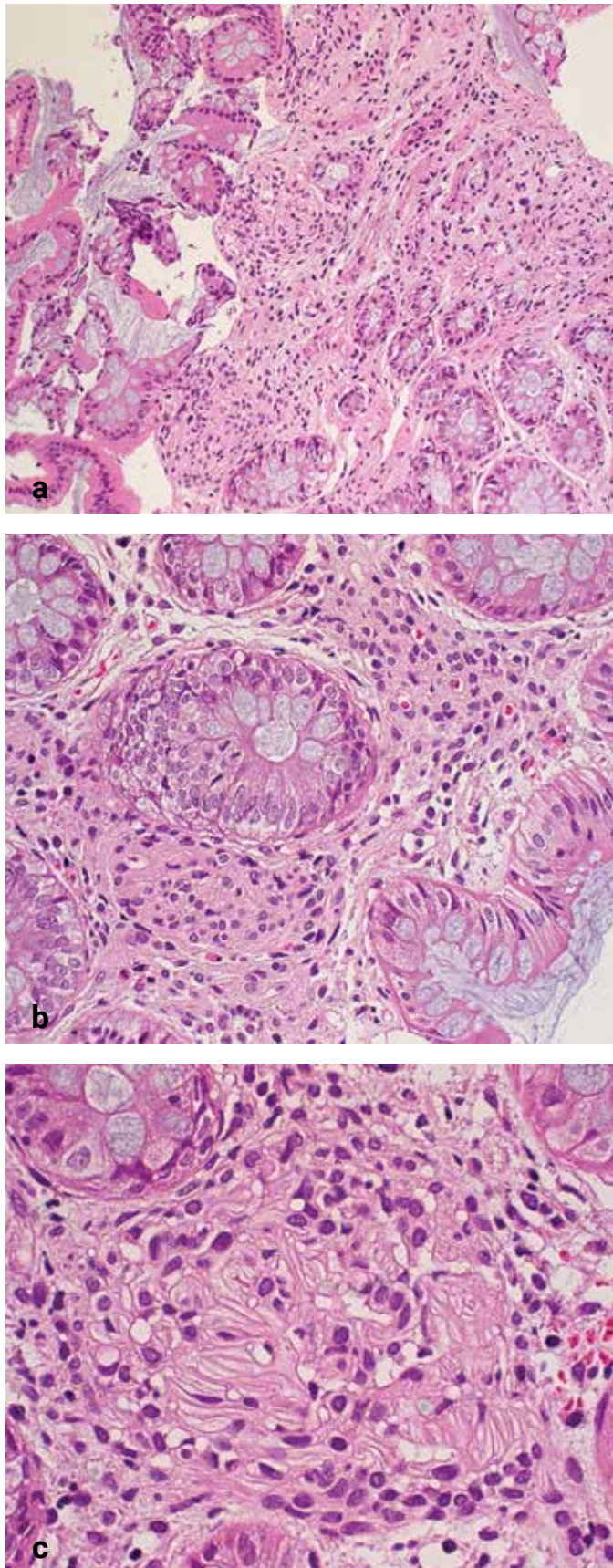
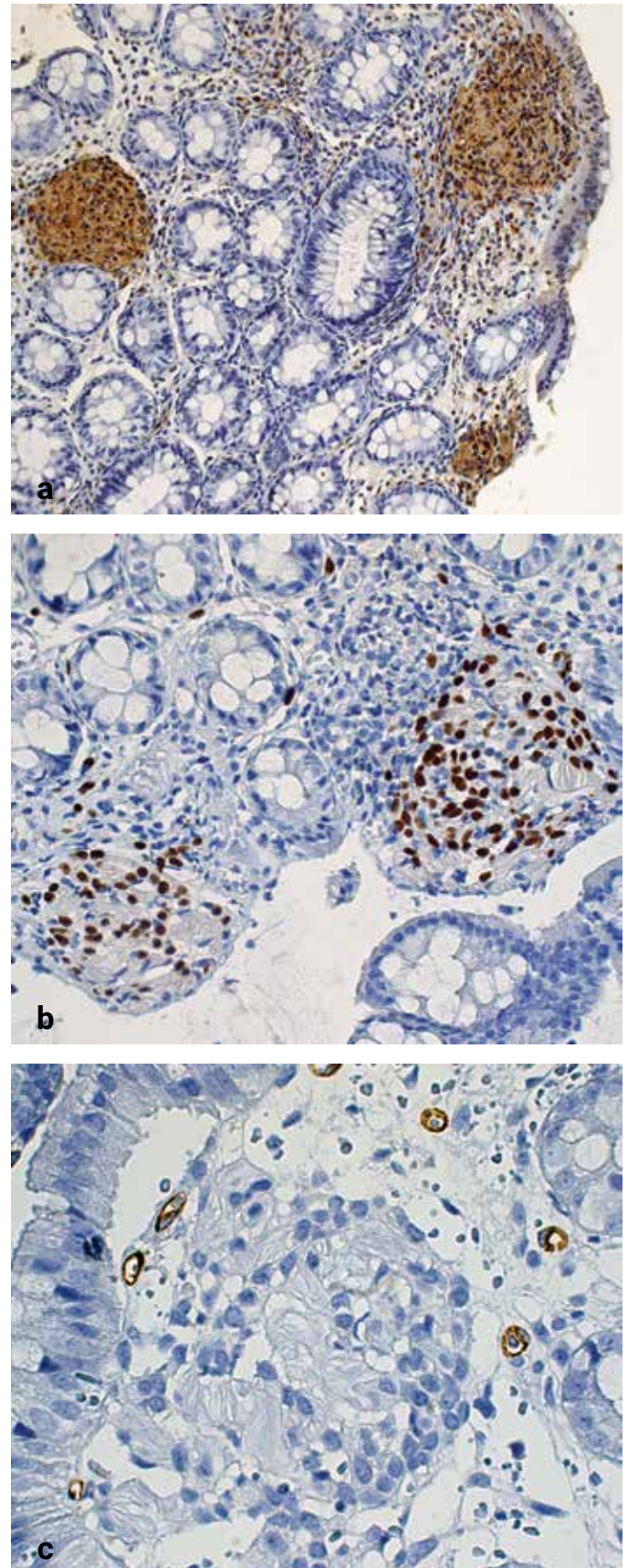


Figure 2. Immunohistochemical features of Schwann cell hamartoma with tactile corpuscle-like bodies. **(a, b)** Positivity for S100 protein and SOX10 are shown, respectively. **(c)** CD34 is limited to the vessels and it is negative in the cells of the lesion.



(polyclonal, DAKO) and SOX10 (clone EP268, Cell Marque) (**Figure 2**). They were negative for following antibodies: CD34 (Qbend/10, prediluted, Biogenex) (**Figure 2c**), EMA (E29, prediluted, Biogenex), synaptophysin (Synp88, prediluted, Biogenex), alpha-smooth muscle actin (1A4, DAKO), CD99 (O13, Ventana), CD56 (123C3, DAKO), chromogranin A (DAK-A3, DAKO), c-kit (polyclonal, DAKO), DOG1 (SP31, Cell Marque), and calretinin (DAK-Calret1, DAKO).

Discussion

In our case, the tumor was composed of Schwann cell proliferation with features typical of SCH⁽¹⁾, i.e., non-circumscribed mucosal lesion composed of vague ill-defined fascicles of bland S100 protein positive spindle cells. In addition, some plexiform foci of the tumor formed lamellated structure with morphology of tactile corpuscle like bodies, as described by Myrsidis and Cereilo Munoz et al.^(5,11). Our case is quite similar to the case of SCH with tactoid body features described by Ferra et al.⁽¹²⁾. Both cases indicate that SCH and tactile corpuscle like bodies may represent a single entity and that tactile corpuscle like bodies of the mucosa can be regarded as a special form of SCH. By reading of previous reports of SCH, we have realized that some of these studies show in SCH structures similar to the tactile corpuscle-like corpuscles, and therefore the cases could be considered to be SCHs with tactile corpuscle like bodies. Ortiz et al.⁽²⁾ in their figures 1 and 2, and Han et al.⁽³⁾ in their figure 1C depict round Schwann cell nests with lamellated cell arrangement which is quite similar to that of Wagner-Meissner corpuscle. In addition to this morphologic overlap between SCH and tactile corpuscle like bodies, it is apparent that both lesions overlap also from clinical point of view. They both appear to be reactive non-neoplastic, and all published cases lacked an association with known syndromes with gastrointestinal nerve sheath cell proliferations, such as type 1 neurofibromatosis

and multiple endocrine neoplasia, type 2 B⁽¹⁾. For this reason, it is important for pathologist to be familiar with these lesions. The differential diagnosis of our case included gastrointestinal stromal tumor⁽¹³⁾, neurofibroma^(14,15), mucosal neuroma⁽¹⁶⁾, ganglioneuroma⁽¹⁷⁾, mucosal schwannoma^(18,19) and perineurioma^(20,21). Gastrointestinal stromal tumors are usually submucosal or intramural, lack tactile-like corpuscles, and they express CD117 and often CD34 and actin. Neurofibromas contain in contrast with SCH heterogeneous cell population which includes CD34+ and/or EMA+ cells and scattered axons, in addition to S100+ Schwann cells. Tactile-like corpuscles are common in diffuse type neurofibroma of the skin and soft tissue, but this type of neurofibroma is exceedingly rare in the gastrointestinal system^(14,15). Ganglioneuroma contains in addition to Schwann cells at least a few ganglion cells which express synaptophysin and NSE^(17,22). Mucosal neuroma, a lesion associated often with multiple endocrine neoplasia, consists of hyperplastic bundles of nerve fibers, including frequent axons^(1,16,22). Immunohistochemically, it contains S100+ Schwann cells, CD34+ endoneurial cells and EMA+ perineurial cells (like cutaneous encapsulated palisaded neuroma). Mucosal schwannoma^(18,19) is well circumscribed, surrounded by dense lymphoid infiltration and it express S100 protein and GFAP. Some cases contain axons and/or CD34+ cells. It lacks tactile body like corpuscles. Mucosal colonic perineurioma is S100 protein-negative and it express perineurial cell markers, such as EMA, GLUT-1 and claudin-1^(20,21).

In sum, we described mucosal SCH with focal features of tactile corpuscle-like bodies. The case further supports histogenetic relationship between mucosal SCH and tactile corpuscle-like bodies. Both lesions are benign and none of the published cases was associated with inherited syndromes.

REFERENCES

- Gibson JA, Hornick JL. Mucosal Schwann cell „hamartoma”: clinicopathologic study of 26 neural colorectal polyps distinct from neurofibromas and mucosal neuromas. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 781-787.
- Ortiz J, Chinchilla L, Muñoz E, et al. Mucosal Schwann cell hamartoma: colonic lesion susceptible to an interesting differential diagnosis. *Open J Pathol* 2018; 8: 101-105.
- Han J, Chong Y, Kim TJ, et al. Mucosal Schwann cell hamartoma in colorectal mucosa: A rare benign lesion that resembles gastrointestinal neuroma. *J Pathol Transl Med* 2017; 51: 187-189.
- Bae MN, Lee JE, Bae SM, et al. Mucosal Schwann-cell hamartoma diagnosed by using an endoscopic snare polypectomy. *Ann Coloproctol* 2013; 29: 130-134.
- Myrsidis I, Xirou P, Koumbanaki M, et al. Tactile-like corpuscles in gastric mucosa. A case report [abstract]. *Virchows Arch* 2009; 455: S216.
- Barbieri AL, Jain D, Gobel S, et al. Wagner-Meissner corpuscle proliferation: a unique cause of colon polyps. *Int J Surg Pathol* 2012; 20: 79-82.
- Reale D, Ballotta MR, Borghi L, et al. Wagner-Meissner-like corpuscles in gastric mucosa: a brief report. *Int J Surg Pathol* 2014; 22: 544-546.
- George SA, Shepherd NA. Neural-derived tactile corpuscle-like structures in gastrointestinal biopsy specimens and their mimicry of granulomata. *Histopathology* 2010; 57: 147-148.
- Salim S, Liu B, Mahmoodi M, et al. Tactile-like corpuscles in gastric mucosa: a case report. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 39.
- Wills EJ, Croker J, Brammah S. Tactile corpuscle-like bodies in colonic mucosa. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27: 79-86.
- Celeiro-Muñoz C, Huebner TA, Robertson SA, et al. Tactile corpuscle-like bodies in gastrointestinal-type mucosa: A case series. *Am J Surg Pathol* 2015; 39: 1668-1672.
- Ferreira de Beça F, Lopes J, Maçoas F, Carneiro F, Lopes JM. Tactoid body features in a Schwann cell hamartoma of colonic mucosa. *Int J Surg Pathol* 2014; 22: 438-441.
- Miettinen M. Gastrointestinal Stromal Tumor, in *Modern Soft Tissue Pathology: Tumors and Non-Neoplastic Conditions*. New York, USA: Cambridge University Press, 2010, p. 491-507.
- Basile U, Cavallaro G, Polistena A, et al. Gastrointestinal and retroperitoneal manifestations of type 1 neurofibromatosis. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 186-194.
- Agaimy A, Märkl B, Kitz J, et al. Peripheral nerve sheath tumors of the gastrointestinal tract: a multicenter study of 58 patients including NF1-associated gastric schwannoma and unusual morphologic variants. *Virchows Arch* 2010; 456: 411-422.
- Attar B, Khurana D, Hlaing-Ray V, et al. Mucosal neuroma of the rectosigmoid colon. *Gastrointest Endosc* 1986; 32: 219-220.

17. Shekitka KM, Sobin LH. Ganglioneuromas of the gastrointestinal tract: relation to von Recklinghausen disease and other multiple tumor syndromes. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 250-257.
18. Miettinen M, Shekitka KM, Sobin LH. Schwannomas in the colon and rectum: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 846-855.
19. Zamecnik M, Mukensnabl P, Sokol L, et al. Perineurial cells and nerve axons in gastrointestinal schwannomas: a similarity with neurofibromas. An immunohistochemical study of eight cases. *Cesk Patol* 2004; 40: 150-153.
20. Eslami-Varzaneh F, Washington K, Robert ME, et al. Benign fibroblastic polyps of the colon: a histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 374-378.
21. Zamecnik M, Chlumska A. Perineurioma versus fibroblastic polyp of the colon. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1337-1339.
22. Rittershaus AC, Appelman HD. Benign gastrointestinal mesenchymal BUMPS: a brief review of some spindle cell polyps with published names. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 1311-1319.

MUDr. Michal Zámečník

Agel, a. s., Laboratory of Surgical Pathology
K nemocnici 76,741 01 Nový Jičín, Czech Republic
e-mail: zamecnikm@seznam.cz

ABL90 FLEX PLUS | **AQT90 FLEX**

WORLD LEADER IN ACUTE CARE TESTING



NAJVIAC PARAMETROV | NAJMENŠÍ OBJEM VZORKY
NAJRÝCHLEJŠIA ANALÝZA | AUTOMATICKÝ SYSTÉM KVALITY
NAJVIAC INŠTALÁCIÍ V ČESKEJ A SLOVENSKEJ REPUBLIKE

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

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

RADIOMETER s.r.o. | zastoupení pro ČR a SR

Křenova 3, 162 00 Praha 6, Tel.: +420 220 400 300, www.radiometer.cz

www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

