

newslab

časopis laboratórnej medicíny

Ročník XII.

2
2021

**Molekulárny mechanizmus karcinogenézy indukovanej
prostredníctvom baktérií**

Molecular mechanism of bacterial-induced
carcinogenesis

**Extracelulárne vezikuly a ich potenciálne využitie
v klinickej praxi**

Extracellular vesicles and their potential
use in clinical practice

**Detection of copy number variation from low-coverage
whole-genome sequencing data**

Detekcia štrukturálnych variantov v genóme
z dát s nízkym pokrytím

**Lengths of circulating DNA fragments as a promising
predictor of cancer stage**

Dĺžkové profily fragmentov cirkulujúcej DNA
ako potenciálny prediktor štádia onkologických ochorení

**Využitie hmotnostnej spektrometrie v diagnostike
porúch glykozylácie**

The application of mass spectrometry in diagnostics
of glycosylation disorders

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

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

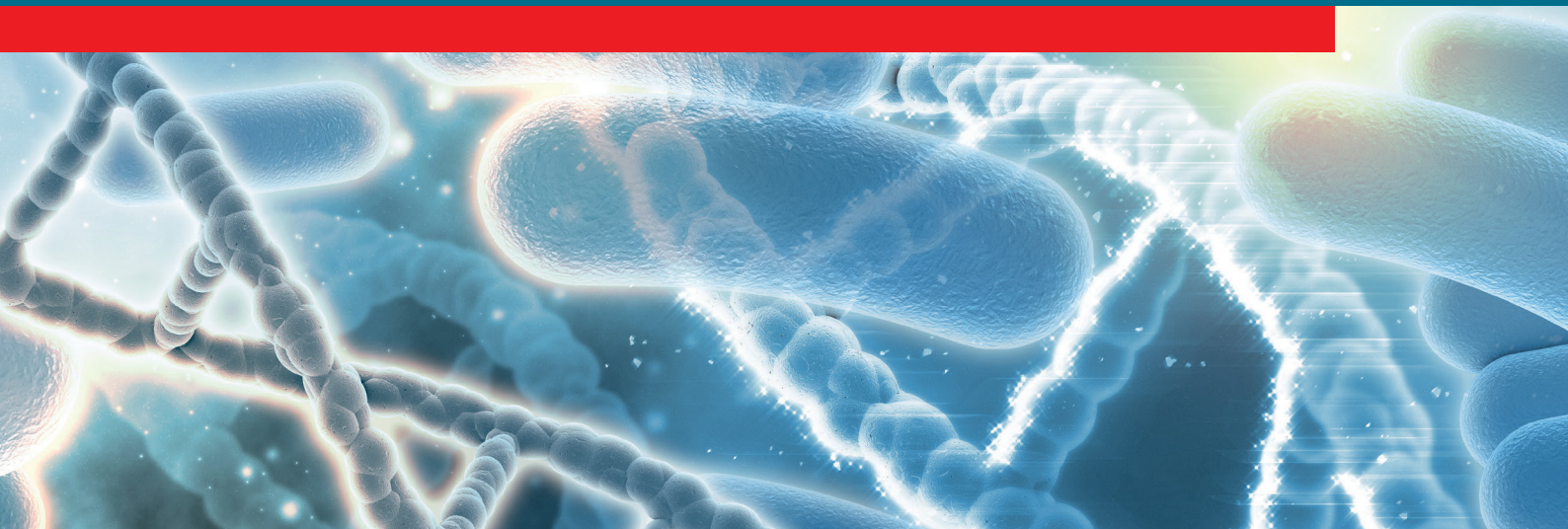
Časopis má pridelenú citačnú skratku, čo v praxi znamená, že autorom sa ich príspevky započítavajú do publikačnej činnosti. Zároveň je indexovaný v Bibliographia Medica Slovaca (BMS) a citácie sú spracované v CiBaMed.

Všetky uverejnené príspevky autorov sú recenzované.

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

Aktuálne vydanie nájdete na stránke www.newslab.sk.

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



Milí čitatelia,

končí sa už druhý rok pandémie. V porovnaní s prvým rokom pandémie sa zmenilo veľa vecí. Mnohí pochopili, že vírus tu s nami asi pobudne dlhšie a nie je to len rýchla pandémia na jednu jar. Zároveň veľká časť populácie prestáva vnímať riziko nákazy. Nanešťastie u mnohých to nie je z dôvodu, že sú chránení imunitou získanou prekonaním či očkovaním. Práve táto pasivita alebo niekedy až odpor k očkovaniu nám situáciu zhoršujú. Kým začiatok pandémie sprevádzal strach, solidarita k zdravotníkom a súdržnosť pri vyrábaní rúšok a iných ochranných prostriedkov, práve objavené riešenie túto súdržnosť rozbilo. Napriek tomu, že moderná veda dokázala rýchlo vytvoriť účinnú očkovaciu látku na boj s vírusom, nestačilo to na zastavenie šírenia. Nepomáha mediálna kampaň, pozitívne príklady zo zahraničia ani vyjadrenia odborníkov. Nízka zaočkovanosť však nevlplyva iba na šírenie vírusu, ale aj na celé všeobecné zdravie. Pandémia nanešťastie nezastavila prejavy a šírenie ostatných ochorení. Ich liečba sa len odkladá. Nemocnice sú počas jednotlivých vln dlhé mesiace v núdzovom stave a dokážu poskytovať iba nevyhnutnú starostlivosť. V období medzi vlnami sa snažia dobehnúť odložené zákroky, no zároveň je to aj jediný čas na regeneráciu zdravotníckeho personálu. Navyše mnohí pacienti odkladajú návštevy u lekárov aj z obavy pred nákazou, čím sa ich stav často zhoršuje. Ak nie fyzický, tak určite psychický, ktorý je nahlodávaný neistotou z možných vážnych diagnóz. Možno pomôže strach z málo známeho variantu omikron. Deprimujúce okolnosti posledných rokov však nezastavili úplne našu snahu. Mnohí z nás naďalej pracujú a zotrvávajú v bádateľskej alebo zdravotníckej činnosti. Museli sme sa prispôsobiť novým podmienkam a naučiť sa plánovať inak ako v minulosti. Plánujeme pandemicky, s časovou rezervou a s automatickým predpokladom, že svoju prácu budeme musieť obmedziť alebo úplne zastaviť. Napriek okolnostiam nám neostáva nič iné, iba veriť, že poctivou prácou vytvorený obsah tohto vydania pomôže vo zvyšovaní povedomia čitateľov a dodá im silu ďalej pracovať.

Prajem príjemné a poučné čítanie.



Mgr. Michal Kajsík, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY

Pôvodné práce

Detection of copy number variation from low-coverage whole-genome sequencing data	53
Zuzana Klinovská, Marcel Kucharík, Martina Sekelská, Michaela Hýblová, Jaroslav Budiš, Tomáš Szemes	
Lengths of circulating DNA fragments as a promising predictor of cancer stage	58
Marek Štrba, Jaroslav Budiš, Werner Krampfl, Tomáš Sládeček, Ondrej Pös, Mária Lucká, Tomáš Szemes	
Dôkaz DNA Pneumocystis jirovecii verzus mikroskopický dôkaz pri vyšetreniach pneumocystózy u pacientov zo Slovenska v rokoch 2001 – 2019	64
Vojtech Boldiš, František Ondriska, Michaela Čerňancová, Ľubor Kováč, Jakub Steinhübel, Marcela Bastlová	
Využitie hmotnostnej spektrometrie v diagnostike porúch glykozylácie	69
Zuzana Pakanová, Marek Nemčovič, Rebeka Kodríková, Maroš Krchňák, Anna Šalingová, Claudia Šebová, Vladimír Bzdúch, Hana Hansíková, Ján Mucha	
Možnosti analýzy močových konkrémentov	73
Erik Drabiščák, Erik Dorko, Stanislav Jeleň	

Prehľadové práce

Mikrobiálne spoločenstvá a ich vplyv na liečbu diabetickej nohy	79
Michal Kajsík, Pavol Janega	
Molekulárny mechanizmus karcinogenézy indukovanej prostredníctvom baktérií	83
Kamila Bernátová, Ondrej Pös	
Extracelulárne vezikuly a ich potenciálne využitie v klinickej praxi	88
Matúš Jurčík, Veronika Lukáčová	

Kazuistiky

Fibroepitelový stromálny polyp vulvy: opis prípadu	92
Vladimír Bartoš	

Ročník 12, 2021, číslo 2
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: december 2021

Redakčná rada:

Šéfredaktorka:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Členovia:

Dr. Domenico Pangallo, DrSc.
 Dr. Boris Klempa, DrSc.
 RNDr. Martin Radina
 prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.
 prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.
 Ing. Pavol Sulo, CSc.
 Dr. Bálint Nagy, PhD.
 Dr. Branislav Zagrapan, PhD.
 Dr. Tomas Kovacic
 Dr. Gabriela Gubo
 Dr. Štefan Lukáč
 Mgr. Peter Baráth, PhD.
 RNDr. Ján Radvánszky, PhD.
 Dr. Jaroslav Bojňanský
 Dr. Katarína Vlniešková

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

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

Výkonné redaktorky:

Mgr. Slavomíra Šindelárová
 Mgr. Martina Šoltésová

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Natália Hobothová

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 of copy number variation from low-coverage whole-genome sequencing data

Zuzana Klinovská¹, Marcel Kucharík^{1,2}, Martina Sekelská^{4,5,6}, Michaela Hýblová^{4,5,6}, Jaroslav Budiš^{1,2,3}, Tomáš Szemes^{1,2,7}

¹Geneton Ltd, Bratislava, Slovakia

²Comenius University Science Park, Bratislava, Slovakia

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

⁴Medirex Inc., Bratislava, Slovakia

⁵TrisomyTest Ltd., Bratislava, Slovakia

⁶Medirex Group Academy, Bratislava, Slovakia

⁷Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava

Copy number variation (CNV) is a form of structural variant that leads to an abnormal number of copies of genomic regions in a cell. Next-generation-sequencing technologies enabled efficient whole-genome-sequencing, which made the detection of CNVs cheaper and faster. In this article we review four tools for the detection of CNVs on low-coverage data and compare their results and highlight their advantages and disadvantages.

Key words: structural variants, detection of the structural variants, tools for the detection of structural variants, copy number variations, detection of copy number variations.

Detekcia štrukturálnych variantov v genóme z dát s nízkym pokrytím.

Variety počtu kópií (CNV) sú jednou z foriem štrukturálnych variantov, ktoré spôsobujú abnormálne kopírovanie niektorých regiónov genómu v bunke. Sekvenovanie druhej generácie umožnilo efektívne celogenómové sekvenovanie a tým sa umožnila rýchlejšia a lacnejšia detekcia týchto variantov. V našom článku posudzujeme štyri nástroje pre detekciu CNV variantov na dátach s nízkym pokrytím. Porovnáваме ich výsledky a pre každý nástroj sa snažíme ustanoviť jeho výhody a prípadné nevýhody.

Kľúčové slová: štrukturálne varianty, detekcia štrukturálnych variantov, nástroje pre detekciu štrukturálnych variantov, varianty počtu kópií, detekcia variantov počtu kópií.

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 53 – 57

Introduction

In recent years the sequencing costs were dropping rapidly and this trend continues each day. The analysis of various structural variants using shallow-depth sequencing data is becoming more and more popular mainly due to a fact that it is cheaper, faster, and yields relatively accurate results. This approach can be used in the detection of a specific type of structural variants called Copy number variations or CNVs.

Fetal CNVs in NIPT and tools for their detection

Copy number variation is a phenomenon in which sections of DNA are duplicated or they are deleted. This phenomenon represents a significant source of genetic diversity among different species including humans.

However, CNVs are linked to various syndromes and diseases as well. They are associated with schizophrenia, autism, or susceptibility to HIV infection⁽¹⁾. What is more, CNVs can cover part of a gene, whole gene, or even several genes and therefore they are likely to have a role in the alternation of human physiological functions, which are essential processes such as metabolism, movements, reproduction, and others⁽²⁾.

Genetic centers have developed numerous tools for the detection of CNVs. Our goal is to compare four different CNV detection tools. We are particularly interested in fetal CNVs that were acquired via non-invasive prenatal testing (NIPT), which uses shallow whole-genome sequencing. In this study, we analyzed data with very small coverages from 0.05x to 0.5x, which is common in NIPT and similar tests. Chosen tools share some similarities in the detection approach. However, due to various factors that affect this process, their performance is greatly varied. Overall, detection of any microdeletion/microduplication variant is limited by four main factors: fetal fraction in NIPT samples (proportion of cell-free fetal DNA - fetal DNA that circulates freely in the maternal blood), size of the particular CNV, coverage, and biological and technical variability of the event region⁽²⁾. From these factors only coverage can be directly changed to obtain more accurate results, but with a higher production cost. Naturally, the higher the fetal fraction and the bigger the size of CNV, the easier the detection for any of the tools. Biological and technical variability of the event region refers to the fact that some sectors can be more variable than others. It can be caused by various factors such as repetiti-

ve elements, mapping ability, and so on⁽²⁾. As a result, these regions are harder to detect and are usually filtered out from the analyses.

CNV detection approach

Tools for CNV detection share some similarities in their approaches. Usually, there are four main steps. Firstly, the reads of the target sequence are separated into smaller sections called bins. Bin-size is the number of bases inside the bin. Although this parameter can be often adjusted by the user, some tools propose a method to determine the optimal bin size. Final detection resolution strongly depends on the bin size. Larger bin size results in worse resolution, but faster computational time in some tools.

The second step is normalization. This process normalizes or purifies the bin counts from various biological biases such as GC content. The process of normalization is very important since it reduces the noise commonly seen in samples and therefore can considerably improve final sensitivity and specificity.

Following normalization comes segmentation of the signal. Segmentation is a process of splitting the signal into parts with equal height (or equal normalized bin-count in our scenario). Circular binary segmentation (CBS) is a fast, recursive algorithm, which finds change points in sequential data, where CNVs could be found. It is a popular method for segmentation.

Finally, the segments are categorized as baseline segments (no CNV detected) or segments with duplication/deletion. Furthermore, in the NIPT case, here we can usually distinguish segments with fetal and maternal CNV based on the strength of the signal compared to the fetal fraction.

CNV detection tools

Comparison of CNV detection tools helps highlight the advantages and disadvantages of the particular tools. Although there are similarities within them, the results vary, especially when the detection is done on a special type of samples, such as NIPT samples with low coverage. Overall, the comparison was done over four different tools.

The first tool we wanted to include in our comparison is WisecondorX^(2,3). In contrast to its predecessor WISECONDOR⁽²⁻⁴⁾, the newer tool is faster and has a wider usage. The authors used the CBS algorithm in the segmentation step and thus lowered computation time. In addition to this, they made WisecondorX usable for analyses beyond NIPT, since the original tool could not be used on other samples.

The next tool is CNV-caller, which similarly to WisecondorX uses the CBS algorithm. However, since this procedure partitions a chromosome excessively, which can create excessive noise, authors of these tools apply a rule to determine the significance of a segment. This could lead to more accurate results.

The following tool is called iCopyDav⁽⁵⁾, the default bin size for this tool for low-coverage data is 500bp which is more suitable for data with higher coverage. Previous tools had default sizes in tens of kilobases. In our analyses, we use the same bin size for every tool (20 000bp) and as a result, we expect less accurate results. However, this tool uses some interesting approaches and ideas that we wanted to put to a test. In the segmentation step, CBS is used, but in contrast

to the previous two tools, iCopyDav uses a different method for smaller aberrations. This is because a CBS is predominantly used for identifying larger CNVs, consequently, iCopyDav should have a wider range of CNV predictions.

The last tool we compared is called CNVkit^(5,6). In this case, CNVkit is said to calculate bin size specifically for off-target (non-coding) regions, which is an interesting approach and we wanted to see how this methodology would do in the comparison. In addition, this tool accepts an input with no control samples, thus it can work without a reference from normal samples, while other tools require this data. However, a reference genome such as hg19 should be provided. For the segmentation step, CBS is used as in the other tools.

Materials and methods

One of our goals was to discover the relation between detection accuracy and parameters such as fetal fraction and CNV size. Three sets of samples were used for this analysis: training samples, mixed data samples, and healthy NIPT samples. All obtained samples are from patients, who signed consent with the study.

Training samples for all tools, except for the CNVkit, use a constructed reference for CNV detection. For the reference creation process, 134 samples were used. Training data were collected from standard NIPT samples, originating from confirmed genetically healthy singleton pregnancies.

To analyze the effect of fetal fraction and CNV length, samples with different values of these factors were needed. We decided to use samples mixed in the laboratory from samples with confirmed selected microdeletion syndromes. We mixed these samples with healthy samples in different ratios imitating different fetal fractions. The selected microdeletion syndromes were: DGS-DiGeorge syndrome (chr 22), AS-Angelman syndrome (chr 15), PW-Prader Willy syndrome (chr15), CDC-Cri du chat syndrome (chr5), WHS-Wolf Hirschhorn syndrome (chr4), 1p36-1p36 (chr1). A total number of obtained mixed samples is 19.

We gathered 35 NIPT samples from the production with confirmed 41 CNVs. Maternal CNVs were processed as well (11 CNVs). The average percentage of fetal fraction for these samples is 14%. For each CNV, the approximate start/end position on the chromosome was stated. All samples were sequenced by Illumina NextSeq. Subsequently, reads were aligned by Bowtie2⁽⁷⁾ to a reference genome hg19.

Results

Comparison of the tools according to their success rate

The comparison of mentioned tools showed how tools react to various samples with different fetal fractions and CNV sizes. As expected, samples that contained little fetal fraction and smaller CNVs were harder to detect, yet some tools appear to be successful even with those cases. What we found interesting is that some tools seemed to detect maternal CNV with no problems while CNVs from NIPT were not detected. In the end, some tools are designed for NIPT samples, therefore we calculated the success rate individually for fetal and maternal aberrations. Gathered results for success rate are shown in **Table 1**.

Table 1. Shows overall success rate for detection of CNVs.

Tool	Overall success rate (SR)	Fetal CNVs SR	Maternal CNVs SR
CNV-caller	92%	80%	100%
WisecondorX	60%	56%	73%
CNVkit	46%	16%	100%
iCopyDAV	25%	16%	70%

Naturally, we tested precision as well, meaning we observed whether the tool can rightly state the position of the aberration. This is because the tool might detect a CNV somewhere on the genome, but in order to correctly set a diagnosis, the tool should be as precise as possible.

Individual results for the tools

For mixed samples, we summarize the results of all four tools in **Table 2**.

Overall the best results yielded the CNV-caller tool, where the success rate reached approximately 92% for both mixed and normal NIPT samples as shown in **Table 1**. Furthermore, this tool was the most precise tool for normal NIPT samples as can be seen in **Table 1**. In the output, CNV-caller produces output, where CNVs are color-coded by the confidence or severity of the detection. Since this tool performed well with NIPT samples, we show in **Figure 1** the importance of the fetal fraction and the size of the CNV for prediction accuracy.

Following CNV-caller comes WisecondorX with an overall success rate of 60% as is shown in **Table 1**. The results for mixed samples are also displayed in **Figure 2**.

For both tools, samples with less than 10% of fetal fraction remained challenging (as is shown in **Figure 1** for CNV-caller and in **Figure 2** for WisecondorX) and proved the importance of this factor. Furthermore on **Figure 2** we can see that even an aberration, with the size above average (17.7 Mb), was not detected due to low fetal fraction, which was less than 6%.

When it comes to practical use, both tools generate a .png file from which aberrations can be observed and text output with precise coordinates for machine processing.

Both remaining tools have an overall success rate below 50%, which is mainly due to low accuracy for fetal CNVs (both tools were not specifically created for the NIPT scenario). Coverage had a great impact on the detection as well. In the case of iCopyDAV, we suspect that low coverage was the reason why no CNV was reported from this tool for mixed samples as shown in **Table 2**. Manuals for iCopyDAV suggest using at least 1x coverage, while the average coverage of our data is significantly less (from 0.05x to 0.5x).

Discussion

copy number variations may lead to various diseases and by detecting these aberrations in the early state from NIPT samples we might be able to set a correct diagnosis

Table 2. Shows the size of the aberrations, coverage, and the percentage of the fetal fraction for mixed samples. Letter D means the CNV was detected by the particular tool, whereas symbol '-' represents CNVs that were not detected.

	Size	coverage	fetal fraction	CNV-caller	WisecondorX	CNVkit	iCopyDAV
0.9Mb	19.24M	5.90%	-	-	-	-	
	20.36M	11.50%	D	D	-	-	
	21.52M	17.30%	D	D	-	-	
2.6Mb	19.6M	8.70%	-	-	-	-	
	14.54M	16.69%	D	D	-	-	
	19.45M	17.30%	D	D	-	-	
3Mb	25.27M	4.50%	-	-	-	-	
	20.59M	11.20%	D	-	D	-	
	20.39M	20.10%	D	D	-	-	
5.3Mb	15.3M	7.30%	D	-	-	-	
	24.3M	13.40%	D	D	D	-	
6Mb	19.31M	10.60%	D	D	-	-	
	19.26M	14.60%	D	D	D	-	
9.3Mb	8.3M	9.10%	D	D	-	-	
	8.4M	14.10%	D	D	-	-	
	16.2M	16.40%	D	D	-	-	
17.7Mb	16.47M	5.11%	D	-	-	-	
21 Mb	15.9M	4.86%	D	-	-	-	
	21.5M	9.85%	D	-	-	-	

Figure 1. Describes success rate of CNV-caller for mixed samples. Circles displaying detected CNVs and crosses display CNVs that were not detected. The relation between fetal fraction and size of the CNV with the correct detection is shown through gradient with darker areas displaying regions that are harder to detect.

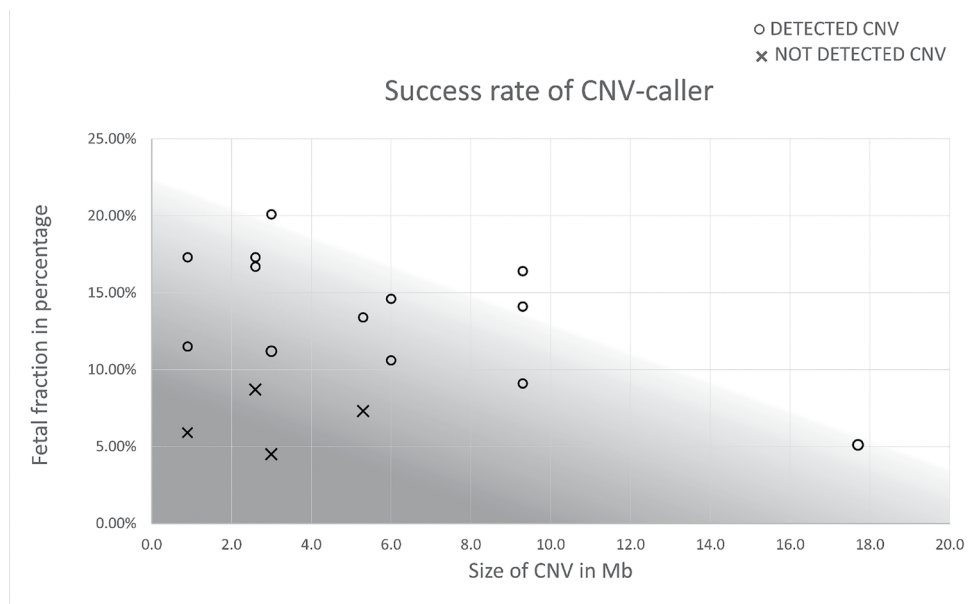
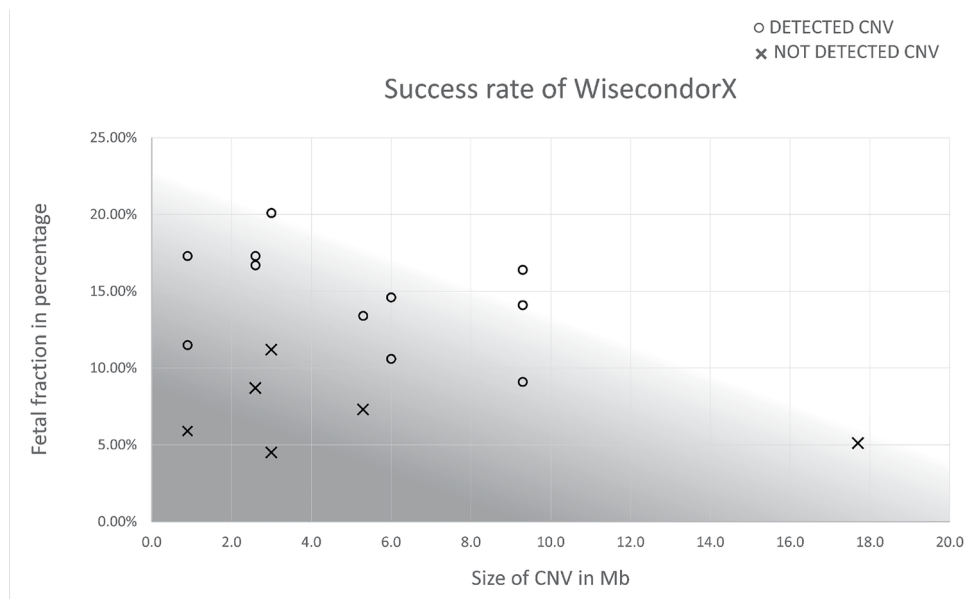


Figure 2. Describes the success rate of WisecondorX for mixed samples. Circles displaying detected CNVs and crosses display CNVs that were not detected. The relation between fetal fraction and size of the CNV with the correct detection is shown through gradient with darker areas displaying regions that are harder to detect.



in time and assure a better treatment. In combination with a low-coverage method, we can predict not only the health risks but calculate the effectiveness (in both production time and costs). By comparing different tools we get a better perspective on limitations that are challenging for the tools and we get a better understanding of what causes inaccuracy or inability to detect a given CNV.

There is no doubt that the best performing tool was the CNV-caller. With a 92% success rate and 100% success rate for maternal CNVs, this tool can be used for the detection of CNVs in both NIPT and normal samples. In addition, it generates a .png file for clarity and with each found CNV

there is information about the confidence of the said detection. This particular tool also detected some CNVs in samples with smaller fetal fractions even lower than 5%, but the CNVs were a bit longer to compensate for the lower fetal fraction.

To conclude, by comparing CNV detection tools and highlighting which samples are the most suitable for the particular tool we could design a decision tree that would pick the right tool to use for the CNV based on its fetal fraction level, size of the CNV, and coverage. In our study CNV-caller alongside WisecondorX proved to be the most reliable and accurate tools for CNV detection.

Acknowledgment

The article was created with the support of the OP Integrated Infrastructure for the projects: Introduction of an innovative test for screening and monitoring of cancer patients - GenoScan LBquant, ITMS: NFP313010Q927; and Center for biomedical research - BIOMEDIRES - II. phase, ITMS: 313011W428, both co-financed by the European Regional Development Fund. The article was also supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. PP-COVID-20-0051.

PodĎakovanie

Vytvorenie tohoto článku podporil program OP Integrovaná Infraštruktúra pre projekty: Zavedenie inovatívneho testu pre screening a monitoring onkologických pacientov - GenoScan LBquant, ITMS: NFP313010Q927; a Centrum pre biomedicínsky výskum - BIOMEDIRES - II. etapa, ITMS: 313011W428, oba spolufinancované z Európskeho fondu regionálneho rozvoja pod zmluvou Č. PP-COVID-20-0051.

REFERENCES

1. Liu S, Yao L, Ding D, Zhu H. CCL3L1 copy number variation and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. PLoS One. 2010;5: e15778.
2. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2009. pp. 451–481. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164217
3. Raman L, Dheedene A, De Smet M, Van Dorpe J, Menten B. Wisecondor X: Improved copy number detection for routine shallow whole-genome sequencing. Nucleic Acids Res. 2019;47: 1605–1614.
4. Straver R, Sistermans EA, Reinders MJT. Introducing WISECONDOR for noninvasive prenatal diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2014;14: 513–515.
5. Dharanipragada P, Vogeti S, Parekh N. iCopyDAV: Integrated platform for copy number variations-Detection, annotation and visualization. PLoS One. 2018;13: e0195334.
6. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. PLoS Comput Biol. 2016;12: e1004873.
7. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods. 2012. pp. 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923

Zuzana Klinovská

Mierová 2088/113

821 05 Bratislava

e-mail: zuzana.klinovska@geneton.sk

Lengths of circulating DNA fragments as a promising predictor of cancer stage

Marek Štrba^{1,2}, Jaroslav Budiš^{1,3,4}, Werner Krampfl^{1,3,5}, Tomáš Sládeček¹, Ondrej Pös^{1,3,5}, Mária Lucká^{6,7}, Tomáš Szemes^{2,3,5}

¹Geneton Ltd., Bratislava, Slovakia

²Faculty of Informatics and Information Technologies, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovakia

³Comenius University Science Park, Bratislava, Slovakia

⁴Slovak Centre of Scientific and Technical Information, Bratislava, Slovakia

⁵Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava

⁶Kempelen Institute of Intelligent Technologies, Bratislava, Slovakia

⁷Department of Applied Informatics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University in Bratislava, Slovakia

Bioinformatics has become one of the key scientific disciplines during the 21st century. The aim of this work was to utilize state-of-the-art tools and help further the research of oncologic diseases while improving the quality of life of people by contributing to the research of liquid biopsy. To achieve this goal we analysed dataset of oncologic samples Graz with focus on DNA fragment length profiles in blood plasma. Our hypothesis was that, the oncologic samples will have shorter fragments due to the ctDNA being released into the bloodstream. The results from the Graz dataset confirmed our hypothesis. After confirming our hypothesis we tested different ML models and feature selection methods on the Graz dataset samples with the aim of creating the best possible predictor for differentiating oncologic samples from healthy samples. The result of our work was creation of a SVM predictor, which offered prediction with satisfactory accuracy.

Keywords: Liquid biopsy, Machine Learning, SVM, Fragment length profiles, cfDNA, ctDNA

Dĺžkové profily fragmentov cirkulujúcej DNA ako potenciálny prediktor štádia onkologických ochorení

V 21. storočí sa stala Bioinformatika jednou z popredných vedeckých disciplín. Cieľom tejto práce bolo využiť najmodernejšie dostupné nástroje a pomôcť svojim výsledkom k výskumu onkologických ochorení a prispieť tak k zlepšeniu kvality života ľudí tým, že prispejeme k výskumu problematiky tekutej biopsie. Za týmto cieľom sme postupne analyzovali dataset onkologických vzoriek Graz so zameraním sa na dĺžkové profily DNA fragmentov v krvnej plazme. Našou hypotézou bolo, že vzorky onkologických pacientov budú mať kvôli uvoľňovaniu ctDNA do krvi kratšiu dĺžku fragmentov. Výsledky analýzy Graz datasetu našu hypotézu potvrdili. Po potvrdení našej hypotézy sme otestovali rôzne ML modeli a rôzne „feature selection“ metódy na vzorkách Graz datasetu za cieľom vytvorenia čo najlepšieho prediktora na rozlíšenie onkologických a zdravých vzoriek. Výsledkom bolo vytvorenia prediktora na báze SVM, ktorý nám ponúkol dostatočne uspokojivú presnosť predikcie.

Kľúčové slová: krvná biopsia, strojové učenie, SVM, dĺžkové profily fragmentov, cfDNA, ctDNA

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 58 – 63

Introduction

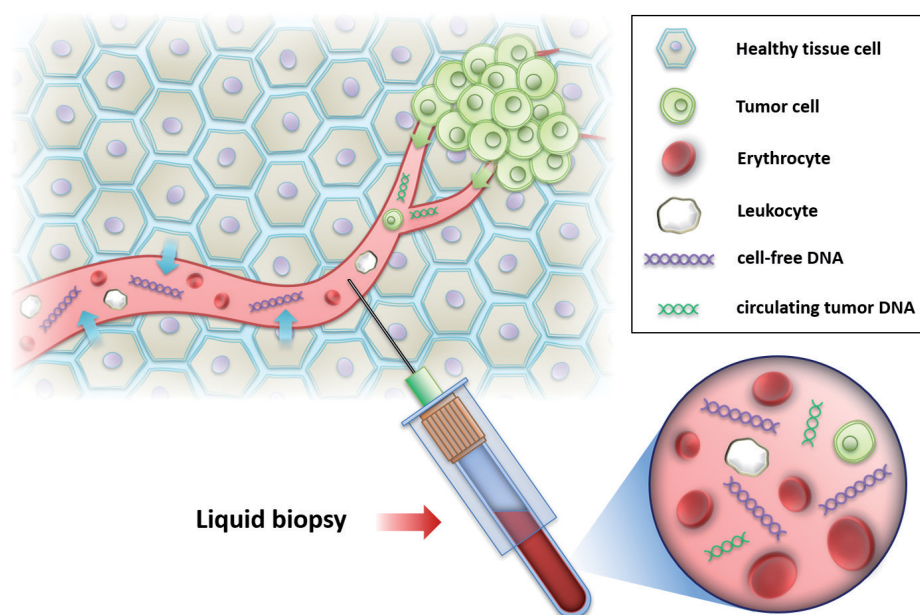
Biopsy has been one of the leading diagnostics approaches to characterize oncology disease for many years. This well known procedure has saved many lives, however it has multiple crucial drawbacks including the high cost, discomfort it brings to the patient, difficulty of obtaining the samples in more complicated diagnosis and lastly it does not show the whole image of the tumour based on the tumour's heterogeneous nature⁽¹⁾. The answer to these problems may in future be the liquid biopsy method. This method relies on the analysis of blood samples from patients, specifically the occurrence of circulating tumour DNA (ctDNA) in the sample⁽²⁾ as can be seen in **Figure 1**. The goal of liquid biopsy is

to monitor the development and progress of malignant disease and its reaction to therapy by analyzing blood samples of the patient. Furthermore, liquid biopsy proved to be a useful tool in the process of targeted therapy - changing of medicine and therapy based on changes in blood test results^(1,2).

Cell apoptosis and/or cell necrosis leads to release of short nucleic fragments (<166bp) into plasma⁽³⁾. These fragments are referred to as cfDNA - circulating cell-free

DNA. The tumour derived subset of cfDNA, caused by high turnover rate of tumour cells is called ctDNA - circulating tumour DNA⁽³⁾. Circulating Tumour Cells (CTC) are rare cells released into patient's bloodstream. These cells then extravasate to different organs, which in small fraction leads to

Figure 1. Liquid biopsy schema. Cell free DNA (cfDNA) is released into blood circulation by cells. The majority of these fragments is in length of 150-180bp and come from hematopoietic cells. However the DNA is also released by surrounding tissues potentially including tumour cells in the bodies of oncologic patients. These circulating tumour DNA fragments (ctDNA) are generally shorter than 145bp. The tumour releases not only the nucleic acids, but also the circulating tumour cells (CTC) which can also be used in the process of genetic analysis. The blood also contains leukocytes, which after the centrifugation of blood create so called "buffy coat", routinely used in the extraction of genomic DNA:



formation of metastasis⁽¹⁾. Detection of these cells after the first cycles of therapy, combined with their short lifespan indicates a futility of the treatment⁽²⁾.

There are several big challenges, that must be overcome before liquid biopsy could be widely used in clinical practice.

Firstly, the concentration of ctDNAs in blood is very low, which leads to the need of extremely sensitive and specific analytic methods for the characterisation and even detection of these fragments. The concentration of ctDNA is even lower in samples of patients in early stages of cancer⁽²⁾.

Secondly, even though the analysis of plasma samples, used in the ctDNA method is easier, the samples may be contaminated by cfDNA released during innate processes of cell life-cycle. The ctDNA method also severely lacks required standardisation of techniques.

Thirdly, the differences between healthy cfDNA and oncologic ctDNA are not significant which leads to problems in distinguishing them from each other.

Lastly, the liquid biopsy is not usable in testing of every cancer type or every patient, diagnosed with a given type of cancer. The main problem being the insufficient concentration of CTCs and ctDNA fragments into the bloodstream of the patient⁽⁴⁾.

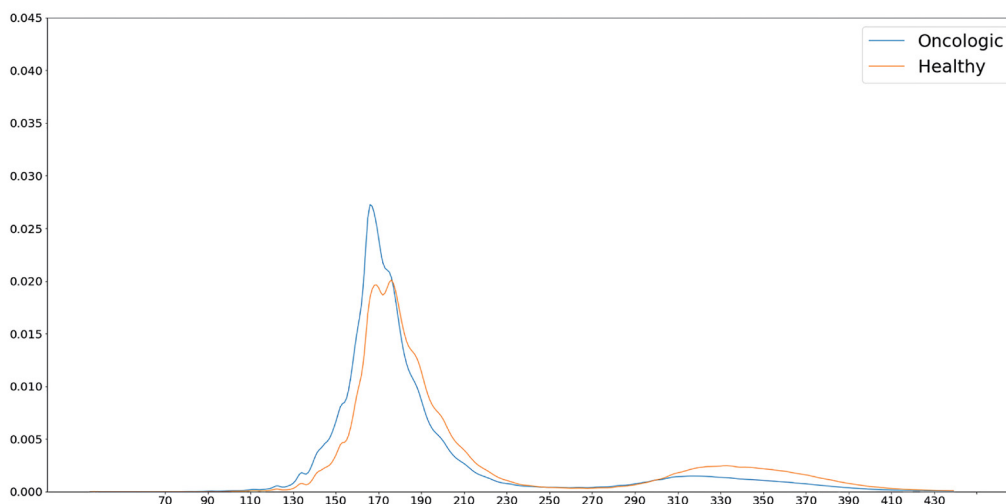
Multiple studies were conducted with the goal of confirming that there is a difference between the length of the ctDNA fragments and regular cfDNA fragments. Oncologic patients were proven to have increased quantity of cfDNA, which can be result of tumour shedding ctDNA fragments into the bloodstream⁽⁵⁾.

The more valuable information is however, that the average size of ctDNA fragments is smaller than the size of a non-carcinoma cfDNA^(5,6). Some specific examples include:

Human Melanoma (Healthy-165bp, Oncologic-145bp⁽⁵⁾, Human Lung Cancer (Healthy-283.7±4.1 bp, Oncologic-277.0±4.7bp)⁽⁵⁾, Animal models of GBM (Most common length of Healthy fragments - 167bp, most common length of Oncologic fragments - 134 and 144bp)⁽⁵⁾. It has also been proven, that the modal size of ctDNA fragments for most of the cancer types is below 167bp⁽⁶⁾. The typical size of cfDNA fragments is between 150 and 200bp⁽⁷⁾ which provides only small intersection of sizes. The shorter length of fragments originating from tumours compared to healthy fragments has been also confirmed by a study of dried blood samples, in which it was determined that the modal length of ctDNA fragments was 150bp compared to 170bp of healthy cfDNA fragments⁽⁸⁾ Furthermore a study from 2015, targeted at patients suffering from HCC observed a positive correlation between the proportion of DNA fragments less than 150bp and the tumour DNA fraction in plasma as well as negative correlation between the proportion of DNA fragments larger than 180bp and tumour DNA fraction.⁽⁹⁾ The same study also determined based on the difference between cumulative frequencies between 8p deletions and 8q amplifications in plasma DNA of samples that since the difference attains maximum at 166bp the key difference between tumorous and nontumorous plasma DNA is the relative abundance of DNA <166bp and 166bp⁽⁹⁾.

It has been also proven, that not only the ctDNA fragments have shorter average length, but also, that the length of the fragment is clearly tied to the frequency of mutations on allele. In Melanoma Patients samples, the mutations occurred in highest frequency on fragments of length between 110bp and 140bp⁽⁵⁾. Lung cancer samples also showed higher frequency of mutations in shorter fragments⁽⁵⁾.

Figure 2. Here we can see the mean oncologic and healthy fragment length profile calculated from samples in our dataset. The biggest difference is in a dominant peak around length 165 bp in oncologic samples which is not present in the healthy samples. Furthermore the healthy samples show higher count of fragments of longer length. These observations support the hypothesis of oncologic samples having shorter fragment length profiles.



Fragmentation of mutated ctDNA is much more prevalent than the fragmentation of healthy cfDNA⁽⁶⁾ which could explain the overall shorter length of the ctDNA fragments.

It has also been suggested, that the maximum enrichment of the ctDNA occurs in fragments of length between 90 and 150bp, with a secondary group in ranges of 250 to 320bp⁽⁶⁾.

The contradicting evidence or facts, that could prove problematic are less numerous, yet they are present. It has been concluded that fraction of ctDNA in early stages of cancer is very low⁽¹⁴⁾ which could lead to fragments of ctDNA that are longer than expected.

In the process of testing the lung cancer samples, it was discovered that, there is a considerable overlap in peak values of healthy and oncologic fragments⁽⁵⁾.

The studies that were analysed for this study overwhelmingly support the use of fragment length of the DNA fragments in plasma as a partial or independent predictor for differentiating healthy samples from carcinoma samples. This conclusion was achieved based on several independent studies, which provided result determining clear difference of length of ctDNA and cfDNA fragments⁽⁵⁻⁹⁾.

The goal of our study was to learn whether the fragment length profiles of samples could be used as a partial predictor for machine learning based liquid biopsy. Fragment length profiles represent the amount of DNA fragments of every given length in bp (base pairs) found in sequenced samples. We aimed to analyse differences in length profiles between samples and suggest whether these profiles could be used in the process of diagnosis and monitoring of oncologic diseases.

Material and Methods

Data acquisition

We downloaded the dataset of 116 oncologic samples from 44 patients (multiple samples were obtained from several patients as the disease progressed) and 22 control healthy samples⁽¹⁰⁾ (EGA Study ID EGAS00001003530). All four

grades of tumour severity⁽¹¹⁾ were present among the samples retrieved from patients.

Analysis

The first stage of data processing was carried out as previously described⁽¹²⁾. NextSeq-produced fastq files (two per sample) were directly mapped using the Bowtie 2⁽¹³⁾ algorithm with `-very-sensitive` option to the human reference genome hg19 (GRCh37). Reads with mapping quality of 40 or higher were retained for further data processing. Length of a DNA fragment was determined as the difference of the leftmost and the rightmost mapped base of the corresponding read pair.

As the first step we decided to calculate weighted median and mean of fragment lengths of the samples. We used the functions provided by the Weighted stats library (<https://pypi.org/project/weightedstats/>).

As we can see from results, there is a clear difference between oncologic and control samples in their length. Medians of both metrics are significantly lower ($U=214.15$, $p=3.15 \times 10^{-10}$) for oncologic samples (162-193 bp, mean 174.28 bp) than healthy (177-192 bp, mean 183.18 bp), suggesting that the overall length of fragments in oncologic samples is shorter than the length in control samples. The only statistic contradicting this conclusion is the maximum weighted median of fragment length in oncological samples, which is higher than the healthy one.

However this phenomena can be easily attributed to the existence of an outlier in oncologic samples. The difference between healthy and oncologic samples can be clearly seen on mean fragment length profiles shown in **Figure 2**.

After the initial analysis of median and mean fragment lengths suggested a clear difference between oncologic and control samples we decided to normalize the count of fragments of given lengths in the samples (we divided the number of fragments of every given length by the sum of all fragments in the sample in effort to ease comparison between the samples). Following the normalization we plotted all on-

Figure 3. Plots (a) and (b) show all fragment length profiles of oncologic and healthy respectively. The darker shade of the line indicates that the given part of profile was shared by higher number of samples when compared to lighter lines. These plots, same as the **Figure 2** show the dominant peak around 165bp in oncologic samples as well as the higher number of longer fragments in healthy samples.

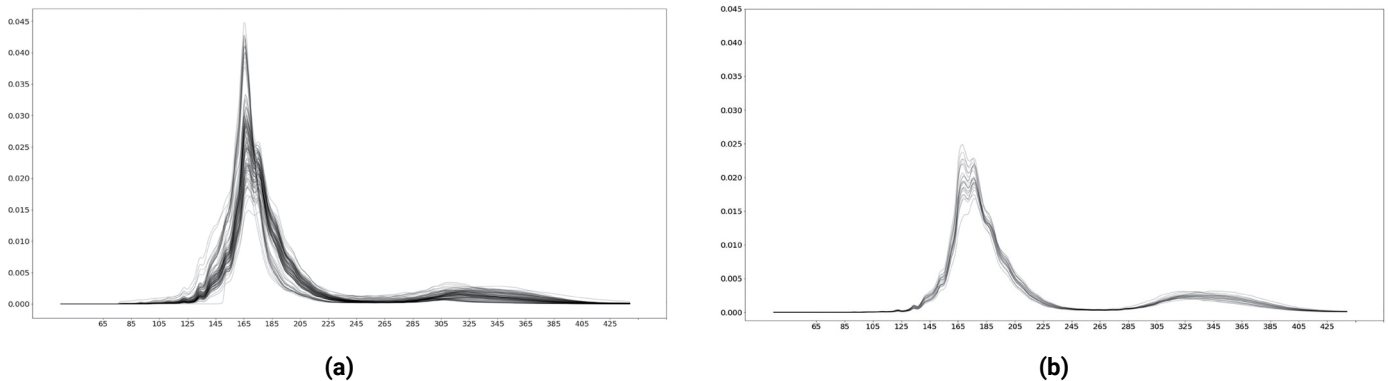


Figure 4. Boxplots shown in this figure represent the declining trend of median fragment length with the rising severity of tumour (tumour grade). The higher values in G3 samples when compared to G2 and G4 can be attributed to the early stages of metastasis. The metastatic secondary tumours release longer fragments compared to the main tumour, which dilute the readings leading to a higher median fragment length. Other grades however all show signs that lower median fragment length could be linked to higher severity of the tumour.

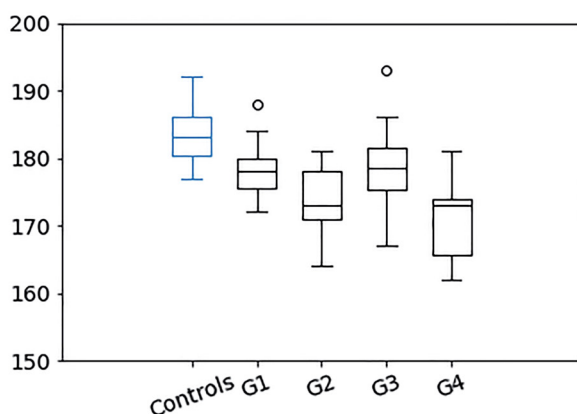
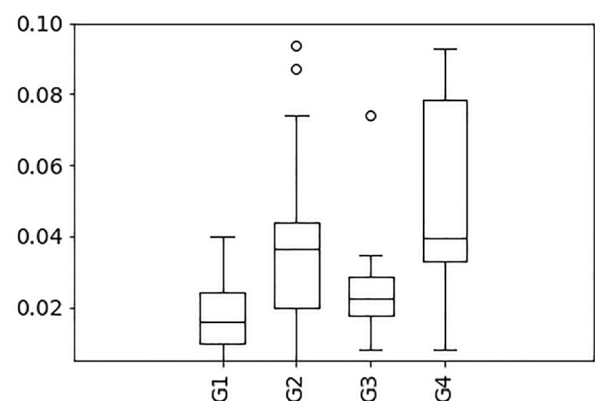


Figure 5. In effort to reduce the undeniable visual difference between oncologic fragment length profiles and a mean healthy fragment length profile into just one number we calculated their euclidean distance. When grouped by the tumour severity we arrived to similar findings as with the median fragment length (**Figure 4**). The bigger the difference (higher number) the higher tumour severity. G3 proved to be an outlier similarly to the median fragment length case.



cologic and all healthy fragment length profiles to allow for visual comparison.

The difference between Oncologic samples and Control samples is clear. Oncologic samples have very high and sharp peak in lengths between 155 bp and 165 bp (**Figure 2 and 3(a)**), which is completely absent in the control samples. On the other hand the control samples contain a higher number of fragments of length between 285 bp and 395 bp, which we can clearly see represented by the higher ridge on the right tail of the plot (**Figure 2 and 3(b)**).

We also compared the oncologic samples between each other in effort to find differences in their length profiles based on the grade of the tumour. We compared the median fragment lengths by the grade (**Figure 4**) and calculated euclidean distance of fragment length profiles from mean control healthy profiles (**Figure 5**).

We found that the G1 (the lowest tumour grade) samples were the most similar to control samples both in the median values and according to calculated euclidean distances. On

the contrary the G4 (the highest tumour grade) samples proved to deviate from the control samples more significantly.

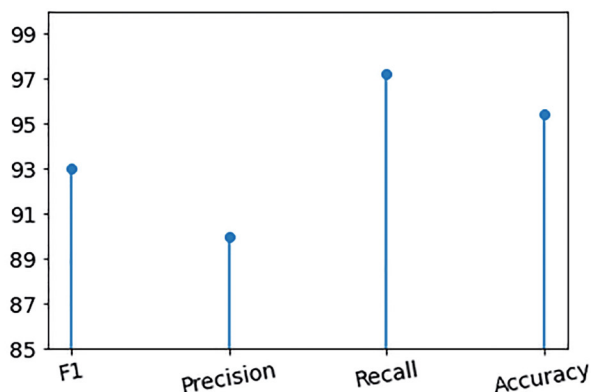
Machine learning

Based on the results from data analysis we decided to create a prototype of machine learning model which would differentiate the oncologic samples from healthy controls.

The crucial part of any machine learning is the feature selection. Based on the analysis results we were convinced that the calculated weighted median and weighted mean 35 had to be included as features. No matter how clear was the difference in weighted means and medians between oncologic samples and healthy controls these two features aren't enough to show the whole characteristic of a length profile. We tested several different approaches to select the additional features:

- **k-best** - using the sklearn's univariate feature selection (https://scikit-learn.org/stable/modules/generated/sklearn.feature_selection.SelectKBest.html) which selects

Figure 6. The model achieved satisfactory results on the test datasets with scores of: F1 - 0.9301, Precision - 0.9 (ability to classify an oncologic sample as oncologic), Recall - 0.972 (ability to classify a healthy sample as healthy) and Accuracy - 0.9545. All scores were at least 0.9 which shows great promise in further usage of fragment length profiles in machine learning models used in oncology.



the best features based on univariate statistical tests we chose the 10 best features which had the best results in the given tests. 12 features total.

- **medians** - we divided the fragment length profile of a sample into ten bins by the
- fragment length. Each bin had the same range (first bin: 1bp-100bp, second bin: 101bp-200bp and so on...). After the division into bins we calculated the weighted median of every bin and added it as a feature. This method produced 10 additional features. 12 features total.
- **sums** - we divided the fragment length profile into bins same as when we calculated the medians, however in this method we summed the number of fragments
- in given bin instead of calculating the weighted median of the length in the bin. This method also provided 10 additional features with 12 total.
- **quantiles** - when using this method we calculated the quantiles of the fragment length profile with the step 0.1 (calculating the $Q(0.1)$, $Q(0.2)$... $Q(0.9)$). This resulted in 9 additional features, 11 total.
- **peaks** - last method we decided to test was splitting the fragment length profiles into bins with unequal range based on the occurrence of peaks in the mean plotted profiles. The ranges we chose were:
 1. 1bp-159bp - the pre-peak area
 2. 160bp-174bp - main peak
 3. 175bp-189bp - secondary peak
 4. 190bp-229bp - downwards slope
 5. 230bp-279bp - trough
 6. 280bp-409bp - last low peak
 7. 410bp-1000bp - tail

This method resulted in fewest additional features - 7, totaling only 9.

All additional features were calculated from the normalized values.

We tested machine learning models based on Decision Trees, Random Forests, SVMs and XGBoosting with multiple different hyperparameter settings. We compared the models

in combination with all feature selection models using the GridSearch method based on 10 fold cross validation with the deciding metric being the F1 score because of the unbalanced nature of our dataset. The selection process was done using 85% of our data as the training sub-dataset.

The SVM model combined with the "medians" feature selection method provided the best result of F1 Score equal to 0.9325. We used this model to predict the remaining 15% of the dataset with results captured in **Figure 6**.

Discussion

With the results we acquired during the research it is safe to claim that fragment length profiles are a viable indicator of oncologic disease in the organism. However no matter how promising the results may seem it is crucial to test this conclusion on more data, ideally from multiple different diagnoses. Oncologic disease show great variance in their behaviour and structure which is the main reason behind the need for more testing.

The scope of this work did not allow for testing of other machine learning algorithms and neural networks or deep learning algorithms, which could potentially bring even better results. However even without testing these methods we were able to prepare a machine learning model with results satisfactory enough to be used in combination with other partial predictors in a larger meta-predictor. This was the main goal of this study, which means it is safe to say we were successful.

During our research we also learned that samples with different tumour grades deviate in their fragment length profiles. The level of deviation varied, however it certainly showed a great potential for further research. The important finding was, that the Euclidean distance from mean control profile grew with the severity of the disease. Based on our analysis the biggest challenge, when solving this differentiation, will most likely be the differentiation between grades G2 and G3 since the samples of these grades had often overlapping features.

What we deem as the biggest achievement of this study is that it showed a real possibility of liquid biopsy becoming a reality in the relatively near future. This would noticeably increase the quality of life for oncologic patients and also increase their chances of remission and curing.

Acknowledgment

This article was created with the support of the OP Integrated Infrastructure for the project: Long-term strategic research and development focused on the occurrence of Lynch syndrome in the Slovak population and possibilities of prevention of tumors associated with this syndrome, ITMS: 313011V578, co-financed by the European Regional Development Fund.

Podakovanie

Tento článok bol napísaný s podporou Operačného Programu Integrovaná Infraštruktúra: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na Lynchovho syndrómu v Slovenskej populácii a možnostiach prevencie výskytu nádorov spájaných s týmto syndrómom, ITMS: 313011V578, spolufinancovaný Európskym fondom regionálneho rozvoja (ERDF).

REFERENCES

1. E. Crowley, F. Di Nicolantonio, F. Loupakis, and A. Bardelli, "Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood," *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 10, no. 8, p. 472, 2013.
2. K. Pantel and C. Alix-Panabières, "Real-time liquid biopsy in cancer patients: Fact or fiction?" *Cancer research*, vol. 73, no. 21, pp. 6384–6388, 2013.
3. L. Calapre, L. Warburton, M. Millward, M. Ziman, and E. S. Gray, "Circulating tumour dna (ctdna) as a liquid biopsy for melanoma," *Cancer Letters*, vol. 404, pp. 62–69, 2017.
4. I. S. Haque and O. Elemento, "Challenges in using ctdna to achieve early detection of cancer," *BioRxiv*, p. 237 578, 2017.
5. H. R. Underhill, J. O. Kitzman, S. Hellwig, N. C. Welker, R. Daza, D. N. Baker, K. M. Gligorich, R. C. Rostomily, M. P. Bronner, and J. Shendure, "Fragment length of circulating tumor dna," *PLoS genetics*, vol. 12, no. 7, e1006162, 2016.
6. F. Mouliere, D. Chandrananda, A. M. Piskorz, E. K. Moore, J. Morris, L. B. Ahlborn, R. Mair, T. Goranova, F. Marass, K. Heider, J. C. M. Wan, A. Supernat, I. Hudecova, I. Gounaris, S. Ros, M. Jimenez-Linan, J. Garcia-Corbacho, K. Patel, O. Østrup, S. Murphy, M. D. Eldridge, D. Gale, G. D. Stewart, J. Burge, W. N. Cooper, M. S. van der Heijden, C. E. Massie, C. Watts, P. Corrie, S. Pacey, K. M. Brindle, R. D. Baird, M. Mau-Sørensen, C. A. Parkinson, C. G. Smith, J. D. Brenton, and N. Rosenfeld, "Enhanced detection of circulating tumor dna by fragment size analysis," *Science Translational Medicine*, vol. 10, no. 466, 2018, issn: 1946-6234. doi: 10.1126/scitranslmed.aat4921. eprint: <https://stm.sciencemag.org/content/10/466/eaat4921.full.pdf>. [Online]. Available: <https://stm.sciencemag.org/content/10/466/eaat4921>.
7. M. Fleischhacker and B. Schmidt, "Circulating nucleic acids (cnas) and cancer—a survey," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, vol. 1775, no. 1, pp. 181–232, 2007.
8. K. Heider, J. C. Wan, J. Hall, J. Belic, S. Boyle, I. Hudecova, D. Gale, W. N. Cooper, P. G. Corrie, J. D. Brenton, et al., "Detection of ctdna from dried blood spots after dna size selection," *Clinical Chemistry*, vol. 66, no. 5, pp. 697–705, 2020.
9. P. Jiang, C. W. Chan, K. A. Chan, S. H. Cheng, J. Wong, V. W.-S. Wong, G. L. Wong, S. L. Chan, T. S. Mok, H. L. Chan, et al., "Lengthening and shortening of plasma dna in hepatocellular carcinoma patients," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 11, E1317–E1325, 2015.
10. C. G. Smith, T. Moser, F. Mouliere, J. Field-Rayner, M. Eldridge, A. L. Riediger, D. Chandrananda, K. Heider, J. C. Wan, A. Y. Warren, et al., "Comprehensive characterization of cell-free tumor dna in plasma and urine of patients with renal tumors," *Genome medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 1–17, 2020.
11. N. C. I. USA, <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet>, Last visited: 18. 10. 2020.
12. Minarik, G.; Repiska, G.; Hyblova, M.; Nagyova, E.; Soltys, K.; Budis, J.; Duris, F.; Sysak, R.; Gerykova Bujalkova, M.; Vlkova-Izrael, B.; 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, e0144811. [Google Scholar] [CrossRef]
13. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010;2: 61ra91. pmid:21148127
14. C. -C. Huang, M. Du, and L. Wang, "Bioinformatics analysis for circulating cellfree dna in cancer," *Cancers*, vol. 11, no. 6, p. 805, 2019.

Bc. Marek Štrba

L. Novomeského 5,
902 01 Pezinok

email: marek.strbaa@gmail.com

Dôkaz DNA *Pneumocystis jirovecii* versus mikroskopický dôkaz pri vyšetreniach pneumocystózy u pacientov zo Slovenska v rokoch 2001 – 2019

Vojtech Boldiš¹, František Ondriska^{1,2}, Michaela Čerňancová², Ľubor Kováč³, Jakub Steinhübel¹, Marcela Bastlová¹

¹Medirex Group, a. s., úsek parazitológie, Bratislava

²Trnavská univerzita, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnava

³Medirex Group, a. s., úsek virológie, sérológie a molekulovej biológie infekčných ochorení, Bratislava

Pneumocystis jirovecii patril v minulosti do ríše Protozoa, ale aktuálne je už taxonomicky zaradený do ríše Fungi. *Pneumocystis* bývajú obvykle detegované v pľúcach zdravých ľudí, ale pri imunosuprimovaných jedincoch ide o oportúnny patogén zodpovedný za pneumocystovú pneumóniu, respektíve pneumocystózu. Cieľom práce bolo zistiť a vyhodnotiť spoľahlivosť metód laboratórnej diagnostiky pneumocystózy aj výskyt tohto ochorenia u pacientov zo Slovenska počas 19 rokov. Diagnostika spočíva v mikroskopickom dôkaze mikroorganizmu v bronchoalveolárnej laváži a v spúte za použitia farbenia podľa Giemsa a Grama a Weigerta. Z metód molekulárnej biológie sme aplikovali klasickú a real-time PCR. Z celého súboru pacientov sme *pneumocystis* detegovali u 190 osôb (5,7 %). Onkologickí pacienti predstavovali najrizikovejšiu skupinu z hľadiska infekcie *pneumocystami*, čo sme potvrdili ich najvyšším podielom (57,9 %) z jedincov s pneumocystózou. Na základe binárneho klasifikačného testu sme vyhodnotili 33,7 % citlivosť a 100 % špecifickosť mikroskopického dôkazu v porovnaní s PCR. Molekulárne metódy sú v detekcii *Pneumocystis jirovecii* citlivejšie v porovnaní s mikroskopickým dôkazom a v súčasnosti predstavujú spoľahlivý detekčný systém v diagnostike pneumocystózy.

Kľúčové slová: *Pneumocystis jirovecii*, pneumocystóza, mikroskopický dôkaz, polymerázová reťazová reakcia (PCR)

The DNA evidence of *Pneumocystis jirovecii* versus microscopic evidence in Slovak patients examined for pneumocystosis during the years 2001 – 2019

In the past, *Pneumocystis jirovecii* belonged to the Protozoa group, but is currently taxonomically included in the kingdom Fungi. *P. jirovecii* is an opportunistic pathogen, responsible for pneumocystis pneumonia with frequent complications of immunocompromised patients. Delayed initiation of appropriate therapy increases the risk of death in immunocompromised patient. The aim of this work was to determine and evaluate the reliability of methods of laboratory diagnosis of pneumocystosis as well as the occurrence of this disease in patients from Slovakia during 19 years. The diagnosis is based on microscopic examination (Giemsa- and Gram-Weigert-staining) and detection of parasite DNA by classical or real-time PCR in bronchoalveolar lavage and sputum. We detected pneumocystis in 190 persons (5.7 %) from the whole group of patients. Cancer patients represented the riskiest group in terms of pneumocystosis, which was confirmed by the highest percentage (57.9 %) of individuals infected with *P. jirovecii*. We used a binary classification test for statistical evaluation and confirmed 33.7 % sensitivity and 100 % specificity of microscopy compared to PCR. Molecular methods are more sensitive in the detection of *Pneumocystis jirovecii* compared to microscopic evidence and currently represent a reliable detection system in the diagnosis of pneumocystosis.

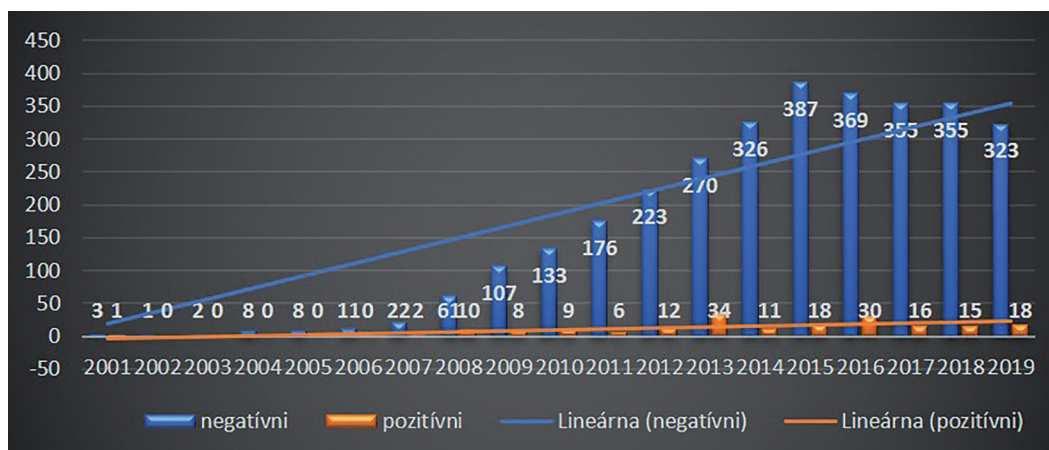
Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, pneumocystosis, microscopic evidence, polymerase chain reaction (PCR)

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 64 – 68

Úvod

Pneumocystis jirovecii je oportúnny mikroorganizmus, ktorý bol v minulosti označovaný ako *Pneumocystis carinii*. Táto atypická huba spôsobuje u ľudí závažnú infekciu nazývanú pneumocystovú pneumóniu⁽¹⁾. Najčastejšie postihuje ľudí s oslabeným imunitným systémom a v niektorých prípadoch môže vážne ohroziť život. Medzi rizikových pacientov patria osoby s rôznymi chorobnými stavmi, ako sú nádorové ochorenia, HIV infekcia, transplantácie orgánov či užívanie imunosupresívnej terapie a liekov. Pacienti s pneu-

mocystózou klinicky vykazujú symptómy horúčky, kašľa, dýchavičnosti a v závažných prípadoch môže dôjsť k zlyhaniu dýchacích orgánov až smrti. Primárne sa *Pneumocystis* prenáša z človeka na človeka vzdušnou cestou, boli však opísané aj ďalšie spôsoby prenosu. Takisto sa môže šíriť prostredníctvom asymptomatických nosičov, teda ľudí s normálnym imunitným systémom, ktorí sú kolonizovaní. Napriek statusu najbežnejšej a najvážnejšej oportúnnej respiračnej infekcie u pacientov s AIDS v súčasnosti incidencia ochorenia v populácii klesá v dôsledku zavedenia profylaxie a účinnej

Graf 1. Požiadavky na vyšetrenie *P. jirovecii*.

antiretrovísusovej terapie⁽²⁾. Čoraz častejšie sa však pneumocystóza vyskytuje u HIV negatívnych pacientov liečených protinádorovými chemoterapeutikami a imunosupresívnou liečbou⁽³⁾.

Používaným štandardom v laboratórnej diagnostike pneumocystózy u pacientov so zníženou imunitou je detekcia *P. jirovecii* v bronchoalveolárnej laváži (BAL) a vo vzorkách indukovaného spúta prostredníctvom mikroskopického dôkazu⁽⁴⁾. Ide o mikroskopický dôkaz cýst alebo trofických foriem parazita v pľúcnom materiáli s použitím viacerých farbiacich techník⁽⁵⁾. Postupne však boli vyvinuté vysokocitlivé molekulárne metódy (PCR) detekcie *P. jirovecii* a konvenčné metódy diagnostiky sa stali menej spoľahlivými⁽⁶⁾. Ako minimálne invazívny spôsob diagnostiky pneumocystózy predstavujú sérologické metódy.

Vďaka vysokej účinnosti a dostupnosti perorálnych a parenterálnych foriem je liekom voľby trimetoprim-sulfametoxazol pri liečbe miernej až závažnej pneumocystózy u pacientov infikovaných HIV, ale aj u pacientov, ktorí nie sú infikovaní HIV⁽⁷⁾.

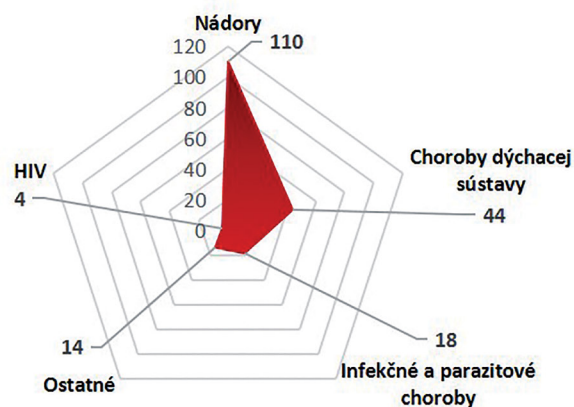
Materiál a metódy

Počas 19-ročného obdobia sme v rámci štúdie vyšetrili 3 330 pacientov pochádzajúcich z celého Slovenska pre podozrenie na infekciu spôsobenú *P. jirovecii*. Prevažne išlo o bronchoalveolárne laváže a spúta.

Pri mikroskopickom dôkaze sme použili farbenie podľa Giemsa na detekciu trofozoitov a Gramovo a Weigertovo farbenie na determinovanie cýst^(8,9). Na izoláciu DNA zo vzoriek sme použili komerčne dostupný DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Nemecko). Z metód molekulárnej biológie sme aplikovali klasickú polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) s použitím primerov pAZ102-E a pAZ102-H, ktoré amplifikujú časť génu veľkej podjednotky mitochondriálnej rRNA⁽¹⁰⁾. Pre real-time PCR sme použili komerčnú súpravu LightMix® Kit *Pneumocystis jirovecii*, kde ako cieľový fragment sa na amplifikáciu využila 244 bp sekvencia multikópiového MSG génu z *P. jirovecii*.

Výsledky boli analyzované štatistickým softvérom OpenEpi, verzia 3.03 (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) a na vyhodnotenie štatistických rozdielov bol použitý chí-kvadrátový test, kde hodnota $P < 0,05$ sa považovala

Graf 2. Pozitívni pacienti s pneumocystózou vzhľadom na ich diagnózu či ochorenie.



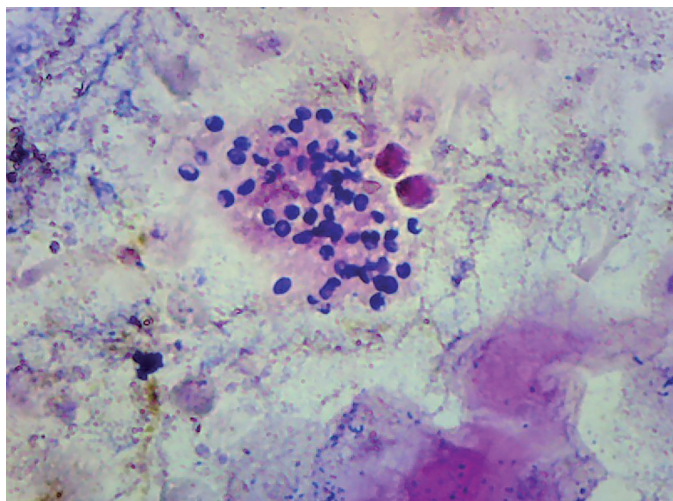
za významnú⁽¹¹⁾. Výpovedné hodnoty použitých testov sme vypočítali pomocou štatistického programu MedCalc (http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

Výsledky

Počas 19 rokov počet vyšetrení a detekcia *P. jirovecii* stúpa, čo je na grafe 1 vyznačené trendovými lineárnymi spojnícami. Najvyšší nárast vzoriek pozorujeme v rokoch 2008 až 2015, kde sa počet pacientov počas 8 rokov znásobil 6x ($387 : 61 = 6,35$). V nasledujúcich rokoch od roku 2016 je množstvo vyšetřovaných pacientov relatívne stabilné v rozmedzí od 323 do 369.

Metódami PCR sme pneumocysty zachytili u 5,7 % (190/3 330) vyšetřovaných pacientov, pričom mikroskopicky sme potvrdili mikroorganizmy u 1,9 % (64/3 330) prípadov. U 163 pacientov sme infekť dokázali v BAL, u 25 v spúte. Prítomnosť *P. jirovecii* sa potvrdila hlavne u imunokompromitovaných osôb s onkologickým ochorením 57,9 % (110/190), ale aj u pacientov s chorobami dýchacej sústavy 23,2 % (44/190), s infekčnými a parazitárnymi chorobami 9,4 % (18/190), s inými ochoreniami 7,4 % (14/190) a s HIV 2,1 % (4/190). Najcitlivejšími skupinami pacientov z hľadiska infekcie pneumocystami sú onkologickí jedinci a pacienti s chorobami dýchacej sústavy (graf 2).

Obrázok 1. Cysty *P. jirovecii* po farbení podľa Grama a Weigerta.



Obrázok 3. Rtg. nález v pľúcach pacienta s pneumocystózou (fotografia MUDr. M. Franeková).

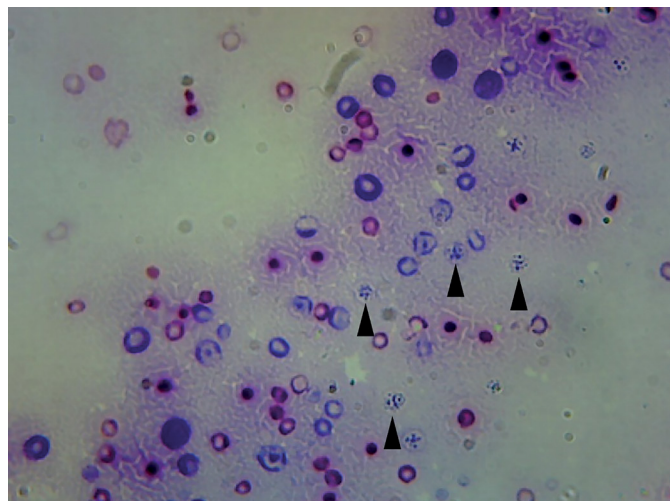


Z celého súboru sme v rokoch 2001 – 2012 vyšetrili 803 pacientov pomocou klasickej PCR, kde sa nám podarilo detegovať DNA *P. jirovecii* u 48 (6 %) pacientov a u 12 (1,5 %) z nich sme pneumocysty potvrdili aj mikroskopickým dôkazom. V rokoch 2013 – 2019 sme s využitím real-time PCR z 2 527 osôb detegovali DNA *P. jirovecii* u 142 (5,6 %) a u 52 (2,1 %) z nich sme pneumocysty potvrdili aj mikroskopicky. Na **obrázku 1** sú znázornené niektoré naše pozitívne preparáty cýst po farbení podľa Grama a Weigerta. Morfológia pneumocýst je nepravidelná, majú tvar „defektnej lopty“ a sú s veľkosťou od 4 do 8 μm . V cyste postupným delením vzniká 8 jednojadrových teliesok, tzv. intracystické telieska (**obrázok 2**).

S cieľom priblíženia klinickej manifestácie infekcie spôsobenej *P. jirovecii* u onkologického pacienta, kde sme v našom laboratóriu potvrdili etiologický agens, prikkladáme rtg. snímku s komplikovanou pneumocystovou infekciou s výrazným škvrnitým zatienením oboch pľúcnych krídiel (**obrázok 3**).

Štatisticky významné rozdiely pre pacientov s pneumocystózou sme potvrdili vzhľadom na vekovú skupinu, odobratý biologický materiál a stanovenú diagnózu. Najvyšší podiel

Obrázok 2. Intracystické telieska (zárodky trofozoitov) *P. jirovecii* po farbení podľa Giemsa.



infikovaných sme detegovali u dospelých jedincov vo veku od 21 do 40 rokov (9,7 %), ďalej nasledovali deti 0 – 10 rokov (6 %), starí ľudia nad 61 rokov (5,2 %), pacienti medzi 41. a 60. rokom života (4,8 %) a najmenej u 10- až 20-ročných osôb (1,6 %). Tieto rozdiely boli štatisticky významné ($p = 0,009$). Väčší podiel infikovaných pneumocystami tvorila skupina, v ktorej bol indikovaný odber spúta (9,8 %) ako v porovnaní s odberom BAL (5,4 %; $p = 0,029$). Signifikančné rozdiely v počtoch pacientov s pneumocystózou sme pozorovali aj v súvislosti s predikovanou diagnózou ($p = 0,02$). Najvyššie percento (12,5 %) pacientov s pneumocystózou tvorila skupina s diagnózou infekčných a parazitárnych chorôb. Druhú, najviac zastúpenú skupinu (5,8 %) infikovaných tvorili pacienti s diagnózou chorôb dýchacej sústavy, za ktorou nasledovali diagnózy ako ostatné (5,7 %), onkologické choroby (5,1 %), choroby krvi a krvotvorných orgánov s účasťou imunitných mechanizmov (3,7 %) a choroby obehovej sústavy (3,1 %). Žiadnu významnú súvislosť sme nezistili medzi prítomnosťou pneumocystovej infekcie a pohlavím ($p > 0,05$).

Štatistické ukazovatele spoľahlivosti mikroskopického dôkazu *P. jirovecii* sme vyjadrili vzhľadom na PCR, ktorú sme považovali za zlatý štandard. Po prepočtoch nám vyšla 33,7 % citlivosť, 100 % špecifickosť, 100 % pozitívna predpovedaná hodnota a 96,1 % negatívna predpovedaná hodnota mikroskopie v porovnaní s PCR počas celého 19-ročného obdobia vyšetrovania.

Diskusia

Na Slovensku boli publikované iba 2 práce, ktoré dokumentovali výskyt či diagnostické možnosti laboratórnej diagnostiky *Pneumocystis jirovecii*^(12,13). Táto práca podáva komplexný prehľad o prítomnosti *P. jirovecii* u vyšetrovaných pacientov s pľúcnymi komplikáciami na Slovensku za obdobie 19 rokov a poskytuje možnosti laboratórnej diagnostiky v podmienkach rutinného laboratória.

Z celého súboru vyšetrovaných sme pneumocysty detegovali hlavne u osôb s onkologickým ochorením (najmä lymfatická leukémia). Sing et al.⁽¹⁴⁾ diagnostikovali pneumocysty najviac u jedincov s HIV (6 %), potom nasledovali onkologickí (1,8 %) a transplantovaní (1,5 %) pacienti. V našom súbore vyšetrovaných nebol taký veľký počet HIV osôb

(1,1 %; 36/3 330), aký mali Sing et al. (26,7 %; 89/334), preto sme mali oveľa nižšie percento HIV pacientov infikovaných pneumocystami. Ale najviac pozitívnych pacientov na *P. jirovecii* tvorili imunosuprimovaní (60 %), podobne ako v práci Singa et al. (94,3 %). Fillatre et al.⁽¹⁵⁾ sa takisto vo svojej štúdii zaoberali 293 prípadmi pneumocystózy. Z celkového súboru pacientov bolo 154 (52,6 %) prípadov HIV negatívnych. Ako najčastejšie poruchy rozvoja pneumocystózy identifikovali hematologické malignity (32,5 %), ďalej to boli solídne nádory (18,2 %), zápalové ochorenia (14,9 %), transplantácie solídnych orgánov (12,3 %) a vaskulitída (9,7 %). Štúdia Liu et al.⁽³⁾ potvrdila, že najbežnejšou príčinou PJP sú hematologické malignity (29,1 %) podobne ako v štúdii Fillatre et al.⁽¹⁵⁾. Nám približne rovnaké výsledky dokumentovali aj Kim et al.⁽⁴⁾, kde malígne ochorenia dosahovali až 68,7 %, a Gazonnes et al.⁽¹⁶⁾, ktorí detegovali PJP u pacientov s nádorovými ochoreniami (60 %). Abastabar et al.⁽¹⁷⁾ podobne ako my zistili, že prevalencia *P. jirovecii* sa líši podľa veku pacientov. V ich štúdii bol však častejší výskyt PJP u pacientov vo vekovom rozmedzí 71 – 80 rokov (> 80 %), respektíve vo veku 81 – 90 rokov (100 %). Nezistili žiadny významný rozdiel medzi mužmi a ženami, pokiaľ ide o prevalenciu tohto ochorenia, podobne ako v našej práci.

Vo väčšine prác vyšla podstatne vyššia citlivosť PCR v porovnaní so štandardnými cytologickými farbiacimi technikami pri vyšetrení BAL, indukovaného aj neindukovaného spúta⁽¹⁸⁻²²⁾. Wakefield et al.⁽²³⁾ uvádzajú 90 % citlivosť PCR v porovnaní s 35 % citlivosťou klasického mikroskopického farbenia. Lipschik et al.⁽²⁴⁾ uvádzajú 93 % citlivosť a Chouaid et al.⁽²²⁾ dokonca až 100 % citlivosť a špecifickosť PCR v BAL a indukovanom spúte. Podobne ako vo väčšine prác sme zistili podstatne nižšiu citlivosť mikroskopie v porovnaní s PCR metódou. Mikroskopicky sme mali 66,3 % vzoriek falošne negatívnych a touto metódou sme zachytili v masívnej väčšine cystické štádiá a v jednom prípade intracystické telieska pneumocýst.

Vzhľadom na zvyšujúci sa počet imunosuprimovaných jedincov je diagnostika *P. jirovecii* nevyhnutná. Potvrdili sme to aj v našej štúdii, kde počet vyšetrení a detekcia tohto oportúnneho patogénu počas rokov stúpa a v 190 prípadoch sa nám podarilo odhaliť kauzálny agens zodpovedný za vážne pľúcne komplikácie u imunokompromitovaných pacientov.

Podakovanie

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

LITERATÚRA

- Center for Diseases Control and Prevention. 2020. Pneumocystis pneumonia. [online]. Georgia (Atlanta): U.S. Department of Health & Human Services.
- Truong, J., Ashurst, Jv. 2020. *Pneumocystis (Carinii) jirovecii* Pneumonia. In StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Liu, Y., Su, L., Jiang, S. J., Qu, H. 2017. Risk factors for mortality from *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in non-HIV patients: A meta-analysis. In *Oncotarget*, roč. 8, č. 35, s. 59729-59739.
- Kim, T-O., Lee, J-K., Kwon, Y-S., Kim, Y-I., Lim, S-Ch., Kim, M-S., Kho, B. G., Park, Ch-K., Oh, I-J., Kim, Y-Ch., Park, H. Y., Shin, H.J. 2021. Clinical characteristic and prognosis of patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia without a compromised illness. In *PLOS ONE*, roč. 16, č. 2, s. 1-12.
- Salzer, H. J. F., Chafer, G., Hoenigl, M., Gunther, G., Hoffmann, C., Kalsdorf, B., Alanio, A., Lange, C. 2018. Clinical, diagnostic, and treatment disparities between HIV-infected and non-HIV infected immunocompromised patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. In *Respiration*, roč. 96, č. 1, s. 1-14.
- Bateman, M., Oladele, R., Kolls, J. K. 2020. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. In *Medical Mycology*, roč. 58, č. 8, s. 1015-1028.
- Tasaka, S. 2020. Recent advances in the diagnosis and management of *Pneumocystis* pneumonia. In *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, roč. 83, č. 2, s. 132-140.
- Giemsa, G. 1904. Eine vereinfachung und vervollkommnung meiner methylenazur methylenblau-eosin-färbemethode zur erzielung der romanowsky-nachtschen chromatin-färbung. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten der Tiere, I. Abteilung, originale*, roč. 37, s. 308-311.
- Garcia, L. S., Bruckner, D. A. 1997. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3. vyd. Washington, D.C.: ASM Press, 1997, 937s. ISBN: 1-55581-116-7.
- Tamburrini, E., Mencarini, P., Luca, A. D., Antinori, A., Visconti, E., Ammassari, A., Ortona, L., Ortona, E., Siracusano, A., Vicari, E. 1993. Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. In *Journal of Clinical Microbiology*, roč. 31, č. 10, s. 2788-2789.
- Markechová, D., Tirpáková, A., Stehlíková, B. 2011. *Základy štatistiky pre pedagógov*. Nitra : FPV UKF v Nitre, 405s.
- Albrecht, P., Horka, G. 1953. *Pneumocystis* pneumonia in western Slovakia. In *Lekársky Obzor*, č. 2, s. 766-73.

- Boldiš, V., Ondriska, F., Kováč, L., Nohýnková, E., Špitalská, E. 2013. Evidence of *Pneumocystis jirovecii* in human clinical samples in south-western Slovakia over a 10-year period (2001-2010). In *Biologia*, roč. 68, č. 4, s. 662-666.
- Sing, A., Terebesius, K., Roggenkamp, A., Rüßmann, H., Tybus, K., Pfaff, F., Bogner, J. R., Emminger, Ch., Heesemann, J. 2000. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. In *Journal of Clinical Microbiology*, roč. 38, č. 4, s. 1461-1467.
- Fillatre, P., Decaux, O., Jouneau, S., Revest, M., Gacouin, A., Robert-Gagneux, F., Fresnel, A., Guiguen, C., Le Tulzo, Y., Jégo, P., Tattevin, P. 2014. Incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among groups at risk in HIV-negative patients. In *The American Journal of Medicine*, roč. 127, č. 12, s. 1242.e11-1242.e17.
- Gazonnes, S., Bergeron, A., Menotti, J., Desseaux, K., Molina, J. M., De Castro, N. 2020. *Pneumocystis jirovecii* and quantitative PCR: pneumonia or colonization? In *Revue des Maladies Respiratoires*, roč. 37, č. 4, s. 299-307.
- Abastabar, M., Mosayebi, E., Shokohi, T., Hedayati, M. T., Jarabi Amiri, M. R., Seifi, Z., Hadghani, I., Aliyali, M., Saber, S., Sheikholeslami, M. F. 2019. A multi-centered study of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with respiratory disorders: Is there a colonization trend in the elderly? In *Current Medical Mycology*, roč. 5, č. 3, s. 19-25.
- Galan, F., Oliver, J. L., Roux, P., Poirot, J. L., Berezziat, G. 1991. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by polymerase chain reaction compared to direct microscopy and immunofluorescence. In *The Journal of protozoology*, roč. 38, č. 6, s. 199S-200S.
- Kitada, K., Oka, S., Kohjin, T., Kimura, S., Nakamura, Y., Shimada, K. 1993. *Pneumocystis carinii* pneumonia monitored by *P. carinii* shedding in sputum by the polymerase chain reaction. In *Internal Medicine*, roč. 32, č. 5, s. 370-373.
- Leigh, T. R., Gazzard, B. G., Rowbottom, A., Collins, J. V. 1993. Quantitative and qualitative comparison of DNA amplification by PCR with immunofluorescence staining for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. In *Journal of Clinical Pathology*, roč. 46, č. 2, s. 140-144.
- Olsson, M., Elvin, K., Lofdahl, S., Linder, E. 1993. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. In *Journal of Clinical Microbiology*, roč. 31, č. 2, s. 221-226.

22. Chouaid, C., Roux, P., Lavard, I., Poirot, J. L., Housset, B. 1995. Use of the polymerase chain reaction technique on induced-sputum samples for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. A clinical and cost-analysis study. In *American Journal of Clinical Pathology*, roč. 104, č. 1, s. 72-75.
23. Wakefield, A. E., Pixley, F. J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R. F., Moxon, E. R., Hopkin, J.M. 1990. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA

sequences from *Pneumocystis carinii* of rat and human origin. In *Molecular and Biochemical Parasitology*, roč. 43, č., s. 69-76.

24. Lipschik, G. Y., Andrawis, V. A., Ognibene, F. P., Kovacs, J. A., Gill, V. J., Nelson, N. A., Lundgren, J. D., Nielsen, J. O. 1992. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. In *THE LANCET*, roč. 340, č. 8813, s. 203-206.

RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: vojtech.boldis@medirex.sk

Využitie hmotnostnej spektrometrie v diagnostike porúch glykozylácie

Zuzana Pakanová¹, Marek Nemčovič¹, Rebeka Kodríková¹, Maroš Krchňák¹, Anna Šalingová², Claudia Šebová², Vladimír Bzdúch³, Hana Hansíková⁴, Ján Mucha¹

¹Chemický ústav SAV Bratislava

²Oddelenie laboratórnej medicíny NÚDCH Bratislava

³Detská klinika LFUK a NÚDCH Bratislava

⁴Klinika pediatrie a dedičných porúch metabolismu 1. LF a VFN v Praze

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú zriedkavé dedičné ochorenia vznikajúce v dôsledku mutácií génov kódujúcich enzýmy komplexnej dráhy glykozylácie proteínov. Bežnými príznakmi sú najmä poruchy rastu, psychomotorická retardácia, imunodeficiencia, hypotónia, záchvaty či muskuloskeletové abnormality. Heterogenita klinických príznakov robí z CDG ťažko diagnostikovatelné ochorenia. Izoelektrickou fokusáciou (IEF) transferínu s imunodetekciou môžeme rozlíšiť dva základné typy porúch N-glykozylácie (typ I a II). Na diagnostiku porúch O-glykozylácie sa využíva izoelektrická fokusácia apolipoproteínu C-III, glykobiomarkera nesúceho jedno O-glykozylačné miesto. Pre špecifikáciu konkrétneho subtypu po pozitívnom alebo hraničnom výsledku IEF môže byť glykoproteín pacienta analyzovaný prostredníctvom MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie, ktorá umožní zacieliť diagnostický proces na kauzálny gén, najmä v nejasných prípadoch. V práci prezentujeme dvoch pacientov s odlišnými typmi porúch v N-glykozylácii. U pacienta I s mutáciou génu *ALG12* kódujúceho α -mannozyltransferázu 8 boli pozorované znížené hladiny jej produktov. V prípade pacienta II spôsobila mutácia génu *SLC37A4* mislokalizáciu glukózo-6-fosfátového transportéra. Analýzou sérového glykoproteínu pacienta II boli zaznamenané signifikantne zvýšené hladiny tzv. hybridných glykánov. Diagnostika CDG hmotnostnou spektrometriou umožňuje lepšiu personalizáciu liečby a napomáha objasneniu molekulovej podstaty týchto ochorení.

Kľúčové slová: diagnostika; kongenitálne poruchy glykozylácie; hmotnostná spektrometria

The application of mass spectrometry in diagnostics of glycosylation disorders

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are rare hereditary diseases caused by mutations of genes coding enzymes of complex glycosylation pathways. Common clinical manifestation includes growth and psychomotor retardation, immunodeficiency, hypotonia, seizures, or musculoskeletal abnormalities. Because of the heterogeneity of the clinical spectrum, CDG is difficult to diagnose. Isoelectric focusing of transferrin (IEF) with immunodetection enables distinguishing between two primary N-glycosylation disorders (type I and II). In contrast, isoelectric focusing of apolipoprotein C-III is used to diagnose O-glycosylation disorders, as this glycoprotein bears one O-glycosylation site. For closer specification of subtype upon positive or borderline IEF result, MALDI-TOF mass spectrometry, which enables to focus the diagnostic process on the causal gene, mostly in unclear cases, can be utilized. In this study, we present two patients diagnosed with different types of N-glycosylation disorders. The patient I possessed a mutation in gene *ALG12*, coding α -mannosyltransferase 8. In this patient's serum, significantly decreased levels of its products were observed. In the case of the patient II, mutation of the *SLC37A4* gene caused the misallocation of the glucose-6-phosphate transporter. Analysis of this patient's glycoproteins revealed increased levels of hybrid glycans. Diagnostics of CDG by MALDI-TOF mass spectrometry enables the personalization of treatment and helps clarify the molecular basis of these disorders.

Keywords: diagnostics; congenital disorders of glycosylation; mass spectrometry

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 69 – 72

Úvod

Glykozylácia je esenciálna modifikácia proteínov, ktorá zásadne ovplyvňuje ich funkciu, stabilitu, aktivitu a mnohé iné vlastnosti. Na rozdiel od transkripcie a translácie je to netemplátový proces, katalyzovaný stovkami rôznych enzýmov a transportérov, prebiehajúci v endoplazmatickom retikule, Golgiho aparáte a cytozole. Dnes je známe, že porucha homeostázy organizmu môže negatívne ovplyvniť súhrn týchto glykozylačných metabolických kaskád. Aberantná glykozylácia

bola pozorovaná pri rôznych onkologických, neurodegeneratívnych, autoimunitných a iných ochoreniach⁽¹⁻³⁾ pravdepodobne ako sekundárny jav; ale takisto pri kongenitálnych poruchách glykozylácie (CDG), ktoré sú primárne spôsobené mutáciou génov komplexnej glykozylačnej dráhy.

Pôvodne sa skupina CDG delila na dva typy (typ I a II) podľa profilu IEF transferínu (Tf), pričom do skupiny CDG I patrili defekty spôsobené pri syntéze N-glykánov vzniknuté v cytozole alebo v endoplazmatickom retikule a do CDG II defekty

vzniknuté v Golgiho aparáte pri úprave glykánov. Toto rozdelenie zahŕňalo len poruchy N-glykozylácie. Vzhľadom na narastajúci počet ochorení a neustále odhaľovanie nových porúch v dráhach glykozylácie bolo nutné po opísaní viac ako 40 ochorení v roku 2009 klasifikáciu aj nomenklatúru zmeniť. Na označenie ochorenia sa v súčasnosti používa názov mutovaného génu spolu so skratkou CDG. V súčasnosti je známych viac ako 160 rôznych porúch glykozylácie. Nová klasifikácia rozdeľuje celú skupinu na: (a) poruchy N-glykozylácie proteínov, (b) poruchy O-glykozylácie proteínov, (c) poruchy syntézy glykozylfosfatidylinozitolovej kotvy a glykolipidov, (d) poruchy viacerých dráh glykozylácie a poruchy ostatných dráh.

Biochemickým skríningom N-glykozylačných, O-glykozylačných a zmiešaných porúch a porúch syntézy dolicholu je IEF Tf, apolipoproteínu C-III zo séra a vyšetrenie profilu dolicholov v moči.

Klinické príznaky CDG často zahŕňajú multiorgánové postihnutie. Medzi častými nálezmi sú polystigmatizácia, poruchy rastu, psychomotorická retardácia, poruchy imunity, hypotónia, záchvaty a muskuloskeletové abnormality. Klinické manifestácie takmer u všetkých CDG pacientov sa objavujú už v dojčenskom veku⁽⁴⁾. Biochemické parametre zahŕňajú koagulopatie a zvýšené hladiny pečenejých transamináz. V prípade PMM2-CDG, subtypu s celosvetovo najvyššou frekvenciou výskytu heterogenita klinických prejavov zahŕňa skorú neonatálnu mortalitu až po dosiahnutie normálnej dospelosti⁽⁵⁾. Korelácie medzi genotypom a fenotypom sú u jednotlivých pacientov veľmi variabilné, čo spolu s nešpecifickými klinickými príznakmi zaraďuje tieto ochorenia medzi ťažko diagnostikovateľné.

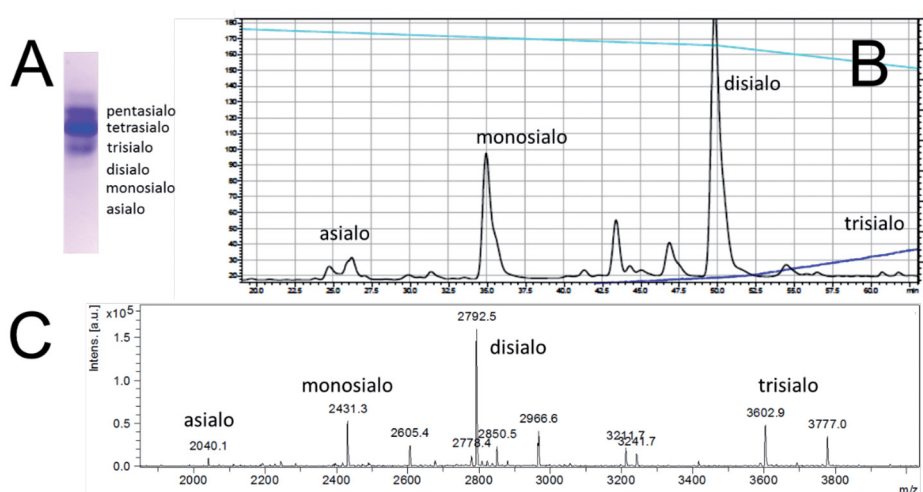
Materiál a metóda

V roku 2012 bol v Centre dedičných metabolických porúch (CDMP) NÚDCH zavedený selektívny skríning CDG založený na metóde izoelektrickej fokusácie (IEF) sérového transferínu. Za obdobie rokov 2012 – 2020 bolo celkovo analyzovaných 3 600 vzoriek pacientov so suspektným podozrením na CDG odoslaných z metabolických ambulancií a klinických

pracovnísk v rámci celého Slovenska. Princíp IEF Tf spočíva v separácii izoform transferínu (biomarkera nesúceho dve N-glykozylačné miesta) na základe ich izoelektrického bodu s následnou imunodetekciou a denzitometrickou kvantifikáciou. Metóda umožňuje rozlíšiť poruchu glykozylácie v syntéze oligosacharidického prekursora v endoplazmatickom retikule (CDG typ I) od poruchy v procesovaní glykánov (CDG typ II), ktoré prebieha v Golgiho aparáte. Táto metóda je veľmi spoľahlivá, reprodukovateľná a predstavuje celosvetovo tzv. zlatý štandard pre CDG diagnostiku, nedokáže však určiť konkrétne miesto prerušenia glykozylačnej metabolickej dráhy. Odhaduje sa, že až 40 % zachytených CDG pacientov stále nemá potvrdenú presnú molekulárnu podstatu⁽⁶⁾. Diagnostika týchto zriedkavých ochorení vyžaduje personalizovaný prístup, kde nachádza svoje uplatnenie spolupráca klinických diagnostikov s vedeckými laboratóriami.

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied sa vďaka bohatým skúsenostiam v oblasti štruktúrnej analýzy glykokonjugátov zapojil do regionálnej (CDMP NÚDCH) i medzinárodnej spolupráce (v rámci CDG & ALLIES – PPAIN siete). Zavedený štandardný operačný protokol analýzy N-glykoproteínov využíva 10 mikrolitrov krvného séra alebo približne 100 mikrogramov imunoafinitne izolovaného glykobiomarkera (napr. Tf). Glykány sú enzymaticky odštiepené a separované od proteínov prostredníctvom „solid-phase extrakcie“. S cieľom zvýšenia intenzít signálov v následne nameraných MALDI TOF hmotnostných spektrách (MS) sa vzorky derivatizujú permetyláciou. V prípade potreby kvantifikácie jednotlivých štruktúr sa využíva vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) v kombinácii s MS. Reprezentatívny glykoproteín Tf získaný zo vzorky negatívnej kontroly metódami tradičného selektívneho skríningu, HPLC a MS je znázornený na **obrázku 1**. Pri podozrení na poruchu glykozylácie prvého typu (CDG I) je vhodná analýza neutrálnej frakcie N-glykánov prostredníctvom MALDI TOF MS a pri podozrení na CDG II je, naopak, najvhodnejším prístupom analýza sialylovaných glykánov, kde možno pozorovať prípadné defekty v konečnom procesovaní glykánov už naviazaných na vznikajúci proteín.

Obrázok 1. Reprezentatívny glykoproteín sérového transferínu (Tf), získaný zo vzorky negatívnej kontroly metódami tradičného selektívneho skríningu na báze IEF (A), vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (B) a MALDI TOF hmotnostnou spektrometriou (C). Na základe prítomnosti dvoch N-glykozylačných miest, ktoré Tf nesie, je „tetrasialo“ frakcia v IEF (A) priamo korelovaná s „disialo“ štruktúrami pozorovanými v chromatograme (B) a hmotnostných spektrách (C) uvoľnených a izolovaných glykánov.



Výsledky a diskusia

V predloženej práci prezentujeme dvoch vybraných slovenských pacientov, ktorým bola diagnostikovaná CDG s nasledujúcou skrátenou epikrizou:

Pacient I – novorodenec, respiračná insuficiencia, hypoglykémia, trombocytopenia, hypokolagaučný stav, skeletové abnormality, nefropatia, hepatopatia, opakujúce sa respiračné infekcie. IEF Tf poukázala na CDG typu I. Pacient exitoval vo veku 164 dní. Sekvenovaním klinického exómu bola potvrdená homozygotná mutácia v géne *ALG12*, kódujúceho esenciálny enzým zúčastňujúci sa na výstavbe oligosacharidického prekursora v endoplazmatickom retikule⁽⁷⁾.

Pacient II – vek v čase stanovenia diagnózy 12 rokov; k dnešnému dňu v dobrom klinickom stave; pretrvávajúci hypokoagulačný stav, mierne zvýšené hladiny AST, ALT, hypcholesterolémia, hypobetalipoproteinémia. IEF Tf poukázala na CDG typu II. Na základe exómového sekvenovania bola u pacienta potvrdená de novo mutácia v géne *SLC37A4*, zodpovedná za mislokalizáciu glukóza-6-fosfátového transportéra⁽⁸⁾.

U prezentovaných CDG I aj II pacientov bola na základe pozitívneho výsledku zo selektívneho skríningu vykonaná analýza sérových N-glykánov prostredníctvom MALDI TOF MS. V prípade pacienta I boli pozorované znížené hladiny GlcNAc2Man8-9 (m/z 2192.2 a 2396.3). Hladina GlcNAc2Man9Glc1 (m/z 2600.6) bola u pacienta I nedetegovateľná. V prípade pacienta II boli pozorované signifikantne zvýšené hladiny „hybridných“ štruktúr Hex6GlcNAc3NeuAc1 (m/z 2390.2), Hex5GlcNAc3NeuAc1 (m/z 2186.1), a Hex4GlcNAc3NeuAc1 (m/z 1982.0). Reprezentatívne spektrá porovnané s negatívnymi kontrolami, napovedajúce o primárnej poruche v glykozylácii, sú znázornené na **obrázku 2**. (GlcNAc – N-acetylglukozamín, Man – manóza, Glc – glukóza, NeuAc – kys. sialová).

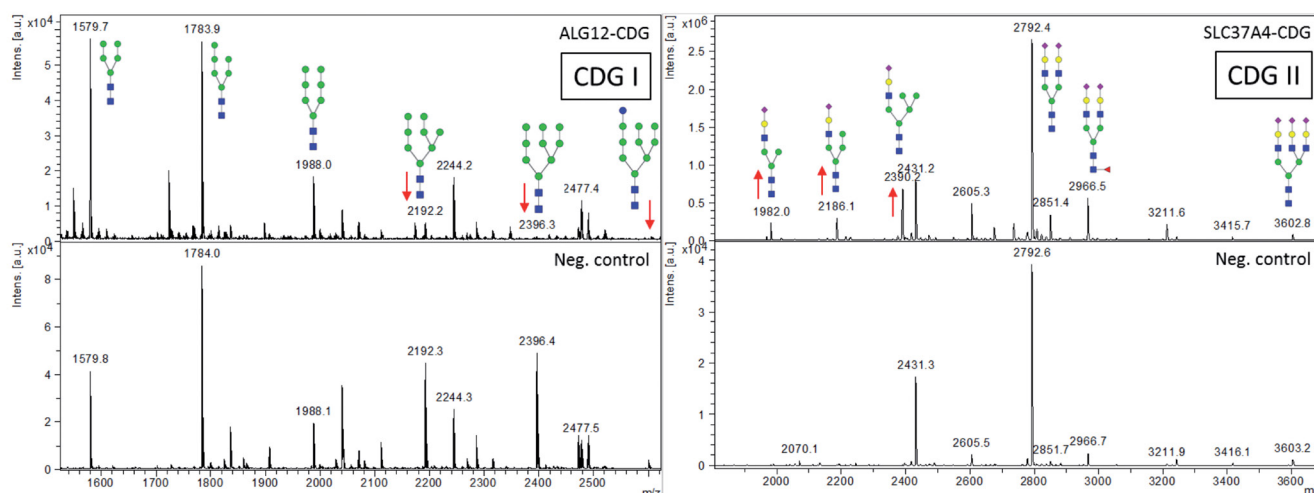
U pacienta I signifikantný pokles hladín GlcNAc2Man8-9 vo frakcii neutrálnych sérových N-glykánov poukázal na zníženie aktivity α -manozyltransferázy 8, kódovanej génom *ALG12*. Tento enzým katalyzuje pridanie ôsmeho manózové-

ho zvyšku na vznikajúci oligosacharid, viazaný prostredníctvom lipidového nosiča na membránu endoplazmatického retikula. Analýza klinického exómu prostredníctvom Clinical Exome Solution panelu sekvenovania novej generácie (z angl. „next generation sequencing“, NGS) identifikovala homozygotný variant c.1439T>C p.(Leu480Pro) v exóne 10 génu *ALG12*. K dnešnému dňu bolo celosvetovo identifikovaných iba 16 pacientov s týmto ochorením.

Poruchy glykozylácie druhého typu sú veľkou výzvou pre diagnostiku, pretože aberantný glykoproteín často nepoukazuje na konkrétny defekt v glykozylačnej kaskáde. Prezentované výsledky z analýzy sérových N-glykánov pacienta II, ktorého molekulárna podstata bola objasnená na zahraničnom pracovisku⁽⁸⁾, však na základe akumulácie aberantných hybridných štruktúr poukazujú na primárnu poruchu v glykozylácii. NGS analýza exómu poukázala na de novo mutáciu c.1267C > T (R423*) v géne *SLC37A4* kódujúcom transportér glukózo6-fosfátu⁽⁸⁾. Na základe literatúry strata funkcie transportéra glukózo-6-fosfátu vedie k lyzozómovej poruche s názvom „Glycogen storage disorder (GSD)“ typu Ib⁽⁹⁾, ale špecifická mutácia v tomto géne môže viesť aj k intracelulárnej mislokácii tohto transportéra s úplne odlišnou klinickou manifestáciou⁽⁸⁾.

Hmotnostná spektrometria predstavuje významný prínos v diagnostike CDG prvého aj druhého typu a môže byť štandardne zavedená ako nasledujúci krok, nadväzujúci na pozitívny, respektíve hraničný výsledok selektívneho skríningu. Štruktúrna analýza predstavuje esenciálnu súčasť personalizovanej diagnostiky a aj vďaka svojej nižšej finančnej a časovej náročnosti by mala predchádzať molekulárnogenetickým analýzám (NGS). Odhaduje sa však, že pre technologickú náročnosť personalizovanej diagnostiky a širokú heterogenitu klinických príznakov celosvetovo stále ostáva mnoho CDG pacientov poddiagnostikovaných. Zvýšenie povedomia laickej i odbornej verejnosti o týchto ochoreniach a spolupráca klinických a vedeckých pracovísk však môže významne prispieť k včasnemu a spoľahlivému určeniu diagnózy, čo môže mať aj výrazný vplyv na kvalitu života pacientov a ich rodín.

Obrázok 2. MALDI TOF hmotnostné spektrá permetylovaných N-glykánov, získaných zo sérových proteínov *ALG12*-CDG (CDG I) a *SLC37A4*-CDG (CDG II) pacientov, porovnané s negatívnou kontrolou vo vybranej m/z oblasti. Štruktúry glykobiomarkerov typických pre tieto ochorenia sú znázornené schematicky (zelený kruh – manóza, žltý kruh – galaktóza, modrý štvorec – N-acetylglukozamín, fialový kosoštvorec – kyselina sialová, červený trojuholník – fukóza).



Záver

V diagnostike zriedkavých ochorení nachádza spolupráca medzi vedeckými inštitúciami a diagnostickými pracoviskami veľké uplatnenie. Pokročilé analytické metódy ako hmotnostná spektrometria a kvapalinová chromatografia môžu byť napriek svojej technickej náročnosti optimalizované a automatizované do vysokopriepustných formátov a rozšíriť tak možnosti tzv. personalizovanej diagnostiky s individuálnym prístupom ku každému pacientovi. Práve dôkladná korelácia výsledkov štruktúrnej analýzy biomarkerov a klinických, biochemických a genetických vyšetrení môže pomôcť objasniť molekulárnu podstatu týchto raritných ochorení.

Konflikt záujmov

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

Podakovanie

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, grantom č. 2/0060/21 Slovenskej grantovej agentúry pre vedu VEGA. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a MZ ČR-RVO-VFN64165 Autori tohto článku sú členmi Európskej referenčnej siete pre zriedkavé metabolické poruchy (European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders, MetabERN – Project ID No 739543).

LITERATÚRA

1. Moffett S, Shiao TC, Mousavifar L, et al. Aberrant glycosylation patterns on cancer cells: Therapeutic opportunities for glycodendrimers/metalloendrimers oncology. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 2021;13(1):e1659.
2. Shafi S, Singh A, Gupta P, et al. Deciphering the Role of Aberrant Protein Post-Translational Modification in the Pathology of Neurodegeneration. CNS Neurol Disord – Drug Targets 2021;20(1):54–67.
3. Kennedy PGE, Graner M, Pointon T, et al. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis J Neuroimmune Pharmacol. Publikované online 03. máj 2021. doi:10.1007/s11481-021-09996-1
4. Lekka DE, Brucknerova J, Salingova A, et al. Congenital disorders of glycosylation – an umbrella term for rapidly expanding group of rare genetic metabolic disorders – importance of physical investigation. Bratislava Med J 2021;122(03):190–195.
5. Morena-Barrio ME, Sabater M, Morena-Barrio B, et al. ALG12-CDG: An unusual patient without intellectual disability and facial dysmorphism, and with a novel variant. Mol Genet Genomic Med 2020;8(8):e1304.
6. Jones MA, Bhide S, Chin E, et al. Targeted polymerase chain reaction-based enrichment and next generation sequencing for diagnostic testing of congenital disorders of glycosylation. Genet Med 2011;13(11):921–932.
7. Ziburová J, Nemčovič M, Šesták S, et al. A novel homozygous mutation in the human ALG12 gene results in an aberrant profile of oligomannose N-glycans in patient's serum. Am J Med Genet Part A 2021;185(11):3494–3501.
8. Marquardt T, Bzduch V, Högberg M, et al. SLC37A4-CDG: Mislocalization of the glucose-6-phosphate transporter to the Golgi causes a new congenital disorder of glycosylation. Mol Genet Metab Reports 2020;25:100636.
9. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase/glucose-6-phosphate transporter complexes. J Inher Metab Dis 2015;38(3):511–519.

Ing. Zuzana Pakanová, PhD.

Chemický ústav SAV,
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
e-mail: zuzana.pakanova@savba.sk

Možnosti analýzy močových konkrementov

Erik Drabiščák¹, Erik Dorko¹, Stanislav Jeleň²

¹Ústav verejného zdravotníctva a hygieny, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice, Slovensko

²Katedra geografie a geológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica, Slovensko

Úvod: Analýza chemického zloženia konkrementov tvorí neoddeliteľnú súčasť manažmentu pacienta s urolitiázou. Presné výsledky sú dôležité pre správnu identifikáciu procesov v moči a metabolických abnormalít.

Materiál a metodika: Močové konkrementy mali humánny pôvod a boli získané vymočením po litotripsii. Vo všetkých vzorkách humánnych močových konkrementov boli analyzované morfológické znaky. Následne boli vzorky špeciálne upravené a analyzované. Využili sme spektroskopické metódy – infračervenú (FTIR) a Ramanovu spektroskopiu (RAMAN), práškovú difrakčnú analýzu (PXRD) a elektrónovú mikroskopiu (SEM) s mikroanalýzou (EDS).

Výsledky: Bola opísaná vnútorná aj vonkajšia štruktúra homogénnych a zmiešaných kalcium-oxalátových konkrementov. Na základe molekulových vibrácií a ich intenzít identifikovaných FTIR bola stanovená prítomnosť homogénneho whewellit. Údaje získané metódou RAMAN poukazovali na prítomnosť dahllitu. Klasifikáciou medzi rovinných vzdialeností a ich intenzít vo vzťahu k Millerovým indexom bol definovaný struvit. Prostredníctvom fotografií boli pozorované kryštálové tvary weddellitu. Mikroanalýzou bol stanovený vysoký obsah prvkov Ca, O a N a ich distribúcia v rámci vzorky.

Diskusia a záver: Za zlatý štandard pre rutinnú analýzu močových konkrementov možno považovať FTIR pre jej nenáročnosť, rýchlosť a presnosť analýzy v porovnaní s chemickou titračnou metódou. RAMAN, PXRD a EDS sú presnejšie metódy, ale meranie a príprava vzoriek trvajú dlhšie a proces je nákladnejší.

Kľúčové slová: močové konkrementy, infračervená spektroskopia, prášková difrakčná analýza, elektrónová mikroskopia, elektrónová mikroanalýza

Posibilities in urinary concretion analysis

Introduction: Analysis of the chemical concretion composition is an inseparable part of managing a patient with urolithiasis. The exact results are essential for correctly identifying processes in the urine and metabolic abnormalities.

Material and methods: Urinary concretions had a human origin and were gained after urination after lithotripsy. In all samples of human urinary concretions, morphological signs were analysed. Subsequently, the samples were specially processed and analysed. We utilised spectroscopic methods – infrared (FIR) and Raman spectroscopy (RAMAN), powder X-ray diffraction analysis (PXRD) and electronic microscopy (SEM) and microanalysis (EDS).

Results: Internal and external structures of homogenous and mixed calcium-oxalate concretions were described. Based on molecular vibrations and their intensity identified by FTIR, a homogenous whewellit was detected. Data gained by the method RAMAN pointed to the presence of dahllit. Struvite was seen with the classification of interplanar distances and their intensity concerning the Miller index. Via images, crystal shapes of weddellit were observed. High content of Ca, O, and N and their distribution in the sample were detected by microanalysis.

Discussion and conclusion: FTIR might be considered the gold standard for routine analysis of urinary concretions thanks to its easy maintenance, speed, and preciseness compared to the chemical titration method. RAMAN, PXRD and EDS are more precise methods, but samples' measurement and preparation last longer, and the process is more financially demanding.

Keywords: urinary concretions, infrared spectroscopy, powder diffraction analysis, electron microscopy, electron microanalysis

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 73 – 78

Úvod

Súčasťou manažmentu pacienta s urolitiázou je evaluácia extrahovaných alebo spontánne vylúčených močových konkrémentov. Toto hodnotenie má byť dostatočne presné na to, aby sa dokázala prítomnosť majoritných zložiek konkrémentu. Konkrementy môžu byť analyzované z hľadiska chemického zloženia, tvaru kryštálov, farby, tvrdosti a morfológie⁽¹⁾.

Vlastnosti konkrémentov úzko súvisia s prevládajúcim rizikovým faktorom, preto je pre liečbu pacientov s urolitiázou potrebné vykonať analýzu správne. Konkrementy môžu byť chemicky aj morfológicky homogénne alebo pozostávajú z viacerých frakcií. Homogénne konkrementy sú výsledkom jednoduchších procesov odohrávajúcich sa v prostredí s konštantnými vlastnosťami. Viaczložkové konkrementy vznikajú v prostredí s variabilnejšími vlastnosťami. Výsledný charakter konkrémentu je závislý od charakteru prostredia, v ktorom konkrement vzniká, a od jeho variability v čase. Evaluácia jednotlivých frakcií viaczožkových konkrémentov môže odhaliť problém (metabolickú zmenu), ktorý bol vyšetrením krvi alebo moču nezistený. Presnou analýzou konkrémentu dokážeme lepšie určiť rizikové faktory vzniku urolitiázy. Vo vzťahu k rizikovým faktorom dokážeme určiť rizikové potraviny a následne upraviť stravovacie návyky tak, aby nedochádzalo k recidívam^(1,2).

Prevažné množstvo laboratórií na Slovensku aj vo svete používa zastaranú chemickú titračnú analýzu. Pri vysokej miere nepresností a chýb dochádza často k nesprávnemu určeniu chemického zloženia konkrémentu (viac ako 50 % konkrémentov je určených chybné)⁽²⁾.

Materiál a metodika

Všetky vzorky majú humánny pôvod. Nie sú známe bližšie údaje o pacientoch.

Morfologické štúdie. Konkrementy boli pozorované binokulárnou lupou Nikon SZM 1500 s SD-Fi2 kamerou s maximálnym zväčšením 11,25x z vonkajšej, po sekcii konkrémentu z vnútornej strany pri odrazenom svetle.

Infračervená spektroskopia (FTIR). Vzorky boli homogenizované na prášok. Výsledkom merania je spektrum s charakteristickými molekulovými vibráciami, ktoré sa prejavujú ako absorpčné pásy. Spektrálny záznam bol vyhotovený prístrojom Nicolet iS50 v rozmedzí 4 000 – 400 cm⁻¹ použitím techniky zoslabeného úplného odrazu (ATR) na diamantovom kryštále. Záznam pozostáva zo 64 skenov v 2 cm⁻¹ krokoch.

Ramanova spektroskopia (RAMAN). Analýzy boli vykonané bez dodatočnej úpravy vzorky spektrometrom LabRAM-HR 800 – verzia UV-VIS-NIR vybaveného mikroskopom Olympus BX-41 s maximálnym zväčšením 100x. Mikroskop pozostáva z CCD detektora Synapse chladeného Peltierovým článkom (-70 °C) s difrakčnou mriežkou 600 vrypov/mm. Na meranie boli použité lasery s vlnovou dĺžkou 532 nm (Nd: YAG) a 633 nm (He-Ne). Celková dĺžka záznamu dosahovala 8 – 120 minút.

Prášková difrakčná analýza (PXRD). Práškové preparáty boli vložené do prístrojovej komory tak, aby sa zabránilo horizontálnemu usporiadaniu kryštálov a analyzované rtg. difraktometrom Bruker D8 Advance SolXE. Žiarenie s napätím 40 kV a prúdom 40 mA z W vlákna dopadalo na Cu anódu s $\lambda = 1,540562 \text{ \AA}$. Boli zaznamenané skeny v krokoch 0,02°/0,8 s v rozmedzí 2 – 65°. Výsledkom merania je difrakčná tabuľka, ktorá udáva hodnoty medzirovinných vzdialeností a intenzít vo vzťahu k Millerovým indexom. Priemerné referenčné hodnoty boli vypočítané z doposiaľ publikovaných hodnôt.

Elektrónová mikroskopia (SEM) a mikroanalýza (EDS). Na vzorky bola nanosená vrstva uhlíka, v prípade EDS boli vzorky narezané. Analýza bola vykonaná mikroskopom JEOL JSM-6390LV. Prostredníctvom mikroanalyzátoru JEOL JXA 8530 F so spektrometrom SDD a rozlíšením 133 eV sa vykonala distribúcia prvkov v konkrémentoch.

Výsledky

Morfologické štúdie

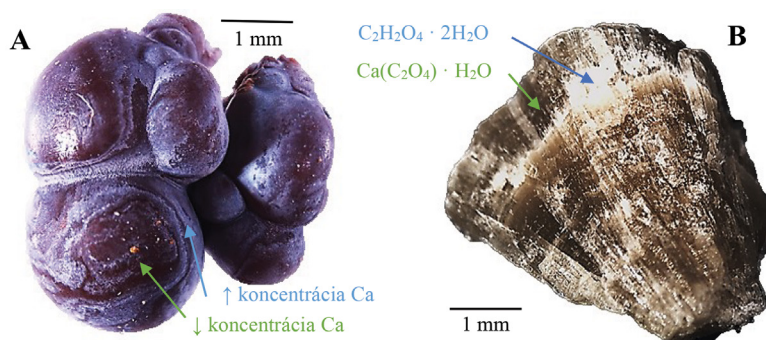
Pozorovanie vzoriek pod binokulárom (**obrázok 1 A, B**) odhalilo rozdiely v morfológických vlastnostiach konkrémentov. Pozorujeme odlišné sfarbenie, vnútornú aj povrchovú štruktúru. Pri konkrémentoch sú prítomné koncentrické vrstvy. Na určenie chemického zloženia bola vykonaná analýza FTIR.

Infračervená spektroskopia (FTIR) a Ramanova spektroskopia (RAMAN)

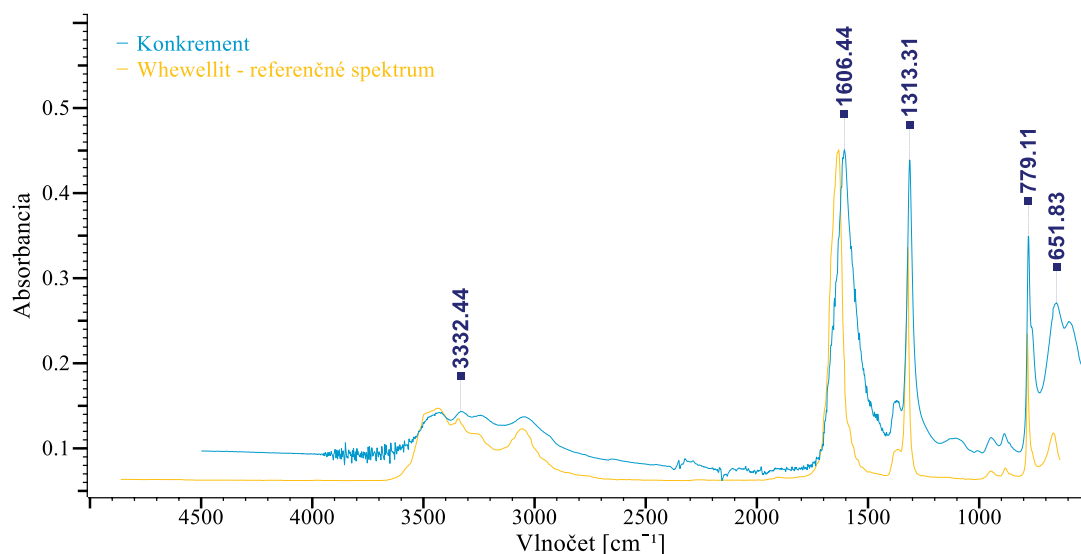
Metódou FTIR bol vo vzorke na **obrázku 1A** identifikovaný *whewellit* $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$. Rozdielne sfarbenie koncentrických vrstiev je spôsobené odlišnou koncentráciou Ca. *Whewellit* bol určený dvoma spôsobmi:

a) namerané spektrum bolo porovnané s databázou ATR-IR – Inorganics 1 – Bio-Rad Sadtler a na základe najvyššej zhody určený *whewellit* (**obrázok 2**),

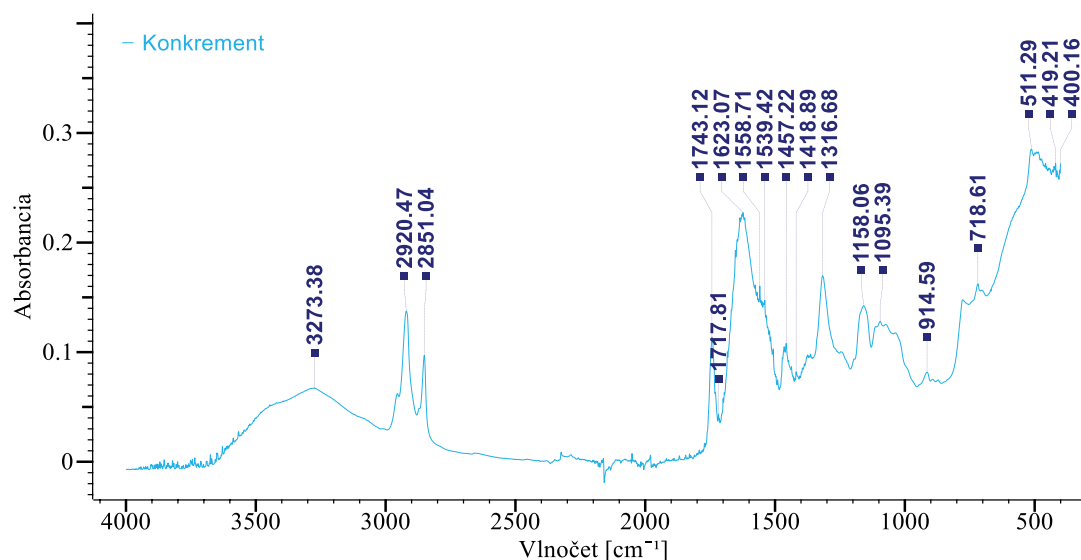
Obrázok 1. A čistý whewellit; B zmiešaný konkrement whewellitu a dihydrátu kys. etándiovej



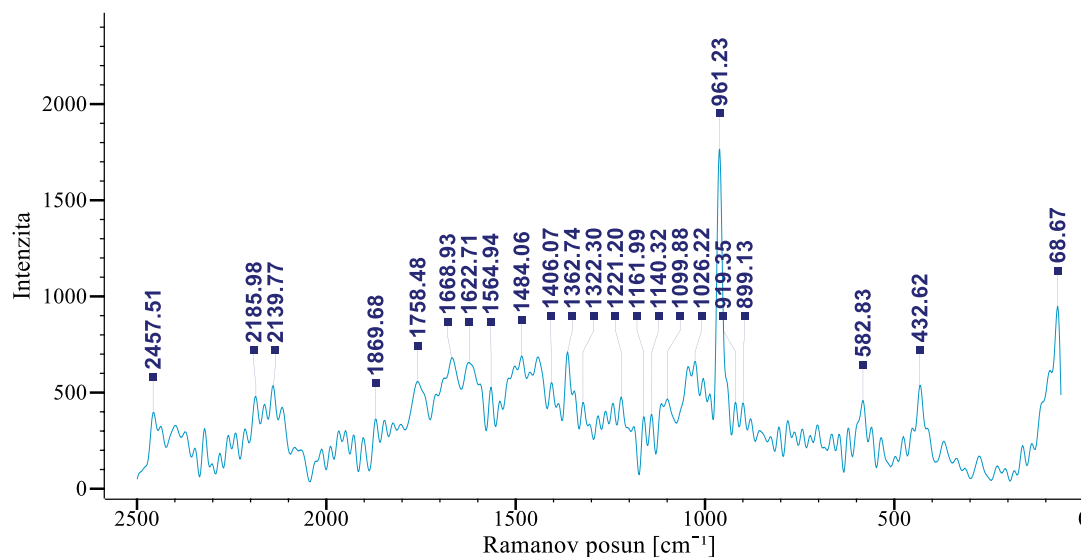
Obrázok 2. FTIR záznam – porovnanie nameraných a referenčných hodnôt pre whewellit – zhoda pozície vlnových čísel a absorbcie je dostatočne silná na to, aby sme vzorku mohli označiť ako whewellit



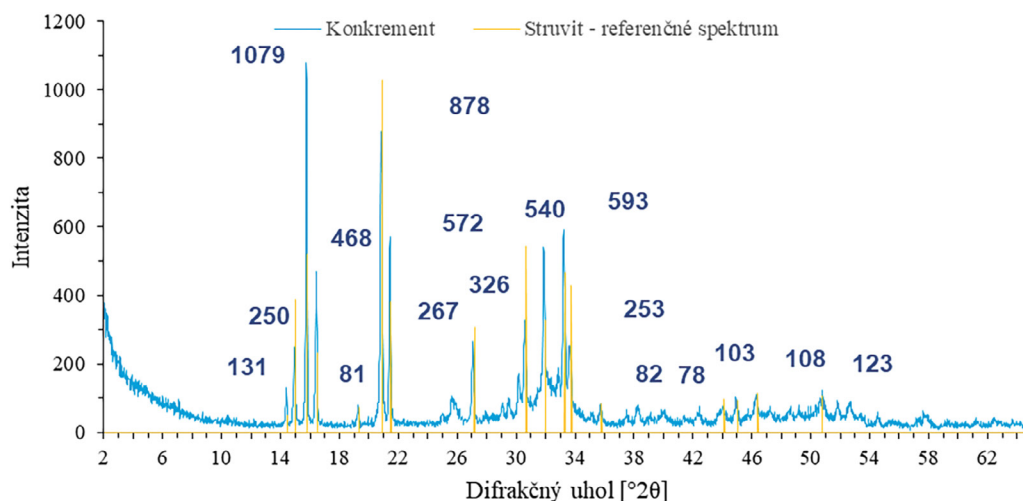
Obrázok 3. FTIR záznam – absorpčné maximá zodpovedajú prítomnosti whewellitu a dihydrátu kys. etándiovej



Obrázok 4. Ramanove spektrum dahllitu



Obrázok 5. Difraktogram struvitu – porovnanie pozícií a intenzít difraktovaných lúčov s referenčnými



b) bol identifikovaný *whewellit* na základe prítomnosti funkčných skupín charakteristických pre tento minerál. Vibrácie s $\sigma = 652, 3\,000 - 3\,500\text{ cm}^{-1}$ reprezentujú H_2O . Absorpčné maximum s $\sigma = 779\text{ cm}^{-1}$ je charakteristickou vibráciou C–H väzby a vibrácie skupín C=O a C–O sa prejavujú v miestach s $\sigma = 1\,313\text{ cm}^{-1}$, resp. $\sigma = 1\,606\text{ cm}^{-1}$.

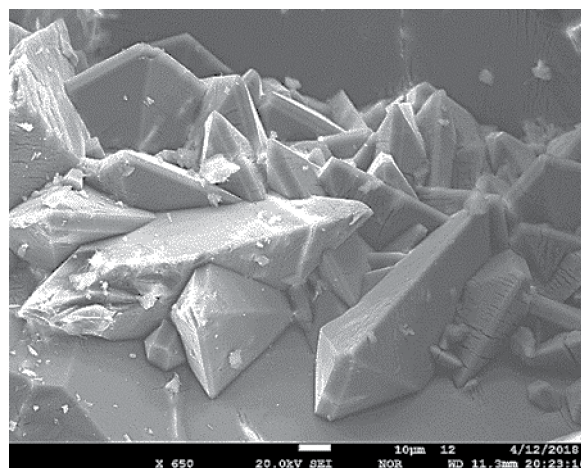
Vo vzorke na **obrázku 1B** boli svetlé koncentrické vrstvy tvorené dihydrátom kys. etándiovej $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tmavé časti tvoril *whewellit* $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$. Výsledok merania zobrazuje **obrázok 3**. Vibrácie s $\sigma = 915$ a $1\,539\text{ cm}^{-1}$ zodpovedajú NH_2 skupine. Absorpčné maximum s $\sigma = 1\,316\text{ cm}^{-1}$ patrí amidovej C–N skupine. Vibrácia s $\sigma = 1\,457\text{ cm}^{-1}$ reprezentuje CH_2 skupinu. Karboxylová dvojité C=O väzba je vyjadrená vibráciou s $\sigma = 1\,743\text{ cm}^{-1}$. Ostatné absorpčné maximá patria *whewellitu*.

Metódou RAMAN (**obrázok 4**) bola zistená prítomnosť *dahlitu* $\text{Ca}_5(\text{PO}_4\text{CO}_3)_3(\text{OH})$ (**obrázok 3**) identifikáciou vibrácií fosforečnanových $(\text{PO}_4)^{3-}$ molekúl v miestach s $\sigma = 433, 583, 961, 1\,026\text{ cm}^{-1}$. Absorpčné maximum s $\sigma = 1\,099\text{ cm}^{-1}$ je charakteristické pre $(\text{CO}_3)^{2-}$ skupinu a vibrácia s $\sigma = 1\,565\text{ cm}^{-1}$ je identifikačná pre amidovú C–N–H skupinu. Vibrácie sú typické pre *dahlit*.

Prášková difrakčná analýza (PXRD)

Obrázok 5 zobrazuje difrakčný záznam *struvitu* (NH_4) $\text{Mg}(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a porovnanie údajov s referenčným spektrom pre *struvit* získané z publikovaných priemerných hodnôt⁽³⁻⁶⁾.

Obrázok 6. SEM fotografia prizmatických dipyramidálnych kryštálov typických pre *weddellit*



Elektrónová mikroskopia (SEM)

Na **obrázku 6** sú viditeľné prizmatické dipyramidálne kryštály. Tento tvar je typický pre *weddellit* $\text{Ca}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, aj keď podobné kryštály môže vytvárať aj iný minerál.

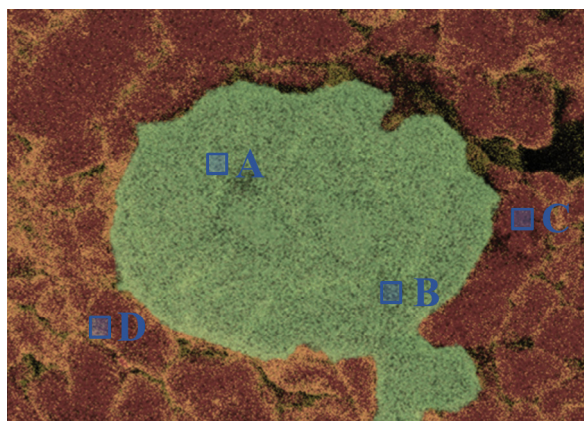
Elektrónová mikroanalýza (EDS)

Výsledky EDS analýzy dokumentuje **tabuľka 1** a **obrázok 7**. **Tabuľka 1** zobrazuje zastúpenie prvkov a oxidov na

Tabuľka 1. Výsledky kvantitatívnej EDS analýzy

Prvky	Miesta analýz				Oxidy	Miesta analýz			
	A	B	C	D		A	B	C	D
N	-	-	89,39	86,81	Na₂O	0,29	0,33	-	-
Na	0,22	0,25	-	-	SiO₂	2,21	4,01	7,35	13,19
Si	1	1,86	3,43	6,16	P₂O₅	2,68	2,17	-	-
P	1,16	1,17	-	-	SO₃	1,36	1,26	-	-
S	0,69	0,63	-	-	CaO	93,46	92,23	2,52	-
Ca	66,83	65,94	1,8	-					
O	30,1	30,02	4,64	7,03					
Cl	-	-	0,74	-					
Spolu	100	100,1	100	100					

Obrázok 7. Zložená mapa distribúcie prvkov



(■ – Si, ■ – N+O, ■ – Ca+O)

vybraných miestach vzorky. Zo získaných údajov predpokladáme na základe stechiometrických výpočtov a porovnania s databázou⁽⁷⁾ vznik nasledujúcich minerálov: oxid vápenatý CaO , kremeň SiO_2 a malé množstvá apatitu $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ a anhydritu CaSO_4 . V miestach (C a D) s dominantným obsahom N predpokladáme vznik bližšie nešpecifikovanej organickej zložky a kremeňa SiO_2 . **Obrázok 7** zachytáva rozmiestnenie prvkov vo vzorke a ich vzájomnú afinitu. N a Ca preukazujú vysokú afinitu k O, Si sa ukladá v okrajových častiach NO a CaO tvorí samostatnú jednotku.

Diskusia a záver

Metódu morfológických štúdií využívame ako doplnkovú podobne ako iní autori (8). Výhodou je nízka cena analýzy, jednoduchosť obsluhy, nenáročné hodnotenie výsledkov a krátky čas merania (do 10 min.). Ak na povrchu konkrémentu nie sú dostatočne vyvinuté kryštálové tvary, metóda nepostačuje na presnú analýzu konkrémentov.

Metóda FTIR spĺňa predpoklady na rutinné používanie a považujeme ju za najlepšiu metódu na analýzu konkrémentov^(1,9). Poskytuje údaje na semikvantitatívnej úrovni (má vysokú špecifitu a senzitivitu) a minimalizuje množstvo chýb v porovnaní s chemickou titračnou analýzou^(10,11). Je relatívne lacná (15 €/analýza)⁽¹²⁾, jednoduchá na obsluhu, hodnotenie výsledkov je stredne náročné, vzorka vyžaduje homogenizáciu a meranie trvá < 10 min. Namerané hodnoty sú podobné ako publikované údaje^(13,14).

RAMAN poskytuje v porovnaní s FTIR výsledky na kvantitatívnej úrovni so senzitivitou 96,3 % a špecifitou 98,5 – 99,5 %⁽¹⁵⁾. Cena analýzy je 17 €/vzorku⁽¹⁶⁾, merania možno ro-

biť bodovo, vzorky nevyžadujú špeciálnu úpravu a analýza aj následné hodnotenie výsledkov sú stredne náročné. Nevýhodou je dĺžka merania, ktorá môže byť v rozmedzí 10 – 180 min. Na použitie metódy RAMAN a FTIR postačuje množstvo vzorky $\geq 0,5 \text{ mm}^{3(17)}$ a metódy sú vhodné na analýzu liekových a iných menej častých konkrémentov. Hodnoty a intenzita vibrácií sú totožné sa zhodujú s meraniami iných autorov⁽¹⁸⁾.

PXRD analýza je kvalitná kvantitatívna metóda na identifikácii štruktúry kryštalickej látky. Meranie trvá 20 – 180 min a predlžuje sa s klesajúcou hmotnosťou vzorky. Cena analýzy je 50 €/vzorku⁽¹⁵⁾, konkrément je potrebné homogenizovať, analýza je stredne náročná a hodnotenie výsledkov náročné. Nevýhodou je nemožnosť merania amorfných konkrémentov^(19,20). Namerané hodnoty sú dostatočne podobné priemerným hodnotám z doposiaľ publikovaných prác v rámci databázy AMCS⁽²¹⁾.

Metóda SEM poskytuje fotografie vo vysokom rozlíšení (dokáže rozlíšiť komponenty s veľkosťou od 1 nm). Dĺžka analýzy stúpa so zvyšovaním chemickej heterogenity konkrémentu a trvá 20 – 120 min. Cena 1 analýzy je 20 €⁽¹⁶⁾, je potrebné naparenie vzorky uhlíkom, je náročná na obsluhu aj hodnotenie výsledkov^(22,23). Kryštály na SEM fotografii sú tvarom podobné kryštálom *weddellitu* z iných publikácií⁽²⁴⁾ a databáz⁽²⁵⁾.

Metóda EDS ponúka kvantitatívne výsledky chemického zloženia a distribúciu vybraných prvkov. Dĺžka analýzy (30 – 120 min.) podobne ako pri SEM stúpa chemickou heterogenitou konkrémentu. Povrch vzorky je potrebné upraviť, aby bol hladký, a napariť uhlíkom. Cena 1 analýzy je 20 €, meranie a vyhodnocovanie výsledkov je relatívne náročné^(16,23). Výsledky EDS tabuľky pre jednotlivé merané body sú pri porovnaní s databázou dostatočne zhodné⁽⁷⁾. **Obrázok 7** zobrazuje rozloženie prvkov a ich vzájomnú afinitu a pomáha lepšie pochopiť vznik konkrémentu.

V porovnaní so zastaranou⁽¹⁾ chemickou titračnou analýzou sú všetky opísané metódy výskumu močových konkrémentov kvalitatívne lepšie. Nedochádza k takému vysokému množstvu chýb – falošne pozitívnym a falošne negatívnym výsledkom. V slovenských laboratóriách vždy prevažuje používanie chemickej titračnej analýzy. Týmto sme chceli ponúknuť iné, spoľahlivejšie možnosti analýz močových konkrémentov.

Grantová podpora

Výskum bol podporený grantmi KEGA 008UPJŠ-4/2020, KEGA 010UPJŠ-4/2021 a VVGS VUaVP35 2020-1653.

LITERATÚRA

1. Türk C, Neisius A, Petrik A, et al. EAU Guidelines on Urolithiasis. 2021st ed. EAU Guidelines Office; 2021.
2. Gilad R, Williams JC, Usman KD, et al. Interpreting the results of chemical stone analysis in the era of modern stone analysis techniques. J Nephrol 2017; 30(1): 135-140.
3. Ferraris G, Fuess H, Joswig W. Neutron diffraction study of $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (struvite) and survey of water molecules donating short hydrogen bonds 1986; 42(3): 253-258.
4. Mathew M, Schroeder LW, IUCr. Crystal structure of a struvite analogue, $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Acta Cryst 1979; 35(1): 11-13.
5. Whitaker A, Jeffery JW, IUCr. The crystal structure of struvite, $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Acta Cryst 1970; 26(10): 1429-1440.
6. Graeser S, Postl W, Bojar H-PB, et al. Struvite-(K), $\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, the potassium equivalent of struvite a new mineral. Eur J Mineral 2008; 20(4): 629-633.
7. <http://webmineral.com/chemical.shtml>
8. Cruz-May TN, Herrera A, Rodríguez-Hernández J, et al. Structural and morphological characterization of kidney stones in patients from the Yucatan Maya population. J Mol Struct 2021; 1235: 130267.

9. Kravdal G, Helgø D, Moe MK. Infrared spectroscopy is the gold standard for kidney stone analysis. *Tidsskr Den Nor legeförening* 2015; 135(4): 313-314.
10. Khan AH, Imran S, Talati J, et al. Fourier transform infrared spectroscopy for analysis of kidney stones. *Investig Clin Urol* 2018; 59(1): 32-37.
11. Primiano A, Persichilli S, Gambaro G, et al. FT-IR Analysis of Urinary Stones: A Helpful Tool for Clinician Comparison with the Chemical Spot Test. *Dis Markers* 2014; 2014: 1-5.
12. <https://www.ruvzke.sk/sites/default/files/cennik/cennik.pdf>
13. Sekkoum K, Cheriti A, Taleb S, et al. FTIR spectroscopic study of human urinary stones from El Bayadh district (Algeria). *Arab J Chem* 2016; 9(3): 330-334.
14. Muthuselvi C, Arunkumar A, Rajaperumal G. Growth and Characterization of Oxalic Acid Doped with Tryptophan Crystal for Antimicrobial Activity. *Chem Sin* 2016; 7(4): 55-62.
15. Cui X, Zhao Z, Zhang G, et al. Analysis and classification of kidney stones based on Raman spectroscopy. *Biomed Opt Express* 2018; 9(9): 4175.
16. <http://www.geo.sav.sk/wp-content/uploads/Cennik-UVZ-SAV.pdf>.
17. Castiglione V, Sacré PY, Cavalier E, et al. Raman chemical imaging, a new tool in kidney stone structure analysis: Case-study and comparison to Fourier Transform Infrared spectroscopy. *PLoS One* 2018; 13(8).
18. Kalimullina AR, Pisareva EV, Timchenko EV, et al. Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy. *J Opt Technol* 2018; 85(3): 130-135.
19. Uvarov V, Popov I, Shapur N, et al. X-ray diffraction and SEM study of kidney stones in Israel: Quantitative analysis, crystallite size determination, and statistical characterization. *Environ Geochem Health* 2011; 33(6): 613-622.
20. Srivastava A, Swain KK, Vashisht B, et al. Studies of kidney stones using INAA, EDXRF and XRD techniques. *J Radioanal Nucl Chem* 2013; 300: 191-194.
21. Downs RT, Hall-Wallace M. The American Mineralogist Crystal Structure Database. *Am Mineral* 2003; 88: 247-250.
22. Singh VK, Rai PK. Kidney stone analysis techniques and the role of major and trace elements on their pathogenesis: a review. *Biophys Rev* 2014; 6(3-4): 291-310.
23. Racek M, Racek J, Hupáková I. Scanning electron microscopy in analysis of urinary stones. *Scand J Clin Lab Invest* 2019; 79(3): 208-217.
24. Saffo MB, Lowenstam HA. Calcareous Deposits in the Renal Sac of a Molgolid Tunicate. *Science* 1978; 200(4346): 1166-1168.
25. <https://www.mindat.org/gm/4254>

Mgr. Erik Drabiščák

Ústav verejného zdravotníctva a hygieny
Lekárska fakulta UPJŠ
Šrobárova 2, 040 01 Košice
e-mail: erik.drabiscak@student.upjs.sk

Mikrobiálne spoločenstvá a ich vplyv na liečbu diabetickej nohy

Michal Kajsík¹, Pavol Janega^{1,2}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta UK v Bratislave

Chronické, ťažko liečiteľné ulcerácie diabetickej nohy spôsobujú veľkú záťaž pre pacienta aj pre systém zdravotnej starostlivosti. Napriek použitiu mnohých konvenčných a alternatívnych spôsobov liečby nedokážeme spoľahlivo zabrániť infekcii, ktorá často vedie k sepe, prípadne až k amputácii nohy. Narastajúce množstvo dát získaných štúdiom infikovaných rán pacientov naznačuje, že zloženie mikrobiómu hrá dôležitú úlohu v procese hojenia rany. K najčastejším bakteriálnym rodom identifikovaným v ranách patria *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Pseudomonas*. Moderné štúdium mikrobiómu založené na metódach nezávislých od kultivácie organizmov nám však umožnili odhaliť nielen baktérie, ktoré je náročné kultivovať, ale aj gény virulencie, ktoré majú vplyv na hojenie rany. Podľa nových zistení práve zvýšená diverzita bakteriálneho spoločenstva zvyšuje pravdepodobnosť úspešného hojenia rán.

Kľúčové slová: diabetes mellitus, diabetická noha, mikrobióm, sepsa

Microbial communities and their influence on the treatment of diabetic foot

Chronic, difficult-to-treat diabetic foot ulcerations place a massive burden on the patient and the healthcare system. Despite using many conventional and alternative treatments, we cannot reliably prevent the infection that often leads to sepsis or even amputation of the foot. The growing amount of scientific data obtained from the study of infected wounds in patients suggests that microbiome composition plays an essential role in wound healing. The most common bacterial genera identified in wounds include *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Pseudomonas*. However, modern microbiome studies based on methods independent of the cultivation of organisms have enabled us to detect bacteria that are difficult to cultivate and virulence genes that affect wound healing. According to new findings, the increased diversity of the bacterial community increases the likelihood of successful wound healing.

Keywords: Diabetes mellitus, Diabetic foot ulcer, Microbiome, sepsis

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 79 – 82

Úvod

K dlhodobým komplikáciám diabetu mellitu patrí periférna neuropatia s rizikom vzniku vredov na nohách. Tieto ulcerácie označujeme pojmom „syndróm diabetickej nohy“ (SDN)⁽¹⁾. Riziko vzniku diabetickeho vredu na nohe pacientov je 19 – 34 %. Vysoká je však miera recidívy vredov, ktorá dosahuje až 40 % do jedného roka po uzdravení a 65 % do piatich rokov⁽²⁾. Bez poskytnutej včasnej a vhodnej starostlivosti vedie ulcerácia k infekcii, ku gangréne, k amputácii a dokonca až k smrti. Celkovo je amputácia dolných končatín u pacientov s diabetom 15× vyššia ako u pacientov bez cukrovky. Odhaduje sa, že približne 50 – 70 % všetkých amputácií dolných končatín je spôsobených diabetickejšími vredmi. Na vzniku vredov sa podieľa mnoho faktorov. Medzi najzávažnejšie rizikové faktory patrí periférna neuropatia, ochorenie periférnych ciev a sprievodná bakteriálna infekcia, ktorá komplikuje hojenie vredov⁽³⁾. Podľa epidemiologických údajov je asi 50 % prípadov SDN spôsobených výlučne neuropatiou, ktorá narúša normálne ochranné reflexné mechanizmy, čo má za následok vážnu traumy alebo opakované nepozorované poranenie spôsobujúce otvorené rany. Senzorická neuropatia takisto vedie k vzniku abnormalít v proprioceptii, ktoré spôsobujú chybnú záťaž pri chôdzi, čo podporuje tvorbu kalusu alebo

vredov⁽⁴⁾. Druhou častou príčinou ulcerácií sú ochorenia periférnych ciev (PVD), ktoré sú zodpovedné za 15 % prípadov, zatiaľ čo 35 % prípadov ulcerácie nôh sa vyvíja ako kombinácia neuropatie a angiopatie. Ischemické a neuropatické dystrofické tkanivo je citlivé na infekcie a poranenia. Štrukturálne zmeny veľkých a malých ciev spolu s hyperglykémiou môžu zvýšiť vazokonstrikciu a faktory agregácie krvných doštičiek v cievach. To spôsobuje zníženie prekrvenia chodidiel a nervov, čo môže v konečnom dôsledku viesť ku gangréne a k infekcii. Spúšťacími faktormi sú však často banálne poranenia pokožky spôsobené obuvou alebo poranenia, ktoré vznikajú pri strihaní nechťov⁽⁵⁾.

Liečba syndrómu diabetickej nohy

Konvenčná liečba diabetickej nohy zahŕňa vyčistenie rany, liečbu infekcie antibiotikami a revaskularizačné procedúry. Debridement podporuje rast granulačného tkaniva, znižuje riziko infekcie a eliminuje zápach. Časté komplikácie s hojením však viedli k používaniu prídavných terapií, ako je hyperbarická kyslíková terapia, terapie s negatívnym atmosférickým tlakom v oblasti rany alebo využitie sterilných lavičiek. Tie nielen eliminujú nekrotické tkanivo, ale vlastnými výlučkami

pomáhajú bojovať s infekciou⁽⁶⁾. Liečba SDN je často komplikovaná sprievodnou infekciou, ktorá sa vyskytuje až v 60 % prípadov⁽⁷⁾. Štúdie opisujúce využitie nových prístupov liečby síce reportovali zníženie počtu ulcerácií so sepsou, nedokázali však infekciu eliminovať úplne⁽⁸⁾. Rany na nohách u pacientov s cukrovkou stratili mnohé obranné mechanizmy intaktnej kože, ktoré tak nepredstavujú zábranu pre invázne mikroorganizmy⁽⁹⁾. Dôvody zvýšeného rizika a závažnosti infekcií u osôb s diabetom nie sú úplne jasné. Zdá sa, že cukrovka má multifaktoriálne účinky na rôzne časti imunitného systému, najmä na bunky, ktoré sprostredkujú vrodenú imunitu. Táto imunitná odpoveď pozostáva predovšetkým z lokálnych vazoaktívnych a prozápalových cytokínov, komplementového systému a buniek schopných fagocytózy, t. j. polymorfonukleárných buniek (PMN) a monocytov. Lokálne vazoaktívne cytokíny spôsobujú vazodilatáciu cez reakciu oxidu dusnatého. Pri hyperglykémii však môže dôjsť k dysregulácii tejto reakcie, čo môže, naopak, viesť k vazokonstrikcii, ktorá následne spôsobuje hypoxiu a zhoršený prílív fagocytov. Takisto sa ukázalo, že u osôb s diabetom majú PMN a monocyty viaceré poruchy vrátane chemotaxie, aderenzie, fagocytózy a intracelulárneho zabíjania⁽¹⁰⁾.

Metódy charakterizácie mikrobiómu pri ulceráciách

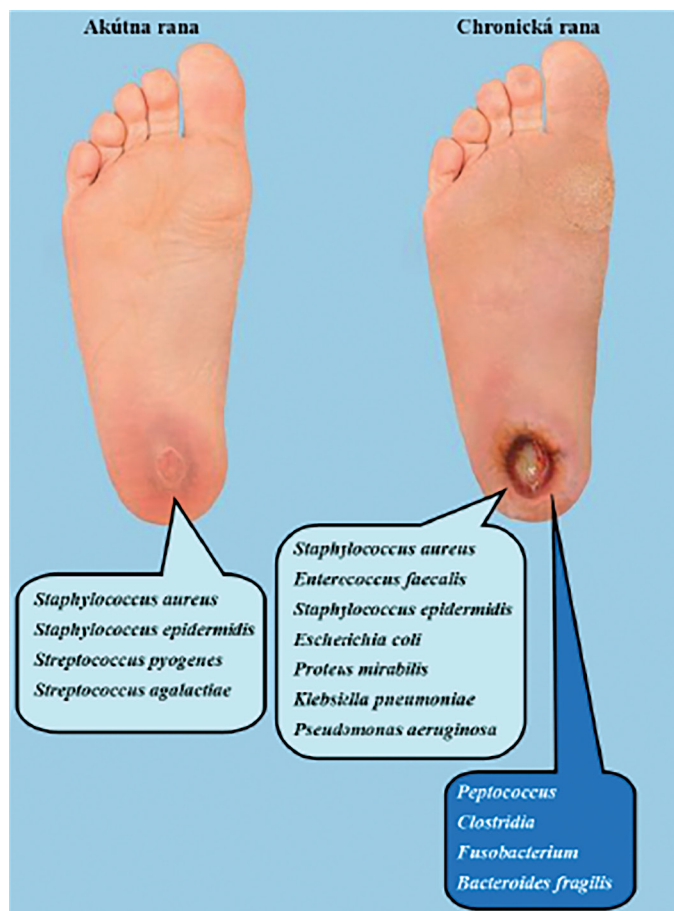
Ulcerácie sú kolonizované spektrom rôznych baktérií, ktorých vplyv na postup infekcie nepoznáme. Klasické metódy založené na kultivácii sú orientované na tie mikroorganizmy, ktorým sa darí rásť v laboratórnych podmienkach a nedostatočne reprezentujú plesňové, kvasinkové a ostatné bakteriálne spoločenstvá⁽¹¹⁾. Z toho dôvodu sa začali využívať metódy nezávislé od kultivácie. Tie sú založené na vysokoparalelnom sekvenovaní a následnej bioinformatickej analýze. Väčšina vedeckých skupín využíva amplikónové sekvenovanie 16S rRNA regiónu, 28S rRNA, prípadne ITS sekvencií, ktoré predstavujú konzervatívne sekvencie obsiahnuté vo všetkých prokaryotických alebo eukaryotických organizmoch. Napriek nesporným výhodám nám metóda ponúka len slabé taxonomické rozlíšenie na úrovni rodov a v niektorých prípadoch aj druhov. Najviac štúdií využíva sekvenovanie 16S rRNA regiónu, ktorý pozostáva z 9 hypervariabilných úsekov (V1-V9), medzi ktorými sa nachádzajú konzervované sekvencie vhodné pre dizajn amplifikačných primerov⁽¹²⁾. Vzhľadom na efektivitu metódy sa neanalyzuje celá oblasť génu 16S rRNA, ale iba jednotlivé úseky. Najčastejšie sa využíva úsek V4, prípadne úseky V1 až V3. Využitie len jednotlivých úsekov však spôsobuje niektoré nedostatky v presnom zaradení do taxonomických jednotiek, napríklad rozlíšenie jednotlivých druhov čeľade *Enterobacteriaceae* alebo druhov rodu *Staphylococcus*. Vážnym nedostatkom sekvenovania regiónu V4 z pohľadu stanovenia mikrobiómu kože je značná nepresnosť pri detekcii komenzálov *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* a *Corynebacterium*⁽¹³⁾. Pre lepšie chápanie vplyvu mikrobiómu na hojenie je však potrebné uviesť bakteriálne zloženie na úrovni kmeňa. Zároveň z amplikónového sekvenovania nezískame žiadne informácie o ostatnom genetickom vybavení mikroorganizmov a jeho vplyve na progres infekcie^(13,14). Alternatívou je použitie celogenómového shotgun sekvenovania, ktoré je síce náročnejšie na čas aj zdroje, ale poskytuje viac potrebných informácií o taxonómii mikroorganizmov aj ich rezistencii proti antibiotikám⁽¹³⁾. Na

druhej strane, aj keď sú tieto techniky oveľa citlivejšie ako kultivácia, kvalita extrakcie DNA sa líši v závislosti od druhu, a tak môže stále niesť určitú chybovosť v určení kvantity. Nerozlišujú ani medzi živými a mŕtvymi baktériami a vyžadujú si nákladné vybavenie⁽¹⁵⁾.

Zloženie mikrobiómu syndrómu diabetickej nohy

V zdravom stave kožné komenzálne mikróby koexistujú so svojimi ľudskými hostiteľmi a pomáhajú predchádzať kolonizácii kože potenciálne patogénnymi mikróbami. Štúdie však preukázali klinicky relevantné rozdiely v kožnom mikrobióme pokožky nohy medzi nediabetickými a diabetickými jedincami, ktoré pravdepodobne prispievajú k vyššej miere kožných infekčných chorôb u diabetických pacientov⁽¹⁶⁾. Dlhodobá štúdia mikrobiómu SDN sledovala zloženie mikrobiálneho spoločenstva ulcerácie v porovnaní s pacientovou zdravou nohou aj s kontrolnou skupinou zdravých jedincov. Mikrobióm rany a nepoškodenej kože diabetického pacienta sa líšili. Bola takisto pozorovaná znížená diverzita mikroorganizmov medzi pacientmi s diabetom a zdravými jedincami. Napriek zníženej diverzite bolo identifikovaných 69 taxonomických jednotiek (OTUs) špecifických pre kožný mikrobióm pacientov s diabetom⁽¹⁷⁾. V staršej štúdii však pozorovali, naopak, vyššiu diverzitu bakteriálnych druhov na koži pacientov s diabetom⁽²⁷⁾. Takto významné rozdiely naznačujú vplyv geografického a environmentálneho prostredia, trvania a štádia progresie ochorenia. Okrem toho hospitalizácia pacienta a zvolená antibiotická liečba môžu zmeniť profil citlivosti, ale aj zastúpenie bakteriálnych patogénov. Niekoľko vedeckých tímov sa snažilo identifikovať jednotlivých pôvodcov komplikácií. Pomocou klasických kultivačných metód a typizácie pomocou testov ABI20 sa podarilo identifikovať bakteriálne druhy v skorých aj neskorých ranách. Pri akútne infikovaných ranách patria medzi bežne izolované patogény predovšetkým *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a β -hemolytické streptokoky *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae*. Naproti tomu chronické rany boli častejšie polymikrobiálne so zmesou aeróbných a anaeróbných baktérií. V chronických vredoch boli najčastejšie izolovanými aeróbnymi grampozitívnymi baktériami *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus epidermidis*. Z aeróbných gramnegatívnych baktérií sa vyskytovali predovšetkým *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Hlbšie chronické vredy osídľovali prevažne anaeróbne baktérie *Peptococcus*, *Clostridia*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, pričom najrozšírenejším bakteriálnym patogénom prítomným v infikovaných vredoch bol *Bacteroides fragilis*⁽¹⁸⁾ (**obrázok 1**). Komplexnejší náhľad do zloženia mikrobiómu poskytujú techniky založené na vysokoparalelnom sekvenovaní. Väčšina dostupných štúdií stanovovala zloženie mikrobiálneho spoločenstva pomocou amplikónového sekvenovania 16S rRNA. Wolcott a kolektív (19) zistili masívnu prítomnosť druhov z rodov *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* a *Fingoldia*. Gardner a kol.⁽¹¹⁾ rozdelili diabetické vredy na tri typy v závislosti od dominantných taxónov v ranách, ktorými boli *Staphylococcus*, *Streptococcus* alebo zmes anaeróbných baktérií a proteobaktérií. Podobné výsledky boli zistené v neskoršej štúdii, kde v dvoch skupinách rán dominoval buď *Staphylococcus*, alebo *Streptococcus*.

Obrázok 1. Rozdiel v zložení mikrobiálneho spoločenstva akútneho a chronického diabetického vredu. Upravené podľa Abulrazak a kol.⁽¹⁸⁾



cus a rody *Corynebacterium* a *Finegoldia*⁽²⁰⁾. Tie isté rody boli pozorované vo väčšine rán, zatiaľ čo rody *Serratia* a *Proteus* boli špecifické pre jednotlivcov. V štúdiu McDonald a kol.⁽²¹⁾ stanovili vplyv identifikovaných baktérií na hojenie. Nehojace sa rany obsahujú prevažne baktérie zo skupín *Bacteroidales*, *Streptococcaceae* a fakultatívne anaeróby, najmä druhy rodu *Enterobacter*. Naopak, rany, ktoré sa hojili rýchlo, často obsahovali druhy z *Actinomycetales* a *Staphylococcaceae*. Zaujímavé sú aj zmeny v zložení biofilmu v ranách v závislosti od času a liečby. Stanovenie mikrobiómu nových vredov v porovnaní s opakujúcimi sa viedlo k zisteniu, že stafylokok bol bežný pri nových vredoch, ale nie pri chronických ranách⁽²²⁾. Rozdiely vo výsledkoch napovedajú veľkú variabilitu mikrobiómov diabetických vredov, pričom nie je zjavná žiadna typická mikrofóra vyskytujúca sa u všetkých pacientov.

Vplyv interakcie medzi mikroorganizmami na hojenie ulcerácie

Vzhľadom na polymikrobiálnu povahu SDN je vplyv na vývoj rany jednotlivých bakteriálnych druhov závislý od partnerských baktérií. Napríklad patogénne účinky anaeróbov sa zvyšujú v prítomnosti aeróbov, pretože spotrebúvajú kyslík, a následná hypoxia v hĺbke tkaniva uľahčuje rast anaeróbov.

Takéto symbiotické vzťahy sú definované ako kooperatívna interakcia dvoch alebo viacerých druhov, čo môže viesť k zvýšeniu virulencie vedúcej k oneskoreniu uzdravenia⁽²³⁾. Ďalším príkladom je spoločný výskyt *Pseudomonas aeruginosa* a *S. aureus* ako dvoch najčastejších príčin chronických rán. Ich spoločné infekcie sú virulentnejšie než jednotlivé infekcie a vykazujú aj zvýšenú rezistenciu proti antibiotickej liečbe⁽²⁴⁾. Existujú však aj pozitívne vplyvy interakcií. Príkladom je, že kompetitívna interakcia medzi nepatogénneho kmenzála *Helicobacterium kunzii* prítomného v ranách výrazne znižuje virulenciu *S. aureus* bez priamej modifikácie obrannej odpovede hostiteľa⁽²⁵⁾. Celogenómové sekvenovanie mikrobiómu umožnilo identifikovať nielen taxonomické zloženie, ale aj jednotlivé gény obsiahnuté v genómoch mikroorganizmov. Dôkladnou bioinformatickou analýzou možno filtrovať gény zodpovedné za virulenciu baktérií. Kalan a kolektív⁽¹⁴⁾ použitím tejto metódy potvrdili častý výskyt rezistencie proti antibiotikám v ranách s pomalým hojením. Dokázali tiež identifikovať a celogenómovo sekvenovať kmeň *S. aureus*, ktorý sa vyskytoval v ranách pacientov s pomalým hojením. Tento kmeň obsahoval niekoľko génov zabezpečujúcich rezistenciu proti rôznym antibiotikám. V inej štúdii Sloan a kolektív (26) identifikovali rezistencie proti tetracyklínu a makrolidom v kmeňoch *Streptococcus anginosus* a *Prevotella*. Tetracyklín ani makrolidy nepatria k aktuálne používaným antibiotikám na liečbu diabetického nohy, no používajú sa v prípade pacientov s alergiou na penicilín. Rezistencia proti antibiotikám však nie je jediným faktorom virulencie asociovaným s komplikovanými infekciami rán. K častým faktorom patrí aj produkcia biofilmov, ktoré zvyšujú odolnosť baktérií proti antibiotikám, komplikujú čistenie rán, prípadne umožňujú anaeróbnym baktériám efektívnejšie rásť. Anotáciou génov v minulosti identifikovali agrABCD operón kódujúci metabolickú dráhu asociovanú s produkciou biofilmu⁽¹⁴⁾.

Záver

Mikrobióm infikovanej diabetického nohy predstavuje komplikované a komplexné spoločenstvo mikroorganizmov. Mnohé vedecké skupiny sa pokúšali identifikovať konkrétne bakteriálne druhy spôsobujúce komplikácie, no ich výsledky sa často nezhodujú. Najčastejšie sa vyskytujúci organizmami sú *S. aureus*, *Streptococcus* alebo *Bacteroides*. Rôznorodosť výstupov nasvedčuje, že pôvodcov infekcií je niekoľko a ich výskyt je závislý od mnohých faktorov. Existuje čoraz viac dôkazov, že pôvod infekcie je polymikrobiálny, pričom vzájomné interakcie môžu priebeh hojenia zhoršovať alebo, naopak, zlepšovať inhibíciou rastu patogénov vplyvom nepatogénnych kmenzálav. Je preto dôležité smerovať výskum na odhaľovanie týchto interakcií a ich vplyvu na hojenie rán.

Podakovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu: „Využitie mezenchymálnych kmeňových buniek v kombinácii s ďalšími podpornými biologickými postupmi v liečbe chronického diabetického vredu“ (DIASTEM) APVV-17-0526 podporeného grantom agentúry na podporu výskumu a vývoja.

LITERATÚRA

1. Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A. Diabetic foot syndrome: Immune-inflammatory features as possible cardiovascular markers in diabetes. *World J Orthop.* 2015;6(1):62-76.
2. Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N Engl J Med.* 2017;376(24):2367-2375.
3. Monteiro-Soares M, Boyko EJ, Ribeiro J, Ribeiro I, Dinis-Ribeiro M. Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2012;28(7):574-600.
4. Tresierra-Ayala MÁ, García Rojas A. Association between peripheral arterial disease and diabetic foot ulcers in patients with diabetes mellitus type 2. *Medicina Universitaria.* 2017;19(76):123-126.
5. Hazari A, Arun Maiya G. Diabetic Foot Complications: Foot Deformities, Peripheral Vascular Disease, Claudication, Foot Ulcers, and Amputation. *Clinical Biomechanics and its Implications on Diabetic Foot.* Published online 2020:49-58.
6. Hinchliffe RJ, Valk GD, Apelqvist J, et al. Specific guidelines on wound and wound-bed management. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2008;24(S1):S188-S189.
7. Zubair M, Ahmad J. Potential risk factors and outcomes of infection with multidrug resistance among diabetic patients having ulcers: 7 years study. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(1):414-418.
8. Shi E, Shofler D. Maggot debridement therapy: a systematic review. *Br J Community Nurs.* 2014;Suppl Wound Care:S6-S13.
9. Noor S, Khan RU, Ahmad J. Understanding Diabetic Foot Infection and its Management. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2017;11(2):149-156.
10. Peters EJG, Lipsky BA. Diagnosis and Management of Infection in the Diabetic Foot. *The Foot in Diabetes.* Published online 2020:265-286.
11. Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K, Segre JA, Grice EA. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes.* 2013;62(3):923-930.
12. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007;69(2):330-339.
13. Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS, et al. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *J Invest Dermatol.* 2016;136(5):947-956.
14. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, et al. Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host Microbe.* 2019;25(5):641-655.e5.
15. Lavigne J-P, Sotto A, Donyach-Remy C, Lipsky BA. New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. *Adv Wound Care.* 2015;4(1):38-49.
16. Liu C, Ponsoero AJ, Armstrong DG, Lipsky BA, Hurwitz BL. The dynamic wound microbiome. *BMC Med.* 2020;18(1):1-12.
17. Gardiner M, Vicaretti M, Sparks J, et al. A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ.* 2017;5:e3543.
18. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications.* 2005;19(3):138-141.
19. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):163-174.
20. Loesche M, Gardner SE, Kalan L, et al. Temporal Stability in Chronic Wound Microbiota Is Associated With Poor Healing. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):237-244.
21. MacDonald A, Brodell JD, Daiss JL, Schwarz EM, Oh I. Evidence of differential microbiomes in healing versus non-healing diabetic foot ulcers prior to and following foot salvage therapy. *Journal of Orthopaedic Research.* 2019;37(7):1596-1603.
22. Smith K, Collier A, Townsend EM, et al. One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiol.* 2016;16:54.
23. Dalton T, Dowd SE, Wolcott RD, et al. An In Vivo Polymicrobial Biofilm Wound Infection Model to Study Interspecies Interactions. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27317.
24. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One.* 2013;8(2):e56846.
25. Essebe CN, Visvikis O, Fines-Guyon M, et al. Decrease of *Staphylococcus aureus* Virulence by *Helicobacterium kunzii* in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2017;7.
26. Sloan TJ, Turton JC, Tyson J, et al. Examining diabetic heel ulcers through an ecological lens: microbial community dynamics associated with healing and infection. *J Med Microbiol.* 2019;68(2):230-240.
27. Oates A, Bowling FL, Boulton AJ, et al. Molecular and culture-based assessment of the microbial diversity of diabetic chronic foot wounds and contralateral skin sites. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2263-2271.

Mgr. Michal Kajsík, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava

e-mail: michal.kajsik@medirexgroupacademy.sk

Molekulárny mechanizmus karcinogenézy indukovanej prostredníctvom baktérií

Kamila Bernátová¹, Ondrej Pös^{1,2,3}

¹Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

²Geneton, s. r. o., Bratislava, Slovensko

³Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

Mikroorganizmy ovplyvňujú množstvo fyziologických, ale aj patofyziologických procesov vo svojich hostiteľských organizmoch. Hoci bola hypotéza účasti baktérií na indukcii a progresii rakoviny pôvodne zavrhnutá, výskumy čoraz častejšie potvrdzujú presný opak. Aj keď je množstvo priamo karcinogénnych baktérií veľmi malé a stále nie je úplne objasnený vzťah týchto prokaryotických organizmov a rakoviny, je známe, že baktérie sú schopné podnietiť vznik alebo uľahčiť rozvoj tumorigenézy viacerými spôsobmi. Cieľom tohto článku je opísať mechanizmy, ktorými baktérie môžu indukovať karcinogenézu alebo jej rozvoj, a sumarizovať výsledky dosiaľ uskutočnených experimentov, ktoré sa zaoberajú touto problematikou.

Kľúčové slová: rakovina, mikrobióm, infekcia, zápal, dysbióza

Molecular mechanism of bacterial-induced carcinogenesis

Microorganisms affect many physiological but also pathophysiological processes in their host organisms. Although the hypothesis of the involvement of bacteria in the induction and progression of cancer was initially rejected, scientific evidence is increasingly confirming the exact opposite. Although the number of directly carcinogenic bacteria is minimal and the relationship between these prokaryotic organisms and cancer is still not fully understood, it is known that bacteria can stimulate the onset or facilitate the development of tumorigenesis in several ways. This article describes the mechanisms by which bacteria can induce carcinogenesis or its progression and summarises the results of experiments dealing with this issue.

Keywords: cancer, microbiome, infection, inflammation, dysbiosis

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 83 – 87

Úvod

Medzi prvé asociácie baktérií s rakovinou patrí teória z roku 1772, ktorá predpokladala účasť *Mycobacterium tuberculosis* na vzniku malignít. Teória založená na pozorovaní bronchogénnych karcinómov v miestach zjazvených v dôsledku tuberkulózy bola takisto podporená pozorovaním vyššieho výskytu aktívnej tuberkulózy práve u pacientov s rakovinou pľúc oproti bežnej populácii. Neskôr však bola táto teória vyvrátená, pretože sa ukázalo, že pľúcne nádory boli lokalizované inde, nie v mieste zjazvenia po tuberkulóze⁽¹⁾. V roku 1890, William Russell pozoroval vo vzorkách nádorov objekty, ktoré nazval *fuchsin bodies*. I keď tieto objekty sám ďalej neskúmal, naznačil, že mohlo ísť o baktérie⁽²⁾. Následne začali pribúdať spojitosti ďalších baktérií s rôznymi typmi nádorov, ale v roku 1963 skupina vedcov z Národného inštitútu rakoviny v Spojených štátoch amerických odmietla akékoľvek hypotézy tohto typu, pretože usúdili, že dané baktérie boli pozorované v nádorovom tkanive len ako dôsledok kontaminácie alebo sekundárnej infekcie. O šesť rokov neskôr bola táto hypotéza zamietnutá a vedci sa opäť vrátili ku skúmaniu tohto spojenia. Najlepšie opísaný vzťah je medzi baktériou *Helicobacter pylori* a rakovinou žalúdka. Ďalej boli pomerne podrobne opísané spojenia medzi *Streptococcus bovis* a rakovinou hrubého čreva, *Chlamydia pneumoniae* a rakovinou pľúc a tiež spojenie *Bartonella species* s tvorbou cievnych nádorov⁽³⁾.

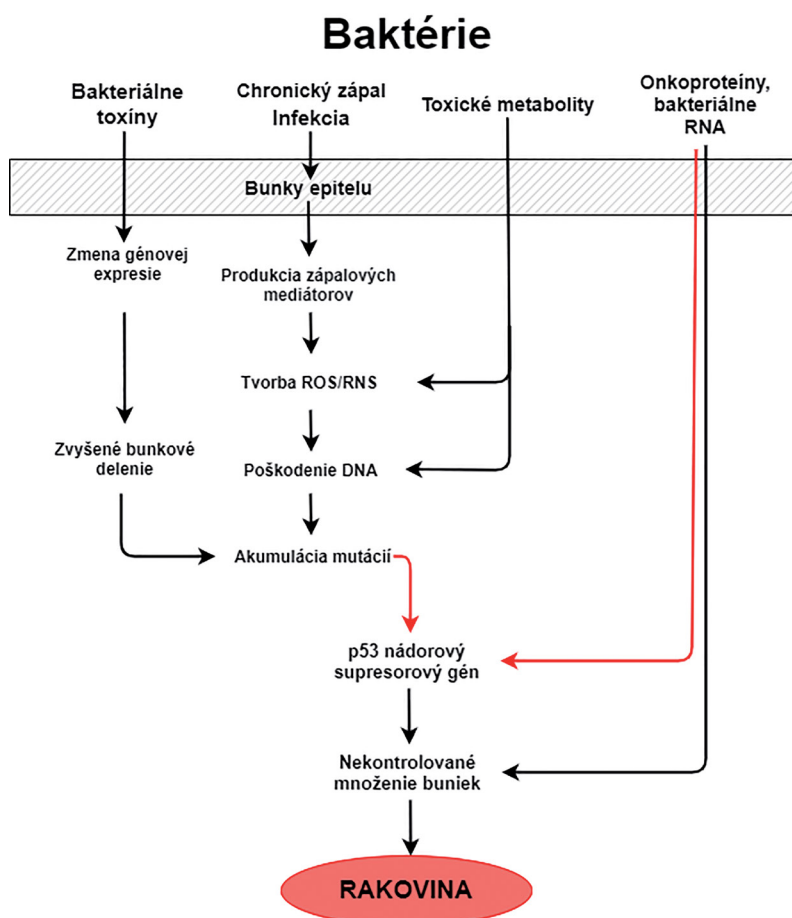
Molekulárne mechanizmy karcinogenézy

Spojitosť medzi baktériami a rakovinou nie je ani v súčasnosti úplne preskúmaná, ale podstatne promovanou je hypotéza, ktorá sa skladá z dvoch častí: 1. Chronický zápal spôsobený perzistentnou bakteriálnou infekciou môže viesť ku vzniku rakoviny; 2. Bakteriálne toxíny a sekundárne metabolity produkované pri chronickej bakteriálnej infekcii môžu indukovať karcinogenézu⁽⁴⁾. Okrem toho však boli objavené aj ďalšie spôsoby, konkrétne dysbióza a bakteriálne RNA, ktoré takisto môžu byť účastné na karcinogenéze (obrázok 1).

Chronický zápal

Imunitný systém cicavcov deteguje prítomnosť mikrobiálnej infekcie pomocou viacerých receptorov, z ktorých najvýraznejšími sú *toll-like* receptory (TLR) rozoznávajúce molekulárne vzory asociované s patogénmi (angl. *pathogen-associated molecular patterns*). Po ich aktivácii dochádza k produkcii prozápalových cytokínov a ďalších zápalových mediátorov, pričom krátkodobý akútny zápal je pre organizmus prospešná reakcia, ktorej cieľom je obnovenie poškodeného tkaniva a odstránenie patogénnych agensov z tela. Ak sa nepodari odstrániť príčinu vyvolávajúcu zápal, akútny zápal prerastie do chronického zápalu, ktorý je pre organizmus škodlivý, vyvoláva oxidačné poškodenie DNA a narúša kľú-

Obrázok 1. Možné spôsoby účasti baktérií na procese karcinogenézy (ROS – reaktívne formy kyslíka, RNS – reaktívne formy dusíka, červené šípky – inhibícia, čierne šípky – aktivácia).



čové kaskády regulujúce rast a rozmnožovanie buniek, čím môže dôjsť k malígnej transformácii buniek v organizme⁽⁵⁾.

Bakteriálne toxíny

Toxíny tvoria širokú skupinu biologicky aktívnych látok, ktoré produkujú organizmy s cieľom poškodiť iné organizmy, a tým prispieť k vlastnému prežitiu v danom prostredí. Pri pôsobení väčšiny skúmaných bakteriálnych toxínov dochádza najčastejšie k narušeniu signálnych dráh MAPK/ERK (mitogénom aktivovanej proteínkinázy/extracelulárnymi signálmi regulovanej kinázy) a tiež dráhy Wnt/ β -katenín (angl. *wingless-related integration site*). Obe tieto dráhy sú zapojené v regulácii bunkovej adhézie, elongácie, proliferácie a tiež v regulácii expresie tumorových supresorových génov. Pri ich narušení sú deregulované všetky tieto deje, dochádza najmä k inhibícii tumorových supresorov a zvýšenej expresii regulačných génov *c-MYC* a *cyklínu D*. Expresia *c-MYC* a *cyklínu D* sa zvyšuje tým, že sa rozrušuje komplex transmembránového proteínu s funkciou tumorového supresora E-kadherínu a proteínu riadiaceho bunkovú adhéziu a transkripciu génov β -katenínu, kde β -katenín následne prechádza do jadra a spôsobuje zvýšenie bunkového delenia^(6,7,11,13). Väčšina toxínov takisto iniciuje vo svojich hostiteľských bunkách zápalové reakcie vedúce k produkcii reaktívnych foriem kyslíka a dusíka, ktoré poškadzujú DNA, ovplyvňujú imunitné reakcie hostiteľa vo svoj prospech a vyhýbajú sa tak deštrukcii. Mnohé toxíny sú známe tým, že zvyšujú epiteliálnu

permeabilitu, čím uľahčujú kolonizáciu nielen sebe, ale aj iným patogénom a sú schopné inhibovať proces apoptózy a mechanizmy opráv poškodenej DNA^(6,7,9,11-13). K týmto toxínom patrí toxín *Bacteroides fragilis*, gén A asociovaný s cytotoxínmi a vakuolizujúci cytotoxín A, oba produkované *Helicobacter pylori*, ďalej sem patrí toxín *Pasteurella mutocida*, cytoletálne toxíny a dentilizín produkovaný baktériami *Treponema species*, *Fusobacterium* adhezín A, *Fusobacterium* proteín apoptózy 2, toxíny *Escherichia coli*, konkrétne kolibaktín, cytotoxické nekrotizujúce faktory a α -hemolizín a toxín produkovaný baktériou *Salmonella enterica*, proteín avirulencie A. *Pasteurella mutocida* toxín sa vyznačuje navyše schopnosťou ovplyvňovať regulačné G-proteíny, o ktorých je známe, že sú pri rakovinovom bujení zapojené do procesu angiogenézy, migrácie buniek a apoptózy⁽¹⁰⁾. Gén A asociovaný s cytotoxínmi podporuje proces epitelovo-mezenchýmového prechodu, keď bunky nadobúdajú zvýšenú invázivnosť a schopnosť migrácie, čím dochádza k podpore metastáz a bunky tiež nadobúdajú vlastnosti rakovinových kmeňových buniek, ktorými sú schopnosť obnovovať sa a diferencovať na veľké množstvo buniek⁽⁸⁾. *Bacteroides fragilis* toxín tiež naruša reguláciu metylómov, otvára chromátin a zvyšuje jeho prístupnosť pre transkripčné faktory a zvyšuje metyláciu promótorov nízkoexprimovaných génov⁽⁶⁾. Na zvyšovaní nestability genómu hostiteľov sú takisto účastné toxíny *Escherichia coli* a cytoletálne toxíny, pretože podporujú akumuláciu mutácií a vznik chromozómových aberácií⁽¹³⁾.

Tabuľka 1. Bakteriálne metabolity a ich vplyvy na hostiteľské bunky, ktoré majú potenciálne karcinogénny účinok alebo sú účastné na progresii rakoviny, a produkujúce kmene (ROS – reaktívne formy kyslíka, RNS – reaktívne formy dusíka).

Metabolity:	Vplyv na hostiteľskú bunku:	Produkujúce bakteriálne kmene:
• masné kyseliny s krátkym reťazcom (acetát, propionát, butyrát) • sekundárne žľčové kyseliny (kyselina deoxycholová, kyselina lithocholová) • xenobiotiká, nekongugovaný estrogén • N-nitrózo zlúčeniny, amoniak, polyamíny • sírovodík • acetaldehyd • kongugované linolové kyseliny	• stimulácia proliferácie buniek a progresie rakoviny(15,16) • ovplyvnenie funkcií a stavby črevného epitelu, iniciácia zápalu, podpora proliferácie, invázie buniek, generovania ROS a RNS, poškodenie DNA, inhibícia p53, modifikácia črevnej mikroflóry, uľahčenie translokácie baktérii (17,18,19,20,21) • generovanie ROS, podpora metastáz, zmena expresie génov(22,23) • alkylácia DNA, poškodenie črevnej sliznice, oxidačný stres(24) • rozpad bunkových bariér, poškodenie DNA, generovanie ROS, inhibícia metylácie DNA(24) • poškodenie DNA, generovanie ROS, degradácia kyseliny listovej(25) • ovplyvňovanie G-proteínov(26)	• <i>Bacteroidetes</i> a <i>Firmicutes</i> • <i>Bacteroidetes</i>, <i>Firmicutes</i>, a <i>Proteobacteria</i> • <i>Actinobacteria</i>, <i>Bacteroidetes</i> a <i>Firmicutes</i> • <i>Bacteroidetes</i>, <i>Firmicutes</i> a <i>Proteobacteria</i> • <i>Proteobacteria</i> • <i>Proteobacteria</i> • <i>Actinobacteria</i> a <i>Firmicutes</i>

Bakteriálne metabolity

Hlavnou dráhou signalizácie medzi hostiteľom a mikrobiómom je bakteriálna produkcia metabolitov, ktoré vstupujú do obehu a pomocou cirkulácie putujú do orgánov, kde ovplyvňujú rôzne biologické funkcie. Výsledný účinok metabolitov (**tabuľka 1**) na organizmus môže byť ochranný, ale dokážu vytvoriť aj predispozíciu na vznik rakoviny. Zmeny koncentrácie alebo typu metabolitov môžu byť spôsobené rôznymi faktormi, ako je napríklad strava, životný štýl alebo bakteriálna dysbióza⁽¹⁴⁾.

Bakteriálne RNA

Jedným z najnovšie objavených spôsobov komunikácie medzi baktériami a ich hostiteľmi je výmena informácií prostredníctvom regulačných RNA. Bakteriálne RNA sa považujú za molekulárny vzor asociovaný s patogénom, ktorý je účastný v reakciách ľudského hostiteľského organizmu na infekciu. RNA je v bakteriálnych bunkách v nadbytku a môže sa z nich uvoľniť po lýze buniek, ale môžu ju vylučovať aj živé baktérie prostredníctvom membránových vezikúl (MV), ktorých hlavnou úlohou je prenos a ochrana RNA pred degradáciou⁽²⁷⁾. Experimenty s uropatogénnou *E. coli* ukázali, že táto baktéria je schopná produkovať MV, ktoré obsahujú bakteriálne mRNA, rRNA, tRNA a malé nekódujúce RNA. Autorom tejto práce sa podarilo demonštrovať, že uvedené molekuly dokážu vstúpiť do hostiteľských buniek, kde by mohli ovplyvňovať dôležité biologické funkcie⁽²⁸⁾. Alternatívnym spôsobom na doručenie bakteriálnych RNA do buniek hostiteľa je ich produkcia intracelulárnymi baktériami, ku ktorým patrí napríklad *Listeria monocytogenes*. Pri kultivácii buniek s touto baktériou boli detegované jej RNA v cytosole hostiteľských buniek⁽²⁹⁾. Ďalším spôsobom, ako sa môžu bakteriálne RNA dostať do hostiteľskej bunky, je ich uvoľnenie z baktérií, ktoré zostávajú zachytené vo fagozóme⁽³⁰⁾.

Dosiaľ bola opísaná prítomnosť bakteriálnych RNA v cytosole, endozomálnych a fagozomálnych častiach a dokonca

aj v jadre hostiteľských buniek. Bakteriálna RNA v ľudských bunkách aktivuje TLR vrodenej imunity, ktoré aktivujú kaskády imunitného systému. Zároveň sa predpokladá, že by mohli mať schopnosť ovplyvniť metabolické a apoptotické funkcie aj imunitnú odpoveď hostiteľa vo svoj prospech⁽²⁷⁾. V súčasnosti sa čoraz viac výskumov zaoberá otázkou, či bakteriálne RNA dokážu regulovať expresiu génov hostiteľa, keďže je známe, že približne 60 % ľudských génov má expresiu regulovanú pomocou svojich mikroRNA (miRNA)⁽³¹⁾. Jedným z potenciálnych spôsobov, ako by bolo toto možné, je väzba bakteriálnych sRNA (malé RNA), ktoré sú obdobou ľudských miRNA, na hostiteľské miRNA na základe komplementarity, čím by pôsobili ako antisense RNA. Keďže majú oveľa väčšiu dĺžku než eukaryotické RNA, je potrebné eliminovať tento rozdiel, čo by sa teoreticky dalo ich fragmentáciou v hostiteľovi⁽³²⁾. Jeden z experimentov potvrdzujúcich túto hypotézu využil dve endogénne sRNA z *Escherichia coli* (*E. coli*), ktoré sú produkované, ak je baktéria vystavaná stresu. Konkrétne šlo o OxyS a DsrA sRNA, pričom bol ich účinok skúmaný na modelovom organizme *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Zistilo sa, že OxyS narušila chemosenzorické vlastnosti *C. elegans* inhibíciou expresie chemosenzorického génu *che-2* a DsrA zas obmedzila životnosť *C. elegans* potlačením expresie génu diacylglycerol lipázy *F42G9.6*, čím sa vo výslednom efekte *E. coli* chránila pred požiarením *C. elegans*⁽³³⁾.

Výskumná skupina Tanooka a kol. uskutočnila experiment, v ktorom sa zaoberali otázkou, či cudzie bakteriálne gény môžu vyvíjať onkogénnu aktivitu prostredníctvom interferencie s hostiteľskými RNA, ak sú endogénne exprimované. Vychádzali z toho, že miRNA dokážu regulovať expresiu onkogénov prostredníctvom interakcie s ich mRNA v oblasti UTR (neprekľadaný úsek RNA). Spomedzi rôznych druhov interferujúcich RNA má endogénne exprimovaná kompetitívna RNA „špongiový efekt“ na nahradenie funkcie miRNA. Na základe tohto je teda možné predpokladať, že aj endogénne exprimovaná cudzia RNA bakteriálneho pôvodu môže spôsobiť

Tabuľka 2. Detegované bakteriálne zmeny pri rôznych typoch rakoviny (↑ zvýšený výskyt oproti zdravým kontrolám, ↓ znížený výskyt oproti zdravým kontrolám).

Typ rakoviny:	Detegované bakteriálne zmeny:
Rakovina žalúdka	<i>Helicobacter pylori</i> ; ↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Nitrospirae</i> , <i>Burkholderia fungorum</i> a <i>Lachnospiraceae</i> (40)
Adenokarcinóm pažeráka	↓ <i>Helicobacter pylori</i> ; ↑ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Fusobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> a <i>Spirochaetes</i> (41)
Rakoviny hrubého čreva	↑ <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> a <i>Porphyromonas</i> spp.; ↓ <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Roseburia</i> spp. a <i>Bifidobacterium</i> spp.(42)
Rakovina pečene	↓ <i>Lachnospiraceae</i> ; ↑ <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Fusobacteriaceae</i> a <i>Veillonellaceae</i> (43)
Rakovina pankreasu	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; ↑ <i>Enterobacter</i> , <i>Fusobacteria</i> , <i>Enterococcus</i> a <i>Escherichia coli</i> (21)
Rakovina pľúc	↑ <i>Streptococcus viridans</i> , <i>Granulicatella adiacens</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Acinetobacter junii</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a <i>Chlamydia pneumoniae</i> (44, 45)
Rakovina prsníka	↑ <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> (pks+), dysbióza baktérií tráviaceho traktu(46)
Rakovina vaječníkov	<i>Abiotrophia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> a <i>Peptoniphilus</i> (47)
Rakovina maternice	↑ <i>Atopobium vaginae</i> a <i>Porphyromonas</i> spp.(48)

rakovinu, ak sa uplatní efekt špongie a bakteriálna RNA ovplyvní expresiu onkogénov. Pri tomto experimente bol použitý enterobakteriálny plazmidový gén *mucAB* a jeho genomický homológ *umuDC* z *E. coli*. V bunkách, do ktorých boli vnesené gény *mucAB* a *umuDC*, bola pozorovaná deregulácia viacerých génov, pričom najviac bola pozorovaná deregulácia onkogénu *Nedd9*. Na základe týchto pozorovaní autori vyslovili hypotézu, že mRNA génov *mucAB/umuDC* kompetitívne interferuje s miRNA-145, ktorá pôsobí regulačne na danú oblasť, čím zvyšujú expresiu *Nedd9*, čo vedie k malígnej transformácii buniek. Tieto zistenia indikujú, že ak má RNA sekvenciu komplementárnu k určitej miRNA, dokáže s ňou interagovať a ovplyvniť expresiu génov, ktoré sú pod kontrolou danej miRNA, pričom interagujúca RNA môže byť cudzieho pôvodu⁽³⁴⁾.

Ďalšou skupinou zaujímavých RNA sú dlhé nekódujúce RNA (lncRNA), ktorým sa začala venovať pozornosť len nedávno a od sRNA sa odlišujú svojou dĺžkou. Je o nich známe, že pokrývajú relatívne veľkú časť genómu a zistilo sa, že rovnako ako miRNA alebo sRNA dokážu ovplyvniť expresiu svojich cieľových génov. Experimenty ukázali, že baktérie počas infekcie dokážu meniť expresiu hostiteľských lncRNA s cieľom deregulácie imunitných reakcií hostiteľa voči patogénu. Rovnako aj baktérie produkujú lncRNA, ktoré im pomáhajú odolávať bunkovým antibakteriálnym aktivitám, no zatiaľ neboli identifikované žiadne bakteriálne lncRNA, ktoré by sa podieľali na epigenetických zmenách alebo na zmenách stability a regulácie hostiteľských mRNA⁽³⁵⁾.

Dysbióza

Črevný mikrobióm zložito interaguje s hostiteľským organizmom nielen na lokálnej, ale aj vzdialenej úrovni. Zdravé a vyvážené zloženie črevnej mikrobioty je esenciálne pre zachovanie črevnej bariéry, imunity a metabolizmu. Väčšinu zdravej intestinálnej mikrobioty tvoria baktérie z dvoch kmeňov: *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Vo fekálnej mikrobióte

zdravých jedincov boli najviac detegované štyri bakteriálne kmene, ktorými sú *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria*⁽³⁶⁾. Bakteriálna dysbióza, zmeny v zložení a podiele mikrobiómu, sa spája s mnohými chorobami, ktorými sú metabolické ochorenia, psychiatrické poruchy, ale aj neoplastické choroby. Pri nádorových ochoreniach je dysbióza spájaná s rakovinou močových ciest, krčka maternice, prostaty, kože, prsníkov, dýchacích ciest, lymfatických uzlín a hrubého čreva⁽¹⁴⁾. Na základe rastúcich dôkazov o tom, že dysbióza môže súvisieť s karcinogenezou, bolo vyslovených päť hypotéz, ako by k tomu mohlo dôjsť: 1. *alfa-bug*⁽³⁷⁾; 2. vodič spolujazdec; 3. efekt biofilmu⁽³⁸⁾; 4. dynamická rovnováha črevnej mikrobioty; 5. náhodný vedľajší efekt⁽³⁹⁾.

Tabuľka 2 znázorňuje detegované alternácie v mikrobióme jedincov pri rôznych typoch rakoviny. Hoci existuje veľa dôkazov o spojení bakteriálnej dysbiózy a karcinogenézy, stále zostáva otáznosť, či rakovina vzniká ako dôsledok zmien mikrobioty alebo zmeny v „normálnej“ mikrobióte sú spôsobené vznikom a progresiou karcinogenézy⁽¹⁴⁾.

Záver

Hoci väčšina mechanizmov stále chýba úplné objasnenie, terajšie poznatky jasne potvrdzujú účasť bakteriálnej infekcie na indukcii a progresii rakoviny. Ďalšie výskumy zaoberajúce sa týmto spojením by mohli viesť k jeho úplnému pochopeniu, čo by predstavovalo dôležitý pokrok vedúci k zefektívneniu riešenia jedného z najväčších zdravotných problémov dnešnej doby.

Podakovanie

Táto práca vznikla za podpory Operačného programu Integrovaná infraštruktúra na základe projektu ITMS: 313011V446 spolufinancovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Onuigbo WI, 1975. Some nineteenth century ideas on links between tuberculous and cancerous diseases of the lung. *Br. J. Dis. Chest* 69, 207–210.
2. Russell W, 1890. An Address on a Characteristic Organism of Cancer. *Br. Med. J.* 2, 1356–1360.
3. Nath G, Gulati AK, Shukla VK. 2010. Role of bacteria in carcinogenesis, with special reference to carcinoma of the gallbladder. *World J. Gastroenterol.* 16, 5395–5404.
4. Lax AJ, Thomas W. 2002. How bacteria could cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol.* 10, 293–299.
5. Kawai T, Akira S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21, 317–337.
6. Allen J, Hao S, Sears CL, Timp W. 2019. Epigenetic Changes Induced by Toxin. *Infect. Immun.* 87. <https://doi.org/10.1128/IAI.00447-18>
7. Alipour M. 2021. Molecular Mechanism of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *J. Gastrointest. Cancer* 52, 23–30.
8. Dongre A, Weinberg RA. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84.
9. Ansari S, Yamaoka Y. 2020. Virulence Factor Cytotoxin-Associated Gene A (CagA)- Mediated Gastric Pathogenicity. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21197430>
10. Zywiets A, Gohla A, Schmelz M, Schultz G, Offermanns S. 2001. Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. involvement of Gq but not G11. *J. Biol. Chem.* 276, 3840–3845.
11. Lax A. 2012. The *Pasteurella multocida* toxin: a new paradigm for the link between bacterial infection and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361, 131–144.
12. Blazkova H, Krejčíková K, Moudry P, et al. 2010. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 357–367.
13. Silbergleit M, Vasquez AA, Miller CJ, et al. 2020. Oral and intestinal bacterial exotoxins: Potential linked to carcinogenesis. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 171, 131–193.
14. Kovács T, Mikó E, Ujlaki G, et al. 2020. The Microbiome as a Component of the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1225, 137–153.
15. Belcheva A, Irrazabal T, Robertson SJ, et al. 2014. Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells. *Cell* 158, 288–299.
16. Singh V, Yeoh BS, Chassaing B, et al. 2018. Dysregulated Microbial Fermentation of Soluble Fiber Induces Cholestatic Liver Cancer. *Cell* 175, 679–694.e22.
17. Stadler J, Stern HS, Yeung KS, et al. 1988. Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 29, 1326–1331.
18. Qiao D, Gaitonde SV, Qi W, Martinez JD. 2001. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 22, 957–964.
19. Pai R, Tarnawski AS, Tran T. 2004. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* 15, 2156–2163.
20. Degirolamo C, Modica S, Palasciano G, Moschetta A. 2011. Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends Mol. Med.* 17, 564–572.
21. Kiss B, Mikó E, Sebő É, et al. 2020. Oncobiosis and Microbial Metabolite Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* 12.
22. Gandhi N, Das GM. 2019. Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. *Cells* 8.
23. Kim DH, Jin YH. 2001. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch. Pharm. Res.* 24, 564–567.
24. Reis SAD, da Conceição LL, Peluzio M. do C.G. 2019. Intestinal microbiota and colorectal cancer: changes in the intestinal microenvironment and their relation to the disease. *J. Med. Microbiol.* 68, 1391–1407.
25. Salaspuro M. 1997. Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Addict. Biol.* 2, 35–46.
26. Tsvetkova SA, Koshel EI. 2020. Microbiota and cancer: host cellular mechanisms activated by gut microbial metabolites. *Int. J. Med. Microbiol.* 310, 151425.
27. Simonov D, Swift, S, Blenkiron C, Phillips AR. 2016. Bacterial RNA as a signal to eukaryotic cells as part of the infection process. *Discoveries (Craiova)* 4, e70.
28. Blenkiron, C., Simonov, D., Muthukaruppan, A., Tsai, P., Dauros, P., Green, S., Hong, J., Print, C.G., Swift, S., Phillips, A.R., 2016. Uropathogenic *Escherichia coli* Releases Extracellular Vesicles That Are Associated with RNA. *PLoS One* 11, e0160440.
29. Hagmann CA, Herzner AM, Abdullah Z, et al. 2013. RIG-I detects triphosphorylated RNA of *Listeria monocytogenes* during infection in non-immune cells. *PLoS One* 8, e62872.
30. Cervantes JL, La Vake CJ, Weirnerman, B, et al. 2013. Human TLR8 is activated upon recognition of *Borrelia burgdorferi* RNA in the phagosome of human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 94, 1231–1241.
31. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
32. Shabalina SA, Spiridonov NA, Kashina A. 2013. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic Acids Res.* 41, 2073–2094.
33. Liu H, Wang X, Wang H-D, et al. 2012. *Escherichia coli* noncoding RNAs can affect gene expression and physiology of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 3, 1073.
34. Tanooka H, Inoue A, Takahashi R-U, et al. 2020. Bacterial SOS Genes Promote Mouse Tumors by Activating Oncogenes via a miR-145 Sponge. *Mol. Cancer Res.* 18, 1271–1277.
35. Wen Y, Chen H, Luo F, Zhou H, Li Z. 2020. Roles of long noncoding RNAs in bacterial infection. *Life Sci.* 263, 118579.
36. Weng M-T, Chiu Y-T, Wei P-Y, et al. 2019. Microbiota and gastrointestinal cancer. *J. Formos. Med. Assoc.* 118 Suppl 1, S32–S41.
37. Sears CL, Pardoll DM. 2011. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J. Infect. Dis.* 203, 306–311.
38. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 575–582.
39. Van Raay T, Allen-Vercos E. 2017. Microbial Interactions and Interventions in Colorectal Cancer. *Microbiol Spectr* 5.
40. Weng M-T, Chiu Y-T, Wei P-Y, et al. 2019. Microbiota and gastrointestinal cancer. *J. Formos. Med. Assoc.* 118 Suppl 1, S32–S41.
41. Yang L, Lu X, Nossa CW, Francois F, Peek RM, Pei Z. 2009. Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. *Gastroenterology* 137, 588–597.
42. Rezasoltani S, Asadzadeh Aghdahi H, Babiri, H, et al. 2018. The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microb. Pathog.* 124, 244–249.
43. Yu L-X, Schwabe RF. 2017. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 527–539.
44. Shirazi MSR, Al-Alo KZK, Al-Yasiri MH, Lateef ZM, Ghasemian A. 2020. Microbiome Dysbiosis and Predominant Bacterial Species as Human Cancer Biomarkers. *J. Gastrointest. Cancer* 51, 725–728.
45. Tsay J-CJ, Wu BG, Badri MH, et al. 2018. Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, 1188–1198.
46. Parida S, Sharma D. 2019. The power of small changes: Comprehensive analyses of microbial dysbiosis in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1871, 392–405.
47. Banerjee S, Tian T, Wei Z, et al. 2017. The ovarian cancer oncobiome. *Oncotarget* 8, 36225–36245.
48. Walther-Antônio MRS, Chen J, Multinu F, et al. 2016. Potential contribution of the uterine microbiome in the development of endometrial cancer. *Genome Med.* 8, 122.

Bc. Kamila Bernátová

Katedra molekulárnej biológie,
Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave
Mlynská dolina
Ilkovičova ulica 6, 842 15 Bratislava 4
e-mail: kamila.bernatova@gmail.com

Extracelulárne vezikuly a ich potenciálne využitie v klinickej praxi

Matúš Jurčík, Veronika Lukáčová
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Pojmom extracelulárne vezikuly označujeme heterogénnu skupinu membránových štruktúr, ktoré sa uvoľňujú z povrchu buniek do extracelulárneho priestoru. Do tejto skupiny patria napríklad exozómy, mikrovezikuly alebo apoptotické telieska. Navzájom sa medzi sebou líšia veľkosťou, obsahom aj spôsobom ich vzniku, môžu vznikať endozomálne alebo sa priamo uvoľňujú z plazmatickej membrány. Extracelulárne vezikuly sú súčasťou mnohých fyziologických a patofyziologických procesov. Sú produkované takmer všetkými druhmi buniek za prísne špecifických podmienok, pričom nesú podrobnú informáciu o obsahu bunky. Nachádzajú sa v rôznych telových tekutinách, ako je napríklad moč, krv, mozgovomiechový mok, materské mlieko, a tiež v slinách. Z uvedených dôvodov sú extracelulárne vezikuly veľmi vhodnými nástrojmi na identifikáciu známych, ale aj nových biomarkerov v klinických vzorkách.

Kľúčové slová: extracelulárne vezikuly, exozómy, mikrovezikuly, biomarkery

Extracellular vesicles and their potential use in clinical practice

The term extracellular vesicles refers to a heterogeneous group of membrane structures released from the cell surface into the extracellular space. This group includes, for example, exosomes, microvesicles, or apoptotic bodies. They differ in size, content, and how they are formed, they may arise endosomally or are released directly from the plasma membrane. Extracellular vesicles are part of many physiological and pathophysiological processes. They are produced by almost all cell types under strictly specific conditions, bearing detailed information about the cell contents. They can be found in various body fluids, such as urine, blood, cerebrospinal fluid, breast milk, and saliva. For these reasons, extracellular vesicles are very suitable tools for identifying known and new biomarkers in clinical samples.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, biomarkers

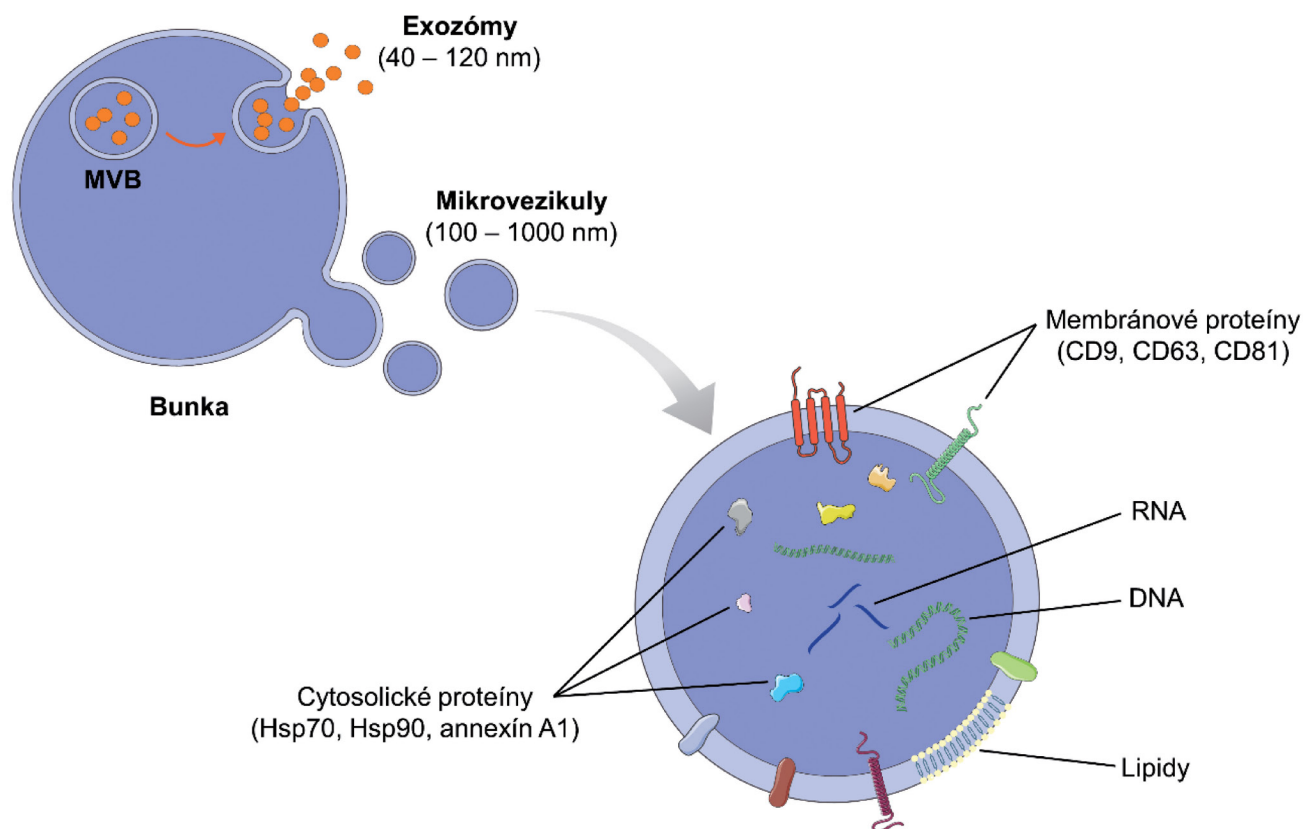
NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 88 – 91

Úvod

Extracelulárne vezikuly (EVs) sú lipidovou membránou obkolesené vezikuly nanometrových rozmerov. Tieto membránové štruktúry sú sekretované všetkými druhmi buniek a obsahujú lipidy, proteíny a rôzne druhy nukleových kyselín. EVs zahŕňajú mikrovezikuly (MV), exozómy, onkozómy, argozómy aj apoptotické telieska a sú klasifikované podľa veľkosti, obsahu, syntézy a funkcie⁽¹⁾. MV sa oddeľujú priamo z plazmatickej membrány, sú veľké 100 nm až 1 µm a obsahujú cytoplazmatický materiál⁽²⁾. Ďalší druh EV, exozómy, sú tvorené fúziou medzi multivezikulárnymi telieskami a plazmatickou membránou, pri ktorej multivezikulárne telieska uvoľňujú menšie vezikuly (exozómy), ich veľkosť je v rozmedzí 40 – 120 nm (**obrázok 1**). Umierajúce bunky uvoľňujú takzvané vezikulárne apoptotické telieska, s veľkosťou 50 nm – 2 µm, ktoré môžu byť za špecifických podmienok zastúpené viac ako exozómy alebo MV a môžu sa líšiť aj obsahom⁽³⁾. Membránové výčnelky môžu tiež viesť k vzniku veľkých EV, nazývaných onkozómy (1 – 10 µm), ktoré sú produkované predovšetkým malígnymi bunkami⁽⁴⁾. Posledným typom EV sú argozómy. Argozómy boli objavené v imaginálnom disku epitelia *Drosophila melanogaster*. Pochádzajú z bazolaterálnych membrán a sú produkované mnohými rôznymi oblasťami imaginálneho disku. Cestujú cez susedné tkanivo, kde sa nachádzajú prevažne v endozómoch. Úlohou argozó-

mov je transport a šírenie wingless proteínu⁽⁵⁾. Dlhý čas boli EV vnímané ako nástroje bunky pre odbúravanie odpadového materiálu. V poslednej dekáde však výskum ohľadom EV významne pokročil a v súčasnosti sa vie, že ich úloha je omnoho rozsiahlejšia. Podieľajú sa na mnohých procesoch a sú nástrojmi bunky pre kontrolu jej okolia⁽⁶⁾. EV slúžia ako dôležité mediátory intracelulárnej komunikácie, ktorá ovplyvňuje fyziologické a patologické stavy⁽⁷⁾. Pôvodne sa myslelo, že intracelulárna komunikácia prebieha výhradne cez priame bunkové kontakty, cytokíny, hormóny a rastové faktory. V roku 1996 však Raposo a kolektív preukázali, že intracelulárna komunikácia môže byť takisto sprostredkovaná vezikulárnou aktivitou⁽⁸⁾. Keďže EV sú schopné transportu veľkého množstva proteínov, lipidov a nukleových kyselín, sú zahrnuté v rôznych signálnych dráhach. EV ako mediátory intracelulárnej komunikácie dopravujú rôzne molekuly z jednej bunky do druhej väzbou na jej receptory a takto priamo ovplyvňujú kondíciu danej bunky. Preto majú schopnosť zvyšovať regeneráciu tkanív a podieľať sa na imunitnej modulácii. Vzhľadom na schopnosť EV prenášať bioaktívne zložky a prekonávať biologické bariéry, sú EV v súčasnosti čoraz viac skúmané pre ich potenciálnu schopnosť pôsobiť ako terapeutické činidlá. Takisto sú v súčasnosti používané ako alternatíva liečby kmeňovými bunkami a biologicky upravené EV môžu slúžiť ako nosiče rôznych terapeutických látok⁽⁷⁾.

Obrázok 1. Biogenéza a obsah EVs. Mikrovezikuly sa priamo uvoľňujú z plazmatickej membrány, zatiaľ čo exozómy sú do extracelulárneho priestoru uvoľňované jej fúziou s multivezikulárnym telieskom (MVB). Súčasťou obsahu EVs sú lipidy, rôzne druhy nukleových kyselín a proteíny, z ktorých mnohé môžu byť biomarkermi ochorení.



Stavba a zloženie extracelulárnych vezikúl

EV pozostávajú z lipidovej dvojvrstvy podobnej tej v cytoplazmatickej membráne. Napríklad exozómy sú obohatené o sfingomyelín, gangliosidy, disaturované lipidy a podiel fosfatidylcholínu a diacylglycerolu je znížený v porovnaní s množstvom týchto lipidov v bunkách ich pôvodu⁽⁹⁾. Exozómy sa vyznačujú aj zníženým množstvom cholesterolu v porovnaní s inými typmi bunkových membrán⁽¹⁰⁾. EV obsahujú enzýmy metabolizmu lipidov vrátane fosfolipáz D a A2, ktorých aktivita závisí od prítomnosti GTP⁽¹⁰⁾. Adipocyty za hypoxických podmienok vylučujú EV so zvýšenými hladinami enzýmov potrebných na *de novo* lipogézu vrátane syntázy mastných kyselín⁽¹¹⁾. Normálne adipocyty ošetrované týmito EV majú tendenciu akumulovať väčšie množstvo lipidov, čo môže byť v dôsledku prítomnosti syntázy mastných kyselín prenášanej v týchto EV. EV bazofilných buniek RBL-2H3 tiež transportujú bioaktívne lipidy, ako napr. kyselinu arachidónovú a prostaglandín E2⁽¹⁰⁾. Porovnaním pôvodnej rakovinej bunkovej línie s EV vzniknutými z tejto línie, EV sú obohatené o ceramidy, kyselinu fosfatidovú, iné lipidy a lipidové metabolické enzýmy, ktoré majú schopnosť ovplyvňovať stav recipientných buniek⁽¹⁰⁾. Okrem lipidov sú v EV prítomné aj molekuly RNA. Táto transportovaná RNA má menej ako 200 nukleotidov, je teda kratšia ako RNA priemernej bunkovej frakcie⁽¹³⁾. V rámci EV boli nájdené molekuly tRNA, miRNA aj dlhé kódujúce a nekódujúce RNA^(4,13). Množstvo RNA v rámci

EV sa líši v závislosti od bunkového typu a pôvodu. Niektoré EV rakovinových buniek obsahujú viac celkovej RNA ako EV normálnych buniek. EV môžu takisto transportovať molekuly DNA, ktorá môže mať veľkosť od 100 básových párov (bp) až po 2 500 bp. V rámci EV je DNA obkolesená membránou, tá však DNA nechráni pred DNázovou aktivitou. Sekvenovaním celkovej exozomálnej DNA sa ukázalo, že exozómy obsahujú všetky sekvencie genomikkej DNA. Celková sekvenovaná EV-DNA v rámci exozómov experimentálnych myšiek buniek melanómu B16-F10, ako aj v rámci séra pacientov s rakovinou pankreasu potvrdila, že exozómy zahŕňajú DNA materiál naprieč celým genómom⁽¹⁴⁾. Proteínové zloženie EV je v niektorých prípadoch súvisiace s typom bunky a spôsobom ich biogenézy. Exozómy pochádzajúce z endolizozomálneho systému môžu byť obohatené o hlavný histokompatibilný systém triedy II (trieda MHC II) a tetraspaníny CD37, CD53, CD63, CD81 a CD82⁽²⁾. Zatiaľ čo celkový proteínový profil MV je veľmi závislý od ich pôvodu a metódy izolácie, MV obsahujú aj skupiny proteínov typické pre tieto štruktúry. Sú to proteíny nachádzajúce sa v rámci MV nezávisle od pôvodu MV a prítomnosť týchto proteínov odzrkadľuje spôsob ich biogenézy⁽¹⁵⁾. Pretože MV vznikajú vonkajším pučaním bunkovej plazmatickej membrány, nie je prekvapujúce, že ich obsah tvoria hlavne cytosolické a s cytoplazmatickou membránou spojené proteíny, obzvlášť proteíny zhromažďujúce sa na povrchu cytoplazmatickej membrány, napríklad tetraspaníny⁽¹⁶⁾.

Na rozdiel od exozómov a MV apoptotické telieska obsahujú neporušené organely, chromatin a malé množstvá glykozylovaných proteínov⁽¹⁾. Môžeme teda očakávať vyššie množstvo proteínov spojených s jadrom, mitochondriami, Golgiho aparátom a endoplazmatickým retikulom. Proteomický profil apoptotických teliesok a bunkového lyzátu je do veľkej miery zhodný, zatiaľ čo medzi proteomickým profilom ďalších typov EV a profilom bunkového lyzátu existujú výrazné rozdiely⁽¹⁷⁾.

Extracelulárne vezikuly ako zdroj biomarkerov

Využitie extracelulárnych vezikúl ako zdroja biomarkerov, najmä exozómov a mikrovezikúl, je v aktuálnej literatúre veľmi dobre etablované. Ich aplikácia a použitie v rámci klinických účelov je veľmi podobná⁽¹⁷⁾. Použitie exozómov ako zdrojov biomarkerov je ideálne, pretože sa nachádzajú v telových tekutinách, ako je krv a moč, čo umožňuje minimálne až neinvazívne metódy, ako kvapalná biopsia, na diagnostiku a monitorovanie odpovede pacienta na liečbu. Schopnosť exozómov odzrkadľovať reakciu pacienta na liečbu je ďalším potenciálnym využitím týchto EV v klinickom prostredí⁽¹⁸⁾. Ak markery určitého ochorenia priamo korelujú s jeho štádiom a ak liečba u pacienta funguje, možno u neho pozorovať zmeny hladín biomarkerov⁽¹⁷⁾. Bolo zistené, že exozómy nachádzajúce sa v mozgovomiechovom moku a v plazme obsahujú alfa-synukleín, proteín spájaný s Parkinsonovou chorobou. Nedávna štúdia tiež opísala exozómy a MV sekretované bunkami glioblastómu, ktoré odzrkadľujú molekulárne zloženia a vlastnosti buniek ich pôvodu a sú schopné opustiť prostredie nádoru, dostať sa do mozgovomiechového moku a z neho do krvného obehu⁽¹⁹⁾. Takisto exozómy izolované z moču preukázali schopnosť odzrkadľovať akútne poškodenie obličiek⁽²⁰⁾. V rámci exozómov boli úspešne nájdené aj biomarkery rakoviny pankreasu a rakoviny pľúc⁽²¹⁾. Proteomic-

ká analýza EVs rakoviny vaječníkov zistila prítomnosť proteínov podliehajúcich acetylácii a fosforylácii. Medzi najviac zastúpené proteíny patrila fosfatidylinozitol-3-kináza (PI3K), mitogénom aktivovaná proteínkináza (MAPK) a členovia ErbB rodiny proteínov⁽²²⁾. Toto zistenie by mohlo čiastočne vysvetliť silný biologický účinok EV na bunky príjemcu, pretože kinázy často slúžia ako kľúčové molekuly bunkovej signalizácie⁽²³⁾. Takisto treba spomenúť, že proteíny na povrchu EV indikujú biologický status buniek, z ktorých pochádzajú. Napríklad expresia proteínov EpCam, CD24, CA-125, CA19-9, EGFR, a CLDN3 je spoločná pre bunky rakoviny vaječníkov a nimi produkovanými extracelulárnymi vezikulami⁽²⁴⁾, čo značí, že dané proteíny môžu slúžiť ako biologické markery pre tento typ rakoviny.

Záver

Z aktuálnej vedeckej literatúry je zrejmé, že obsah extracelulárnych vezikúl priamo odráža stav buniek, z ktorých sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru. Vďaka ich výskytu v mnohých telových tekutinách možno neinvazívnym spôsobom identifikovať biomarkery, ktoré obsahujú a sú špecifické pre určité ochorenie. Extracelulárne vezikuly preto môžu zohrávať dôležitú úlohu v diagnostike, terapii a v neposlednom rade pri sledovaní priebehu ochorenia, resp. progresie liečby s potenciálom poskytnúť pacientovi kvalitnejšiu zdravotnú starostlivosť.

Podakovanie

Tento prehľadový článok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. fáza, ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(10): 824–30.
- Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood.* 1999; 94(11): 3791–9.
- El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(5): 347–57.
- Morello M, Minciacchi VR, De Candia P, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle.* 2013; 12(22): 3526–36.
- Greco V, Hannus M, Eaton S. Argosomes: A potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell.* 2001; 106(5): 633–45.
- Nagarajah S. Exosome Secretion – More Than Simple Waste Disposal? Implications for Physiology, Diagnostics and Therapeutics. *J Circ Biomark.* 2016; 1: 5–7.
- Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötvall J, et al. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med.* 2019; 11(492).
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J EXP MED.* 1996; 183(3): 1161–72.
- Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, et al. Mast cell- and dendritic cell-derived display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J.* 2004; 380(1): 161–71.
- Llorente A, Skotland T, Sylväna T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2013; 1831(7): 1302–9.
- Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res.* 2010; 51(8): 2105–20.
- Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, et al. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(2): 327–33.
- Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics.* 2013; 14(1).
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014; 24(6): 766–9.
- Østergaard O, Nielsen CT, Iversen LV, et al. Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *J Proteome Res.* 2012; 11(4): 2154–63.
- Zöller M. Tetraspanins: Push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(1): 40–55.
- Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells.* 2019; 8(7): 727.
- Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, et al. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297(4): F1006–16.
- Giusti I, Di Francesco M, Dolo V. Extracellular vesicles in glioblastoma: Role in biological processes and in therapeutic applications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017; 17(3): 221–35.

20. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.* 2006; 70(10) :1847–57.
21. Sandfeld-Paulsen B, Aggerholm-Pedersen N, Bæk R, et al. Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol.* 2016; 10(10) :1595.
22. Sinha A, Ignatchenko V, Ignatchenko A, et al. In-depth proteomic analyses of ovarian cancer cell line exosomes reveals differential enrichment of functional categories compared to the NCI 60 proteome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(4) :694–701.
23. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience.* 2015; 65(8) :783–97.
24. Im H, Shao H, Park YI, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(5) :490–5.

Mgr. Matúš Jurčík, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.
Novozámocká 1/67, 949 05 Nitra
e-mail: jurcikmatus@gmail.com

Fibroepitelový stromálny polyp vulvy: opis prípadu

Vladimír Bartoš

Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin

Fibroepitelový stromálny polyp (FESP) sa zaraďuje k „orgánovo špecifickým“ mezenchýmovým léziám dolného genitálneho traktu u žien. Do tejto kategórie patrí ešte niekoľko nádorov s podobnou histomorfológiou a imunofenotypom. Najčastejšie vzniká v pošve, zriedkavejšie vo vulve a v krčku maternice. V článku je opísaný prípad 15-ročného dievčaťa s nebolestivým kožným polypom vyrastajúcim na labium majus. Pri bioptickom vyšetrení dominovala vo vaskularizovanej stróme pomerne riedka, rovnomerne distribuovaná populácia blandných vretenovitých buniek vzhľadu fibroblastov. Imunohistochemicky boli pozitívne na vimentín, CD163, estrogénové aj progesterónové receptory a negatívne na dezmin, CD34 a S100. Histopatologický obraz lézie zodpovedal FESP vulvy. Z klinickej stránky je vulvovaginálny FESP nenádorová afekcia bez väčšieho prognostického významu. Jeho bioptická diagnostika však nemusí byť vždy jednoduchá, pretože morfológicky môže pripomínať iné, síce takisto benígne, ale prognosticky nepriaznivejšie mezenchýmové nádory.

Kľúčové slová: fibroepitelový stromálny polyp, celulárny angiofibróm, vulva

Fibroepithelial stromal polyp of the vulva: a case report

Fibroepithelial stromal polyp (FESP) belongs to „organ-specific“ mesenchymal lesions of the distal genital tract. This category also includes some tumours sharing similar histomorphology and immunophenotype. FESP most often occurs in the vagina, followed by the vulva and the cervix. This article describes a case of a 15-year-old girl who has been presented with a painless skin polyp arising in the labium majus. Histology revealed a vascularized fibrous stroma containing a population of scattered bland fibroblast-like cells. They were immunoreactive for vimentin, CD163, estrogen and progesterone receptors and negative for desmin, CD34 and S100. A diagnosis of FESP of the vulva was established. From a clinical point of view, vulvovaginal FESP represents a non-neoplastic pathology without prognostic significance. However, biopsy diagnosis may not always be straightforward because it can morphologically mimic others, also benign but prognostically less favourable mesenchymal tumours.

Keywords: fibroepithelial stromal polyp, cellular angiofibroma, vulva

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 92 – 95

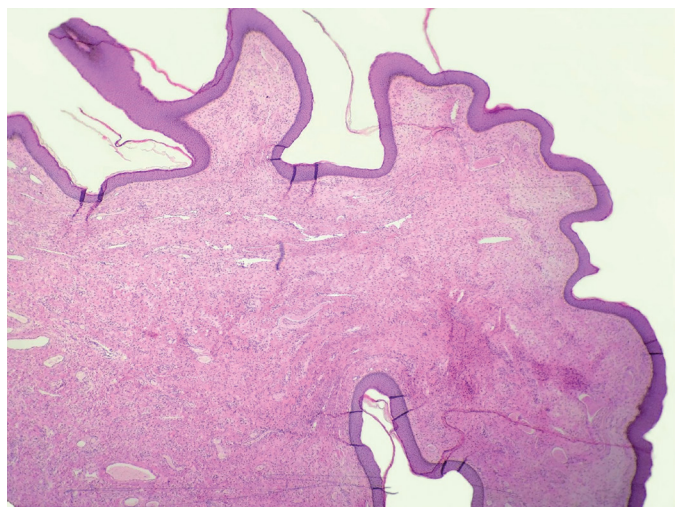
Úvod

Mezenchýmové nádory vulvy a pošvy sú pomerne zriedkavé chorobné jednotky. Vo všeobecnosti ich rozdeľujeme na dve kategórie^(1,2). Prvú predstavujú „orgánovo špecifické“ lézie, teda tie, ktoré vznikajú prevažne v tejto anatomickej lokalite, a iba výnimočne aj extragenitálne^(1,2). Druhú kategóriu zahŕňajú „bežné“ tumory mäkkých tkanív (napr. lipóm, neuróm, neurofibróm), ktoré sa vyskytujú v rôznych častiach tela, ale vonkajšie genitálie a pošvu postihujú iba sporadicky⁽¹⁾. Predmetom záujmu prezentovaného článku je prvá kategória benígnych mezenchýmových nádorov, ktoré vznikajú zo spoločných prekursorových, hormonálne dependentných stromálnych buniek. Do tejto skupiny patrí fibroepitelový stromálny polyp (FESP, nejde o pravý nádor), celulárny angiofibróm, hlboký (agresívny) angiomyxóm, angiofibroblastóm a superficiálny myofibroblastóm⁽¹⁻³⁾. Uvedené jednotky majú viaceré spoločné klinické a morfológické znaky, v dôsledku čoho je ich bioptická diagnostika niekedy obťažná. V predkladanom príspevku autor stručne opisuje prípad FESP vulvy u mladej pacientky, ktorý diagnostikoval počas svojej bioptickej praxe.

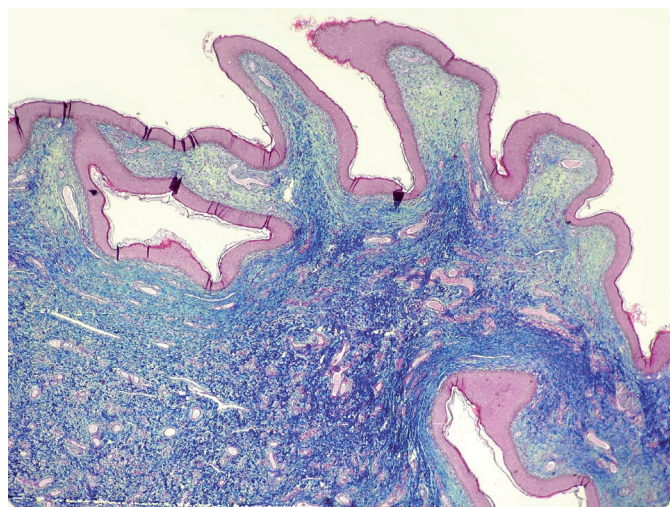
Opis prípadu

15-ročné dievča sa dostavilo na gynekologické vyšetrenie s polypovitým tumoróznym výrastkom na labium majus l. dx. Útvár mal vzhľad pendulujúceho kožného polypu rozmerov 3,5 x 2 x 1 cm so zvráskaveným povrchom hnedej farby. Palpačne bol nebolestivý, presiaknutej elastickej konzistencie. Odstránený bol ambulantne totálnou chirurgickou excíziou. Histologicky išlo o polypovito až kondylomatózne formovanú fibroepitelovú léziu tvorenú zmnoženou väzivovou strómou lemovanou dlaždicovobunkovým epitelom bez dysplázie (**obrázok 1 a 2**). V edematózne presiaknutej stróme (farbenie na hlien bolo negatívne) sa vyskytovala pomerne riedka, rovnomerne distribuovaná populácia proliferovaných blandných vretenovitých buniek vzhľadu fibroblastov bez atypií (**obrázok 3**). Imunohistochemicky boli pozitívne na vimentín, CD163 (**obrázok 4**), estrogénové receptory (**obrázok 5**) a progesterónové receptory a negatívne na dezmin, CD34 a S100. Ich proliferatívna aktivita bola minimálna (Ki-67/MIB1 index < 1 %). Stróma zároveň obsahovala zmnožené tenkostenné krvné cievy, pričom vaskularita aj celularita boli výraznejšie v centre útvaru. Histomorfologický obraz lézie zodpovedal FESP vulvy. Po stanovení diagnózy autor nemal o pacientke ďalšie klinické informácie.

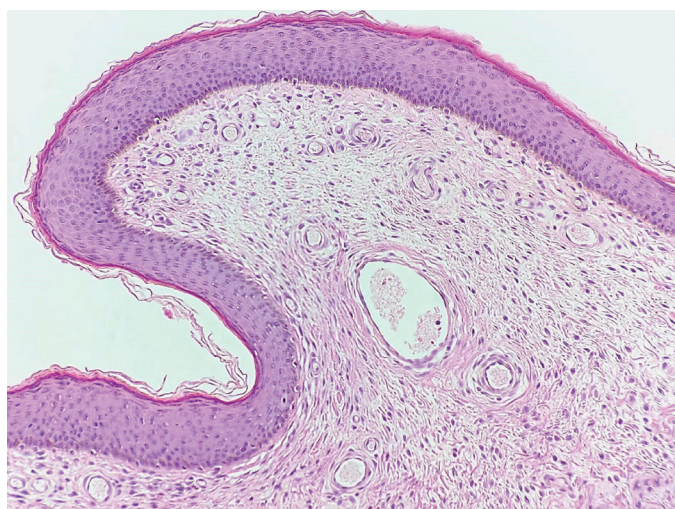
Obrázok 1. Prehľadové zväčšenie lézie s typickou polypovito-kondylomatóznou konfiguráciou (farbenie hematoxylínom & eozínom, zväčšenie 10x).



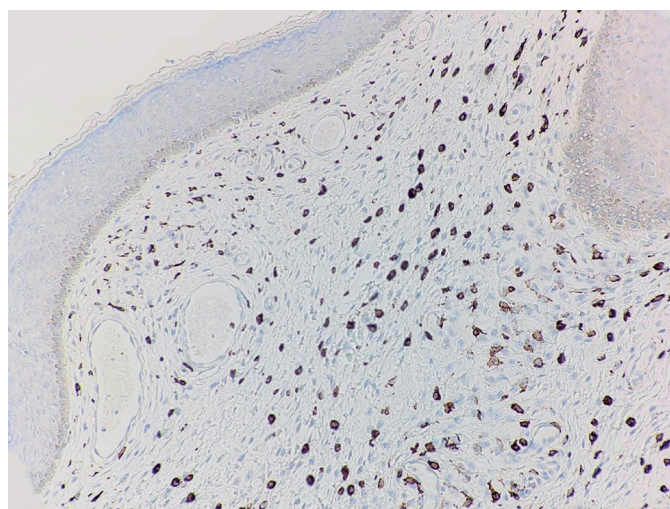
Obrázok 2. Prehľadové zväčšenie lézie po ofarbení Massonovým trichrómom. V centre lézie je znateľná výraznejšia vaskularizácia (zväčšenie 10x).



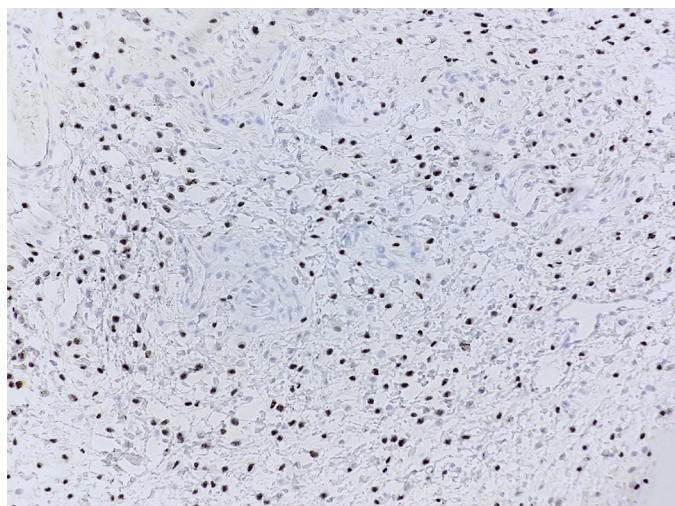
Obrázok 3. Detailnejšie zväčšenie periférnej časti lézie. Ede-matózne presiaknutá stróma obsahuje disperzne distribuované uniformné bunky vzhľadu fibroblastov a tenkostenné krvné cievy (farbenie hematoxylínom a eozínom, zväčšenie 20x).



Obrázok 4. Cytoplazmatická pozitivita stromálnych buniek na CD163 (zväčšenie 20x).



Obrázok 5. Jadrová pozitivita stromálnych buniek na estrogénové receptory (zväčšenie 20x).



Diskusia

FESP dolného genitálneho traktu sa vyskytuje prevažne u žien v reprodukčnom veku s vyššou incidenciou v tehotenstve, ale aj u žien v postmenopauze, ktoré užívajú hormonálnu suplementačnú liečbu⁽²⁻⁴⁾. Najčastejšie vzniká v pošve, zriedkavejšie vo vulve a v krčku maternice⁽²⁻⁴⁾. Klinicky sa prejavuje ako rôzne veľký pendulujúci polypovitý útvar⁽²⁻⁴⁾. Zvyčajne je asymptomatický, môže sa však manifestovať krvácaním a lokálnym diskomfortom⁽²⁻⁴⁾. Hoci má FESP pomerne charakteristické histomorfologické atribúty, celkový obraz lézie sa často líši od prípadu k prípadu⁽²⁻⁴⁾. To môže v biopтической praxi zapríčiniť diagnostické ťažkosti a najmä pri výraznejších bunkových atypiách viesť aj k nesprávnej diagnóze malignity. Pri prehľadovom zväčšení má FESP typický polypovitý vzhľad s centrálnym fibrovaskulárnym jadrom⁽²⁻⁴⁾. Najdôležitejší komponent je variabilne celulárna stróma. Hypocelulárny variant FESP pozostáva z blandných vretenovitých buniek s nejasnou cytoplazmou, ktoré sú situované v ried-

Tabuľka 1. Prehľad a základné klinickopatologické znaky „orgánovo špecifických“ benígnych mezenchýmových lézií ženského genitálneho traktu. Pozn.: Superficiálny angiomyxóm do tejto kategórie nepatrí, ale pre potenciálnu podobnosť s ostatnými léziami by mal byť zahrnutý v diferenciálnej diagnostike (sumarizované z ref. 1-7).

Fibroepitelový stromálny polyp

- polypovito rastúci solitárny tumorózny útvar (< 5 cm)
- hypocelulárna aj hypercelulárna stróma obsahujúca roztrúsené vretenovité bunky
- často sa vyskytujú atypické stelátne aj multinukleárne stromálne bunky
- zmnožené cievy v stróme akcentované najmä v centrálnej časti polypu
- stromálne bunky dezmín+, ER+, PR+

Agresívny angiomyxóm (ICD-O kód 8841/0)

- slabo ohraničená, infiltratívne rastúca nádorová masa väčších rozmerov (> 10 cm)
- stróma hypocelulárna, difúzne myxoidne presiaknutá
- zmnožené rôzne veľké cievy uniformne distribuované v rozsahu celej lézie
- vretenovité bunky s tenkými zväzkami kolagénového väziva
- stromálne bunky dezmín+, ER+, PR+, HMGA2+

Angiomyofibroblastóm (ICD-O kód 8826/0)

- dobre ohraničená intradermálna tumorózna masa (< 5 cm)
- bifázická, hypocelulárna aj hypercelulárna populácia stromálnych buniek
- zmnožené cievy malého až stredne veľkého kalibru
- vretenovité aj epiteloïdné bunky distribuované v klastroch, často okolo ciev
- stromálne bunky dezmín+, ER+, PR+, Bcl2+, CD99+, CD34+

Celulárny angiofibróme (ICD-O kód 9160/0)

- dobre ohraničená solídna intradermálna tumorózna masa (< 5 cm)
- stredne výrazná celularita, krátke zväzky blandných vretenovitých buniek
- v derme zvyčajne prítomná „grenz“ zóna
- zmnožené cievy stredného kalibru s hrubou hyalinizovanou stenou
- stromálne bunky ER+, PR+, dezmín +/-, αSMA+/-, CD34+/-, strata 13q14 (FOX1A1)

Superficiálny myofibroblastóm (ICD-O kód 8825/0)

- polypoidná alebo solídna intradermálna tumorózna masa
- proliferované oválne a vretenovité stromálne bunky v jemne kolagenizovanej stróme
- v derme zvyčajne viditeľná „grenz“ zóna
- tenkostenné dilatované krvné cievy koncentrované v centre lézie
- stromálne bunky dezmín+, CD99+, variabilne CD34+ a ER+, αSMA-

Superficiálny angiomyxóm (ICD-O kód 8841/0)

- multilobulárna exofyticky rastúca intradermálna tumorózna masa (< 5 cm)
- hypocelulárna difúzne myxoidne presiaknutá stróma s prímiesou neutrofilov
- stróma často obsahuje keratinové cystičky a rezíduá skvamózneho epitelu
- zmnožené tenkostenné cievy, roztrúsené vretenovité bunky v stróme
- stromálne bunky slabo CD34+, ER-, PR-

kom kolagénovom matrice⁽²⁻⁴⁾. Naopak, hypercelulárny variant FESP má floridný vzhľad s nukleárnou pleomorfou, častými mitózami vrátane atypických mitotických figúr, čím nadobúda až pseudosarkomatoidné črty⁽²⁻⁴⁾. K takýmto morfológickým zmenám dochádza najmä počas gravidity, na čo treba myslieť v diferenciálnej diagnostike. Pomôckou na rozpoznanie FESP je prítomnosť hviezdovitých a multinukleárných stromálnych buniek a absencia rozhrania medzi leziónnou strómou a povrchovou epitelovo-stromálnou vrstvou („grenz“ zóna)⁽²⁻⁴⁾. Stromálne bunky sú imunoreaktívne na vimentín, dezmín, estrogénové a progesterónové receptory a niekedy aj na hladkosvalový aktín⁽²⁻⁴⁾.

Ako už bolo spomenuté, FESP patrí k „orgánovo špecifickým“ mezenchýmovým léziám ženských genitálií, ku ktorým zaradujeme ešte niekoľko nádorových jednotiek s podobným histomorfologickým obrazom aj imunofenotypom. Ich detailnejší opis by presahoval rámec tohto príspevku, ale prehľad a základné diferenciálnodiagnostické znaky týchto lézií sú uvedené v **tabuľke 1**⁽¹⁻⁷⁾. V rámci nich je FESP jedinou jednotkou, ktorá vo WHO klasifikácii nádorov ženského reprodukčného systému⁽³⁾ nie je definovaná ako pravý nádor. Skôr sa považuje za reaktívnu léziu vznikajúcu proliferáciou myofibroblastov špecializovanej subepitelovej strómy distálneho

ženského genitálneho traktu. Histogenetická príbuznosť celej skupiny „orgánovo špecifických“ mezenchýmových lézií ženských genitálií je však nespochybniteľná. V tomto smere zaujímavú kazuistiku simultánneho výskytu FESP a superficiálneho myofibroblastómu v pošve u staršej ženy publikovali Zámečník a Sučanský⁽⁸⁾. Obidve lézie mali veľmi podobný histologický obraz a rovnaký imunoprofil, na základe čoho predpokladajú, že majú spoločnú histogézu a môžu byť súčasťou spektra jednej myofibroblastovej nozologickej jednotky dolného genitálneho traktu.

V našom prípade spočiatku vzbudzovala pochybnosti o FESP neprítomnosť hviezdovitých a multinukleárných buniek v stróme a najmä negativita lézie na dezmín. Prvotne sa preto uvažovalo aj o celulárnom angiofibróme. Polypovitá konfigurácia lézie, absencia „grenz“ zóny a neprítomnosť krvných ciev s hrubšou hyalinizovanou stenou však favorizovali diagnózu FESP. Zmätocná bola aj imunohistochemická negativita stromálnych buniek na dezmín, ktorá sa pri vulvovaginálnom FESP považuje za konštantne pozitívny nález. Po revízii dostupných literárnych zdrojov však možno konštatovať, že imunoreaktivita na dezmín nemusí byť prítomná vždy. Olson et al.⁽⁹⁾ v súbore 25 FESP identifikovali 2 prípady (8 %) negatívne na dezmín a kolektív me-

xických autorov⁽¹⁰⁾ potvrdil v súbore 7 FESP jeden takýto prípad (14 %). V tomto kontexte však treba pripomenúť, že pri diagnostike FESP a už zmieňovaných príbuzných „orgánovo špecifických“ mezenchýmových lézií dolného genitálneho traktu má imunohistochemické vyšetrenie limitovanú hodnotu a smerodajný je vždy celkový histomorfologický obraz lézie.

Záver

Vulvovaginálny FESP je zriedkavá benígna mezenchýmová lézia, ktorá sama osebe nemá väčší prognostický význam. Histomorfologicky však môže pripomínať iné, síce takisto benígne, ale prognosticky nepriaznivejšie mezenchýmové nádory sprevádzané agresívnejším rastom a vyšším rizikom lokálnej recidívy. V prezentovanej práci sa autor snažil oboznámiť čitateľov s touto patologickou jednotkou, s ktorou sa možno občas stretnúť v gynekologickej praxi.

LITERATÚRA

1. Nucci MR, Oliva E. Gynecologic Pathology. A volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology. 1th Edition, Churchill Livingstone Elsevier; 2009. ISBN 978-0-443-06920-8
2. Nucci MR, Fletcher CDM. Vulvovaginal soft tissue tumours: update and review. *Histopathology* 2000; 36(2):97-108.
3. Kurman R, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH (Eds): WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed., Vol. 6, IARC:Lyon; 2014. ISBN 978-92-832-2435-8
4. Pharaon M, Warrick J, Lynch MC. Fibroepithelial stromal polyp of the vulva: case report and review of potential histologic mimickers. *Int J Gynecol Pathol* 2018; 37(4):e1-e5.
5. Zámečník M. Celulárny angiofibróm vulvy. *NewsLab* 2018; 9(1):46-49.
6. Babala P, Bíró C, Klačko M, Miloš P, Ondruš D. Angiomyofibroblastoma of the cervix uteri: a case report. *Klin Onkol* 2011; 24(2):133-136.
7. Veselý K. Myxoidní nádory měkkých tkání. *Cesk Patol* 2017; 53(2):71-80.
8. Zamečník M, Sucansky R. Synchronous superficial myofibroblastoma and stromal polyp of the vagina: report of a case supporting common histogenesis of both lesions. *J Interdiscipl Histopathol* 2015; 3(2):63-67.
9. Olson NJ, Fritchie KJ, Torres-Mora J, Folpe AL. MyoD1 expression in fibroepithelial stromal polyps. *Hum Pathol* 2020; 99:75-79.
10. De la Torre Rendón FE, Peralta Serna JY, Ruiz Moreno JL. Tumores estromales del tracto genital inferior: angiomiofibroblastoma y pólipo fibroepitelial estromal. *Patologia Rev Latinoam* 2012; 50(4):285-292.

MUDr., PhDr. Vladimír Bartoš, PhD., MPH

Martinské biopické centrum, s. r. o.

Prieložtek 1, Martin, 036 01

e-mail: vladim.bartos@gmail.com

www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk

