



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie
Slovak Society of Clinical Biochemistry
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2021
Ročník XXVI.



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2021

Ročník XXVI.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Hedviga Pivovarníková

ODBORNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

REDAKČNÁ RADA

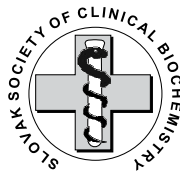
Ján Balla
Pavel Blažíček
Beáta Bolerázská
Dušan Dobrota
Eva Ďurovcová
Michal Farkaš
Vladimír Heriban
Beáta Hubková
Mária Kačániová
Katarína Lepejová
Daniel Magula
Angela Molčányiová
Jana Netriová
Katarína Šebeková
Ladislav Turecký

Laboratórna Diagnostika
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS
Evidenčné číslo periodickej tlače: EV 5929/20
ISSN 1335-2644
Vychádza: 2-krát ročne
nepredajné

OBSAH

ÚVODNÍK: AKTIVITY SSKB POČAS PANDÉMIE KORONAVÍRUSU NA PRELOME ROKOV 2020–2021.....	5
IN MEMORIAM	
PRIMÁR MUDr. FRANTIŠEK DVOŘÁK	8
ŠVEC OVÁ M., ABRAHAMOVSKÁ, M., VEČURKOVSKÁ, I., MAREKOVÁ, M.: COVID-19 A SARS-CoV-2: PŮVOD, ŠTRUKTÚRA A MUTÁCIE KORONAVÍRUSOV	10
ABRAHAMOVSKÁ, M., ŠVEC OVÁ M., VEČURKOVSKÁ, I., RABAJDOVÁ, M.: COVID-19 – VYUŽITIE METÓD qRT-PCR PRI DETEKCII SARS-CoV-2.....	19
VEČURKOVSKÁ, I., ŠVEC OVÁ M., ABRAHAMOVSKÁ, M., STUPÁK M.: COVID-19 – DIAGNOSTICKÉ VYUŽITIE ANTIGÉNOVÝCH TESTOV	28
MAGULA, D., VAVERKOVÁ, G., VINKLEROVÁ, S.: VÝVOJ PREVALENCIE REAKTÍVNYCH PROTILÁTOK TYPU IgM/IgG VOČI NUKLEOKAPSIDOVÉMU ANTIGÉNU VÍRUSU SARS-CoV-2 V SÉRACH PACIENTOV ŠPECIALIZOVANEJ NEMOCNICE SV. SVORADA ZOBOR S VYBRANÝMI SKUPINAMI DIAGNÓZ V OBDOBÍ MÁJ 2020–FEBRUÁR 2021	35
ĎURFINOVÁ, M., DOBIŠOVÁ, A., KOUTUN, J., YAGHI, A., TURECKÝ, L., KURAČKA, L.: VZŤAH VYBRANÝCH PARAMETROV OXIDAČNÉHO STRESU K MORTALITE PACIENTOV S RÔZNYM STUPŇOM SYSTÉMOVEJ ZÁPALOVEJ REAKCIE ORGANIZMU	43
KOŇARIKOVÁ, K., JANUBOVÁ, M., MUCHOVÁ, J., ĎURAČKOVÁ, Z., ŽITŇANOVÁ, I.: VITAMÍN D V ÚLOHE REPARÁCIE DNA SENESCENTNÝCH BUNIEK POŠKODENÝCH PEROXIDOM VODÍKA	48
LAUBERTO VÁ L., ŽITŇANOVÁ I., BALIŠ P., BERNÁTOVÁ I., DVOŘÁKOVÁ M.: VPLYV AKÚTNEHO STRESU A NANOČASTÍC USPIONS NA AKTIVITU KATALÁZY NORMOTENZNÝCH A SPONTÁNNE HYPERTENZNÝCH POTKANOV	53
OHLASOVÁ, J., OHLASOVÁ, D., KMEŤ, V., TIMKOVÁ, S., TOMEČKOVÁ, V.: IDENTIFIKÁCIA RÔZNYCH DRUHOV <i>LACTOBACILLUS SPECIES</i> POMOCO U MALDI-TOF ANALÝZY V ROZVINUTOM ZUBNOM KAZE	58
ŽITŇANOVÁ, I., HLUCHÁŇOVÁ, A., JANUBOVÁ, M., KOŇARIKOVÁ, K., KLOBUČNÍKOVÁ, K., ŠIARNIK, P., KOLLÁR, B.: HLADINY LIPOPEROXIDOV V SLINÁCH A V PLAZME PRI SYNDRÓME OBŠTRUKČNÉHO SPÁNKOVÉHO APNOE.....	63
KUČERA, M.: VYBRANÉ HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE POČAS HYPOLIPIDEMICKEJ LIEČBY.....	68
RÁCZ, O., PELLA, D., BILÁ, E.: SÚLAD A NESÚLAD MEDZI ZÁKLADNÝMI UKAZOVATELMI LIPIDOVÉHO METABOLIZMU STANOVENÝMI RUTINNÝMI LABORATÓRNÝMI METÓDAMI A METÓDOU PROTÓNOVEJ NUKLEÁRNEJ MAGNETICKEJ REZONANČNEJ SPEKTROSKOPIE V NÁHODNE VYBRANEJ POPULAČNEJ VZORKE	79
ORAVEC, S., POTOČÁROVÁ, M., KOVÁČOVÁ E., KUPČOVÁ V., BULAS J.: VPLYV HYPOLIPEMICKEJ LIEČBY NA LIPOPROTEINOVÝ PROFIL PACIENTOV S ARTERIÁLNOU HYPERTENZIOU	86
DVOŘÁKOVÁ, M., SCSUKOVÁ, S., ROLLEROVÁ, E., ŽITŇANOVÁ, I., LAUBERTO VÁ, L.: NANOČASTICE OXIDU TITANIČITÉHO MODULUJÚ LIPIDY U MLADÝCH POTKANOV	93

BLAŽÍČEK, P., LANGOŠ, J.: FEOCHROMOCYTÓM, FEOCHROMOBLASTÓM	
PARAGANGLIÓM, NEUROBLASTÓM.....	97
KLEPCOVÁ, Z., PETEROVÁ, L., TOPORCEROVÁ, S., RABAJDOVÁ, M.: DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL	
NEKÓDUJÚCICH RNA V KULTIVAČNOM MÉDIU EMBRYÍ	115
KALINOVÁ, K., REMEŠOVÁ D., ŠPAKOVÁ I., TOPORCEROVÁ, S., RABAJDOVÁ, M.: DETEKCIA EXPRESIE	
miRNA V IVF PROCESE – MOŽNOSŤ VYUŽITIA V DIAGNOSTIKE NEPLODNOSTI	123



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 5–7

ÚVODNÍK

AKTIVITY SSKB POČAS PANDÉMIE KORONAVÍRUSU NA PRELOME ROKOV 2020–2021

***Vážené a milé kolegyně a kolegovia,
vážení členovia Slovenskej spoločnosti klinickej bioché-
mie !***

***V úvode nového čísla časopisu Laboratórna medicína
1/2021 mi dovoľte zaželať v mene výboru SSKB všetkým
pevné zdravie, trpezlivosť, ešte dostatok síl a entuziazmu
do ďalšej zmysluplnej odbornej činnosti a mnoho výziev
na neustále sa zlepšovanie v komunikácii nielen odbor-
nej, ale aj tej ľudskej.***

***„Smutným aspektom súčasného života je, že veda ob-
javuje nové poznatky rýchlejšie, ako spoločnosť získava
rozum“ citát Isaac Asimov.***

Uplynulý rok bol aj rokom mnohých príležitostí pre klinické laboratória a zároveň odhalil ich kritické a zraniteľné oblasti. Laboratória a odborníci v laboratóriách uplatnili svoj zásadný význam pre zdravotnú starostlivosť, pre skutočné prežitie miliónov ľudí. Odborníci v laboratóriách vždy vedeli, aké dôležité sú kvalitné výsledky, aké kritické sú pre správnu liečbu a správneho pacienta a snád' si teraz uvedomí ešte viac nielen odborný, ale aj laický svet, aké dôležité sú rýchlo dostupné a kvalitné laboratórne výsledky a účasť v programe skúšok spôsobilosti a externého hodnotenia kvality pre nové metódy na testovanie nového koronavírusu. A za všetkými týmito snahami sú erudovaní pracovníci s mnohoročnou praxou a kontinuálnym celoživotným vzdelávaním. Dôraz je kladený na kvalitu a dostupnosť laboratórných testov a táto pandémia koronavírusu si vyžaduje zdroje, a to nielen finančné, ale hlavne personálne a odborné. Myslíme radšej dopredu a na to, čo od nás potrebujú kolegovia a pacienti.

V roku 2020 vydala SSKB dve čísla odborného časopisu „Laboratórna Diagnostika“. V minulosti sa to nepodarilo a od roku 2017 sa vytlačilo iba po jednom čísle a následne bola registrácia na MK SR (Ministerstvo kultúry Slovenskej republiky) č. 153/96 zrušená a tento údaj sa už nemal uvádzať na časopise.

Podľa zákona č. 167/2008 Z. z. je vydavateľ periodickej tlače povinný zabezpečiť, aby každé vydanie periodickej tlače okrem iného obsahovalo názov, periodicitu vydávania, údaje o vydavateľovi, dátum vydania, poradové číslo (v kalendárnom roku 1/2020, 2/2020, 1/2021, 2/2021...), ročník vydávania, cenu výtlačku, ISSN, ak bolo pridelené a evidenčné číslo periodickej tlače.

Pri vydaní iba jedného čísla nebude pridelené žiadne registračné číslo z MK SR, pri vydaní dvoch a viac čísiel je potrebné požiadať o novú registráciu. ISSN prideliuje Univerzitná knižnica v Bratislave, Národná agentúra ISSN. Vydavateľ musí o pridelenie ISSN požiadať – neprideliuje sa automaticky, čo sme aj v spolupráci so SLS urobili.

Evidenčné číslo pre periodickú tlač s názvom „Laboratórna Diagnostika“ je aktuálne EV 5929/20.

Podľa zákona č. 212/1997 Z. z. je vydavateľ periodickej publikácie povinný bezplatne a na svoje trovy odovzdať do troch dní od začatia rozširovania periodickej tlače povinné výtlačky určené Ministerstvu kultúry SR – sekcia médií, audiovízie a autorského práva.

Dovoľujem si preto aj touto cestou opätovne osloviť všetkých členov SSKB na publikovanie v uvedenom odbornom časopise. Redakcia časopisu víta celý rad možných foriem publikácií: *kazuistiky popisujúce zaujímavú skúsenosť z praxe; porovnanie analyzátorov alebo metód; pôvodné práce, prehľadové články, prípadne správy z kongresov,*

konferencií atď. a v tejto náročnej dobe aj možnosti úvah v nepravideľnej rubrike.

V minulom roku sme sa viac vzdelávali a stretávali hlavne vo virtuálnom svete. Boli sme vystavení tlaku mnohým novým poznatkom a informáciám hlavne v oblasti nových možností testovania koronavírusu, ale aj iným oblastiam diagnostiky a bude to pokračovať aj v tomto roku. Do pozornosti dávame niektoré zaujímavé webináre, ktoré sa už uskutočnili a niektoré sú plánované na rok 2021.

IFCC (Medzinárodná federácia klinickej chémie a laboratórnej medicíny) zaradila skríning novorodencov (NBS) do svojich strategických plánov a priniesla tento webový seminár v priamom prenose.

Webinár „Zníženie detskej úmrtnosti prostredníctvom včasnej diagnostiky“ – sa uskutočnil 4.11.2020.

Traja svetovo uznávaní rečníci na ňom prezentovali informácie o stave skríningu novorodencov na celom svete, medzi nimi: *Prof. Piero Rinaldo* (USA), *Prof. Jim Bonham* (UK) a *Prof. Pranesh Chakraborty* (Kanada). Pozvali sme všetkých laboratórnych diagnostikov, lekárov, laborantov, zástupcov spoločností a mladých vedcov/praktikantov, aby sa pripojili k tejto významnej udalosti, ktorá bola naživo vysielaná po celom svete. Webinár sa uzavrel panelovou diskusiou. Záznam z webinára bude k dispozícii pre tých, ktorí sa nemohli zúčastniť priameho prenosu. Je vždy potrebné sa zaregistrovať, aby ste mali prístup k priamemu prenosu alebo k nahrávke.

Skríning novorodencov (NBS), včasná detekcia, liečba a manažment novorodencov s vrodenými poruchami znižuje morbiditu a úmrtnosť dojčiat. Bohužiaľ, iba asi jedna tretina dojčiat na celom svete absolvuje skríning hneď po narodení, čo vedie k významne zvýšenému riziku ochorenia počas detstva a/alebo dospelosti.

17. decembra 2020 sa pre záujemcov konal bezplatný **webinár** na tému „**ÚLOHA ANTIGÉNOVÝCH TESTOV V PANDÉMII COVID-19.**“

V decembri 2020 sme od prezidenta IFCC – Prof. Khosrow Adeli dostali list s nasledujúcim obsahom:

- IFCC považuje dištančné vzdelávanie/eLearning formou živých webinárov s prednáškami odborníkov po celom svete za dôležitý nástroj, ako vrátiť vzdelávanie národným spoločnostiam a ich členom na celom svete. V novom strategickom pláne sa IFCC bude usilovať o to, aby bol globálnym najväčším poskytovateľom bezplatných e-lear-

ningových programov v oblasti laboratórnej medicíny. V rámci tejto novej stratégie IFCC nedávno pilotovala sériu **LIVE WEBINAR** prostredníctvom **platformy WorkCast**, aby získala skúsenosti s týmito typmi virtuálnych globálnych udalostí. *Prof. Khosrow Adeli*, prezident IFCC s radosťou oznamuje, že štyri webové semináre prezentované v septembri, októbri a novembri mali 2500 až 3500 účastníkov, každý z nich až zo 123 krajín sveta, ktorí naživo počúvali prezentácie webinárov. Skutočne medzinárodný charakter! Všetkým registrovaným účastníkom bolo tiež vydané osvedčenie o účasti.

Webináry IFCC sa v roku 2021 rozšíria na všetky funkčné IFCC jednotky vrátane výborov, pracovných skupín a osobitných projektov. Prezident IFCC všetkých osobne pozýva na účasť uvedením jedného z nich a vyzýva všetky regionálne federácie a národné spoločnosti, aby prihlásili návrhy webinárov. Hľadajú sa návrhy webinárov, ktoré by zahŕňali troch prednášajúcich k určitej téme, ktorá by zaujímala komunitu IFCC. Kancelária IFCC zostaví harmonogram webinárov a prideli konkrétny dátum medzi januárom a decembrom 2021.

Čo sa týka logistiky, nie sú potrebné žiadne odborné znalosti organizácie, všetky technické podrobnosti bude riešiť nová pracovná skupina IFCC pre globálny e-learning/eAcademy a noví IFCC koordinátori e-learningu. IFCC použije rovnaký formát, aký bol úspešný v jeseni 2020. Každý webinár bude trvať 90 minút, bude zahŕňať prezentácie troch rečníkov (každý po 20 minút), panelovú diskusiu (20 minút) a záverečné správy. Môžu sa vybrať traja rečníci spomedzi členov odbornej spoločnosti alebo renomovaných kolegov a jedného predsedu/moderátora. **Podrobnejšie informácie nájdete na: <https://www.sskb.sk/portal/virtualna-konferencia-ifcc-2021/>.**

VIRTUÁLNA KONFERENCIA IFCC 2021

V dňoch **15.–17. februára 2021** sa uskutočnila prvá virtuálna konferencia IFCC s názvom **KRITICKÁ ÚLOHA KLINICKÝCH LABORATÓRIÍ V PANDÉMII COVID-19.**

Kľúčové témy:

- Antigénové a molekulárne testovanie: doplnok alebo náhrada?
- Sérologické testovanie a imunita: Čo bude ďalej?
- Predanalytické a analytické problémy: Na čo si dať pozor?

- Úloha biochemického a hematologického testovania pri monitorovaní novej liečby.
- Pediatrický manažment vírusovej infekcie alebo expozícia vírusu SARS-Cov2 a multisystémový zápalový syndróm u detí.
- Laboratórny manažment a bezpečnosť laboratória.
- Analytické a klinické validačné metódy.
- Vzťah medzi prevalenciou a výkonnosťou testu.
- Terapeutické monitorovanie liekov (napr. antikoagulanciá, antitrombotické látky atď.) a interferencie liekov.
- POCT alebo domáce testovanie.
- Modely na predikciu pozitivity a závažnosti.

24. IFCC-EFLM Európsky kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny spolu s Národným kongresom Nemeckej spoločnosti klinickej chémie a laboratórnej medicíny sa bude konať 28. novembra – 2. decembra 2021 v Mníchove.

Možnosti ďalšieho vzdelávania poskytuje EFLM Academy

EFLM propaguje, podporuje a zlepšuje vedu a vzdelávanie v oblasti klinickej biochémie a laboratórnej medicíny. EFLM Academy je balík profesionálnych výhod pre špecialistov v klinickej biochémii a laboratórnej medicíne, ktorý počas pandémie Covid-19 pomáha zvládnuť vákuum vo výluke prezenčných odborných podujatí. Tento typ dištančného vzdelávania zavádza bezprostredný kontakt s prednášateľom a lektorom.

Akú sú ciele EFLM Academy ?

- Poskytnúť laboratórnym pracovníkom webovú doménu obsahujúcu informačnú a komunikačnú platformu.
- Podporovať vzdelávanie, odbornú prípravu a nepretržitý profesionálny rozvoj laboratórných profesionálov.
- Zvýšiť viditeľnosť EFLM.
- Podrobné vysvetlenie na registráciu za ročný poplatok 15 € nájdete na webovej stránke SSKB.

24. Medzinárodný kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny IFCC WorldLab sa bude konať 26.–30. júna 2022 v Soule, Kórea.

Výbor SSKB sa v roku 2020 obrátil na všetkých členov odbornej spoločnosti s výzvou na spoluprácu pri realizácii projektu v rámci medzinárodnej iniciatívy Choosing wisely alebo Vyberaj rozumne.

Cieľom je upozorniť na nevhodné postupy pri indikácii laboratórných vyšetrení, s ktorými sa stretávame vo svojej praxi. Táto iniciatíva bude pokračovať aj v roku 2021.

Pri návrhoch môžu odborníci vychádzať z osobných skúseností, odporúčenie by malo byť vždy podložené v duchu evidence-based medicine.

Vzhľadom na nepriaznivý aktuálny vývoj pandemickej situácie sa výbor SSKB po dôslednom zvážení rozhodol posunúť termín konania XIV. Kongresu Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie na rok 2022. Predpokladaný termín – jeseň 2022 s nezmeneným miestom konania -Hotel Permon, Podbanské. Termín realizácie podujatia bude upresnený v priebehu roku 2021 podľa aktuálnej epidemiologickej situácie.

Všetky aktuálne informácie vždy nájdete na webovej stránke www.sskb.sk.

A na záver by som sa chcela poďakovať všetkým členom výboru za neúnavnú spoluprácu, vynaložené úsilie, trpezlivosť a čas v tejto zložitej a náročnej dobe pandémie koronavírusu.

S radosťou chcem oznámiť a zároveň poďakovať ďalším partnerom, ktorí sa rozhodli nás podporiť v edukačných aktivitách aj v tejto zložitej situácii rôznymi dostupnými formami v spolupráci so SLS.

Poďakovanie patrí všetkým...

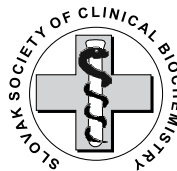
Prajem zdravie, silu a nádej.

A napokon aj záver ukončím citátom:

„Všetky naše sťažnosti na to, čoho sme zbavení, pramenia z nedostatku vďačnosti za to, čo máme“.

Daniel Defoe

*Hedviga Pivovarníková
prezidentka SSKB*



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 8–9

IN MEMORIAM

PRIMÁR MUDr. FRANTIŠEK DVOŘÁK



Dňa 1. apríla 2021 nás vo veku nedožitých 88 rokov v Nitre navždy opustil **MUDr. František Dvořák**, lekár – klinický biochemik a pneumoftizeológ, dlhoročný primár Oddelenia klinickej biochémie vo vtedajšom Odbornom liečebnom ústavu tuberkulózy

a respiračných chorôb v Nitre na Zobore, v ktorom pôsobil počas 9 rokov aj ako jeho riaditeľ.

Narodil sa 16. mája 1933 v Prahe, ale od roku 1940 žil v Bratislave, kde absolvoval aj Lekársku fakultu Univerzity Komenského.

V roku 1959 po promócií nastúpil ako lekár na lôžkové oddelenie tuberkulózy v Krajskej liečebni tuberkulózy v Nitre, terajšej Špecializovanej nemocnice sv. Svorada Zobor, n.o., ktorá sa stala jeho celoživotným pracoviskom až do odchodu do dôchodku.

Po roku 1962 po atestácii v odbore tuberkulóza bol poverený budovaním centrálného biochemického a hematologického laboratória, z ktorého po jeho atestácii z klinickej biochémie v roku 1967 na základe rozhodnutia Povereníctva SNR pre zdravotníctvo vzniklo terajšie Oddelenie klinickej biochémie. V rokoch 1967 až 1999 tu pôsobil vo funkcii primára. V rokoch 1985–1994 vykonával funkciu riaditeľa zariadenia, v ktorej plne uplatnil svoje teoretické, praktické, dobré organizačné a riadiace schopnosti a skúsenosti. Prepájal rozvoj ústavu v jeho klinickej časti v odbore pneumológia a ftizeológia s rozvojom diagnostických zložiek, z ktorých klinická biochémia mala dôležité postavenie. Oddelenie klinickej biochémie vybudoval dob-

re nielen po stránke personálnej, ale vybavil ho aj v tom čase špičkovou prístrojovou technikou, pomocou ktorej bolo možné vykonávať mnohé špeciálne metodiky pre potreby pacientov s chorobami dýchacích ciest, ale aj pre výskumné účely.

Veľkú pozornosť venoval organizovaniu vedecko-vzdelávacích schôdzí nielen v oblasti západného Slovenska v oboch medicínskych odboroch, ale aj v teoretických odboroch fyziológie a patológie dýchania v celoštátnom česko-slovenskom meradle. Významná je jeho činnosť v oblasti výskumných úloh s medzinárodným dosahom, v rokoch 1969–1978 bol koordinátorom veľkej, II. a III. chemoterapeutickej štúdie kontrolovanej intermitentnej liečby tuberkulózy pod egidou Svetovej zdravotníckej organizácie a vedením profesora W. Foxa z londýnskeho Medical Research Council—Tuberculosis and Chest Diseases Research Unit. V rámci tejto štúdie na Oddelení klinickej biochémie zaviedol v slovenských podmienkach jedinečné metódy na stanovenie inaktivácie izoniazidu a protilátok voči rifampicínu. Ďalšou veľkou úlohou bol výskum v oblasti epidemiológie nosičstva hepatitídy B u tuberkulózných pacientov. Bol aj spoluriešiteľom výskumných úloh sledovania nežiaducich účinkov antituberkulózneho liečby, kortikoterapie pri bronchiálnej astme, s využitím príslušných biochemických metodík, ktoré sa v tom čase vykonávali vo vlastnom biochemickom laboratóriu.

Z oblasti pneumológie, klinickej biochémie, fyziológie a patológie dýchania, formou posterov, publikácií a inštruktážnych filmov publikoval ako prvý autor takmer 40 prác, ďalších 60 ako spoluautor.

Okrem práce v materskom zariadení pracoval po roku

2000 viac ako 10 rokov ako odborný zástupca v biochemickom laboratóriu Centrum zdravia na poliklinike v Nitre-Chrenovej. Niekoľko rokov vyučoval na Strednej zdravotníckej škole v Nitre.

V rokoch 1969–1990 bol kontinuálne členom výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie, v rokoch 1977–1986 aj členom Federálneho výboru oboch spoločností klinickej biochémie, v rokoch 1990–1994 členom výboru Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a po roku 1995 dve funkčné obdobia členom výboru Slovenskej spoločnosti fyziológie a patológie dýchania.

Za jeho odbornú prácu a aktívnu činnosť v lekárskejších spoločnostiach bol viackrát ocenený, spomeňme Zlatú medailu „Propter merita“ a Medailu založenia Spoločnosti Lékařsko-Slowanskej Slovenskej lekárskej spoločnosti, Zlatú medailu prof. MUDr. Karola Virsika, DrSc., Medailu Českej lekárskej spoločnosti J. E. Purkyňe, ako i udelenia čestných členstiev Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie, Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a Slovenskej spoločnosti fyziológie a patológie dýchania SLS.

Za celoživotný prínos k rozvoju nitrianskeho zdravotníctva, osobitne pri budovaní a rozvoji Špecializovanej nemocnice sv. Svorada Zobor, n. o., za dlhoročnú propagáciu mesta Nitry prostredníctvom organizovania vedecko-odborných lekárskejších podujatí celonárodného dosahu venovaných problematike chorôb dýchacích ciest mu bola v roku 2013 udelená Cena primátora mesta Nitry.

Odišiel navždy vynikajúci lekár, skvelý človek, dobrý a starostlivý manžel, otec a starý otec. Bolo mi ctou pracovať pod jeho vedením a neskôr po jeho boku od roku 1985, kedy ma ako mladého lekára z pozície riaditeľa prijímal do zamestnania. Zachovajme si v našich spomienkach veľkosť jeho osobnosti a diela, ktorým prispel k rozvoju odboru klinickej biochémie a slovenského zdravotníctva.

Češť jeho pamiatke !

MUDr. Daniel Magula, CSc.

v mene všetkých terajších i bývalých spolupracovníkov z Oddelenia klinickej biochémie Špecializovanej nemocnice sv. Svorada Zobor, n. o., v mene vedenia nemocnice, priateľov a blízkych



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 10–18

COVID-19 A SARS-CoV-2: PÔVOD, ŠTRUKTÚRA A MUTÁCIE KORONAVÍRUSOV

Švecová M., Abrahamovská, M., Večurkovská, I., Mareková, M.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

maria.marekova@upjs.sk

SÚHRN

Ochorenie COVID-19 je spôsobené vysoko infekčným a patogénnym koronavírusom SARS-CoV-2, ktorý sa objavil koncom roku 2019 a je zodpovedný za vypuknutie globálnej pandémie ťažkého akútneho respiračného syndrómu. Článok poskytuje prehľadnou formou informácie o základných príznakoch ochorenia COVID-19, vzniku a štruktúre SARS-CoV-2 vrátane jeho genomických charakteristík. Prezentuje súčasné poznatky o významných mutáciách daného koronavírusu a súčasných možnostiach vakcinačnej ochrany, vrátane súhrnného prehľadu vakcín dostupných na Slovensku.

Kľúčové slová: COVID-19; štruktúra; mutácie; vakcíny

ABSTRACT

COVID-19 is a disease caused by the highly infectious and pathogenic coronavirus SARS-CoV-2, which was first detected in late 2019 and is responsible for the outbreak of a global pandemic of severe acute respiratory syndrome. In this review, we briefly summarized the COVID-19 symptoms, the origin and structure of SARS-CoV-2, including its genomic characteristics. We further

discussed significant mutations of the coronavirus and current possibilities of vaccination, including a summary of vaccines available in Slovakia.

Key words: COVID-19; structure; mutations; vaccines

ÚVOD

Ochorenie COVID-19 (CoronaVirus Disease) je nové infekčné ochorenie, vyvolané koronavírusom 2 spôsobujúcim ťažký akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2). Prvýkrát bol tento vírus identifikovaný u pacientov s atypickou pneumóniou v decembri roku 2019 v čínskom meste Wu-chan, provincii Chu-pej. COVID-19 postihuje najmä dýchací systém, v ťažkých prípadoch vyvoláva závažný zápal pľúc a môže viesť k respiračnému zlyhaniu až k úmrtiu pacienta. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO, World Health Organization) vyhlásila pandémiu 11. marca 2020, pričom ide o prvú pandémiu spôsobenú koronavírusom. Pôvodne bol tento vírus pomenovaný 2019-nCoV (2019 novel Coronavirus), ale neskôr ho Medzinárodný výbor pre taxonómiu vírusov 11. februára 2020 oficiálne pomenoval SARS-CoV-2 kvôli jeho genetickej podobnosti so SARS-CoV (Mittal a kol., 2020).

Príznaky ochorenia

Všeobecné príznaky pozorované u infikovaných jedincov sú horúčka, únava, kašeľ, bolesť hrdla, strata čuchu a/alebo chuti, nevoľnosť až vracanie a hnačky. Ďalší priebeh ochorenia môže viesť k ťažkému zápalu pľúc, syndrómu akútnej respiračnej tiesne, sepse, multiorgánovému zlyhaniu až smrti (H u a n g a kol., 2020; H e y m a n n a kol., 2020).

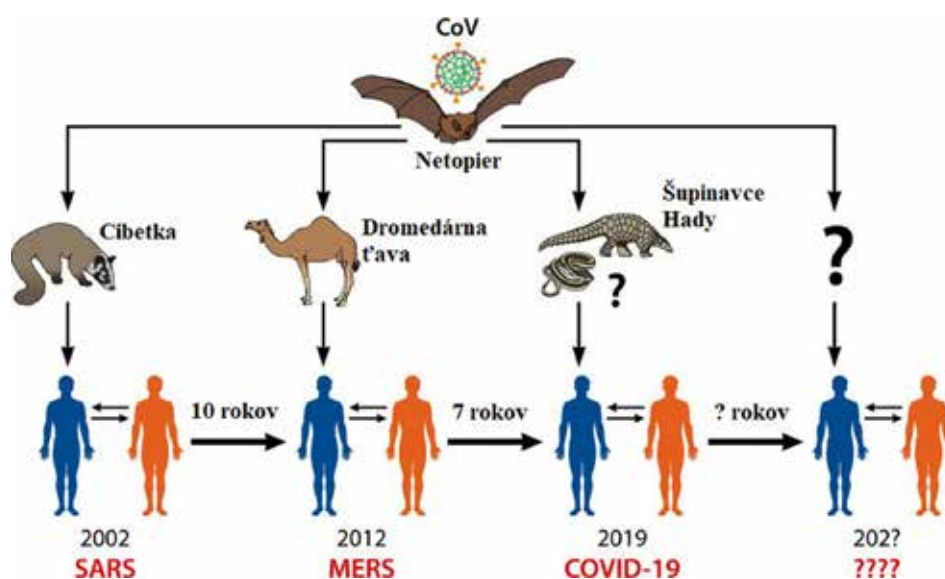
K bežným vírusovým ochoreniam patrí napríklad chrípka, ktorá nemusí mať iba ľahký priebeh. Medzi osoby, ktoré sú najviac ohrozené ťažkou chrípkovou infekciou patria: deti, tehotné ženy, starší ľudia, pacienti s chronickým ochorením a imunokompromitovaní. Pokiaľ ide o ochorenie COVID-19 spôsobené novým koronavírusom, sú rizikovými faktormi najmä vyšší vek, obezita, chronické ochorenia (diabetes, hypertenzia, chronické pľúcne a kardiovaskulárne ochorenia), fajčenie a stavy so zníženou imunitou (onkologickí a imunokompromitovaní pacienti). Letalita na COVID-19 sa javí niekoľkokrát vyššia v porovnaní so sezónnou chrípkou (P i r o t h a kol., 2021). Skutočnú/reálnu úmrtnosť na COVID-19 zatiaľ nepoznáme, nakoľko je to veľmi dynamický údaj a prudko sa zvyšuje s vekom pacientov. Publikované údaje naznačujú, že pomer hrubej úmrtnosti (počet hlásených úmrtí vydelený hlásenými prípadmi) je v rozmedzí 3–4 % (W u a kol., 2020; O n d e r a kol., 2020). V prípade sezónnej chrípky je úmrtnosť zvyčajne výrazne pod 0,1 %. Úmrtnosť je však do značnej miery determinovaná prístupom k zdravotnej starostlivosti a jej kvalitou.

Vznik SARS-CoV a SARS-CoV-2

Ľudské koronavírusy (CoV) vyvolávajú prevažne ochorenia horných dýchacích ciest vrátane bežného nachladnutia. Väčšina ľudí môže byť infikovaná jedným alebo viacerými z týchto vírusov v určitom období svojho života (K i l l e r b y a kol., 2018). SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus) a MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome-related CoronaVirus, koronavírus spôsobujúci akútny respiračný syndróm na Blízkom východe) sú hlavnými príčinami závažného zápalu pľúc u človeka (S o n g a kol., 2019).

V novembri 2002 sa SARS začal šíriť z provincie Guangdong v južnej Číne. V minulosti pochádzali zoonotické vírusy z netopierov, čo motivovalo výskumníkov k zisťovaniu, či sú netopiere prirodzeným rezervoárom SARS-CoV. V roku 2005 dve výskumné skupiny nezávisle od seba uviedli, že netopiere sú prirodzeným hostiteľom rozmanitých koronavírusov a úzko súvisia s tými, ktoré sú zodpovedné za vypuknutie SARS (L i a kol., 2005; L a u a kol., 2005). Tieto vírusy boli pomenované koronavírusy podobné SARS a vykazovali značné genetické podobnosti so SARS-CoV izolovanými z ľudí alebo cibetiek. V Saudskej Arábii sa MERS-CoV objavil v roku 2012, keď boli ľudia infikovaní priamym alebo nepriamym kontaktom s infikovanými ťavami. Analýza genómu však naznačuje, že MERS-CoV mohol pochádzať aj z netopierov a v dávnej minulosti sa prenášal na ťavy (Obr. 1).

V decembri 2019 boli v čínskom Wu-chane hlásení pacienti s ťažkými prípadmi zápalu pľúc neznámej príčiny,



Obr. 1. Pôvod koronavírusov
(upravené podľa Dhama a kol., 2020)

pričom im bol z dolných dýchacích ciest izolovaný nový kmeň koronavírusu. Je zaujímavé, že sekvencia nového koronavírusu je na 96 % identická s nukleotidovou sekvenciou vírusu izolovaného z netopierov. Vykazuje 79,5 % identitu so SARS-CoV a 55 % identitu s vírusom MERS-CoV, čo znamená, že SARS-CoV-2 patrí do rovnakej rodiny vírusov, ktoré spôsobili SARS a MERS (Mittal a kol., 2020).

Napriek blízkej genetickej príbuznosti netopierieho koronavírusu so SARS-CoV-2, sekvencia RBD (Receptor Binding Domain, doména viažuca receptor) v S-proteíne oboch vírusov je odlišná, takže netopier koronavírus nemôže byť priamym pôvodcom SARS-CoV-2, lebo by sa neviazal na ľudské bunky (L a m a kol., 2020). Pri ďalšom hľadaní medzihostiteľa padla voľba na luskona (šupinavec) ilegálne importovaného z Malajzie do Číny, kde sa konzumuje jeho mäso a jeho tkanivá a šupiny sa využívajú v tradičnej čínskej medicíne. Luskony sú citlivé na koronavírusovú infekciu, ktorá u nich spôsobuje príznaky podobné zápalu pľúc. Získaním genómu koronavírusu z luskonov

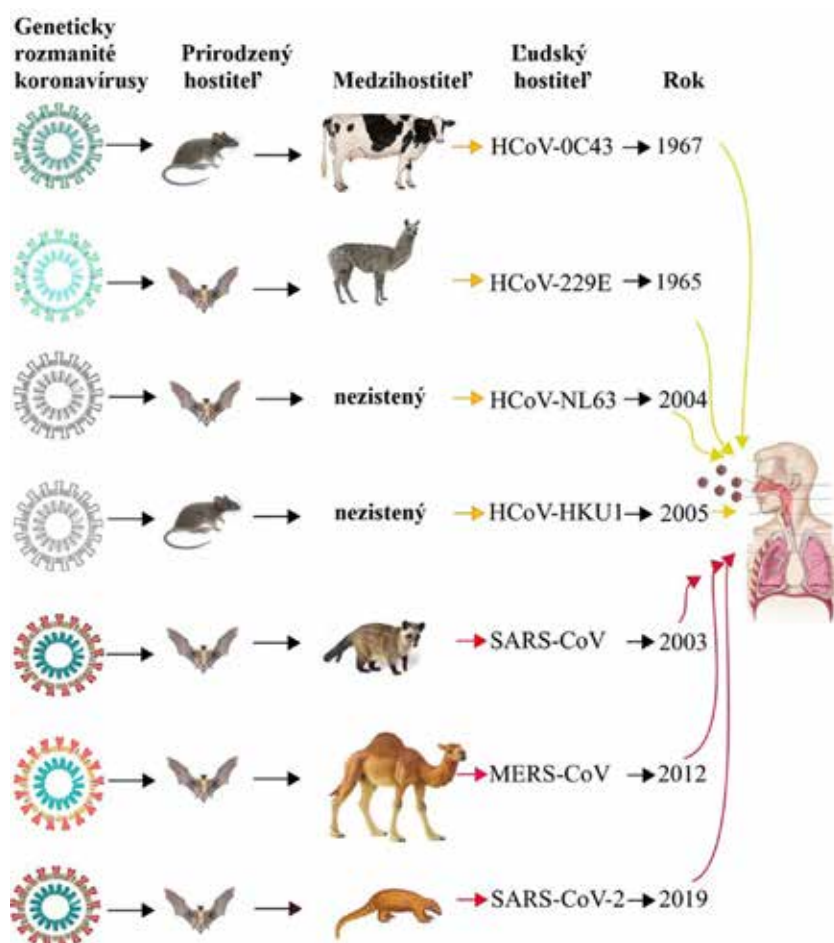
sa prekvapujúco zistilo, že hoci celkový genóm je odlišný od SARS-CoV-2, RBD sekvencia je podobná až na 97 %, pričom 5–6 kľúčových aminokyselín je úplne zhodných s RBD pre SARS-CoV-2 (L a m a kol., 2020).

Koronavírus je najvýznamnejším príkladom vírusu, ktorý prekročil druhovú bariéru od divých zvierat k ľuďom, ako sú SARS a MERS. Skutočnou otázkou však je, ako plánujeme čeliť ďalšej zoonotickej epidémii CoV, ktorá sa pravdepodobne vyskytne v priebehu nasledujúcich 5 až 10 rokov alebo dokonca skôr (Obr. 1) (D h a m a a kol., 2020).

Klasifikácia koronavírusov

Študijná skupina pre koronavírusy Medzinárodného výboru pre taxonómiu vírusov zaradila koronavírusy pod čeľaď Coronaviridae, podčeleď Coronavirinae. Na základe genotypovej a sérologickej charakterizácie sa Coronavirinae delia na 4 rody: alfakoronavírus, betakoronavírus, gammakoronavírus a deltakoronavírus.

Do decembra 2019 bolo známych iba 6 druhov HCoV,



Obr. 2. Pôvod a prenos patogénnych koronavírusov
žlté šípky označujú mierne a červené označujú závažné infekcie u ľudí (upravené podľa Mittal, A. a kol., 2020)

ktoré spôsobujú ochorenia u ľudí. Štyri z nich spôsobujú príznaky nachladnutia u osôb so zníženou imunitou: sú to HCoV-229E a HCoV-OC43, ktoré boli prvýkrát identifikované v polovici 60. rokov; HCoV-NL63, prvýkrát identifikovaný v roku 2004; a HCoV-HKU1, prvýkrát identifikovaný v roku 2005. Ďalšie 2 kmene, ktoré spôsobujú smrteľné ochorenie, sú SARS-CoV, prvýkrát identifikovaný v roku 2003, a MERS-CoV, prvýkrát identifikovaný v roku 2012 (Obr. 2).

Štruktúra koronavírusu

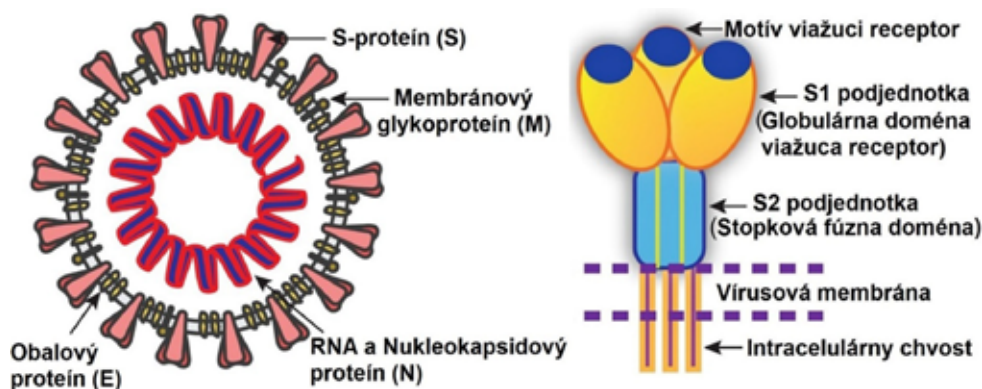
Koronavírusy sú veľké obalené pozitívne RNA vírusy, ktoré sú zodpovedné za infikovanie najrôznejších druhov cicavcov a vtákov. Tieto vírusy obsahujú na svojom povrchu špicaté výbežky glykoproteínov (S-proteín, alebo „spike“ proteín), ktoré sa pod elektrónovým mikroskopom javia ako korunka, a práve preto sa označujú ako koronavírusy (Obr. 3). Genóm koronavírusu kóduje niekoľko štruktúrnych a neštruktúrnych proteínov. Medzi štruktúrne proteíny patria: membránový proteín (M), obalový proteín (E), spike proteín (S) a nukleokapsidový proteín (N). Najdôležitejšie z nich sú práve N a S, pričom prvý pomáha vírusu primerane vyvinúť kapsid a celú vírusovú štruktúru a druhý pomáha pri jeho naviazaní na hostiteľské bunky (S i u a kol., 2008; W a l l s a kol., 2020). Štruktúrne proteíny sú zodpovedné predovšetkým za rozpoznanie receptorov hostiteľa, membránovú fúziu, morfogenézu a uvoľňovanie vírusových častíc. Neštruktúrne proteíny (nsp, nonstructural protein) uľahčujú vírusovú replikáciu a transkripciu (S c h o e m a n a kol., 2019; M i t t a l a kol., 2020).

S-proteíny, respektíve „spike“ (hrotové, špicaté) transmembránové proteíny typu I obsahujú 3 segmenty: veľkú ektodoménu, jednopriechodovú transmembránovú kotvu a krátky intracelulárny chvost (Obr. 3). Tieto S-proteíny zohrávajú hlavnú úlohu pri ukotvení na hostiteľské bunky. Ektodoména S-proteínov pozostáva z podjednotky S1, ktorá obsahuje doménu viažucu receptor (RBD, Receptor Binding Domain), a S2 je podjednotkou membránovej fúzie. C-koncová doména S1 podjednotky obsahuje motív viažuci receptor (RBM, Receptor Binding Motif). Rozpoznanie receptora hostiteľskej bunky RBD S-proteínmi je počiatočným krokom vírusovej infekcie a väzobné interakcie medzi S-glykoproteínom a receptormi sú jedným z najdôležitejších faktorov vírusovej infekcie.

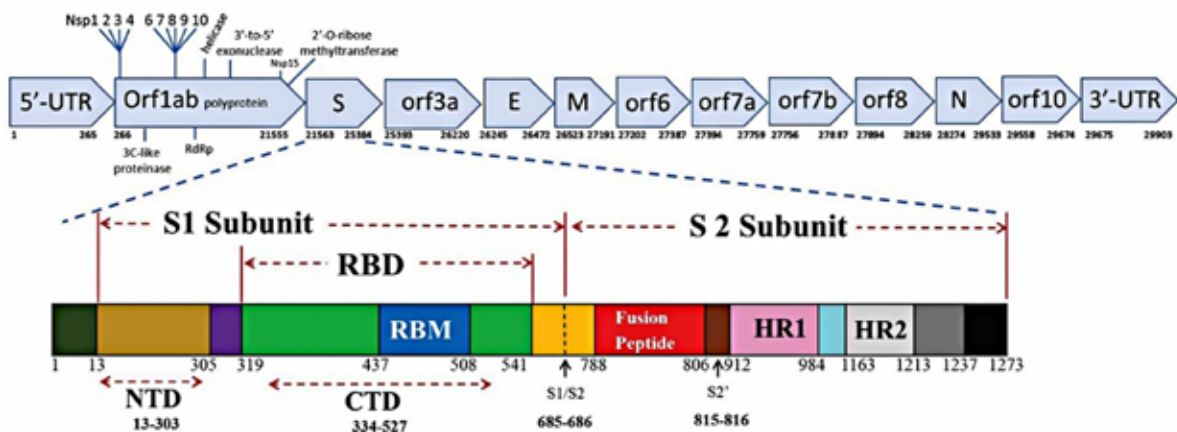
Morfológia a genómová štruktúra SARS-CoV-2

Koronavírusy sú nesegmentované obalené vírusy obsahujúce jednovláknovú RNA (+ssRNA, single-stranded RNA) s dĺžkou medzi 26 až 32 kb (~125 nm alebo 0,125 μm). Elektrónová mikroskopia (EM) negatívne zafarbených častíc SARS-CoV-2 odhalila ich sférický tvar s priemerom v rozmedzí 60–140 nm a vonkajším povrchom posiatym výraznými S-proteínmi dlhými 9–12 nm, ktoré dodávajú viriónom vzhľad slnečnej koruny (Obr. 3). Osekvencovaný SARS-CoV-2 je na 5' konci zakončený čiapkou a na 3' má polyadenylovaný koniec (Obr. 4). Genóm pozostáva z 2 neprekľadaných oblastí (UTR, Untranslated Region) a obsahuje 6–11 otvorených čítacích rámcov (ORF, Open Reading Frame) (M i t t a l a kol., 2020).

Prvý ORF obsahuje približne 67 % genómu, ktorý kóduje 16 neštruktúrnych proteínov (nsp), zatiaľ čo zvyšné



Obr. 3. Štruktúra SARS-CoV-2 (vľavo) a S-proteínu (vpravo)
(upravené podľa Mittal a kol., 2020)



Obr. 4. Genóm SARS-CoV-2
(upravené podľa Mittal a kol., 2020).

ORF kódujú doplnkové a štruktúrne proteíny. Neštruktúrne proteíny zahŕňajú dve vírusové cysteínové proteázy vrátane proteázy podobnej papaínu (nsp3), proteázy podobnej chymotrypsínu, RNA-dependentnej RNA polymerázy (nsp12), helikázy (nsp13) a ďalších, ktoré sa pravdepodobne podieľajú na transkripcii a replikácii SARS-CoV-2 (Chana kol., 2020). 3'-koniec genómu SARS-CoV-2 obsahuje 4 štruktúrne proteíny, ktoré sú zodpovedné za väzbu na receptor hostiteľskej bunky.

Podjednotka S1, zodpovedná za väzbu na hostiteľskú bunku, je ďalej rozdelená na dve subdomény, konkrétne na N-koncovú doménu (NTD, N-Terminal Domain) a C-koncovú doménu (CTD, C-Terminal Domain). Obe tieto subdomény pôsobia ako domény viažuce receptory a účinne interagujú s rôznymi hostiteľskými receptormi. C-koncová doména S1 podjednotky obsahuje motív viažuci receptor (RBM). Podjednotka S2 obsahuje fúzny peptid (FP, Fusion Peptide) zodpovedný za fúziu membrán vírusov a hostiteľských buniek. Ľudské koronavírusy rozpoznávajú rôzne receptory hostiteľa; konkrétne HCoV-229E rozpoznáva ľudskú N-aminopeptidázu (hAPN, human AminoPeptidase-N), MERS-CoV viaže dipeptidylpeptidázu-4 (DPP4, Dipeptidyl peptidase-4), HCoV-OC43 a HCoV-HKU1 viažu určité typy O-acetylovanej kyseliny sialovej a HCoV-NL63 a SARS-CoV rozpoznávajú angiotenzín konvertujúci enzým 2 (ACE2, Angiotensin-converting enzyme 2).

Mutácie SARS-CoV-2

Genetický kód živých organizmov podlieha neustálym zmenám – mutáciám. Mutácie vírusov, vrátane tých, ktoré spôsobujú COVID-19, vznikajú v porovnaní s ľudskými

bunkami oveľa častejšie. Na celom svete boli doteraz identifikované stovky variácií vírusu SARS-CoV-2. Väčšina zmien tohto vírusu mala minimálny vplyv na to, ako sa prenáša, či na závažnosť ochorenia, ktoré spôsobuje. Niektoré môžu byť dokonca škodlivé pre prežitie vírusu. Niektoré zmeny však môžu vírus zmeniť na infekčnejšiu verziu než doposiaľ popísané dominantné varianty vírusu SARS-CoV-2 (Wang a kol., 2020).

Spojené kráľovstvo identifikovalo na jeseň 2020 variant s názvom B.1.1.7 s veľkým počtom mutácií (Wise, 2020). Tento variant obsahuje 23 mutácií, z ktorých 17 je znepokojujúcich (13 nesynonymných, 4 delécie). Mutácie sa vyskytujú v génoch ORF1ab, ORF8 a N (Kirby, 2021). V januári 2021 odborníci vo Veľkej Británii oznámili, že tento variant môže byť spojený s 30 % zvýšením rizika úmrtia v porovnaní s inými variantnými vírusmi, na potvrdenie tohto nálezu je však potrebných viac štúdií (Challen a kol., 2021).

„Juhoafrická“ mutácia, pôvodne detegovaná začiatkom októbra 2020, bola označená B.1.351 a zdieľa niektoré mutácie s B.1.1.7 (Tang a kol., 2021). Juhoafrický variant má 21 mutácií vrátane 9 zmien aminokyselín v S géne (3 na kľúčových miestach v doméne viažucej receptor), pričom zmutované gény sú v oblastiach ORF1ab, ORF3a, N a E. Predbežné dáta naznačujú, že aj táto mutácia môže mať vyššiu schopnosť šírenia sa a má potenciálne dôležitejšie zmeny v S-proteíne. Zatiaľ nie je jasné, či môže mutácia spôsobovať aj ochorenie s ťažším priebehom.

„Brazílska“ mutácia s označením P.1. bola po prvýkrát identifikovaná začiatkom januára u cestujúcich z Brazílie, ktorí boli testovaní počas rutinného skríningu na letisku

v Japonsku. Tento variant pozostáva z 10 mutácií v S géne (3 na kľúčových miestach v doméne viažucej receptor), pričom zmutované sú ORF1ab, ORF8 a N gény (Toovey a kol., 2021).

Vakcíny

Vakcína je látka, ktorá sa používa na aktiváciu imunity podaním modifikovaných živých, oslabených alebo mŕtvych a neaktívnych infekčných organizmov alebo toxínov, s cieľom aktivovať humorálnu a bunkovú imunitu v organizme, a tak zvýšiť jeho odolnosť. Medzi charakteristické imunitné odpovede organizmu patrí produkcia neutralizujúcich protilátok, tvorba T-buniek a zabránenie imunitne zosilnenému účinku (vakcínou vyvolaná reakcia, ktorá by viedla k paradoxne zvýšenej závažnosti ochorenia pri napr. vírusovej expozícii). Väčšina očkovacích látok proti ochoreniu COVID-19 vyvoláva imunitnú odpoveď na určitú špecifickú časť vírusu SARS-CoV-2.

Vzhľadom na to, že S-proteín je dôležitý pre väzbu vírusu na receptory bunky a následnú fúziu vírusu s hostiteľskou bunkou môže byť vhodným cieľom pre návrh vakcín (Du a kol., 2009). Štúdie preukázali, že práve S („spike“) proteín, v jeho natívnej konformácii, je imunodominantným antigénom SARS-CoV. Väzobné a neutralizačné protilátky sa primárne zameriavajú na receptor viažucu doménu S1 podjednotky S-proteínu. Význam S-proteínu pre prípravu vakcín podporujú aj skutočnosti, že protilátky

generované proti S-proteínu sú pretrvávajúce a imunodominantné u pacientov, ktorí prekonali SARS (Cao a kol., 2010; Zhang a kol., 2005).

Okrem S-proteínu boli ako možné ciele pre prípravu vakcín testované aj ďalšie štruktúrne proteíny. Vakcíny na báze N-proteínu zvyčajne nemôžu indukovať neutralizujúce protilátky, pravdepodobne kvôli skutočnosti, že N-proteín sa nenachádza na povrchu CoV. Výhodou N-proteínu je, že je zachovaný v rôznych druhoch CoV, čo z neho robí potenciálny cieľ pre univerzálnu vakcínu proti CoV aktivujúcu T-bunky (Wang a kol., 2020). Vakcíny na báze M-proteínu môžu indukovať zvýšenú protilátkovú odpoveď u imunizovaných zvierat (He a kol., 2005). Doposiaľ publikované štúdie však v predklinických modeloch nepreukázali žiadne neutralizujúce protilátky alebo ochrannú imunitu u vakcín založených na báze M a E proteínov (Buchholz a kol., 2004).

V súčasnosti rozlišujeme klasické vakcíny a vakcíny novej generácie. Klasické, v praxi používané vakcíny sú založené na báze vírusov alebo proteínov. Vírusové vakcíny môžu obsahovať živý oslabený vírus alebo inaktivovaný vírus. Vakcíny obsahujúce živé oslabené vírusy sú vytvárané mnohonásobným prechodom vírusu v bunkovej kultúre, čo vedie k strate jeho virulencie. Tento typ vakcín je zodpovedný za tvorbu miernej infekcie. Vakcíny na báze inaktivovaného vírusu zabezpečujú, že sa virión nemôže replikovať a nie je nákazlivý, teda S-proteín je podaný ako rekombinatná proteínová podjednotka. Vakcíny na báze

Tab. 1. Sumarizácia základných informácií o vakcínach
(Creech a kol., 2021)

Typ vakcíny	mRNA		Vektorová	
Výrobca	Pfizer-BioNTech	Moderna	AstraZeneca/Oxford	Sputnik V
Antigén	S-proteín	S-proteín	Inaktivovaný šimpanzí adenovírusový vektor pre gén S-proteínu	Modifikovaný adenovírus (Serotyp 5 a 26) obsahujúci gén pre S-proteín
Skladovanie	-70 °C (6 mes.) +2-8 °C (5 dní)	-20 °C (6 mes.) +2-8 °C (30 dní)	+2-8 °C (6 mes.)	-18 °C (2 roky) +2-8 °C (6 mes.)
Účinnosť (po 2. dávke)	94,6 %	94,1 %	70,4 %	91,1 %
Nevýhody	Mechanicky menej odolná	Mechanicky menej odolná	Nižšia účinnosť a vyšší výskyt nežiaducich účinkov	Málo klinických štúdií, nechválená EÚ

proteínu môžu pozostávať z purifikovaného proteínu vírusu, rekombinantného proteínu alebo vírusu podobných častíc (VLP, Virus-Like Particles). Inaktivované vírusové vakcíny a vakcíny založené na bielkovinách vyžadujú adjuvans na stimuláciu imunitného systému. Vírusom podobné častice obsahujú štruktúrne proteíny vírusového kapsidu. Zároveň však nemajú vírusový genóm a kritické neštruktúrne proteíny. Jedným z nových podtypov vírusových vakcín sú práve vektorové vakcíny využívajúce vírusy bez schopnosti replikácie, ktoré sú pripravené na expresiu genetickej sekvencie požadovaného antigénu v hostiteľských bunkách (K a r p i n s k i a kol., 2021).

Vakcíny novej generácie nevyžadujú skutočné vírusové častice a môžu sa vyvíjať výlučne na základe sekvencie antigénnych vírusových proteínov. mRNA vakcíny predstavujú sľubnú alternatívu k konvenčným vakcínovým prístupom pre ich vysokú účinnosť, schopnosť rýchleho vývoja a potenciál pre nízkonákladovú výrobu a bezpečné podávanie. V týchto vakcínach sa lipidové nanočastice používajú ako nosiče stabilizovanej mRNA kódujúcej S-proteínu na ceste do intracelulárneho priestoru. Hostiteľ používa mRNA na výrobu cieľového proteínu (v tomto prípade S-proteínu), ktorý indukuje koordinovanú imunitnú reakciu. Spoločnosti Pfizer-BioNTech a Moderna vyvinuli vakcíny na báze mRNA, ktoré v klinických štúdiách preukazujú viac ako 90 % účinnosť proti klinickému ochoreniu SARS-CoV-2. Táto vysoká účinnosť vakcíny je spojená s veľmi malým počtom nežiaducich účinkov, aj keď lokálna a systémová reaktogenita s touto vakcínou sú bežné. Charakteristika a prehľad v súčasnosti najpoužívanejších vakcín je uvedená v Tab. 1 (C r e e c h a kol., 2021).

Molekula mRNA je minimálne imunogénny genetiký vektor, ktorý umožňuje opakované podávanie vakcíny (C u i l i n g a kol. 2020). mRNA vakcíny ponúkajú viacero výhod vďaka svojej flexibilita a schopnosti imitovať prirodzenú vírusovú infekciu. Genetická informácia v mRNA navodzuje intracelulárnu syntézu vírusových proteínov, čo môže potenciálne posilniť humorálnu aj celulárnu imunitnú odpoveď (M u l l i g a n a kol., 2020). Takýmito vakcínami sú mRNA-1273 (Moderna TX, Inc) aj BNT162b1 (BionTech/Fosun Pharma/Pfizer). Ide o vakcíny zložené zo synteticky vyrobenej mRNA opuzdrenej v lipidových časticiach. Syntetická mRNA kóduje úplný S-proteín stabilizovaný pred fúziou SARS-CoV-2 a má potenciál vyvolať vysoko špecifickú imunitnú reakciu na S-proteíny. Tieto vakcíny sa považujú za relatívne bezpečné, pretože nie sú

tvorené inaktivovaným patogénom ani podjednotkami živého patogénu (T u a kol., 2020; M u l l i g a n a kol., 2020).

Základný princíp fungovania DNA vakcín spočíva v použití DNA plazmidu, ktorý kóduje proteín pochádzajúci z patogénu, v tomto prípade SARS-CoV-2. Plazmidová DNA (pDNA) je lacná, stabilná a bezpečná, čo predstavuje vhodnú formu pre dopravenie časti vírusovej genetickej informácie do organizmu príjemcu.

Vakcíny založené na vírusových vektoroch sú vysoko špecifické v transporte dsDNA vírusu do cieľových buniek, sú účinné v génovej transdukcii a indukujú požadovanú imunitnú odpoveď. Ponúkajú dlhodobú a vysokú úroveň expzie antigénového proteínu, a preto majú veľký potenciál na profylaktické použitie. Tieto vakcíny spúšťajú a pripravujú cytotoxické T bunky (CTL, Cytotoxic T Lymphocyte), čo nakoniec vedie k eliminácii buniek infikovaných vírusom. Vakcína AZD1222 (AstraZeneca), JNJ-78436735 (Johnson&Johnson), aj Sputnik V prenášajú dsDNA vírusu pre tvorbu S-proteínu v inaktivovanom adenovíruse (T h a n h a kol., 2020).

Adenovírusy spôsobujú bežné nachladenie a naše telo s nimi prichádza do styku na dennej báze. Rekombinantné adenovírusy sú upravené tak, aby nespôsobili infekciu. Adenovírusy sa používajú vo vakcínach proti rôznym patogénom, v prípade SARS-CoV-2 nesú gén pre S-proteín („spike“) špecifický pre SARS-CoV-2. Po vpichnutí vakcíny sa adenovírus dostane do bunky, kde prinúti bunku exprimovať ním nesenú genetickú informáciu. Keďže sa sám nevie množiť, jediné čo tento upravený vírus spôsobí je, že prinúti bunku vytvárať S-proteín. Tento „spike“ proteín je vystavený bunkám imunitného systému, ktoré vytvoria špecifické protilátky.

V súčasnosti používané vakcíny by mali reagovať na predpokladanú variabilitu vírusu a mali by byť použiteľné pri rôznych formách CoV. Nedávna štúdia S a b i n o a kol. (2021) ukazuje, že brazílsky variant môže odolávať protilátkam u ľudí, ktorí by mali byť imúnni, keďže prekonali infekciu pôvodného koronavírusu. Prvé laboratórne výsledky naznačujú, že vakcína Pfizer môže chrániť pred novými variantmi, aj keď o niečo menej efektívne (M u i k a kol., 2021). Údaje publikované o účinnosti vakcíny Oxford-AstraZeneca prezentujú ochranu organizmu aj pred novým britským variantom a menšiu ochranu pred juhoafrickým variantom. Prvé výsledky štúdie vakcíny Moderna naznačujú, že vakcína je účinná proti

juhoafrickému variantu, aj keď imunitná odpoveď nemusí byť taká silná alebo dlhotrvajúca.

V budúcnosti by mohli vzniknúť nové varianty CoV, preto je potrebné vakcíny ďalej vyvíjať a vylepšovať tak, aby lepšie reflektovali na rýchlo sa meniaci vírus. Podobne ako pri chrípkovom víruse, kde sa každý rok podáva upravená vakcína, zohľadňujúca zmeny v cirkulujúcich chrípkových vírusoch, pravdepodobne aj v prípade koronavírusu bude potrebné účinne reflektovať zmeny CoV.

ZÁVER

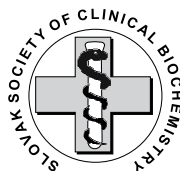
COVID-19 je tretie vysoko infekčné ochorenie človeka spôsobené koronavírusom v ostatných dvadsiatich rokoch. Aj keď je menej závažné ako SARS a MERS, pandemické šírenie a vysoká infekčnosť, radia COVID-19 k najväčším hrozbám pre globálne zdravie v tomto storočí. Kým si vybudujeme kolektívnu imunitu a klinicky schválené vakcíny budú široko dostupné, neexistuje lepší spôsob, ako sa chrániť pred SARS-CoV-2 ako preventívne a zodpovedné správanie (napríklad rúška, hygiena rúk a odstup). Napriek tomu, že sa výskumu SARS-CoV-2 venuje vo svete veľký počet výskumných tímov a každý týždeň sú aktualizované poznatky o tomto novom koronavírusu a jeho mutáciách, sú naše poznatky nedostatočné.

Boj proti tejto pandémie je „beh na dlhé trate“ a vyžaduje cieleňú medzinárodnú spoluprácu vedcov. Je potrebné nielen študovať meniaci sa genóm vírusu, ale aj neustále hľadať účinné metódy jeho detekcie a spôsoby ochrany pred ním. Toto všetko vyžaduje spoluprácu štátov pri vytváraní podmienok brániacich jeho nekontrolovanému šíreniu.

LITERATÚRA

- Buchholz, U. J. et al. (2004):** Contributions of the structural proteins of severe respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0403492101.
- Cao, Z. et al. (2010):** Potent and persistent antibody responses against the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in recovered patients. *Virology Journal*. doi: 10.1186/1743-422X-7-299.
- Challen, R. et al. (2021):** Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: Matched cohort study. *The BMJ*. doi: 10.1136/bmj.n579.
- Chan, J. F. W. et al. (2020):** Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and Infections*. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902.
- Creech, C. B., Walker, S. C. and Samuels, R. J. (2021):** SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2021.3199.
- Dhama, K. et al. (2020):** Coronavirus disease 2019—COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.00028-20.
- Du, L. et al. (2009):** The spike protein of SARS-CoV—A target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*. doi: 10.1038/nrmicro2090.
- He, Y. et al. (2005):** Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.43.8.3718-3726.2005.
- Heymann, D. L. and Shindo, N. (2020):** COVID-19: what is next for public health? *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30374-3.
- Huang, C. et al. (2020):** Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- Karpiński, T. M. et al. (2021):** The 2020 race towards SARS-CoV-2 specific vaccines. *Theranostics*. doi: 10.7150/thno.53691.
- Kaur, S. P., Gupta, V. (2020):** COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Research*. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198114.
- Killerby, M. E. et al. (2018):** Human coronavirus circulation in the United States 2014—2017. *Journal of Clinical Virology*. doi: 10.1016/j.jcv.2018.01.019.
- Kirby, T. (2021):** New variant of SARS-CoV-2 in UK causes surge of COVID-19. *The Lancet. Respiratory medicine*. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00005-9.
- Lam, T. T. Y. et al. (2020):** Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.
- Lau, S. K. P. et al. (2005):** Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0506735102.

17. **Thanh Le, T. et al. (2020):** The COVID-19 vaccine development landscape. *Nature reviews. Drug discovery*. doi: 10.1038/d41573-020-00073-5.
18. **Li, Y. Der et al. (2020):** Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19. *Journal of Biomedical Science*. doi: 10.1186/s12929-020-00695-2.
19. **Li, W. et al. (2005):** Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. doi: 10.1126/science.1118391.
20. **Locht, C. (2020):** Vaccines against COVID-19. *Anaesthesia Critical Care and Pain Medicine*. doi: 10.1016/j.accpm.2020.10.006.
21. **Mittal, A. et al. (2020):** COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1008762.
22. **Muik, A. et al. (2021):** Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera. *Science*. doi: 10.1126/science.abg6105.
23. **Mulligan, M. J. et al. (2020):** Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020-2639-4.
24. **Onder, G., Rezza, G., Brusaferro, S. (2020):** Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA—Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2020.4683.
25. **Piroth, L. et al. (2021):** Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30527-0.
26. **Sabino, E. C. et al. (2021):** Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00183-5.
27. **Schoeman, D. and Fielding, B. C. (2019):** Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virology Journal*. doi: 10.1186/s12985-019-1182-0.
28. **Siu, Y. L. et al. (2008):** The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. *Journal of Virology*. doi: 10.1128/jvi.01052-08.
29. **Song, Z. et al. (2019):** From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*. doi: 10.3390/v11010059.
30. **Tang, J. W. et al. (2021):** Introduction of the South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2 into the UK. *Journal of Infection*. doi: 10.1016/j.jinf.2021.01.007.
31. **Toovey, O. T. R. et al. (2021):** Introduction of Brazilian SARS-CoV-2 484K.V2 related variants into the UK. *Journal of Infection*. doi: 10.1016/j.jinf.2021.01.025.
32. **Tu, Y. F. et al. (2020):** A review of sars-cov-2 and the ongoing clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms21072657.
33. **Walls, A. C. et al. (2020):** Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
34. **Wang, N. et al. (2020):** Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2020.00298.
35. **Wang, R. et al. (2020):** Mutations on COVID-19 diagnostic targets. *Genomics*. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.09.028.
36. **Wise, J. (2020):** Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK. *BMJ (Clinical research ed.)*. doi: 10.1136/bmj.m4857.
37. **Wu, Z. and McGoogan, J. M. (2020):** Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA—Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2020.2648.
38. **Zhang, C. et al. (2019):** Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2019.00594.
39. **Zhong, X. et al. (2005):** B-Cell Responses in Patients Who Have Recovered from Severe Acute Respiratory Syndrome Target a Dominant Site in the S2 Domain of the Surface Spike Glycoprotein. *Journal of Virology*. doi: 10.1128/jvi.79.6.3401-3408.2005.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 19–27

COVID-19 – VYUŽITIE METÓD qRT-PCR PRI DETEKЦИИ SARS-CoV-2

Abrahamovská, M., Švecová M., Večurková, I., Rabajdová, M.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

miroslava.rabajdova@upjs.sk

SÚHRN

Ochorenie COVID-19 spôsobené koronavírusom (SARS-CoV-2) sa stalo globálnou pandémiou výrazne zasahujúcou do života všetkých ľudí. Jedným z najdôležitejších faktorov v boji proti pandémii je včasná a presná detekcia vírusu. Zlatým štandardom pre diagnostiku COVID-19 je detekcia prostredníctvom amplifikácie nukleových kyselín. V súčasnosti je prvou voľbou test založený na detekcii RNA metódou reverznej transkriptázovej-polymerázovej reťazovej reakcie (qRT-PCR) v reálnom čase. Na uskutočnenie tohto testu je na trhu niekoľko diagnostických kitov qRT-PCR s odlišnou citlivosťou a špecifickosťou. Práca popisuje súčasné možnosti identifikácie koronavírusu SARS-CoV-2, nevyhnutné pre potvrdenie diagnózy Covid-19.

Kľúčové slová: COVID-19, izolácia, qRT-PCR, amplifikácia

ABSTRACT

COVID-19 disease caused by coronavirus (SARS-CoV-2) has become a global pandemic significantly affecting the lives of all people. One of the most important

factors in the fight against a pandemic is the early and accurate detection of the virus. The gold standard for the diagnosis of COVID-19 is detection by nucleic acid amplification. Currently, the first detection option is a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay. Several qRT-PCR diagnostic kits with different sensitivities and specificities are available to perform this assay. The work describes the current possibilities of identifying the coronavirus SARS-CoV-2, necessary to confirm the diagnosis of Covid-19.

Key words: COVID-19, isolation, qRT-PCR, amplification

ÚVOD

Vírusy zaraďujeme medzi nebunkové organizmy, ktoré využívajú biochemické pochody prebiehajúce v hostiteľských bunkách na svoju vlastnú replikáciu. Sú to drobné častice obsahujúce genetickú informáciu (DNA alebo RNA) v proteínovom obale. Vďaka pokrokom v laboratórnej diagnostike sa prístupy založené na detekcii nukleových kyselín stali rýchlou a spoľahlivou technológiou aj na detekciu vírusov. Dnes už klasická metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR, Polymerase chain reaction) zarna-

menala v ostatných rokoch obrovský pokrok. V súčasnosti existuje mnoho jej variácií, podstatou všetkých je však amplifikácia (pomnoženie) genetického materiálu (DNA, RNA). Spomedzi metód používaných na dôkaz prítomnosti vírusovej nukleovej kyseliny je v súčasnosti považovaná za „zlatý štandard“ metóda kvantitatívnej real-time polymerázovej reťazovej reakcie s reverznou transkripciou (qRT-PCR, Quantitative Real-Time Reverse Transcription PCR). Vďaka vysokej špecificite a senzitivite je qRT-PCR v reálnom čase dnes využívaná aj na detekciu SARS-CoV-2 (Shen a kol., 2020, Tahamtan, Ardebili, 2020).

Biologický materiál

Európske centrum pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) odporúča pri testovaní SARS-CoV-2 odobrať vzorku z horných dýchacích ciest (Interim Guidelines for Clinical Specimens for COVID-19). Pre počiatočné diagnostické testovanie je prijateľný odber nazofaryngeálnej, orofaryngeálnej a nazálnej vzorky odobratej výterom, aspiráciou alebo výplachom (Yu a kol., 2021). V štúdií s 205 pacientmi s potvrdenou infekciou COVID-19 bola pozitivita qRT-PCR najvyššia vo vzorkách odobratých bronchoalveolárnym výplachom (93 %). Nasledovalo spútum (72 %), výter z nosa (63 %) a výter z hltanu (32 %). Zo vzoriek moču nebola zaznamenaná žiadna pozitívna nálež (Wang a kol., 2020). Revízia vykonaná 8. októbra 2020 tiež zahŕňala sliny ako prijateľný diagnostický materiál, ktorého odber je neinvazívny a bezbolestný (Interim Guidelines for Clinical Specimens for COVID-19). Po odbere by mali byť tampóny okamžite vložené do sterilnej transportnej skúmavky obsahujúcej 2–3 ml vírusového transportného média (Amies) alebo sterilného soľného roztoku a skladované pri teplote 4 °C (Tomma, 2020). Pri dlhšom transporte, alebo dlhšej potrebe uchovania je potrebné zmrazenie vzoriek na –70 °C (WHO, 2020). Niektoré štúdie poukazujú na potenciál fekálnych vzoriek pri diagnostike SARS-CoV-2. Táto otázka však zostáva predmetom diskusií, keďže detekcia vírusovej RNA v stolici nemusí odrážať skutočnú vírusovú replikáciu alebo infekciu (Lo a kol., 2020).

Izolácia RNA

Po odbere klinickej vzorky je izolovaná vírusová RNA. Tento krok je mimoriadne dôležitý na zamedzenie vzniku falošne negatívnych výsledkov (Tomma, 2020). Podľa ministerstva zdravotníctva SR je možné použiť manuálne izolačné súpravy alebo súpravy na automatizovanú izolá-

ciu validovanú Národným referenčným centrom pre chrípku ÚVZ SR (Testovanie SARS-CoV-2: SPDTP).

Metódy izolácie vírusovej RNA sú rôzne v závislosti od použitého kitu, pričom môžu byť využívané rôzne stupne automatizácie. Každá z troch nižšie uvedených metód začína lýzou buniek, denaturáciou RNáz a proteínov. Lýzu buniek a denaturáciu RNáz je možné dosiahnuť pomocou chaotropných látok, zatiaľ čo na denaturáciu proteínov sa používa proteínáza K (Ravi a kol., 2020). Medzi najčastejšie spôsoby izolácie vírusovej RNA v súčasnosti patria:

Organická extrakcia: predstavuje zlatý štandard izolácie vírusovej RNA. V porovnaní s inými metódami je manuálne náročnejšia. Počas centrifugácie sa vzorka rozdelí do troch fáz: **dolná** – organická fáza, **stredná fáza** – obsahuje denaturované proteíny a genómovú DNA (gDNA) a **horná** – vodná fáza, ktorá obsahuje RNA. Vírusová RNA sa izoluje z vodnej fázy zrážaním a rehydratáciou alkoholom (Ravi a kol., 2020).

Izolovanie pomocou kolónky: je založené na afinitnej väzbe medzi negatívne nabitou RNA a kladne nabitou membránou oxidu kremičitého v rotačnej kolóne za alkalických alebo vysoko soľných podmienok. To umožňuje vyplavenie ďalších bunkových zložiek, ako sú bielkoviny, sacharidy a lipidy, zatiaľ čo RNA je zadržaná na membráne oxidu kremičitého. Na elúciu RNA z membrány oxidu kremičitého sa použije hypoosmotický roztok napr. Tris-EDTA alebo voda bez nukleáz. Nevýhodou metódy je možnosť nepriechodnosti membrány oxidu kremičitého v rotačnej kolóne kvôli množstvu zvyškov, čo môže nepriaznivo ovplyvniť výťažok a kvalitu RNA (Yu a kol., 2021). Zefektívniť metódu sa podarilo vyvinutím plne automatizovaných nízkopriechodových automatických prístrojov na extrakciu nukleových kyselín s integrovanou centrifúgou, vyhrievanou trepačkou a systémom na manipuláciu s kvapalinami, ako napríklad stolný QIAcube Connect (Qiagen, Hilden, Nemecko), ktorý dokáže spracovať 12 vzoriek v jednom behu (American Society of Microbiology, 2020).

Izolácia pomocou magnetických guľôčok: spočíva v použití predfunkcionalizovaných magnetických guľôčok, ktoré zachytávajú vírusovú RNA. Na rozdiel od silikagélovej membrány sú magnetické častice účinnejšie pri zachytávaní RNA, pretože nehrozí riziko upchatia. Vo vysoko viskózných vzorkách však môžu zabrániť migrácii častíc a zvyškové častice v eluovanej RNA môžu pôsobiť ako kontaminanty (Yu a kol., 2021). Magnetické častice viazané na RNA sa dajú ľahko oddeliť od vodnej fázy pomocou

vonkajšieho magnetického poľa. Po odstránení nenaviazaných látok môže byť RNA eluovaná z magnetických častíc pomocou roztoku s nízkym obsahom solí (R a v i a kol., 2020). Veľké referenčné laboratóriá, ktoré vyžadujú vysokú efektívnosť spracovania vzoriek, disponujú automatizovanými, vysoko výkonnými prístrojmi na extrakciu nukleových kyselín, ktoré sú založené na magnetických časticiach. Medzi takéto patrí napríklad MagNA Pure 96 Instrument (Roche, Mannheim, Nemecko), ktoré dokáže spracovať až 96 vzoriek za menej ako jednu hodinu. Nástroje s nižšou kapacitou, v rozmedzí od 8 do 48 vzoriek, sú komerčne dostupné aj od významných spoločností ako Roche, Qiagen, Promega a bioMérieux (American Society of Microbiology, 2020).

Princíp qRT-PCR

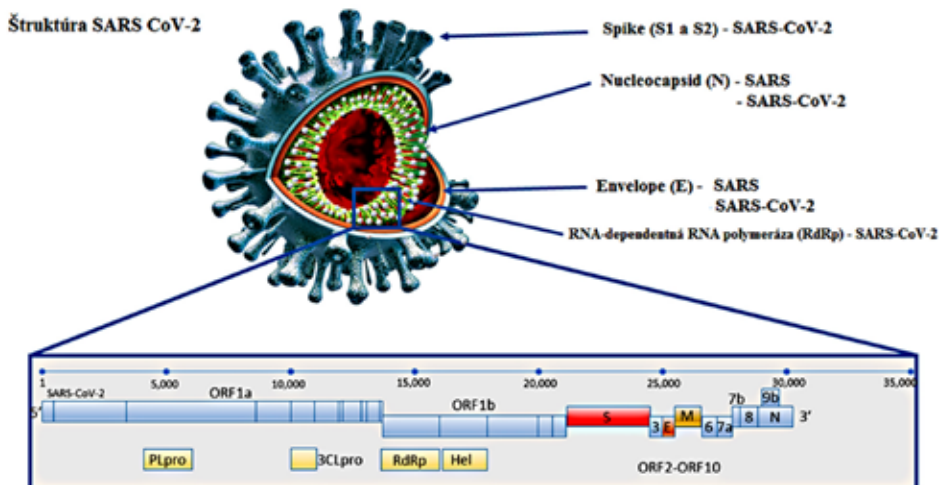
V prípade SARS-CoV2, kde je východiskovým materiálom RNA, sa na detekciu koronavírusu používa kvantitatívna Real-Time PCR s reverznou transkripciou (RT-qRT-PCR). Pri tejto metóde sa RNA najskôr transkribuje do kompletnej DNA (cDNA) reverznou transkriptázou z celko-

vej RNA alebo mediátorovej RNA (mRNA). cDNA sa potom použije ako templát pre reakciu qRT-PCR (Bustin, 2004). qRT-PCR sa uskutočňuje ako jednokroková alebo dvojkroková procedúra. Jednokroková qRT-PCR v reálnom čase používa jednu skúmavku obsahujúcu potrebné priméry a enzýmy na uskutočnenie potrebných qRT-PCR reakcií, amplifikácie a reverznej transkripcie. Dvojkroková qRT-PCR zahŕňa viac ako jednu skúmavku na uskutočnenie samostatných reakcií reverznej transkripcie a amplifikácie (W o n g, M e d r a n o, 2005). Pri detekcii SARS-CoV-2 je všeobecne preferovaným prístupom jednokroková qRT-PCR, pretože je rýchla a pri jej použití sa skraca čas manipulácie so vzorkami, čo znižuje šance na chyby pri pipetovaní, respektíve krížovú kontamináciu medzi krokmi reverznej transkripcie a qRT-PCR. V súčasnosti využíva väčšina molekulových diagnostických testov technológie qRT-PCR zamerané na amplifikáciu rôznych genómových oblastí SARS-CoV-2 (napr. ORF1b alebo ORF8, nukleokapsid (N), spike proteín (S), RNA-dependentná RNA polymeráza (RdRP) alebo obalové (E) gény (Tab.1).

Gén S kóduje S-proteín („Spike“ proteín), ktorý je kľú-

Tab. 1. Cieľové gény, priméry a sondy bežne používané na analýzu SARS-CoV-2 pomocou PCR
(prevzaté od Carter a kol., 2020)

Cieľový gén	Sekvencia primérov a prób (5-3)
N-Sarbeco Protein	F-CACATTGGCACCCGCAATC R-GAGGAACGAGAAGAGGCTTG P-FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ1
Oblasti nukleokapsidu – N gén	2019-nCoV_N1eF: GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT 2019-nCoV_N1-R: TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG 2019-nCoV_N1eP: FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1 2019-nCoV_N2 Forward Primer TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA 2019-nCoV_N2 Reverse Primer GCG CGA CAT TCC GAA GAA 2019-nCoV_N2 Probe FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGT TTC AG-BHQ1 2019-nCoV_Forward Primer: AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 2019-nCoV_Reverse Primer: GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 2019-nCoV_F Probe: FAMeTTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CGeBHQ-1
ORF1ab	FW1GTGCTAAACCCGCTG REV1CAGATCATGGTTGCTTTGTAGGT FW2 CGCCTGGAGATCAATTTAAACAC REV2 ACCTGTAAACCCATTGTGA
RdRP gén	RdRP_SARSr-F2GTGARATGGTCATGTGTGGCGG RdRP_SARSr-R2 CARATGTTAAASACACTATTAGCATA RdRP_SARSr-P2 FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGCBHQ1
S gén	WuhanCoV-sp1-F:TTGGCAAATTCAGACTCACTTT WuhanCoV-sp1-R: TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG
E gén	E_Sarbeco_F:ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT E_Sarbeco_R:ATATTGCAGCAGTACGCACACA E_Sarbeco_PROBE:FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQN



Obr. 1. Štruktúra a genóm SARS-CoV-2
(Kubina, Dziedzic, 2020)

čový pre napadnutie buniek. Je zložený z S1 a S2 podjednotky (Obr. 1). Podjednotka S2 je vysoko konzervatívna. Receptor viažuca doména S1 vykazuje iba 40 % identitu s inými SARS-CoV. Gén S v SARS CoV-2 vykazuje 75 % divergenciu v porovnaní s doteraz opísanými koronavírusmi spôsobujúcimi ochorenie SARS. Ďalšie dva štruktúrne proteíny – E a N sú konzervatívnejšie ako S proteín a sú potrebné na replikáciu a patogenézu koronavírusov (U d u g a m a, 2020). Gén RdRp kóduje RNA-závislú RNA polymerázu. Ukázalo sa, že oblasť génu RdRp u SARS-CoV2 je veľmi podobná oblasti génu RdRp u koronavírusu netopierov (C h a n a kol., 2020).

Typy qRT-PCR v závislosti od počtu analyzovaných sekvencií

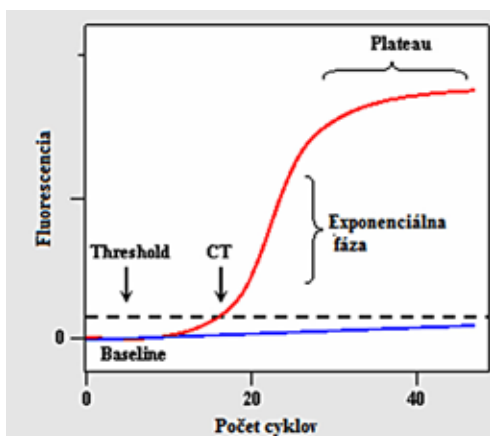
V závislosti na počte analyzovaných génov rozlišujeme **monoplexnú** alebo **multiplexnú qRT-PCR metódu**. Monoplexná qRT-PCR sa používa na detekciu jednej cieľovej sekvencie a nevyžaduje špecifické sondy. Vo svojej podstate je jednoduchšia pri návrhu, implementácii a optimalizácii (P e t r i l l o a kol., 2020). Multiplexná qRT-PCR umožňuje súčasnú kvantifikáciu niekoľkých cieľov RNA v tej istej reakcii (P e t r i l l o a kol., 2020; W a g g o n e r a kol., 2020).

Multiplexná qRT-PCR ponúka možnosť analýzy génovej expresie, sledovania vírusovej záťaže a genotypizácie. Cieľové gény, ako aj interná kontrola sa spoločne amplifikujú v tej istej reakcii, čím sa eliminuje variabilita medzi jednotlivými jamkami, ktorá by nastala, keby sa uskutočňovali samostatné amplifikačné reakcie. Multiplexná analýza zaisťuje vysokú presnosť relatívnej kvantifikácie génov, pri

ktorej sa množstvo cieľového génu normalizuje na množstvo kontrolného referenčného génu (P e r c h e t t i a kol., 2020). Kvantifikácia viacerých génov v jednej reakcii tiež znižuje náklady na reagenty, šetrí vzácny biologický materiál a umožňuje zvýšenú priepustnosť (P a r k a kol., 2020). Tak multiplexná qRT-PCR ako aj monoplexná qRT-PCR sú metódy vyžadujúce použitie sekvenčne špecifických sond, z ktorých každá je označená odlišným fluorescenčným farbivom a vhodným zhášacím zvyškom. To znamená, že emisné maximá farbív musia byť zreteľne oddelené a nesmú sa navzájom prekrývať. Okrem toho, sa reakcie musia uskutočňovať vo vhodnom cykléri, ktorý počtom kanálov a čítaných fluorescenčných rozhraní podporuje multiplexnú analýzu (P e r c h e t t i a kol., 2020; T a h a m t a n a kol., 2020).

Na sledovanie priebehu amplifikačnej reakcie sa pri qRT-PCR používa fluorescenčná reportérová molekula. S každým amplifikačným cyklom je zvýšenie intenzity fluorescence úmerné zvýšeniu koncentrácie amplikónu, pričom prístrojový systém zhromažďuje údaje pre každú vzorku počas každého cyklu qRT-PCR (M a r i n o w i c a kol., 2021). Číslo cyklu, pri ktorom amplifikačný graf prekročí túto prahovú hladinu fluorescence sa nazýva „CT“ (threshold cycle) alebo prahový cyklus (Obr. 2).

Nízke hodnoty CT naznačujú akútne ochorenie a vysokú infekčnosť diagnostikovaného jedinca (Obr. 3). Vysoké hodnoty CT možno rôzne klinicky interpretovať, napríklad aj ako znížené riziko infekčnosti, avšak pri každom diagnostickom závere si interpretácia vyžaduje klinický kontext v súvislosti s epidemiologickou anamnézou.



Obr. 2. Amplifikačná krivka – grafické znázornenie priebehu qRT-PCR (upravené podľa Real-Time qRT-PCR)

Hodnoty CT získané použitím rôznych kitov však nie je možné priamo porovnávať (Tab. 2). Nie všetky laboratóriá používajú rovnaké diagnostické kity. Používané kity sa môžu líšiť napríklad v sekvenciách cieľových génov, použitých reagensoch, metóde extrakcie RNA parametrov cyklov, či detekčných limitoch (S i n g a n a y a g a m a kol., 2020).

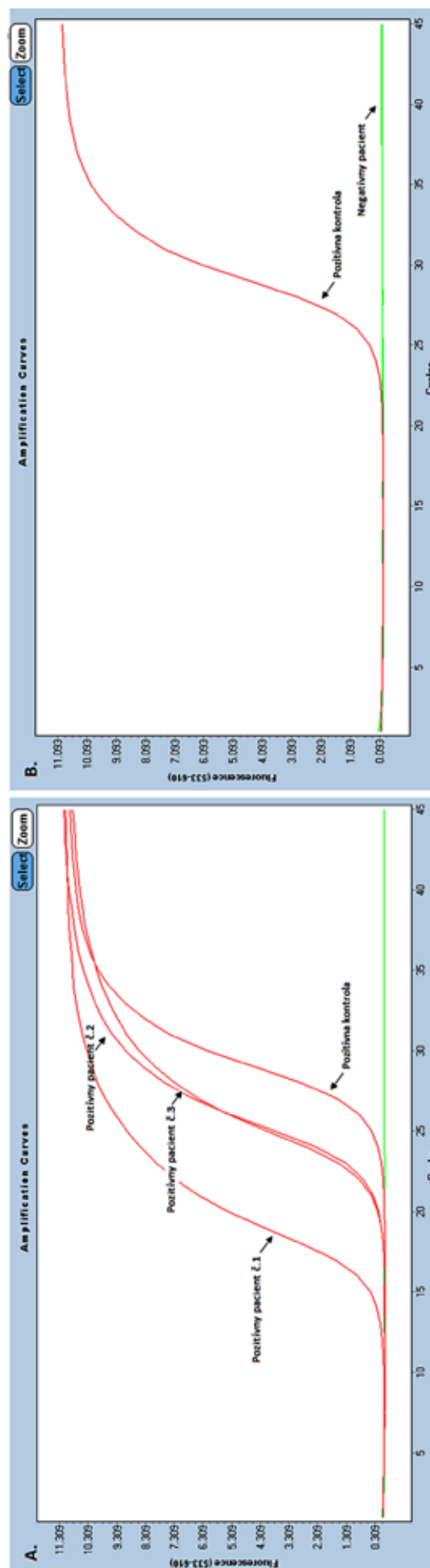
Porovnanie qRT-PCR podľa typu použitej sondy

Produkty qRT-PCR je možné detegovať buď pomocou fluorescenčných farbív, ktoré sa na nich viažu alebo pomocou fluorescenčne značených sekvencie špecifických sond.

SYBR Green je fluorescenčné farbivo, ktoré sa viaže na dvojlátkovú DNA interakciou medzi páry báz. Po naviazaní na DNA sa po excitácii svetlom emituje fluorescenčný signál. Počty amplikónov sa hromadia po každom cykle qRT-PCR, čím dochádza k zodpovedajúcemu zvýšeniu fluorescencie (S m i t h, O s b o r n, 2009). Pretože sa SYBR Green viaže kdekoľvek na dvojlátkovú DNA, je nevyhnutné použiť páry primérov, ktoré sú vysoko špecifické pre cieľovú sekvenciu, aby sa zabránilo generovaniu nešpecifických produktov, ktoré by prispievali k zvýšeniu fluorescenčného signálu (G o n z á l e z - E s c a l o n a, F e y, 2006).

Medzi fluorescenčne značené špecifické sondy (próby) patria:

TaqMan sonda využívajúca fluorescenčne značenú sondu, ktorá hybridizuje s konzervatívnou oblasťou, ktorá leží v cieľovej sekvencii amplikónu. Sonda TaqMan je

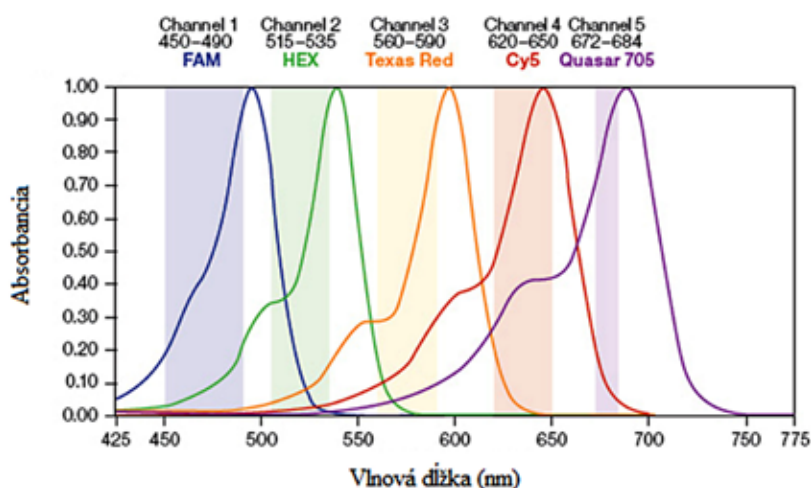


Obr. 3. Grafický výstup z qRT-PCR
A. Pozitívny výsledok (CT~20), B. Negatívny výsledok s amplifikovanou pozitívnou kontrolou

Tab. 2. Porovnanie vyhodnotenia pozitivita SARS-Cov-2 komerčných súprav na základe hodnôt CT pomocou qRT-PCR

Spoločnosť	Názov kitu	Sledované gény	Použité farbičky	CT Pozitivita
DB Biotech	Real Time Multiplex RT-PCR Kit	N	HEX/VIC/JOE	CT < 40
		E	Cal Red 610	
		RdRP	FAM	
Zybio	SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit	N	FAM	CT < 40
		E	Cy5	
		RdRP	ROX	
MultiplexDX, s.r.o.	rTEST COVID-19 qPCR Multiplex Kit	E	FAM	CT < 35
		RdRP	FAM	
MultiplexDX, s.r.o.	rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 kit	S	FAM	CT < 35

zdroje: SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit-Zybio; rTEST COVID-19 qPCR Kit • COVID-19 Diagnostics • MultiplexDX; rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 kit/200 testov. Návod na použitie Ver. 1.0 (sk), 01/2021; DB-1211 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit User Manual



Obr. 4. Grafy excitacej a detekčnej vlnovej dĺžky
(upravené podľa Excitation and Detection Wavelength Charts)

Tab. 3. Excitačná a emisná vlnová dĺžka fluorescenčných farbičiek
(upravené podľa FAM (fluorescein), HEX, JOE, ROX, TAMRA, TET, Texas Red® and others)

Excitácia	Emisia	Farbička
494 nm	518 nm	FAM, SYBR Green I
575 nm	602 nm	ROX, Texas Red
535 nm	556 nm	HEX
651 nm	670 nm	Cy5
690 nm	706 nm	Quasar 706

fluorescenčne označená na 5' konci a obsahuje zhášajúcu molekulu na 3' konci (A f z a I, 2020). Tesná blízkosť tlmiacej molekuly na sonde pri fluorofóre zabraňuje jej fluoreskovaniu v dôsledku prenosu fluorescenčnej rezonančnej energie. Počas kroku hybridizácie každého cyklu qRT-PCR sa priméry a intaktná sonda viažu na svoje cieľové sekvencie. Počas následného predlžovania templátu 5' exonukleázová aktivita enzýmu Taq polymerázy odštiepi fluorofór zo sondy TaqMan a deteguje sa fluorescenčný signál, pretože fluorofór už nie je v tesnej blízkosti zhášača. Amplifi-

kácia templátu sa teda meria uvoľňovaním a akumuláciou fluorofóru počas fázy predlžovania každého cyklu qRT-PCR (C o r m a n, 2020; Y u a kol., 2020).

Pre qRT-PCR so sekvenčne špecifickými sondami sú k dispozícii rôzne fluorescenčné farbivá, každé s vlastnými excitačnými a emisnými maximami (Tab. 3, Obr. 4). Široká škála farbív umožňuje tzv. multiplex qRT-PCR detekciu 3 alebo viacerých amplikónov v tej istej reakcii za predpokladu, že farbivá sú kompatibilné s excitačnými a detekčnými schopnosťami použitého RT cykléra a emisné spektrá vybraných farbív sú navzájom dostatočne odlišné. Pre multiplexnú qRT-PCR sa odporúča používať farbivá s čo najširšou separáciou kanálov, aby sa zabránilo možnému „prekryvu“ signálu (W o n g, M e d r a n o, 2005; L u a kol., 2020).

FRET sondy podobne ako sondy na prenos energie fluorescenčnej rezonancie (napr. hybridizačné sondy Light-Cycler), používajú dve značené oligonukleotidové sondy, ktoré sa viažu na produkt qRT-PCR. Keď sa 2 sondy naviažu, ich fluorofóry sa dostanú do tesnej blízkosti, čo umožní prenos energie z donorového fluorofóru na akceptorový fluorofór (A f z a l, 2020; B r o w n a kol., 2020). Preto je fluorescencia detegovaná počas fázy annealingu (hybridizácie) qRT-PCR a je úmerná množstvu vznikajúceho produktu. Sondy FRET zvyčajne obsahujú farbivá, ktoré sú kompatibilné iba s prístrojmi LightCycler a Rotor-Gene. Pretože systém FRET používa 2 priméry a 2 sondy, je pre úspešné výsledky rozhodujúci dobrý dizajn primérov a sond (A h m a d, G h a s e m i, 2007; S c h n e i d e r a kol., 2020).

Kontrola kvality qRT-PCR

Na overenie správneho fungovania pracovného postupu diagnostiky na molekulovej úrovni sú dôležité kontroly procesu, ktoré sa zvyčajne analyzujú s každou dávkou testovaných vzoriek (E s p e j o, 2020). Kontrola izolácie sa uskutočňuje pomocou internej kontroly priamo z qRT-PCR kitu. Interná kontrolná je tvorená sekvenciou, ktorá je amplifikovaná v rovnakej reakcii ako cieľová sekvencia a detegovaná pomocou inej sondy. Vnútorňa kontrola sa často používa na vylúčenie zlyhania amplifikácie v prípadoch, keď cieľová sekvencia nie je detegovaná (H o o r f a r a kol., 2004).

Ďalšou možnosťou je použitie endogénnej kontroly (tzv. „housekeeping gén“), napríklad ľudskej RNázy P alebo β -aktínu, ktoré sú prirodzene prítomné v ľudských

vzorkách (C o r m a n a kol., 2020; Y u a kol., 2020). Endogénny referenčný gén umožňuje korekcie napríklad na možnú degradáciu RNA, prítomnosť inhibítorov vo vzorke, zmeny obsahu RNA, účinnosť reakcie reverznej transkripcie, či amplifikácie cDNA, respektíve manipuláciu so vzorkou (K h e i r e l s e i d a kol., 2010).

Na overení priebehu samotnej qRT-PCR sa používajú pozitívne a negatívne kontroly, ktoré obsahujú všetky zložky amplifikačnej reakcie. Negatívna kontrola neobsahuje vzorku ale voľu bez nukleáz. Pozitívnu kontrolou môže byť genómová RNA SARS-CoV-2, cieľová RNA transkribovaná *in vitro*, alebo pseudovírus/plazmidová DNA obsahujúca sekvencie cieľového génu (Y u a kol., 2020).

V diagnostike SARS-CoV-2 sa v súčasnosti využívajú aj iné typy amplifikačných metód, ktoré ale nie sú zatiaľ početne využívané v rutinej prevádzke. K týmto špecifickým metódam zaraďujeme napríklad:

- „loop“ izotermálnu amplifikáciu (LAMP, Loop isothermal amplification method), ktorá je ~100-krát citlivejšia ako bežné metódy RT-PCR (K a s h i r, Y a q i n u d d i n, 2020);
- metódu izotermickej amplifikácie (NEAR, Nicking enzyme amplification reaction), ktorá je založená na rýchlej identifikácii malých fragmentov DNA alebo RNA, generovaných priamo z cieľovej nukleovej kyseliny (T r ö g e r a kol., 2015);
- CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – amplifikáciu klastrovo pravidelne rozložených krátkych palindromických opakovaní (Z h a n g a kol., 2020);
- amplifikáciu založenú na chemiluminiscenčnom princípe TMA (Transcription mediated amplification), využitelné aj pri detekcii SARS-CoV-2 (Y u a kol., 2020).

ZÁVER

Za účelom včasnej a spoľahlivej detekcie SARS-CoV-2 boli zdokonalené a upravené metódy využívajúce PCR technológie amplifikácie nukleových kyselín (inovované qRT-PCR), ktoré sa snažia svojou špecificitou a senzitivitou detekciu zefektívniť. Využívanie molekulových metód pri detekcii SARS-CoV-2 v rutinej praxi je v súčasnosti viac než nevyhnutné pre včasnú identifikáciu a následnú izoláciu pacientov, čo spolu s trasovaním ich kontaktov môže zastaviť šírenie ochorenia COVID-19.

LITERATÚRA

1. **Afzal, A. (2020):** Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*. doi: 10.1016/j.jare.2020.08.002.
2. **Ahmad, A. I. and Ghasemi, J. B. (2007):** New FRET primers for quantitative real-time PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-007-1123-4.
3. **Brown, A. S., Ackerley, D. F. and Calcott, M. J. (2020):** High-throughput screening for inhibitors of the SARS-CoV-2 protease using a FRET-biosensor. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules25204666.
4. **Bustin, S. A. (2004):** *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla, California: International University Line Biotechnology Series. pp. 439–492
5. **Carter, L. J. et al. (2020):** Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science*. doi: 10.1021/acscentsci.0c00501.
6. **Corman, V. M. et al. (2020):** Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
7. **Dahdouh, E. et al. (2021):** Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load. *Journal of Infection*. doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.017.
8. **DB-1211 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit User Manual** (no date). Available at: www.dianabiotech.com (Accessed: 1 April 2021).
9. **Espejo, A. P. et al. (2020):** Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*. doi: 10.1093/AJCP/AQAA112.
10. **Excitation and Detection Wavelength Charts** (no date). Available at: https://www.bio-rad.com/webroot/web/html/lsr/products/amplification_pcr/product_overlay/global/amp_excit_emiss_cfx96touch.html (Accessed: 1 April 2021).
11. **FAM (fluorescein), HEX, JOE, ROX, TAMRA, TET, Texas Red® and others** (no date). Available at: <https://www.atdbio.com/content/33/FAM-fluorescein-HEX-JOE-ROX-TAMRA-TET-Texas-Red-and-others> (Accessed: 1 April 2021).
12. **González-Escalona, N. et al. (2006):** Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00943.x.
13. **Hoorfar, J. et al. (2004):** Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004.
14. **Chan, J. F. W., et al. (2020):** Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and Infections*. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902.
15. **Interim Guidelines for Clinical Specimens for COVID-19** | CDC (no date). Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> (Accessed: 1 April 2021).
16. **Kashir, J., Yaqinuddin, A. (2020):** Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
17. **Kheirleiseid, E. A. H. et al. (2010):** Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Molecular Biology*. doi: 10.1186/1471-2199-11-12.
18. **Kubina, R., Dziedzic, A. (2020):** Molecular and serological tests for COVID-19. A comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics*. doi: 10.3390/diagnostics10060434.
19. **Lo, I. L. et al. (2020):** Evaluation of sars-cov-2 rna shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *International Journal of Biological Sciences*. doi: 10.7150/ijbs.45357.
20. **Lu, R. et al. (2020):** SARS-CoV-2 detection using digital PCR for COVID-19 diagnosis, treatment monitoring and criteria for discharge. *medRxiv*. doi: 10.1101/2020.03.24.20042689.
21. **Marinowic, D. R. et al. (2021):** A new SYBR Green real-time PCR to detect SARS-CoV-2. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-021-81245-0.
22. **Park, M. et al. (2020):** Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental and Molecular Medicine*. doi: 10.1038/s12276-020-0452-7.
23. **Perchetti, G. A. et al. (2020):** Multiplexing primer/probe sets for detection of SARS-CoV-2 by qRT-PCR. *Journal of Clinical Virology*. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104499.
24. **Petrillo, S. et al. (2020):** A novel multiplex qrt-pcr assay to detect sars-cov-2 infection: High sensitivity and increased testing capacity. *Microorganisms*. doi: 10.3390/microorganisms8071064.

25. **Ravi, N. et al. (2020):** Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics*. doi: 10.1016/j.bios.2020.112454.
26. *Real-Time qRT-PCR* (no date). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/> (Accessed: 1 April 2021).
27. *rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 kit/200 testov Návod na pouzitie Ver. 1.0 (sk), 01/2021* (no date). Available at: <https://uploads-ssl.webflow.com> (Accessed: 1 April 2021).
28. *rTest COVID-19 qPCR Kit • COVID-19 Diagnostics • MultiplexDX* (no date). Available at: <https://www.multiplexdx.com/products/rtest-covid-19-qpcr-kit> (Accessed: 1 April 2021).
29. *SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit-Zybio* (no date). Available at: <https://m.zybio.com/en/Product/Molecule/2020-03-24/316.html> (Accessed: 1 April 2021).
30. **Shen, M. et al. (2020):** Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. doi: 10.1016/j.jpha.2020.02.010.
31. **Schneider, U. V. et al. (2010):** Optimal design of parallel triplex forming oligonucleotides containing Twisted intercalating nucleic acids-TINA. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkq188.
32. **Singanayagam, A. et al. (2020):** Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveillance*. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483.
33. **Smith, C. J., Osborn, A. M. (2009):** Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
34. **Tahamtan, A., Ardebili, A. (2020):** Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
35. *Testovanie SARS-CoV-2: SPDTP* (no date). Available at: <https://www.standardnepostupy.sk/testovanie-sars-cov-2/> (Accessed: 1 April 2021).
36. **Touma, M. (2020):** COVID-19: molecular diagnostics overview. *Journal of Molecular Medicine*. doi: 10.1007/s00109-020-01931-w.
37. **Tröger, V. et al. (2015):** Isothermal Amplification and Quantification of Nucleic Acids and its Use in Microsystems. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. doi: 10.4172/2157-7439.1000282.
38. **Waggoner, J. J. et al. (2020):** Triplex Real-Time RT-PCR for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*. doi: 10.3201/eid2607.201285.
39. **Wang, L., et al. (2018):** Technical aspects of nicking enzyme assisted amplification. *Analyst*. doi: 10.1039/c7an02037f.
40. **Wang, W. et al. (2020):** Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA—Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
41. **Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005):** Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. doi: 10.2144/05391RV01.
42. **World Health Organization (2020):** 1. *World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. World Health Organization. 2020. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard, World Health Organization.*
43. **Yu, C. Y. et al. (2021):** Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. *Diagnostics*. doi: 10.3390/diagnostics11010053.
44. **Zhang, F. et al. (2020):** A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. *Bioarchive*.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 28–34

COVID-19 – DIAGNOSTICKÉ VYUŽITIE ANTIGÉNOVÝCH TESTOV

Večurkovská, I., Švecová M., Abrahamovská, M., Stupák M.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

marek.stupak@upjs.sk

SÚHRN

Od vypuknutia pandémie Covid-19 spôsobenej novým koronavírusom SARS-CoV-2 sa zvýšilo úsilie o vývoj diagnostických testov, ktoré by spoľahlivo odlišili ľudí pozitívnych (infikovaných vírusom) od negatívnych. Ide o kľúčový krok k zamedzeniu šírenia vírusu. Svoje miesto medzi diagnostickými testami si vyslúžili aj rýchle antigénové testy, a to najmä vďaka možnosti rýchleho dosiahnutia výsledku.

Kľúčové slová: SARS-CoV-2; Ag test; PCR

ABSTRACT

Since the outbreak of the new SARS-CoV-2 coronavirus pandemic Covid-19, efforts have been stepped up to develop diagnostic tests capable of distinguishing positive (infected) from negative people. This is a key step in preventing the virus from spreading further. Domestic antigen tests have also earned their place among diagnostic tests, mainly due to the possibilities of obtaining a result at your own home.

Key words: SARS-CoV-2; Ag test; PCR

ÚVOD

Európska komisia (Brusel, 2020) vydala 15.4.2020 dokument, v ktorom uvádza, že podľa smernice 98/79/ES o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro má označenie CE (Conformitée Européenne) 78 RT-PCR testov, 13 rýchlych antigénových testov a 101 testov na protilátky (väčšinou rýchlych). Treba poznamenať, že ich dostupnosť sa medzi jednotlivými členskými štátmi značne líši. Dôvodom je, že výrobca ich môže posilať na trhy mimo Európskej únie (EÚ) alebo že distribútori, ktorí tieto pomôcky predávajú, nemusia pôsobiť vo všetkých členských štátoch. Dostupnosť sa mení aj v priebehu času, napríklad v závislosti od logistických faktorov pri výrobe a distribúcii. Označenie testov skratkou CE znamená, že výrobcovia prehlasujú, že testy sú v súlade s príslušnými právnymi predpismi EÚ. Podľa smernice EÚ 98/79/ES musí výrobca pre použitie označenia CE na diagnostických pomôckach pre detekciu SARS-CoV-2 špecifikovať výkonnostné charakteristiky pomôcky a vyhlásiť zhodu s požiadavkami na bezpečnosť a výkon uvedenými v príslušnej smernici (Európska komisia, 2020). Podľa La Marca a kol. (2020) a Európskej komisie (2020) možno v zásade všetky registrované testy rozdeliť do dvoch skupín:

- 1. Priame (vírusové testy):** pomenovanie priame odzrkadľuje ich zameranie na detekciu práve prí-

tomného vírusu v organizme, teda aktuálnu infekciu. Vzorkou pre priame testy sú nazofaryngeálne a orofaryngeálne výtery, rovnako tak sú vhodnou vzorkou sliny. Skupina priamych testov sa ďalej delí na:

- testy na molekulovej úrovni (genetické), kde patria všetky testy na základe amplifikácie nukleových kyselín (NAAT, Nucleic Acids Amplification Tests) napríklad: izotermická amplifikácia sprostredkovaná reverznou transkripčnou slučkou (RT-LAMP, Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification) a reverzná transkripčná polymerázová reťazová reakcia (RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction);
- rýchle antigénové testy (RAT, Rapid Antigen Tests), známe aj ako point-of-care tests.

2. Nepriame (testy na protilátky, sérologické testy), ktorých pomenovanie zohľadňuje skutočnosť, že nedetegujú vírus, ale zisťujú sérokonverziu (zvrát zo stavu séronegativity na séropozitivitu voči špecifickému antigénu) na predchádzajúcu infekciu alebo skorú sérokonverziu na prebiehajúcu infekciu. Takouto metódou je napríklad enzýmovo viazaný imunisorbentný test (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Vzorkou pre sérologické testy je krvné sérum.

Testy je možné rozdeliť aj z iných hľadísk. Pokiaľ ide o typ technológie, rozlišujú sa dve kategórie komerčných testov s označením CE:

- *automatizované testy* na použitie v analyzátoroch, ktoré si vyžadujú dlhší čas na spracovanie vzoriek a potvrdenie výsledkov, patria sem testy zo skupiny priamych testov a podskupiny testov molekulových (genetických);
- rýchle testy, ktoré poskytujú výsledky v priebehu niekoľkých minút, sem patria testy druhej podskupiny priamych testov, teda testy antigénové.

Sérologické testy môžu byť tak automatizované (napr. ELISA testy) alebo rýchle (fungujúce na rovnakom princípe ako RAT).

Z hľadiska miesta testovania rozlíšujeme testy na:

- laboratórne;
- určené na delokalizovanú diagnostiku, teda diagnostiku v blízkosti pacienta, resp. na mieste poskytovania starostlivosti mimo laboratórnych testovacích zariadení (POCT, Point-of-care testing).

V EÚ majú testy určené na delokalizovanú diagnosti-

ku používať len zdravotnícki pracovníci. Pojem test určený na delokalizovanú diagnostiku sa nepoužíva v prípade pomôcok určených pre laické osoby. Takéto pomôcky sa musia klasifikovať ako samotesty (Európska komisia, 2020).

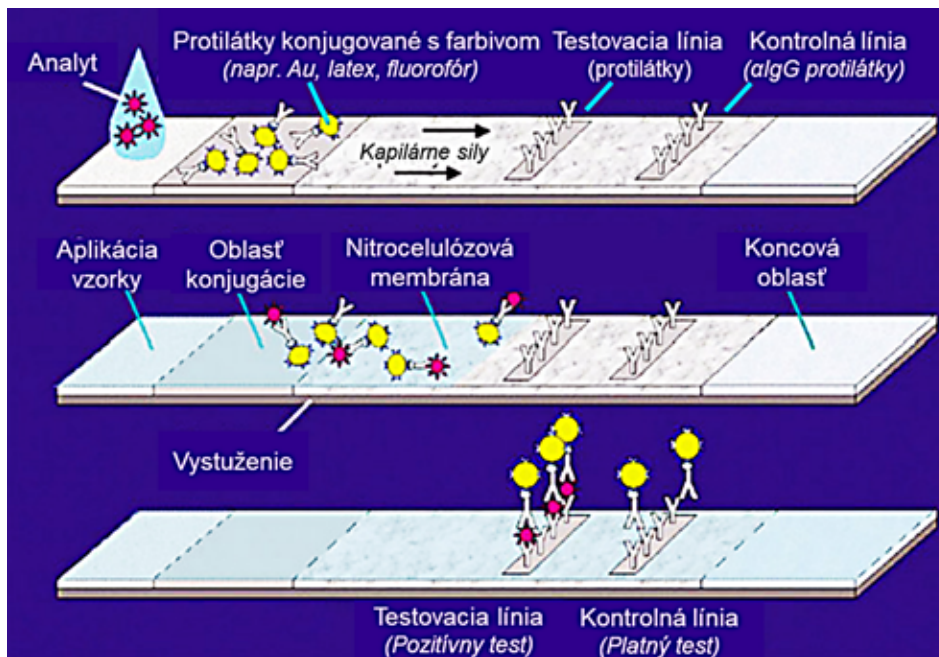
Priama diagnostika

Priama diagnostika najčastejšie zahŕňa využitie testov RT-PCR a rýchlych antigénových testov. Z dôvodu viacerých obmedzení pri metóde PCR (napr. materiálne vybavenie laboratórií, množstvo vyškoleného personálu, možné kapacity testovania, čas potrebný na vykonanie postupu a postup samotný, potreba štandardizácie podmienok odberu biologického, interpretácia výsledkov) bolo vynaložené zvýšené úsilie na vývoj rýchlych antigénových testov (L a M a r c a a kol., 2020).

Rýchlych testov na detekciu antigénov vírusu SARS-CoV-2 bolo navrhnutých niekoľko (D i a o a kol., 2020), no obavami bola falošná pozitivita, resp. falošná negativita výsledkov. Takéto mylné výsledky by mohli byť spôsobené buď nízkou alebo variabilnou vírusovou záťažou a rovnako chybami pri odbere vzoriek. Nekvalitne prevedený odber vzorky má potenciál ďalej zhoršovať problém predovšetkým v prípadoch s nízkym titrom vírusového antigénu (T a n g a kol., 2020). Na citlivosť testu navyše významne vplýva čas, ktorý uplynie medzi infekciou a samotným odberom vzorky (W i e r s i n g a a kol., 2020).

V skupine koronavírusov má SARS-CoV-2 najvyššiu reprodukčnú rýchlosť (RO). Vírusová záťaž v skupine vrcholí v priemere 6 až 11 dní po nástupe symptómov, zatiaľ čo záťaž SARS-CoV-2 vrcholí pri nástupe symptómov a potom klesá. Táto vlastnosť zdôrazňuje úlohu presymptomatických jedincov pri prenose infekcie (P e t e r s e n a kol., 2020), ako aj úlohu asymptomatických jedincov (L a v e z z o a kol., 2020).

Použitie RAT pri diagnostike ochorenia COVID-19 schválil aj Úrad pre potraviny a liečivá (FDA, Food and Drugs Administration). Popisuje ich ako imunochromatografické testy využívané na kvalitatívnu detekciu proteínu exprimovaného na povrchu vírusu SARS-CoV-2, špeciálne N (nukleokapsidového) proteínu, prípadne S (Spike) proteínu. Antigénové testy (Obr. 1) sú založené na princípe testov s laterálnym prietokom (LFA, Lateral Flow Assay). RAT sa vykonávajú na tzv. testovacej platničke, ktorá je potiahnutá nitrocelulóзовou membránou (Obr. 1). Po aplikácii vzorky na testovaciu platničku sa vzorka vplyvom kapilárnych síl posúva postupne po membráne cez



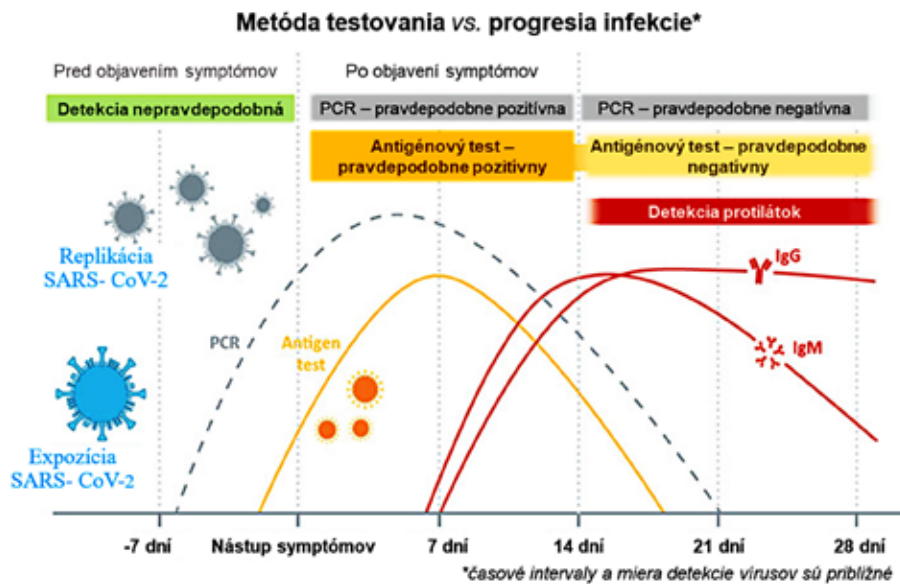
Obr. 1. Princíp fungovania rýchlych antigénových testov (RAT) s použitím respiračných výterov
(upravené podľa <https://asm.org/Articles/2020/August/How-the-SARS-CoV-2-EUA-Antigen-Tests-Work>)

jednotlivé oblasti platničky. Prvou oblasťou, ktorou analyzovaná vzorka prejde, je oblasť obsahujúca vírusové protilátky s konjugovaným farbivom (najčastejšie zlatom). Ak sa vo vzorke nachádza požadovaný antigén (Ag), naviaže sa na protilátku (Ig) konjugovanú so zlatom (Au) a vzniká komplex Ag-Ig-Au. Tento komplex sa posúva ďalej k testovacej línii (T). Testovacia línia je potiahnutá zvieracími protilátkami (najčastejšie myšacie monoklonálne anti-SARS-CoV-2 protilátky), ktoré tiež zachytávajú antigén. Ak vzorka obsahuje antigén, v tejto oblasti sa vytvorí sendvič Ig-Ag-Ig-Au, ktorý spôsobí farebnú zmenu – T prúžok na testovacej platničke. Čím viac antigénu vzorka obsahuje, tým je farba prúžku výraznejšia. Vzorka pokračuje ďalej ku kontrolnej oblasti (C). C línia je potiahnutá myšacími protilátkami proti vírusovým protilátkam, ktoré nemajú naviazaný antigén. Tým sa vytvorí komplex Ig-Ig-Au. Takýto komplex v C oblasti opäť vyvolá farebnú zmenu. C línia je tzv. validnou oblasťou. Pokiaľ sa v nej neobjaví farebný prúžok, test je neplatný a je potrebné ho vykonať opakovane. Interpretácia výsledkov je teda veľmi jednoduchá: ak sa objavia dva prúžky v T a C línii, výsledok je pozitívny. Ak sa objaví jeden prúžok v C línii, výsledok je negatívny. Ak sa objaví jeden prúžok v T línii, alebo sa neobjaví žiaden prúžok, výsledok je neplatný (American Society for Microbiology, 2020).

Skúsenosti s testovaním na chrípkový antigén však nabádajú k opatrnosti, pretože rýchle antigénové testy môžu mať nízku senzitivitu. Najužitočnejšie sú u symptomatických pacientov, u ktorých je vírusová záťaž najvyššia (T a n g a kol., 2020). Limit detekcie stanovený podľa PCR je 106 kópií RNA vírusu/ml respiračnej vzorky (RKI, 2020). Aj keď zdravotné úrady registrujú a schvaľujú priame testy na detekciu antigénu so senzitivitou vyššou ako 80 % a špecifitou vyššou ako 97 %, citlivosť týchto testov je rádovo nižšia ako citlivosť RT-PCR (WHO, 2020a).

Ďalej je nutné dôkladne objasniť ich špecifitu pre SARS-CoV-2, vzhľadom na potenciál krížovej reakcie s inými ľudskými vírusmi zo skupiny koronavírusov (CoV). Napriek týmto obmedzeniam si antigénové testy zaslúžia pozornosť hlavne vďaka svojim výhodám, ako je rýchlosť (10–30 minút v porovnaní s niekoľkými hodinami u NAAT), ľahká interpretácia, obmedzenie technických zručností a požadovanej infraštruktúry (T a n g a kol., 2020).

Aj keď všetci autori uvádzajú vysokú špecifitu rýchlych antigénových testov (< 100 %), senzitivita je mimo ambulantných podmienok nižšia ako udávajú výrobcovia. S c o h y a kol. (2020) uvádzajú len 30,2 % senzitivitu a v svojich záveroch tieto testy neodporúčajú pre použitie v prvej línii pri diagnostike COVID-19. Českí vedci robili štúdiu na 591 probandov absolvujúcich respiračné výte-



Obr. 2. Porovnanie detekčnej schopnosti jednotlivých typov testov
(upravené podľa <https://remedihealth.co/tests-products-services/covid-19-rapid-antigen-test/>)

ry, pričom porovnávali antigénové testy od dvoch rôznych výrobcov:

- test 1 – Panbio Covid-19 Ag Rapid Test, Abbott
- test 2- Standard F Covid-19 Ag FIA, SD Biosenzor.

Prvý test preukázal senzitivitu 66,4 %, druhý test 62,3 %. Ak však analyzovali iba symptomatických ľudí, senzitivita stúpla na 73,8 % pre test 1 a 68,5 % pre test 2. Pre dosiahnutie dôveryhodných výsledkov autori štúdie odporúčajú vykonávať opakované testovania (D r e v í n e k a kol. 2020). D i n n e s a kol. (2020) porovnávali 22 publikácií z rôznych častí sveta. Senzitivita v týchto štúdiách výrazne kolísala (0 %–94 %), pričom priemerná senzitivita bola 56,2 %. Priemerná špecifita bola 99,5 %. WHO uvádza variabilitu v senzitivite RAT od 34 % do 80 % (WHO, 2020b).

Na základe vykonaných štúdií bolo zistené, v ktorom období infekcie sú RAT najúčinnnejšie. Senzitivitu 93 % až 98 % testy dosahujú medzi 6. až 10. dňom od vzniku infekcie. Od 10. do 14. dňa od vzniku infekcie sa využívajú k potvrdeniu bezinfekčnosti u asymptomatických pacientov a pacientov s miernymi príznakmi (Obr. 2). V prvých piatich dňoch od vzniku infekcie je ich detekčná schopnosť nedostatočná (MZ SR, 2020).

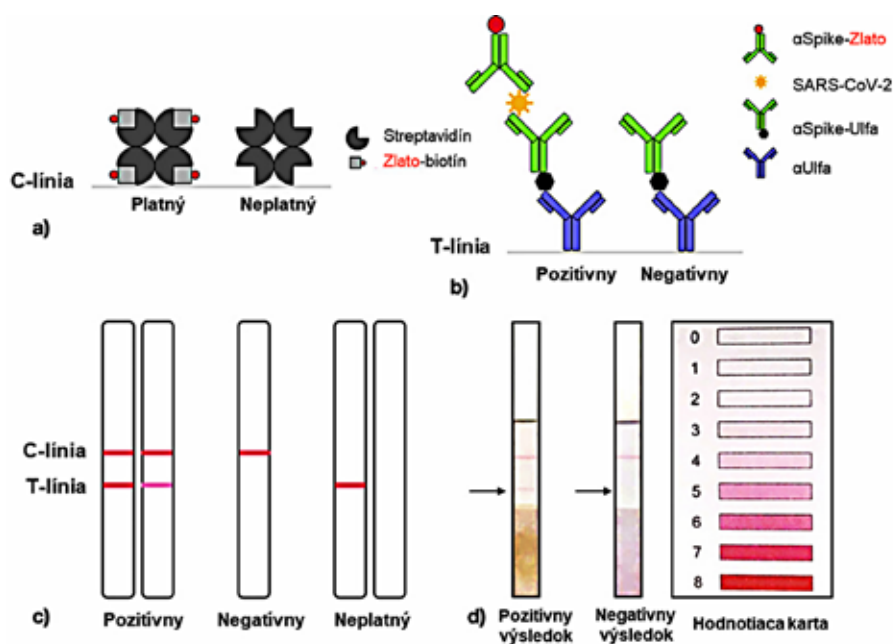
Po vystavení sa vírusu (SARS-CoV-2) nasleduje jeho replikácia, čo prebieha asymptomaticky. Od začiatku replikácie vírusu má určitú detekčnú schopnosť metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Antigénové testy dokážu detegovať vírus SARS-CoV-2 najskôr na 5. deň

od vzniku infekcie, pričom najvyššiu citlivosť vykazujú pri symptomatických jedincov s vysokou vírusovou záťažou, teda až pár dní po objavení príznakov. Detekcia protilátok (IgG a IgM) je využiteľná na 7. deň od výskytu príznakov (u symptomatických ľudí), resp. na 14. deň od vzniku infekcie (aj u asymptomatických ľudí). V tomto období už PCR aj antigénové testy poskytujú pravdepodobne negatívne výsledky.

Diagnostika v slinách

Najčastejšie využívaný výter z dýchacích ciest vyžaduje špecializovaný zdravotnícky personál a je spojený s nezanedbateľným rizikom prenosu vírusu. Samotný výter môže byť spojený s podráždením hltana, s kašľom a kýchaním, čo zvyšuje riziko pre personál, ktorý je v bezprostrednom kontakte s človekom, ktorému sa vykonáva výter (N g a kol., 2020).

Z týchto dôvodov sa mnoho štúdií zameralo na detekciu SARS-CoV-2 v iných telových tekutinách, akými sú moč, stolica, slzy alebo sliny (S u n et al., 2020). Spomedzi týchto telových tekutín najväčšiu pozornosť, aj u širokej verejnosti, si vyslúžili sliny. Vhodnosť použitia slín ako diagnostického média bola posudzovaná už v roku 2003 počas vypuknutia SARS (W a n g a kol., 2004). Obdobne sa nad nimi uvažovalo po prepuknutí MERS-CoV (A d h i k a r i a kol., 2019). Vypuknutie novej pandémie a jej prudký priebeh opäť upriamil pozornosť výskumníkov na túto problematiku.



Obr. 3. Princíp fungovania rýchlych slinných testov (RST) a ich interpretácia (upravené od Azzi a kol., 2020)

Momentálne sa sliny považujú za alternatívnu alebo doplnkovú vzorku k nazofaryngeálnemu a orofaryngeálnemu výteru. Ako dôkaz toho, že je možné sliny použiť ako diagnostické médium, FDA nedávno schválil núdzové použitie niekoľkých testov v slinách. Tento postoj zaujali hlavne z dôvodu, že kvapôčky slín predstavujú hlavný zdroj prenosu infekcie SARS-CoV-2 z človeka na človeka (H a n, I v a n o v s k i, 2020). Použitie sliny ako diagnostickej vzorky ponúka množstvo výhod. Sliny sú pacientovi ľahko odoberateľné bez takmer akýchkoľvek nepríjemných pocitov, nevyžadujú si pri odbere špecializovaný zdravotnícky personál a znižujú sa riziká prenosu vírusu. Neprekvapuje preto fakt, že v posledných mesiacoch niekoľko vedeckých prác informovalo o vývoji nových testov na detekciu SARS-CoV-2 zo slín (W y l l i e a kol., 2020; L a M a r c a a kol., 2020).

Rýchle antigénové testy v slinách

S ohľadom na to, že antigénové testy majú byť vo veľkom počte dodávané do cieľových území, ľahko zvládnuť nemedicínskym zdravotníckym personálom a majú mať primeranú cenu, boli nedávno zverejnené výsledky štúdie zaoberajúcej sa diagnostickou presnosťou takzvaného rýchleho slinného testu (RST, Rapid Saliva Test). RST je založený na podobnom princípe (Obr. 3) ako test, ktorý využíva ako diagnostické médium nazofaryngeálny

alebo orofaryngeálny výter. Výhodou RST je, že poskytuje výsledok už za menej ako 10 minút. Nevýhodou testov je ich nižšia špecificita. Podľa japonskej štúdie bola špecificita RST len 42 % (A z z i a kol., 2020). Na druhej strane sa v štúdiu potvrdila senzitivita testu v slinách až 93 %, čo je viac ako údaj japonského Ministerstva zdravotníctva (66,7 %) (N a g u r a - I k e d a a kol., 2020).

Sendvičové LFA sú upravené tak, aby detegovali prítomnosť SARS-CoV-2 vo vzorkách slín pomocou polyklonálnej protilátky namierenej proti „Spike“ vírusovému S-proteínu (Obr. 3). Vyšetrovanou vzorkou je zmes zriedených slín s tzv. detekčnými protilátkami konjugovanými so zlatom (α Spike-Gold), ktoré zachytávajú S-proteín a pridanou kontrolou platnosti testu - biotínom (40 nm), ktorý je tiež konjugovaný so zlatom (GOLD-biotín). Výsledky testu sa čítajú na základe výskytu červeného kontrolného prúžku (C línia) a červeného testovacieho prúžku (T línia) vo výsledkovom okne nitrocelulózy membrány. C línia je potiahnutá imobilizovaným streptavidínom. Ak vzorka dosiahne C líniu, streptavidín naviaže biotín s vysokou afinitou a v tomto mieste sa objaví červený prúžok (test je platný). Ak vzorka nedosiahne C líniu, prípadne sa z iných dôvodov nezobrazí C prúžok, test je neplatný. T línia pozostáva z imobilizovaných konjugovaných protilátok α Ulfa a α Spike-Ulfa. α Spike-Ulfa je tzv. záchytnou protilátkou. Ak je vo vzorke prítomný S-proteín, naviaže sa najprv

na detekčné protilátky α Spike-GOLD a potom na záchytné protilátky α Spike-Ulfa konjugované s α Ulfa v T línii. Tým sa vytvorí sendvič Ig-Ig-Ag-Ig-Au a vo výsledkovom okne sa objaví v T línii červený prúžok. Naopak, ak glykoproteín „Spike“ vo vzorke chýba, červený prúžok sa v tejto oblasti nevytvorí a ostáva iba červený prúžok v oblasti C línie. Intenzitu T prúžku je možné kvalitatívne vyhodnotiť pomocou hodnotiacej karty (A z z i a kol., 2021).

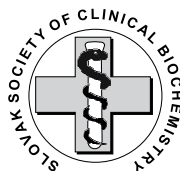
ZÁVER

Antigénové testy sú využívané hlavne kvôli svojim objektívnym výhodám oproti testom na molekulovej úrovni (PCR), medzi ktoré patria: jednoduché vykonanie testu, rýchle dosiahnutie výsledkov a ich jednoduchá interpretácia. Ich veľkou nevýhodou je však oveľa nižšia senzitivita. Tieto charakteristiky predurčujú použitie antigénových testov predovšetkým na lokálnej úrovni, v možných ohniskách pandémie, prípadne na pracoviskách, či školách, čo výrazne šetrí kapacitu citlivejších, no zdĺhavejších a náročnejších PCR testov.

LITERATÚRA

1. **Adhikari, U. et al. (2019):** A Case Study Evaluating the Risk of Infection from Middle Eastern Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in a Hospital Setting Through Bioaerosols. *Risk Analysis*. doi: 10.1111/risa.13389.
2. **American Society for Microbiology (2020):** How-the-SARS-CoV-2-EUA-Antigen-Tests-Work.
3. **Azzi, L. et al. (2020):** Rapid Salivary Test suitable for a mass screening program to detect SARS-CoV-2: A diagnostic accuracy study. *Journal of Cleaner Production*. doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.042.
4. **Azzi, L. et al. (2021):** Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2. *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/0022034520969670.
5. **Diao, B. et al. (2020):** Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein. *medRxiv*. doi: 10.1101/2020.03.07.20032524.
6. **Dinnes, J. et al. (2020):** Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.CD013705.
7. **Drevinec, P. et al. (2020):** The sensitivity of SARS-CoV-2 antigen tests in the view of large-scale testing. *medRxiv*. doi: 10.1101/2020.11.23.20237198.
8. **Európska komisia (2020):** *Oznámenie Komisie Usmernenia k diagnostickým testom in vitro na COVID-19 a ich funkčnosti 2020/C 122 I/01* – Publications Office of the EU (15.04.2020). Available at: <https://op.europa.eu/sk/publication-detail/-/publication/9d8c5572-7f12-11ea-aea8-01aa75ed71a1>.
9. **Han, P., Ivanovski, S. (2020):** Saliva-friend and foe in the COVID-19 outbreak. *Diagnostics*. doi: 10.3390/diagnostics10050290.
10. **La Marca, A. et al. (2020):** Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive BioMedicine Online*. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.06.001.
11. **Lavezzo, E. et al. (2020):** Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020-2488-1.
12. **MZ SR (2020):** *Metodika k testovaniu na prítomnosť koronavírusu SARS-CoV-2 spôsobujúceho ochorenie COVID-19 pre ambulantných poskytovateľov zdravotnej starostlivosti rýchlym antigénovým testom (10.12.2020)*. Available at: https://standardnepostupy.sk/_files/200000766-4be964be9a/Metodika_VUC_AZS_AG_10122020.pdf.
13. **BCOVID-19 and the Risk to Health Care Workers:** A Case Report. *Annals of internal medicine*. doi: 10.7326/L20-0175.
14. **Petersen, E. et al. (2020):** Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *The Lancet Infectious Diseases*. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30484-9.
15. **Robert Koch Institut (RKI) (2021):** *Coronavirus SARS-CoV-2 – Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2 (12.03.2021)*. Available at: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html.
16. **Scohy, A. et al. (2020):** Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *Journal of Clinical Virology*. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104455.
17. **Sun, J. et al. (2020):** Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerging Microbes and Infections*. doi: 10.1080/22221751.2020.1760144.
18. **Tang, Y. W. et al. (2020):** Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.00512-20.
19. **Wang, W. K. et al. (2004):** Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. *Emerging Infectious Diseases*. doi: 10.3201/eid1007.031113.

20. **World Health Organization (WHO) (2020a):** Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. *Interim guidance*.
21. **World Health Organization (WHO) (2020b):** Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19 Rapid diagnostic tests based on antigen detection. *WHO Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic*.
22. **Wiersinga, W. J. et al. (2020):** Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA—Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2020.12839.
23. **Wyllie, A. L. et al. (2020):** Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/nejmc2016359.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 35–42

VÝVOJ PREVALENCIE REAKTÍVNYCH PROTILÁTKO TYPU IgM/IgG VOČI NUKLEOKAPSIDOVÉMU ANTIGÉNU VÍRUSU SARS-CoV-2 V SÉRACH PACIENTOV ŠPECIALIZOVANEJ NEMOCNICE sv. SVORADA ZOBOR S VYBRANÝMI SKUPINAMI DIAGNÓZ V OBDOBÍ MÁJ 2020–FEBRUÁR 2021

Magula, D., Vaverková, G., Vinklerová, S.

Oddelenie klinickej biochémie

Špecializovaná nemocnica sv. Svorada Zobor, n. o., Nitra

magula@snzobor.sk

SÚHRN

Autori analyzujú údaje vývoja prevalence sérových reaktívnych protilátok typu IgM/IgG voči nukleokapsidovému antigénu vírusu SARS-CoV-2 v období pandémie (21. týždeň 2020–7. týždeň 2021) vyšetovaných u pacientov špecializovanej nemocnice s vybranými skupinami diagnóz. Za využitia diagnostickej súpravy Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 bolo realizovaných 5547 vyšetrení (m = 3028, ž = 2519). Podiely pozitívnych identifikácií reaktívnych protilátok (prevalencia) zo všetkých vyšetrených sér boli vyhodnocované v týždňových intervaloch. Významný vzostup sérovej pozitivity zaznamenaný od 44. týždňa 2020 dosiahol ku koncu sledovania nárast na 35 až 47 %, čím kopíroval trend nárastu kumulatívnej incidencie prípadov infekcie diagnostikovanej RT-PCR metódami v regióne Nitra, ktorá ku koncu sledovania presiahla 7 %. Rozdiel medzi podielom jedincov s infekciou potvrdenou RT-PCR metódami a podielom pacientov, ktorí na základe prítomnosti sérových reaktívnych protilátok skutočne infekciu prekonali, dosiahol ku koncu obdobia 28–40 %. Práve táto skupina diagnosticky nezachytených pacientov vyžaduje pri ďalšom terapeutickom a diagnostickom postupe zvýšenú obozretnosť. Vyšetrovanie špecifických protilátok na dôkaz prekonanej infekcie SARS-CoV-2 tak významne rozširuje

možnosti laboratórnej diagnostiky infekcie a malo byť sa stať súčasťou jej základného vyšetrovacieho algoritmu.

Kľúčové slová: infekcia SARS-CoV-2; laboratórna diagnostika; sérové protilátky; prevalencia

ABSTRACT

The authors analyze data of the prevalence advancement of serum reactive IgM/IgG antibodies to the nucleocapsid antigen of the SARS-CoV-2 virus during the pandemic period (21st week 2020–7th week 2021) examined in patients of a specialized hospital with selected groups of diagnoses. The Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 diagnostic kit was used, 5547 examinations were performed, 3028 in males, 2519 in females. The proportions of positive identifications of reactive antibodies (e. g. prevalence) from all examined sera were evaluated at weekly intervals. The significant increase in serum positivity recorded since 44th week 2020 increased to 35–47 % at the end of follow-up, copying the trend of increasing cumulative incidence of RT-PCR-confirmed infections in the Nitra region, which exceeded 7 % at the end of follow-up. The difference between the proportion of individuals with infection confirmed by RT-PCR

methods and the proportion of patients who actually survived the infection due to the presence of serum-reactive antibodies reached 28–40 % at the end of the period. It is this group of diagnostically undetected patients that requires increased caution in further therapeutic and diagnostic procedures. Examination of specific antibodies to detect past SARS-CoV-2 infection thus significantly expands the possibilities of laboratory diagnosis of infection and should be a part of its basic screening algorithm.

Key words: SARS-CoV-2 infection; laboratory diagnosis; serum antibodies; prevalence

ÚVOD

Dňa 11. marca 2020 vyhlásila Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) šírenie infekcie novým vírusom SARS-CoV-2 a ochorenie COVID-19, ktoré vírus spôsobuje, za globálnu pandémiu (O médiách.com; 2020, Cucinotta, Vaneli, 2020).

Pandémia koronavírusovej infekcie významne ovplyvnila zaužívané modely a vzorce poskytovania zdravotnej starostlivosti v nemocniciach i ambulanciách, nielen z pohľadu potreby identifikácie pozitívnych jedincov, stratifikácie rizika s prihliadnutím na ich základné a pridružené ochorenia, zavádzania epidemiologických opatrení u pacientov (izolácia, karanténne opatrenia) ako i požiadaviek ochrany ošetrojúceho personálu v nemocniciach i ambulanciách.

Pre stanovenie diagnózy COVID-19 (COrona VIRUS Disease-2019) sa v diagnostickom postupe vyžaduje integrovať dáta nielen klinické, ale aj laboratórne (Miller a kol., 2020).

Aj podľa odporúčania Európskej komisie sú včasné a správne realizované laboratórne testy na koronavírus SARS-CoV-2 základnou súčasťou manažmentu COVID-19, podporným nástrojom pre spomalenie šírenia epidémie a prijímanie strategických rozhodnutí pri kontrole infekcie, akými sú manažment pacientov v zdravotníckych zariadeniach, ale aj odhaľovanie asymptomatických jedincov, ktorí by mohli, pokiaľ nie sú izolovaní, šíriť infekciu ďalej (European Commission, 2020; Marra a kol., 2020).

Detekcia asymptomatických alebo subklinických prípadov infekcie SARS-CoV-2 je dôležitá nielen pre bližšie pochopenie celkovej prevalence a infekčného potenciálu

COVID-19, ako i poznatku, že asymptomatickí jedinci so subklinicky aktívnou infekciou môžu byť zdrojom ďalšieho šírenia infekcie, ale i sami sú rizikom z dôvodu potreby ich ďalšej diagnostiky a terapeutických intervencií. I keď pozitivita molekulovo-diagnostických testov (RT-PCR, antigénové testy) môže vyjadriť záchyt u pacientov so symptómami COVID-19, ich úzkych kontaktov, prípadne náhodne odhalí i ďalších jedincov, potenciál zachytiť všetkých pacientov, ktorí koronavírusovú infekciu skutočne prekonali, však tieto testy nemajú (Xu a kol., 2020).

V našej nemocnici sme od začiatku pandémie zaviedli pravidlá pre diagnostické testovanie u hospitalizovaných a ambulantných pacientov (RT-PCR testy, antigénové testy), s ich výhodami i obmedzeniami (limitácia počtu testov, časové oneskorenie detekcie, prípadne nízka špecifickosť výsledku). Z dôvodov rizikovosti niektorých skupín pacientov prichádzajúcich do nemocnice (onkologické ochorenia, imunokompromitovaní jedinci, a i.), diferenciálno-diagnostických dôvodov (pacienti s pľúcnyimi chorobami a prítomnými rádiologickými alebo CT zmenami na pľúcach) sme ihneď po uvedení na trh nového vysokocitlivého automatizovaného testu zaradili do algoritmu rozšírenej diagnostiky tiež vyšetovanie špecifických protilátok typu IgM/IgG, ktoré by mohli poukazovať na prekonanie infekcie SARS-CoV-2 aj u asymptomatických jedincov.

Povedľa molekulovej diagnostiky za využitia amplifikácie ribonukleových kyselín (RNA), sú sérologické metódy komplementárnou metódou, ktorá potenciálne vypĺňa diagnostickú medzeru (gap) tvorenú falošne negatívnymi testami RNA a zároveň umožňuje rýchly skrining jedincov na širšej diagnostickej báze. Oba diagnostické princípy sú tak pre manažment antivírusovej liečby, epidemiologických opatrení, prípadne vakcináciu jedincov, a teda aj kontrolu ochorenia, esenciálne (Wolff a kol., 2020).

METÓDA

V prospektívno-retrospektívne koncipovanej štúdií realizovanej v Špecializovanej nemocnici sv. Svrada Zobor, sme v období 18. máj 2020–21.február 2021 (21. týždeň 2020 až 7. týždeň 2021) vo vybranej skupine pacientov vyšetovali prítomnosť špecifických sérových protilátok typu IgM a IgG voči infekcii SARS-CoV-2.

Vopred (prospektívne) boli z pacientov, ktorí prichádzali do nemocnice ambulantne alebo na hospitalizáciu

vybrané kategórie pacientov, u ktorých by vyšetrenie protilátok IgM/IgG mohlo mať podľa doterajších vedomostí klinický význam.

Zvolené boli kategórie:

- pacienti s onkologickým ochorením (prevažne karcinóm pľúc) ako skupina so zvýšeným rizikom infekcie, pľúcnych komplikácií, systémový imunosupresívny stav, navodený základným ochorením, ako i protinádorovou liečbou (najmä chemoterapia, rádioterapia), (R o l s t o n, 2017; A d d e o a kol. 2020),
- pacienti s respiračnými chorobami, vrátane tuberkulózy, z dôvodov diferenciálno-diagnostických (rádiologické a CT nálezy pľúc) ako i zvýšeného rizika z dôvodu samotného ochorenia (C u c i n o t t a, V a n e l l i, 2020),
- pacienti s poruchami imunity,
- pacienti s individualizovanými, špecifickými požiadavkami iných lekárov.

Zo sledovania protilátok boli vyňatí pacienti, ktorí boli a priori prijatí už so známou diagnózou COVID-19 na reprofilitovaný lôžkový fond nemocnice, i keby z pohľadu základnej diagnózy spĺňali kritéria zaradenia do vyššie uvedených kategórií.

Vyšetrenia sér boli vykonávané na Oddelení klinickej biochémie na automatickom imunoanalyzátore COBAS e411 (Roche Diagnostics) za využitia diagnostickej súpravy Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics) na princípe elektrochemiluminiscenčnej imunoanalýzy „ECLIA“. Je to imunotest určený na kvalitatívnu in vitro detekciu protilátok (vrátane IgG) proti vírusu SARS-CoV-2 v ľudskom sére a plazme. Test je určený na stanovenie imunitnej odpovede proti SARS-CoV-2.

Testovacia súprava Elecsys Anti-SARS-CoV-2 využíva rekombinantný proteín predstavujúci nukleokapsidový (N) antigén v sendvičovom formáte s dvoma antigénmi, čím je uprednostňovaná detekcia protilátok proti SARS-CoV-2 s vysokou afinitou, nie však voči ďalším trom štruktúrnym typom antigénov vírusov z čeľade Coronaviridae, rod. Betakoronavírus, t. j. S (spike – hrot), E (envelope – obal), M (membrane – membrána).

Výsledky sú automaticky vypočítané softvérom analyzátora porovnaním elektrochemiluminiscenčného signálu získaného z reakčného produktu vzorky so signálom pre cut-off hodnoty pri kalibrácii.

Číselný výsledok je potom interpretovaný ako hodnota tzv. cut-off-indexu – COI:

- COI < 1.0 – nereaktívne, negatívne na anti-SARS-CoV-2 protilátky,
- COI ≥ 1.0 – reaktívne, pozitívne na anti-SARS-CoV-2 protilátky.

Všetky získané dáta boli vyhodnocované retrospektívne.

VÝSLEDKY

V období 18. máj 2020 (21. týždeň) – 21. február 2021 (7. týždeň) sme celkom vykonali 5547 vyšetrení sérových protilátok IgM/IgG, z toho 3863 vyšetrení u ambulantných pacientov a 1684 u hospitalizovaných pacientov.

Vyšetrenie podstúpilo 3028 mužov (m) priemerného veku (pv) 66,35 rokov, (10–95 rokov) a 2519 žien (ž) pv = 64,50 rokov (14–101 rokov).

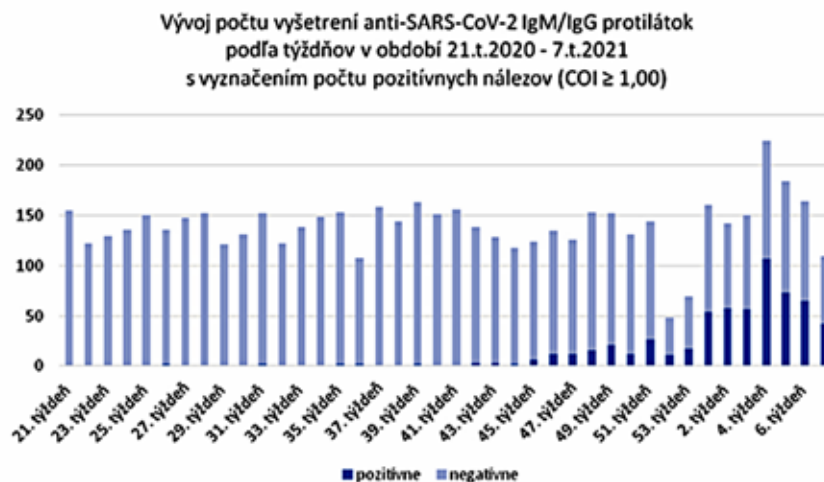
Pacientov s onkologickými ochoreniami (zväčša karcinóm pľúc) bolo 3062 (m = 1843, pv = 66,44 rokov, ž = 1219, pv = 66,73 rokov), pacientov s respiračnými (neonkologickými) ochoreniami bolo 1392 (m = 807 mužov, pv = 66,13 rokov, ž = 585, pv = 64,83 rokov), pacientov s poruchami imunity 397 (m = 132, ž = 265). Zostávajúcich 12,54 % pacientov bolo vyšetrených na základe individuálnych požiadaviek lekárov – geriatrov, diabetológa, reumatológa, všeobecného lekára pre dospelých a i.

Vyšetrenia boli realizované u neočkovaných jedincov. Ku koncu uvedeného časového obdobia sme mali možnosť vyšetriť aj 8 očkovaných jedincov (2 dávky vakcíny Comirnaty, Pfizer/ BioN Tech), ktorí neprekonali COVID-19 – u všetkých z nich boli N (nukleokapsidové) protilátky v sére IgM/IgG negatívne.

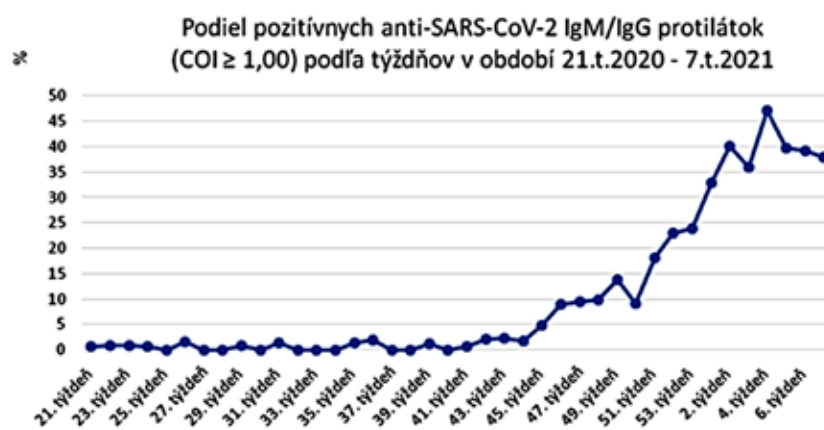
Počty vyšetrení podľa jednotlivých týždňov a podiel pozitívnych vyšetrení IgM/IgG protilátok ukazuje Graf 1.

Čiarový Graf 2. znázorňuje časový vývoj podielu zachytených pozitívnych testov (COI ≥ 1,0) v prehľadnejšej forme.

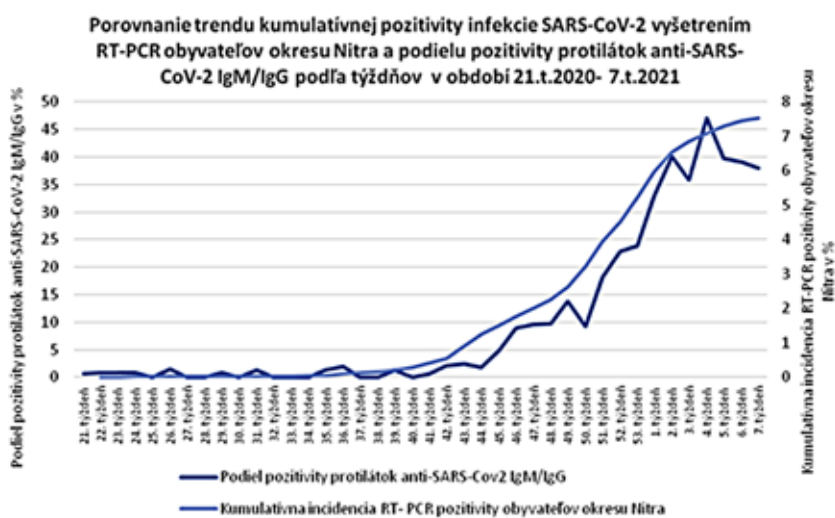
Pre bližšie objasnenie vývoja epidemiologickej situácie v období 21. týždeň 2020 – 7. týždeň 2021 uvádzame v Grafe 3 kumulatívnu incidenciu pozitívne zachytených prípadov infekcie SARS-CoV-2 podľa jednotlivých týždňov v okrese Nitra (metódou RT-PCR) podľa údajov Národného centra zdravotníckych informácií jej časový trend (pri súčasnom vložení do spoločného grafu časového trendu



Graf 1. Vývoj počtu vyšetrených anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG protilátok s vyznačením počtu pozitívnych nálezov (COI $\geq 1,00$) podľa jednotlivých týždňov v období 21. týždeň 2020 – 7. týždeň 2021 (n = 5547 vyšetrených, vlastné dáta)



Graf 2. Podiel (prevalencia) pozitívnych sérových protilátok IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 (COI $\geq 1,00$) podľa jednotlivých týždňov v období 21. týždeň 2020 – 7. týždeň 2021 u pacientov prichádzajúcich do nemocnice (n = 5547 vyšetrených, vlastné dáta)



Graf 3. Porovnanie trendu kumulatívnej pozitívnosti infekcie SARS-CoV-2 zachytenej RT-PCR v okrese Nitra (kumulatívna incidencia) podľa údajov NCZI a prevalencie pozitívnych protilátok anti-SARS-CoV-2 (vlastné dáta) podľa jednotlivých týždňov v období 21. týždeň 2020 – 7. týždeň 2021

podielu pozitívne zachytených sérových protilátok u pacientov nemocnice podľa údajov Grafu 2)

DISKUSIA

Diagnóza novej koronavírusovej infekcie SARS-CoV-2 je komplexný proces, ktorý integruje dáta zistené klinickým a laboratórnym vyšetrením. Práve laboratórne zistenia majú pre stanovenie definitívnej diagnózy svoju nezapustiteľnú konfirmačnú úlohu. Molekulovo-diagnostické metodiky (RT-PCR testy, antigénové testy) majú potenciál potvrdiť ochorenie u tých osôb, u ktorých boli vykonané. Zistenia viacerých autorov však pri rozboroch údajov z testovaní týmito metodikami u všetkých jedincov v uzavretých komunitách ukazujú, že približne 40–45 % pozitívne testovaných jedincov malo asymptomatický priebeh (napr. údaje z japonskej výletnej lode Diamond Princess, ktorá uviazla v karanténe, ukázali až 46,5 % asymptomatických jedincov), (O r a n, T o p o l, 2020).

Za bežných okolností pri populačnom testovaní práve títo jedinci nemusia byť z rôznych dôvodov do testovania zaradení, resp. zachytení. Môžu však byť odhalení náhodne, alebo dodatočne – nakoľko antigény koronavírusu indukujú u jedincov vznik reaktívnych protilátok, typu IgM, IgA, IgG. Práve protilátky typu IgG z dôvodov ich dlhšieho pretrvávania pri vyšetrení séra môžu poukazovať na prekonanie koronavírusovej infekcie. Štúdie viacerých autorov definovali aj časový nástup rozvoja protilátok po prekonaní koronavírusovej infekcie. L i p p i a kol. (2020) skúmali protilátkový profil porovnávajúc anti-SARS-CoV-2 ELISA testy (typu IgA and IgG) a CLIA testy (typu IgG and IgM). U pacientov, ktorí mali nástup symptómov infekcie pred menej ako piatimi dňami, bol podiel sér s pozitívitou protilátok veľmi nízky, u pacientov s nástupom symptómov pred 5–10 dňami bol podiel pozitívnych protilátok v rozmedzí 15.4 %–53.8 %. Ak sa symptómy objavili pred 11 až 21 dňami, podiel pozitivity dosiahol 100 %, s výnimkou protilátok typu IgM s podielom pozitivity u 60 % pacientov.

M i l l e r a kol. (2020) vyšetrovali prítomnosť sérových protilátok IgM, IgA, IgG voči antigénom koronavírusu – zistili ich prítomnosť na 7. deň od začiatku koronavírusovej infekcie verifikovanej RT-PCR testom u 45 % vyšetrovaných, na 14. deň u 87 % a po 20. dni u 100 % vyšetrovaných jedincov.

S vývinom protilátkových testov – z hľadiska užívateľského typu kazetového (testy typu point-of-care) alebo citlivých diagnostických metód realizovaných na analyzátoroch v laboratóriách sa diagnostika koronavírusovej infekcie rozšírila i na takéto nepriame diagnostické metódy. Pri ich využití v uzavretej komunite, skupine alebo i populácii (s prihliadnutím na ich časové oneskorenie) môžu poskytnúť relevantné údaje o počte jedincov, ktorí koronavírusovú infekciu skutočne prekonali, teda prevalenciu ochorenia.

Vzhľadom na to, že pri pandémie koronavírusovej infekcie ide o novú primoinfekciu, môžu vysokocitlivé a vysokošpecifické testy v každom okamihu vývoja pandémie poskytnúť aktuálnu informáciu o tom, aký podiel testovanej populácie koronavírusové ochorenie už prekonalo.

Práve tieto vyšetrenia môžu vyplniť diagnostickú medzeru (gap) medzi počtom klinicky a laboratórnymi molekulovo-diagnostickými testami zachytených pacientov a počtom jedincov, ktorí skutočne infekciu prekonali.

V súčasnosti je k dispozícii viacero vysokocitlivých diagnostických súprav – viacerí autori testovali ich parametre validity. Jedným z najcitlivejších a najšpecifickejších je diagnostický test dodávaný spoločnosťou Roche – Elecsys anti-SARS-CoV-2.

Belgickí autori pri testovaní parametrov senzitivity a špecifickosti štyroch diagnostických súprav – Liaison S1/S2 IgG (Diasorin), IgG a IgA (Euroimmun) a Vidas IgG a IgM a Elecsys SARS-CoV-2 (Roche) zistili u posledných dvoch menovaných najlepšie parametre špecifickosti (žiadne falošne pozitívne výsledky) a pozitívnej prediktívnej hodnoty na úrovni 100 % (W o l f f a kol., 2020). Nemeckí autori pri validácii sérologického testu Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 na reprezentatívnej vzorke pacientov stanovili jeho špecifickosť na 98,84 % a negatívnu prediktívnu hodnotu na 99,98 % (K i t t e l a kol., 2021).

WHO vyhlásila niektoré skupiny ochorení za vysokorizikové z hľadiska infekcie Covid-19 a závažnosti jej priebehu – onkologické, pľúcne choroby, a i.

Vzhľadom na hlavný predmet činnosti našej nemocnice špecializovanej na respiračné choroby, vrátane pľúcnych onkologických procesov, patrí táto skupina pacientov medzi rizikovú populáciu. S dostupnosťou testu na testovanie špecifických protilátok sme prakticky od začiatku pandémie mali možnosť testovania sérových protilátok.

U onkologických pacientov, ktorí pravidelne dochádzajú za účelom chemoterapie, resp. biologickej liečby

v trojtýždňových intervaloch, sme vo viacerých prípadoch medzi dvoma návštevami zaznamenali sérokonverziu, čo znamenalo, že v uvedenom časovom medziobdobí pacient prekonal koronavírusovú infekciu a podanie chemoterapie by v takomto teréne bolo spojené s rizikom zhoršenia, resp. vzplanutia inaparentne prebiehajúcej infekcie.

Asymptomatické infekcie môžu byť spojené so subklinickými pľúcnymi abnormalitami, detekovateľnými počítačovou tomografiou (CT), (O r a n, T o p o l, 2020). Preto aj u pacientov s respiračnými ochoreniami, najmä u tých, u ktorých boli takéto nejasné rádiologické alebo CT nálezy na pľúcach zistené, by pozitívny protilátkový test mohol byť konfirmačným diagnostickým vyšetrením na potvrdenie prekonanej koronavírusovej infekcie.

V našom súbore všetkých testovaných sme v časovej týždňovej postupnosti pozorovali pri testovaní protilátok v prvej vlne 11. 3. 2020–31. 8. 2020 a rovnako i v začiatku druhej vlny pandémie 1. 9.–31. 12. 2020 (Č e r v e n ý a kol., 2021) veľmi nízke podiely zachytenej pozitivity protilátok typu IgM/IgG. Významný zlom vo vzostupe pozitivity sme pozorovali od 45. týždňa (od 2. novembra 2020), pričom vzostup pokračoval i v tretej vlne (od 1. 1. 2021–doteraz) s maximom záchytu v 5. týždni 2021 a to u viac ako 47 % pacientov prichádzajúcich do nemocnice.

Na porovnanie sme podľa dát NCZI pre okres Nitra, z ktorého napriek nadregionálnemu pôsobeniu nemocnice prichádza najviac pacientov, vytvorili v grafe 3 trend kumulatívnej incidencie RT-PCR pozitivity testov (NCZI, 2021). Táto dosiahla ku koncu sledovania cca 7,5 %, čo ani pri započítaní prípadov diagnostikovaných antigénovými testami (približne rovnaký počet zachytených) zďaleka nedosahuje hodnoty prevalence pozitívnych protilátok u vybraných skupín testovaných pacientov prichádzajúcich do nemocnice (cca 47 %).

Z tohto hľadiska možno tieto laboratórne nálezy považovať za nevyhnutnú, dodatkovú informáciu ku komplexnému klinickému zhodnoteniu pacienta, či už z hľadiska ďalšieho terapeutického, diagnostického alebo diferenciálne diagnostického postupu a prijatia ďalších epidemiologických opatrení. V konkrétnych klinických situáciách môže ísť napr. o doplnenie molekulovo-diagnostických testov, epidemiologické opatrenia (izolácia, karanténa, zvýšená observácia, a i.), doplnenie rádiologického alebo CT vyšetrenia pľúc, doplnenie diagnostických vyšetrení, napr. hemokoagulácie, D-diméru (trombogénny potenciál COVID-19), diferenciálneho rozpočtu leukocytov (prí-

tomnosť lymfopénie môže poukazovať na stav imunitnej dysregulácie), zápalových markerov (CRP, interleukín-6, a i.), odkladu plánovanej chemoterapie, resp. rádioterapie u onkologických pacientov (táto záťaž by mohla vyvolať vzplanutie infekcie), a pod.

V štúdií sledované obdobie primoinfekcie koronavírusom bolo vhodným a jedinečným obdobím na takýto typ časového sledovania vývoja premorovania populácie, z ktorej časť tvoria i pacienti prichádzajúci do zdravotníckych zariadení, vrátane našej nemocnice. I keď sa prevalencia pozitivity v našom prieskume môže zdať vyššia, je treba podotknúť, že je to populácia výberová (s rizikovými faktormi) a nie populácia všeobecná.

Na aktuálnej prevalencii pozitivity špecifických protilátok voči SARS-CoV-2 ku koncu štúdie a zjavnému rozdielu voči kumulatívnej incidencii prípadov koronavírusovej infekcie detegovanej pomocou molekulovo-diagnostických metód možno usudzovať na početnosť prípadov so subklinickým priebehom, resp. tých, ktorým z rôznych dôvodov neboli vykonané molekulovo-diagnostické testy. Výsledky našej štúdie ukazujú, že kombinácia molekulovo-diagnostických testov a sérologického vyšetrenia špecifických protilátok môže výrazne zlepšiť diagnostickú účinnosť testovania, ako to deklarovali aj iní autori (Krammer a Simon, 2020). Z toho potom vyplývajú aj dôsledky pre klinickú prax, resp. pre prijímanie potrebných epidemiologických rozhodnutí. Sérologické testy sú preto integrálnou súčasťou testovacieho algoritmu, tak ako bol navrhnutý aj Americkou spoločnosťou infekčných chorôb (Infectious Diseases Society of America; L u et al., 2020).

ZÁVER

V práci sú analyzované dáta o vývoji sérovej prevalence reaktívnych protilátok typu IgM/IgG špecifických voči nukleokapsidovému antigénu vírusu SARS-CoV-2 v časovom období 21. týždňa 2020 až 7. týždňa 2021 prebiehajúcej pandémie, ktoré zahŕňa jej 1., 2. aj 3. vlnu. Protilátky boli vyšetované za pomoci diagnostickej súpravy Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 u ambulantných a hospitalizovaných pacientov nemocnice s vybranými skupinami diagnóz a zvýšeným rizikom (najmä pacienti s onkologickými, pľúcnymi chorobami a stavmi imunodeficiencie), V týždňových intervaloch boli porovnávané podiely pozitívnych záchytov reaktívnych protilátok (prevalencia) voči všetkým vyšet-

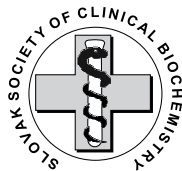
reným séram vybraných kategórií pacientov. Významný vzostup sérovej pozitivity zaznamenaný od 44. týždňa 2020 dosiahol ku koncu sledovania nárast na 35 až 47 %, čím kopíroval trend nárastu kumulatívnej incidencie prípadov infekcie diagnostikovanej RT-PCR metódami v regióne Nitra, ktorá ku koncu sledovania presiahla 7 %. Rozdiel medzi podielom zachytených jedincov molekulo-diagnostickými testami a podielom pacientov, ktorí skutočne prekonalí koronavírusovú infekciu (dôkaz pozitívnych sérových protilátok) je značný a dosiahol ku koncu obdobia 28–40 %. Práve u tejto skupiny pacientov s vyšším rizikom, ktorí infekciu prekonalí buď asymptomaticky, alebo z rôznych dôvodov neboli testovaní molekulo-diagnostickými testami, je pri ďalšom terapeutickom, diagnostickom alebo diferenciálne-diagnostickom postupe potrebná obozretnosť. Vyšetrenie prítomnosti špecifických protilátok na dôkaz prekonanej infekcie SARS-CoV-2 tak významne zvyšuje účinnosť diagnostického procesu, umožňuje prijať skoré epidemiologické opatrenia ako i prípadnú zmenu postupu v manažmente individuálneho pacienta, čím sa stáva základnou súčasťou integrovaného klinického a laboratórneho diagnostického algoritmu koronavírusovej infekcie.

LITERATÚRA

1. **Addeo, A., Obeid, M., Friedlaender, A. (2020):** COVID-19 and lung cancer: Risks, mechanisms and treatment interactions. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BMJ Publishing Group, p. 892. doi: 10.1136/jitc-2020-000892.
2. **Červený, J., Mišík, M., Šufliarsky, K. (2021):** Hospitalizácie počas pandémie SARS-CoV-2. Komentár o hospitalizáciach v súvislosti s koronavírusovou infekciou. Bratislava. Available at: https://www.health.gov.sk/Zdroje?/Sources/dokumenty/iza/Covid19_Komentar-k-hospitalizaciam_IZA_210223.pdf.
3. **Cucinotta, D., Vanelli, M. (2020):** WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomedica*. Mattioli 1885, pp. 157–160. doi: 10.23750/abm.v91i1.9397.
4. **Elecsys Anti-SARS-CoV-2. Cobas®:** Príbalový leták. 2021-02, V 4.0 Slovensky, 7s.
5. **European Commission (2020):** *EU recommendations for testing strategies 1 Testing of patients with acute respiratory infections or influenza-like illnesses in sentinel outpatient clinics and among patients admitted to sentinel hospitals with Severe Acute Respiratory Infections in order to assess virus circulation in the population* (18.03.2020). Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-Discharge-criteria.pdf>.
6. **Kittel, M. et al. (2021):** Specificity testing by point prevalence as a simple assessment strategy using the Roche Elecsys® anti-SARS-CoV-2 immunoassay. *International Journal of Infectious Diseases*, 105, pp. 632–638. doi: 10.1016/j.ijid.2021.02.024.
7. **Krammer, F., Simon, V. (2020):** Serology assays to manage COVID-19. *Science. American Association for the Advancement of Science*, pp. 1060–1061. doi: 10.1126/science.abc1227.
8. **Lippi, G. et al. (2020):** Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. De Gruyter, pp. 1156–1159. doi: 10.1515/cclm-2020-0473.
9. **Lu, H., Stratton, C. W., Tang, Y. W. (2020):** An evolving approach to the laboratory assessment of COVID-19. *Journal of Medical Virology*. John Wiley and Sons Inc., pp. 1812–1817. doi: 10.1002/jmv.25954.
10. **Marra, A. et al. (2021):** Seroconversion in patients with cancer and oncology health care workers infected by SARS-CoV-2. *Annals of Oncology*, 32(1), pp. 113–119. doi: 10.1016/j.annonc.2020.10.473.
11. **Miller, T. E. et al. (2020):** Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological COVID-19 diagnostics for patients presenting to the hospital. *FASEB Journal*, 34(10), pp. 13877–13884. doi: 10.1096/fj.202001700RR.
12. **Národné centrum zdravotníckych informácií. (2020):** *covid-19 Report. Počet pozitívne testovaných pacientov PCR testami na Slovensku* (07.03.2021). Available at: <https://covid-19.nczisk.sk/sk>.
13. **O médiách.com (11.03.2020):** *MIMORIADNA SPRÁVA: Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) práve prehlásila nový koronavírus za pandémiu*. Available at: <https://www.omeiach.com/strucne/17397-mimoriadna-sprava-svetova-zdravotnicka-organizacia-who-prave-prehlasila-novy-koronavirus-za-pandemiu>.
14. **Oran, D. P., Topol, E. J. (2020):** Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Annals of internal medicine*. NLM (Medline), pp. 362–367. doi: 10.7326/M20-3012.
15. **Rolston, K. V. I. (2017):** Infections in Cancer Patients with Solid Tumors: A Review. *Infectious Diseases and Therapy*. Springer Healthcare, pp. 69–83. doi: 10.1007/s40121-017-0146-1.
16. **Wolff, F. et al. (2020):** Monitoring antibody response follow-

ing SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(3). doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115140.

17. **Xu, X. et al. (2020):** Seroprevalence of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in China. *Nature Medicine*, 26(8), pp. 1193–1195. doi: 10.1038/s41591-020-0949-6.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 43–47

VZŤAH VYBRANÝCH PARAMETROV OXIDAČNÉHO STRESU K MORTALITE PACIENTOV S RÔZNYM STUPŇOM SYSTÉMOVEJ ZÁPALOVEJ REAKCIE ORGANIZMU

Ďurfinová, M.¹, Dobišová, A.², Koutun, J.², Yaghi, A.², Turecký, L.¹, Kuračka, Ľ.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava

²I. Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny LF UK a UNB, Bratislava

monika.durfinova@fmed.uniba.sk

SÚHRN

Ročne postihne sepsa na Slovensku 7–8 % obyvateľstva s mortalitou vyššou ako 50 %. Sepsa je život ohrozujúci stav organizmu, ktorý je spôsobený neprimeranou odpoveďou hostiteľa na infekciu a je častým dôvodom hospitalizácie pacienta na jednotke intenzívnej starostlivosti. Doterajšie štúdie poukazujú aj na významnú úlohu oxidačného stresu v patogenéze sepsy. V práci je popísaný pokles hladín MDA a aktivity SOD v plazme pacientov, ktorí prežili 10-dňovú hospitalizáciu na JIS, zatiaľ čo u pacientov s pozitívnou mortalitou tieto parametre stúpali. Zdá sa, že pri zvládnutí závažného poškodenia organizmu zohráva dôležitú úlohu fáza kritická pre rozvinutie ireverzibilných zmien v štruktúrach bunky s následným zlyhaním metabolických a funkčných procesov.

Kľúčové slová SIRS; sepsa; oxidačný stres; mortalita

ABSTRACT

Sepsis affects from 7 to 8 % of the Slovak population annually, with a mortality rate higher than 50 %. Sepsis is a life-threatening organ failure caused by an inadequate host response to infection and it is a common reason for

admitting patients to intensive care unit (ICU). Previous studies have also shown an important role of oxidative stress in the pathogenesis of sepsis. We observed decreased MDA levels and SOD activity in the plasma of patients who survived 10 days of hospitalization at ICU while the patients with positive mortality had increased levels of these parameters. The critical phase for the development of irreversible changes in cell structures with the consequent failure of metabolic and functional processes seems to play an important role in the management of severe damage to the organism.

Key words SIRS; sepsis; oxidative stress; mortality

ÚVOD

Sepsa je život ohrozujúca orgánová dysfunkcia spôsobená neprimeranou zápalovou odpoveďou organizmu na systémovú infekciu. Stala sa hlavnou príčinou úmrtnosti pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti (Vicent a kol., 2006). Riziko sepsy zvyšuje zápal pľúc, chronická obštrukčná choroba pľúc, diabetes, pankreatitída, ochorenia srdca a obličiek, alebo infekcia močových ciest. Sepsa sa často vyskytuje aj ako sprievodná komplikácia infekcií získaných počas chirur-

gických zákrokov v zdravotníckych zariadeniach. Napriek tomu, že mechanizmus vzniku ochorenia nie je úplne objasnený, existuje stále viac dôkazov o zapojení oxidačného stresu do patogenézy sepsy. Nerovnováha medzi tvorbou ROS a antioxidantnou ochranou organizmu vedie k poruchám vaskulárnej permeability, srdcovej nedostatočnosti, zhoršenému dýchaniu (M a n t z a r l i s a kol., 2017).

MATERIÁL A METÓDY

Predkladaná práca sa zaoberá zmenami parametrov oxidačného poškodenia lipidov a antioxidantnej obrany organizmu v sére pacientov počas 10-dňovej hospitalizácie na Klinike anesteziológie a intenzívnej medicíny LF UK a UNB v Bratislave. Protokol štúdie bol schválený etickou komisiou UNB v súlade s Helsinskou deklaráciou. Pacientom boli odobraté vzorky krvi: v deň prijatia pacienta, na 3., 5., 7. a 10. deň hospitalizácie a stanovené základné biochemické parametre na OKB a vybrané parametre oxidačného stresu a zápalu. Do projektu bolo zaradených 44 pacientov (Tab. 1), ktorí boli podľa rozsahu infekcie rozdelení do troch skupín: SIRS, sepsa a septický šok. Stanovené parametre boli porovnané aj vo vzťahu k 10-dňovej mortalite – negatívna mortalita verzus pozitívna mortalita.

Tab. 1. Demografická charakteristika pacientov

	SIRS	Sepsa	Septický šok
Vek	57±17	57±11	60±8
Muži/ženy	8/6	12/3	9/6
Počet	14	15	15

Hodnoty v tabuľke sú udané ako priemerná hodnota a smerodajná odchýlka

Koncentrácia malonyldialdehydu (MDA) bola stanovená spektrofotometricky na 96 jamkovej platničke pri 532 nm metódou podľa O h k a w a kol. (1979). Lipidové hydroperoxydy (LPO) boli stanovené spektrofotometricky 365 nm metódou podľa Jessup a kol. (1994). Aktivita superoxidizmutázy (SOD) bola vypočítaná ako percento inhibície rýchlosti tvorby formazánu, ktorý vzniká reakciou tetrazoliových solí so superoxidovým radikálom produkovaným počas syntézy kyseliny močovej z xantínu. Kyselina

močová (KM) a produkt jej oxidácie alantoín boli stanovené modifikovanou metódou HPLC s UV detekciou (254nm) podľa L u x a kol. (1992). Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bol použitý program StatsDirect Statistical Analysis Software 2.7.2 (Statsdirect, Birkenhead, UK). Výsledky sú udávané ako medián a interkvartilový rozptyl (Q1-Q3: 25–75 %). Shapiro-Wilkov test bol použitý na kontrolu distribúcie nameraných hodnôt. Štatistická významnosť bola stanovená Friedmanovým 2-faktorovým ANOVA neparametrickým testom a korelácia rovnakých parametrov medzi odlišnými skupinami bola posudzovaná Spearmanovým koeficientom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Patofyziológia sepsy zostáva stále neobjasnená a nejasná napriek prebiehajúcej intenzívnej základnej a klinickej výskumu v tejto oblasti. Niektoré mediátory patogenézy sa už poznajú a mnohé z nich sú považované za markery zápalového procesu s vysokou výpovednou hodnotou (napr. IL-6, TNF α , CRP, presepsín). Dôležitú úlohu v patogenéze sepsy však zohráva aj oxidačný stres. Kyslíkové radikály môžu pochádzať z orgánov poškodených hypoxiou (zvýšená hladina laktátu u všetkých sledovaných skupín pacientov), alebo sú produkované napr. aktivitou xantínoxidázy, ktorá sa vytvorí počas ischemie z pôvodnej xantíndehydrogenázy, ďalej to môže byť autooxidácia katecholamínov, metabolizmus kyseliny arachidónovej, ktorá sa uvoľňuje pôsobením fosfolipáz aktivovaných počas ischemie, ako aj z aktivovaných neutrofilov a krvných doštičiek. Nadmerná produkcia voľných radikálov počas sepsy spôsobuje poškodenie makromolekúl v bunkách, následne stratu ich biologickej funkcie až zánik bunky. Mierou poškodenia lipidových štruktúr sú uvoľnené produkty oxidácie vyšších karboxylových kyselín a ďalších vedľajších produktov.

U všetkých pacientov zaradených do štúdie boli v čase hospitalizácie pozorované zvýšené hladiny laktátu v plazme (Tab. 2), čo poukazuje na fakt, že hyperlaktatémia je významný marker závažnosti ochorenia a mortality kriticky chorých pacientov. V súlade so štúdiami, ktoré uvádzajú zvýšené riziko mortality pacientov pri koncentrácii laktátu > 2,5 mmol/l (G a r c i a - A l v a r e z a kol., 2014; W a c h a r a s i n t a kol., 2012), bola pozorovaná signifikantne vyššia hladina laktátu u pacientov so septickým šo-

Tab. 2. Niektoré biochemické a hematologické parametre stanovené v deň hospitalizácie

	SIRS	Sepsa	Septický šok	Referenčná hodnota
LEU [$\times 10^9/l$]	13,78 (7,84–20,01)	12,06 (7,99–14,54)	10,09 (3,69–17,28)	4–10 $\times 10^9/l$
TROM [$\times 10^9/l$]	200,50 (152,25–235,25)	270,00 (138,00–324,00)	201,00 (79,00–267,00)	150–420 $\times 10^9/l$
NEU [$\times 10^9/l$]	9,46 (4,68–15,28)	9,49 (6,01–12,42)	7,77 (3,61–13,41)	1,31–6,71 $\times 10^9/l$
Laktát [mmol/l]	5,26 (2,29–6,91)	4,27 (1,14–6,88)	3,87 (2,95–5,78)	0,5–2,2 mmol/l
Glukóza [mmol/l]	9,72 (8,23–12,73)	9,37 (6,45–15,83)	9,14 (6,06–13,05)	3,9–5,5 mmol/l
Kreatinín [$\mu\text{mol/l}$]	90,05 (80,58–122,65)	113,00 (52,80–202,80)	176,90 (109,90–235,20)**	59–104 $\mu\text{mol/l}$
Bilirubín [$\mu\text{mol/l}$]	6,11 (5,08–9,34)	11,40 (5,70–19,46)	11,40 (8,77–25,17)**	0–21 $\mu\text{mol/l}$
Albumín [g/l]	39,28 (32,27–41,70)*	29,79 (24,52–35,45)	24,56 (21,24–30,51)**	35–50 g/l
CRP [mg/l]	2,42 (0,64–5,73)*	134,73 (70,92–239,49)	269,25 (123,45–386,60)**	< 5 mg/l

Hodnoty v tabuľke sú udané ako medián a interkvartilový rozptyl (Q1–Q3: 25–75 %).

Štatistická významnosť bola stanovená Kruskal-Wallis neparametrickým testom;

* – signifikantné rozdiely sepsa vs SIRS, $p \leq 0,05$; ** – signifikantné rozdiely septický šok vs SIRS, $p \leq 0,05$

Tab. 3. Koncentrácie MDA a LPO v plazme

	SIRS	Sepsa	Septický šok	Referenčná hodnota
MDA [$\mu\text{mol/l}$]	3,71 (2,73–4,98)	2,91 (2,35–6,15)	5,22 (2,78–7,56)	2,16 \pm 0,29
LPO [mmol/l]	0,07 (0,05–0,09)	0,05 (0,04–0,14)	0,1 (0,07–0,19)	0,01 \pm 0,002

Hodnoty v tabuľke sú udané ako medián a interkvartilový rozptyl (Q1 Q3: 25–75 %)

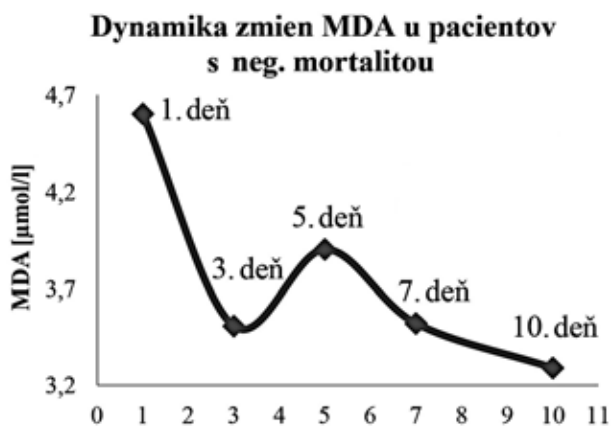
kom, ktorí neprežili 10-dňovú hospitalizáciu v porovnaní so skupinou s negatívnou mortalitou.

Zvýšené množstvo MDA v plazme pacientov (Tab. 3) s rôznymi formami sepsy (SIRS, sepsa, septický šok) je v súlade s literárnymi údajmi *L o r e n t e* a kol. (2013) a ukazuje sa ako prognostický parameter mortality pacientov so septickým šokom. Na tento fakt poukazujú zvýšené hladiny MDA u pacientov s pozitívnou mortalitou (Obr. 1) a ich nárast počas hospitalizácie. U pacientov so sepsou a septickým šokom bola zistená pozitívna korelácia medzi MDA a leukocytmí, čo poukazuje tiež na úlohu oxidačného stresu v patogenéze sepsy v kooperácii so zápalovou reakciou organizmu na infekť.

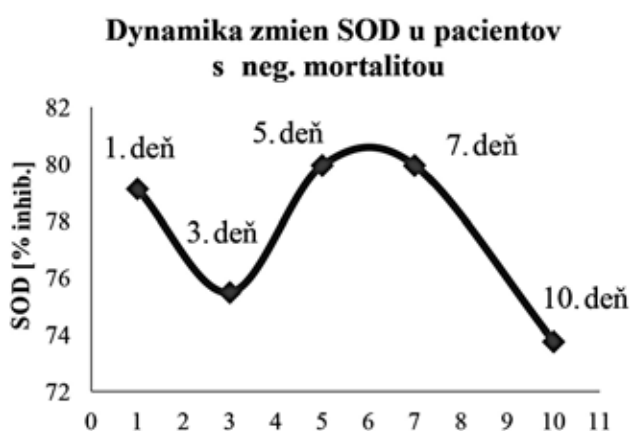
Hladina MDA v priebehu hospitalizácie klesala u pacientov, ktorí prežili. Naopak u pacientov s pozitívnou mortalitou bol medzi prvým a desiatym dňom hospitalizácie zaznamenaný takmer 3-násobný nárast MDA.

U pacientov so septickým šokom bola zaznamenaná vyššia aktivita SOD ako u skupín so sepsou a SIRS. Pomerne vysokú aktivitu SOD u pacientov možno pripísať zvýšenému počtu leukocytov, kde sa tento enzým nachádza. Vyššia aktivita SOD pri pozitívnej mortalite pacientov (Obr. 2) je v súlade s prácou *R i t t e r* a kol. (2003).

Kyselina močová (KM) je konečným produktom degradácie purínových nukleotidov. V organizme patrí medzi látky s antioxidantnými vlastnosťami, čo možno posúdiť



Obr. 1. Dynamika zmien MDA počas 10-dňovej hospitalizácie vzhľadom na mortalitu pacientov



Obr. 2. Dynamika zmien SOD počas 10-dňovej hospitalizácie vzhľadom na mortalitu pacientov

napr. mierou tvorby a vylučovania alantoínu tvoreného po eliminácii radikálov. Ale v podmienkach konverzie xantíndehydrogenázy na xantínoxidázu dochádza pri syntéze KM k tvorbe superoxidového radikálu. Signifikantne vyššia hladina KM bola zaznamenaná u skupiny pacientov so septickým šokom, čo je v súlade s prácou Giovanini a kol. (2006). Štatisticky významné zvýšenie alantoínu bolo zaznamenané u pacientov so sepsou a septickým šokom v porovnaní so SIRS. Hladina alantoínu bola signifikantne vyššia u pacientov s pozitívnou mortalitou v porovnaní s pacientami, ktorí prežili.

ZÁVER

Zvýšené hladiny parametrov oxidačného poškodenia lipidov u pacientov s rôznou formou sepsy poukazujú na účasť oxidačného stresu aj na patogenéze sepsy

a vzostup MDA počas hospitalizácie napriek rýchlej terapii na kritickosť rozpadu membránových štruktúr a ireverzibilitu patologických procesov sprevádzajúcich oxidačný stres. Signifikantne vyššie hladiny KM a alantoínu u pacientov so septickým šokom a štatisticky významné zníženie KM na piaty deň hospitalizácie poukazuje na zvýšenú intenzitu degradácie nukleotidov (aj následkom hypoxie tkanív), ale aj zapojenie kyseliny močovej do antioxidantnej obrany organizmu s jej oxidáciou na alantoín. U pacientov so septickým šokom koreloval vzostup laktátu s ich mortalitou. Niektoré parametre oxidačného stresu a zápalové markery by mohli byť vhodným indikátorom závažnosti septického stavu. Pre pokračovanie analýz navrhujeme rozšíriť súbor pacientov, analyzovaný súbor pacientov rozdeliť nielen podľa závažnosti stavu, ale aj podľa orgánového zdroja infekcie, resp. posúdiť vplyv terapie na sledované parametre.

POĎAKOVANIE

Autori ďakujú p. Viere Ujľakyovej za technickú pomoc pri experimentálnej časti práce a Mgr. Lenke Figurovej za vyhodnotenie a spracovanie výsledkov.

LITERATÚRA

1. **Garcia-Alvarez, M., Marik, P. and Bellomo, R. (2014):** Sepsis-associated hyperlactatemia. *Critical Care*. BioMed Central Ltd., p. 503. doi: 10.1186/s13054-014-0503-3.
2. **Giovannini, I. et al. (2006):** Serum uric acid, creatinine, and the assessment of antioxidant capacity in critical illness [1]. *Critical Care*. BioMed Central, p. 421. doi: 10.1186/cc5008.
3. **Jessup, W., Dean, R. T., Gebicki, J. M. (1994):** Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Methods in Enzymology*, 233(C), pp. 289–303. doi: 10.1016/S0076-6879(94)33032-8.
4. **Lorente, L. et al. (2013):** Prognostic Value of Malondialdehyde Serum Levels in Severe Sepsis: A Multicenter Study. *PLoS ONE*, 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0053741.
5. **Lux, O., Naidoo, D., Salonikas, C. (1992):** Improved HPLC method for the simultaneous measurement of allantoin and uric acid in plasma. *Annals of Clinical Biochemistry*, 29(6), pp. 674–675. doi: 10.1177/000456329202900611.
6. **Mantzaris, K., Tsolaki, V., Zakynthinos, E. (2017):** Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2017/5985209.
7. **Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979):** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), pp. 351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
8. **Ritter, C. et al. (2003):** Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Medicine*, 29(10), pp. 1782–1789. doi: 10.1007/s00134-003-1789-9.
9. **Vincent, J. L. et al. (1998):** Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Critical Care Medicine*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1793–1800. doi: 10.1097/00003246-199811000-00016.
10. **Wacharasint, P. et al. (2012):** Normal-range blood lactate concentration in septic shock is prognostic and predictive. *Shock*, 38(1), pp. 4–10. doi: 10.1097/SHK.0b013e318254d41a.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 48–52

VITAMÍN D V ÚLOHE REPARÁCIE DNA SENESCENTNÝCH BUNIEK POŠKODENÝCH PEROXIDOM VODÍKA

Koňariková, K.¹, Janubová, M.¹, Muchová, J.¹, Ďuračková, Z.¹, Žitňanová, I.¹

¹Ústav Lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava

katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

SÚHRN

V rámci našich experimentov sme sa zamerali na sledovanie protektívnych účinkov vitamínu D na senescentné (starnúce) bunky MRC-5 v pasáži 21 (p21) a nesenescentné (mladé) bunky v pasáži 8 (p8) pred a po poškodení peroxidom vodíka.

MTT testom sme zistili, že vitamín D zvýšil prežívanie buniek p8 nad 100 % v koncentrácii 20 $\mu\text{mol/L}$ a 25 $\mu\text{mol/L}$. V prípade buniek p21 vitamín D zvýšil prežívanie buniek nad 100 % v koncentrácii 10 $\mu\text{mol/L}$ a 25 $\mu\text{mol/L}$. Tieto zvýšenia však neboli signifikantné.

Následne sme sledovali vplyv vitamínu D na poškodenie DNA buniek indukované peroxidom vodíka a zistili sme, že vitamín D vykazuje nielen protektívny, ale aj reparačný účinok. Tento účinok bol signifikantný v koncentráciách 1, 10, 20, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$.

Kľúčové slová: starnutie; vitamín D; ľudské fibroblasty; protektívny účinok; DNA

ABSTRACT

In our experiments we focused on monitoring the protective effects of vitamin D on senescent MRC-5 cells

at passage 21 (p21) and non-senescent cells at passage 8 (p8) before and after hydrogen peroxide damage.

By MTT test we found that vitamin D increased the survival of p8 cells above 100 % at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ and 25 $\mu\text{mol/L}$. In the case of p21 cells, vitamin D increased cell survival above 100 % at a concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 25 $\mu\text{mol/L}$. However, these increases were not significant.

Subsequently, we monitored the effect of vitamin D on hydrogen peroxide-induced DNA damage in cells and found that vitamin D has not only a protective but also a repair effect. This effect was significant at concentrations of 1, 10, 20, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$.

Key words: aging; vitamin D; human fibroblasts; protective effect; DNA

ÚVOD

V súčasnosti sa mnoho štúdií venuje účinkom vitamínu D na ľudské zdravé, ale aj nádorové bunky v podmienkach in vitro (C a l d e r, K e w, 2002). Oxidačný stres a nedostatok vitamínu D vedú k mnohým zápalovým reakciám, ktoré majú na bunky a následne na celý ľudský organizmus, fatálne následky (P f e f f e r a kol., 2008).

Úloha vitamínu D v prevencii a liečbe chorôb spojených so starnutím nie je ešte dobre preštudovaná, a preto s objavom receptorov vitamínu D v nervovom, kardiovaskulárnom a endokrinnom systéme sa jeho úloha i vplyv na tieto systémy stala dôležitou oblasťou výskumu. Starší ľudia sú vystavení riziku nižšej hladiny vitamínu D v dôsledku jeho zníženej syntézy v koži, ako aj nižšieho príjmu stravou. V súčasnosti prebiehajú viaceré klinické štúdie, ktoré zisťujú prínos doplnku vitamínu D pri prevencii a liečbe rôznych ochorení (M e e h a n, P e n c k o f e r, 2014).

Nedostatok vitamínu D je zdravotný problém, ktorý významne ovplyvňuje zdravie starších. Hoci nové štúdie preukázali sľubné výsledky týkajúce sa úlohy vitamínu D v súvislosti s rôznymi ochoreniami kostí a kardiovaskulárneho systému, rakoviny a imunitného systému, tieto zistenia sú nekonzistentné a v súčasnosti nie je možné vyvodiť nijaké jednoznačné závery (N e w b e r r y a kol., 2014).

Adekvátna hladina vitamínu D môže byť tiež prospešná pri udržiavaní integrity DNA. Túto úlohu vitamínu D možno rozdeliť na primárnu funkciu, ktorá zabraňuje poškodeniu DNA, a na sekundárnu funkciu, ktorá reguluje rýchlosť rastu buniek. Suplementácia vitamínu D redukuje 8-hydroxy-2'-deoxyguanozín, marker oxidačného poškodenia (F r a g a a kol., 1990) znižuje poškodenie oxidačným stresom a chromozomálnych aberácií, preventívne pôsobí na skrátene telomér a inhibuje aktivitu telomeráz. Sekundárna funkcia vitamínu D pri prevencii poškodenia DNA zahŕňa reguláciu aktivity poly-ADP-ribóza polymerázy v odpovedi na poškodenie DNA, ktorá sa podieľa na detekcii lézií DNA. Vitamín D je tiež schopný regulovať bunkový cyklus, čím bráni replikácii poškodenej DNA a reguluje apoptózu (N a i r - S h a l l i k e r a kol., 2012).

Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť protektívne účinky vitamínu D na senescentné bunky MRC-5 v pasáži 21 (p21) a nesenescientné bunky v pasáži 8 (p8) pred a po poškodení peroxidom vodíka.

METÓDA

Bunkové línie

Ľudské pľúcne fibroblasty MRC-5 boli kultivované pri 37°C, 5% CO₂ v médiu MEM (Minimum Essential Media), ktoré obsahovalo L-glutamín, neesenciálne aminokyseliny, 10% fetálne sérum a 5% ATB (antibiotiká), staticky

v Petriho miske. Bunky boli získané z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

MTT test

Kontrolné a vitamínom D ovplyvnené bunky sme nasadili do 96 jamkovej sterilnej platničky a kultivovali pri 37 °C, 5 % CO₂ po dobu 24 h. Po skončení kultivácie sme zliali kultivačné médium prevrátením platničky a do každej jamky napipetovali 0,1 mL média obsahujúceho MTT (5 mg MTT soli rozpustíme v 1 mL PBS (Phosphate Buffered Saline) a uchováme pri 4 °C v tme, prefiltrujeme cez filter a riedime v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) v pomere 1 : 10). Prikryté platničky sme kultivovali v termostate 3,5 hod. pri 37 °C. Po tejto dobe sme médium opäť zliali a pridali extrakčný roztok (100 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) v objeme 0,1 mL na jamku. Po 10 min. inkubácii pri laboratórnej teplote sme merali absorbanciu pri 490 nm.

Comet assay

Kométovej test slúži na určenie genotoxického účinku testovanej látky, t.j. určenie priamych, resp. oxidačných zlomov na molekule DNA vplyvom danej látky (C o l l i n s a kol., 1996). Po zdrsnení povrchu podložných sklíčok 1% roztokom NMP (Normal Melting Point) agarózy sme naniesli prvú vrstvu gélu, 100 µL 1 % NMP agarózy. Potom sme si pripravili bunkovú suspenziu o koncentrácii 1,5–2 x 10⁵ buniek/mL riedením v PBS. 1 mL takto pripravenej suspenzie sme preniesli do ependorfky a scentrifigovali 5 min. pri 134 g. Sediment sme rozsuspendovali v príslušnom objeme 0,75 % LMP (Low Melting Point) agarózy a 85 µL s počtom buniek 2–2,5 x 10⁴ buniek na sklíčko sme naniesli na prvú vrstvu gélu. Potom sme bunky lyzovali 60 min. v kvetách s lyzujúcim roztokom (2,5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L TRIS) s prídavkom Tritonu X-100 (0,05 %). Po prebehnutí lýzy sme sklíčka vybrali a nechali odkvapkať a potom dvakrát premyli Fpg tlmivým roztokom (40 mmol/L HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)); 0,1 mol/L KCl; 0,5 mmol/L Na₂EDTA; 0,2 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin solution) pH 7,4). Následne prebehla inkubácia 30 min. s enzýmom (Fpg (Formamidopyrimidine DNA Glycosylase), 50 µL), potom odvíjanie DNA. Sklíčka sme uložili do elektroforetickej nádoby, zaliali elektroforetickým roztokom (5 mol/L NaOH, 0,2 mol/L Na₂EDTA, H₂O, pH > 13) a nechali odvíjať 40 min. Po skončení odvíjania DNA

sme uskutočnili elektroforézu, ktorá prebiehala 30 min. pri 300 mA a 25 V. Po ukončení elektroforézy sme sklíčka vybrali z elektroforetickej nádoby, vložili ich do kyviet a zaliali neutralizačným roztokom (0,4 mol/L TRIS, H₂O). Po 10 min. sme neutralizačný roztok vymenili, postup opakovali dvakrát. Po skončení neutralizácie sme sklíčka z kyviet opatrne vybrali a nechali odkvapkať. Nasledovalo farbenie DNA fluorescenčným farbivom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a fluorescenčná mikroskopická analýza pri zväčšení 800x.

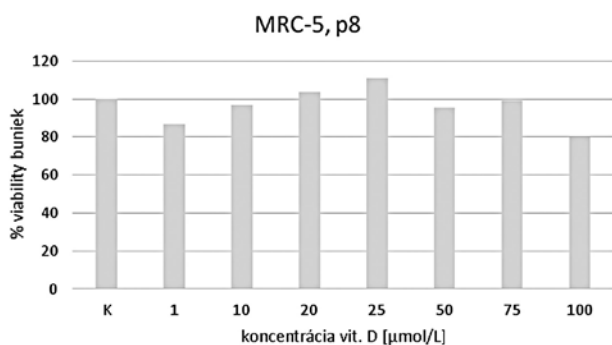
Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Namerané údaje sme vyjadrili ako priemer ±SD (štandardná odchýlka). Na porovnanie štatistických rozdielov získaných hodnôt v experimentálnych vzorkách sme použili nepárový študentov t-test, kde $p^* < 0,05$.

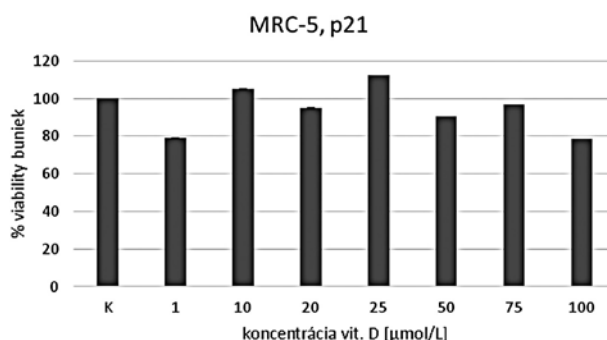
VÝSLEDKY

Sledovali sme účinok vitamínu D na rast fibroblastov MRC-5 v pasáži 21 (senescentné bunky p21) a v pasáži 8 (nesenescentné bunky p8) po ich ovplyvnení rôznymi koncentraciami vitamínu D (1; 10; 20; 25; 50; 75; 100 μmol/L) pred a po poškodení 30 % peroxidom vodíka.

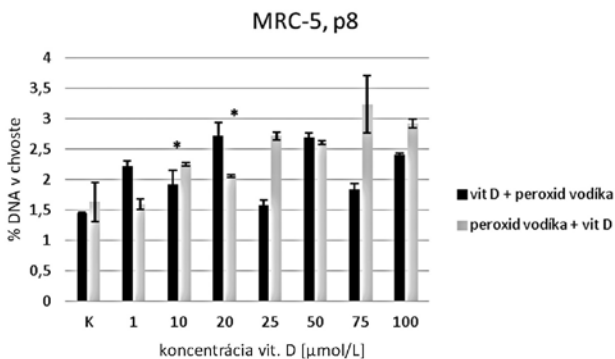
V prvom kroku sme vyhodnocovali percento viability buniek pomocou MTT testu. Bunky boli kultivované 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂. Následne sme ich ovplyvnili vybranými koncentraciami vitamínu D a nechali 24 h kultivovať. Po tomto čase sme vymenili médium a bunky nechali rásť do 72 h inkubácie. Po zmeraní absorbancie sme vyhodnotili percento viability buniek, pričom nás zaujímal nárast nad hodnotu kontroly (bez ovplyvnenia vitamínom D), ktorú sme považovali za 100 %. Kontrolným bunkám sme po 48 h kultivácie vymenili médium tak ako v prípade kultivácie s vitamínom D, aby sme zachovali rovnaké podmienky.



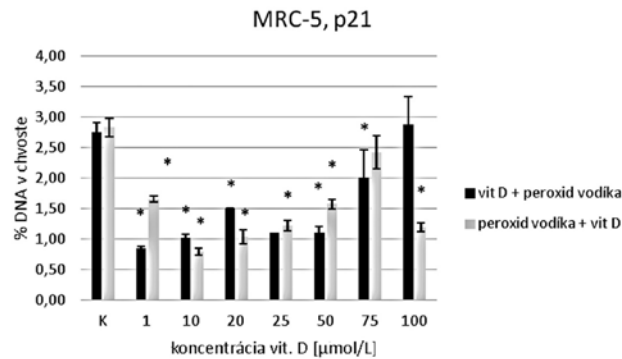
Obr. 1. Percento viability buniek MRC-5 v pasáži 8 po ovplyvnení vitamínom D počas 24 h kultivácie



Obr. 2. Percento viability buniek MRC-5 v pasáži 21 po ovplyvnení vitamínom D počas 24 h kultivácie



Obr. 3. Poškodenie DNA buniek MRC-5 v pasáži 8 ovplyvnených rôznymi koncentraciami vitamínu D pred a po poškodení peroxidom vodíka; * $p < 0,05$



Obr. 4. Poškodenie DNA buniek MRC-5 v pasáži 21 ovplyvnených rôznymi koncentraciami vitamínu D pred a po poškodení peroxidom vodíka; * $p < 0,05$

Zistili sme, že vitamín D zvýšil prežívanie nesenescentných buniek p8 nad 100 % v koncentrácii 20 $\mu\text{mol/L}$ 1,03-krát a v koncentrácii 25 $\mu\text{mol/L}$ 1,11-krát (Obr. 1). V prípade buniek p21 (Obr. 2) vitamín D zvýšil prežívanie buniek nad 100 % v koncentrácii 10 $\mu\text{mol/L}$ 1,04-krát a v koncentrácii 25 $\mu\text{mol/L}$ 1,12-krát. Tieto zvýšenia však neboli významné.

V druhom kroku nás zaujímal podiel poškodenia DNA buniek MRC-5 ovplyvnených vitamínom D pred a po poškodení peroxidom vodíka. Bunky boli kultivované 24 h pri 37 °C a 5 % CO_2 . Následne sme ich ovplyvnili vybranými koncentráciami vitamínu D a nechali 24 h kultivovať. Po 24 h inkubácie s vitamínom D sme bunky poškodili 30 % peroxidom vodíka 30 min. Metódou comet assay sme detegovali percento DNA v chvoste kométy.

V prípade buniek MRC-5 v pasáži 8 vitamín D pridaný pred poškodením peroxidom vykazuje najvýraznejší protektívny účinok v koncentrácii 25 $\mu\text{mol/L}$ (1,58 % DNA v chvoste kométy) v porovnaní s vitamínom D pridaným po poškodení peroxidom vodíka (2,72 % DNA v chvoste kométy). Podobný efekt sme pozorovali aj pri koncentráciách 10, 75 a 100 $\mu\text{mol/L}$ (Obr. 3).

Rovnako sme postupovali aj pri bunkách MRC-5 v pasáži 21, teda senescentnými bunkami (Obr. 4). Vitamín D vykazoval na bunky významný protektívny aj regeneračný účinok. Najvýraznejší efekt sme pozorovali pri koncentrácii 1, 10, 20, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ pred a po poškodení buniek peroxidom vodíka. Zaujímavý účinok vitamínu D sme pozorovali pri najvyššej použitej koncentrácii 100 $\mu\text{mol/L}$, kde v prípade ovplyvnenia vitamínom D a následnom poškodení buniek peroxidom vodíka, ale v opačnom prípade, a teda po poškodení buniek peroxidom a následnom pridaní vitamínu D sme zaznamenali významný pokles poškodenia DNA.

DISKUSIA

V našej práci sme sledovali účinok vitamínu D na ľudské zdravé fibroblasty MRC-5 s cieľom zistiť jeho proliferatívne, protektívne resp. reparačné účinky. Na porovnanie sme využili bunky v pasáži 8 (nesenescentné) a v pasáži 21 (senescentné). Výsledky MTT testu (Obr. 1 a 2) naznačujú, že použité koncentrácie vitamínu D významne neovplyvňovali viabilitu buniek ani v pasáži 8, ani senescentných buniek v pasáži 21. Mnohí autori sledovali

účinky vitamínu D v súvislosti s ovplyvnením proliferácie, s dôrazom na signálne dráhy. Songyang a kolektív sledovali schopnosť inhibovať proliferáciu, inváziu a metastázovanie buniek karcinómu pľúc A549 a NCI-H1975 a schopnosť indukovať apoptózu. Autori potvrdili účinok vitamínu D signálnou cestou PI3K/AKT/mTOR (Songyang a kol., 2021). Dráha PI3K/AKT/mTOR je intracelulárna signálna dráha zapojená do mnohých biologických procesov, ako je bunková proliferácia a apoptóza, angiogenéza a metabolizmus glukózy aj v zdravých bunkách (Xie a kol., 2019). Cesta je iniciovaná väzbou extracelulárnych rastových faktorov na transmembránové receptorové tyrozínkinázy (RTK), ako je EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Chin, Toker, 2010), na ktorej sa aktivuje fosfatidylinozitol 3-kináza (PI3K) a následne aktivuje serín/treonínovú proteínkinázu B (PKB/AKT). To vedie k serínovej a/alebo treonínovej fosforylácii radu následných substrátov, ktorými sú často kináza/fosfatázy alebo iné signálne molekuly sprostredkujúce rôzne bunkové biológie (Nair-Shaliker a kol., 2012). Práve dysregulácia tejto cesty je spojená s vývojom mnohých ľudských chorôb a k zvýšenej aktivácii môže dôjsť prostredníctvom niekoľkých mechanizmov, vrátane inaktivácie negatívnej regulačnej fosfatázy a tenzínového homológu (PTEN) a aktivačných mutácií a génovej amplifikácie génu kódujúceho PIK3CA (Pars, Ringel, 2008). Na základe týchto poznatkov a súvislostí signálnych dráh, ktoré je vitamín D schopný ovplyvniť v nádorových bunkách, sme ďalej sledovali schopnosť vitamínu D ochrániť, resp. reparať DNA pred alebo po poškodení buniek p8 a p21 peroxidom vodíka metódou comet assay v zdravých bunkách MRC-5. Látky, ktoré regulujú reparačné dráhy sa zameriavajú na reguláciu cez AKT signálny proteín, keďže AKT je kľúčová efektorová serínová/treonínová kináza v receptorovej tyrozínkinázovej/fosfatázovej a tenzínovej homológnej/fosfo-inozitol 3-kinázovej dráhe a riadi nespočetné množstvo bunkových funkcií (Liu a kol., 2014).

AKT priamo reaguje na poškodenie DNA a jeho opravy. Kométovou metódou sme pozorovali významný pokles poškodenia DNA pri koncentrácii 1, 10, 20, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ pred a po poškodení buniek peroxidom vodíka. Z literatúry je známy opravný mechanizmus DNA cez PARP, poly (ADP-ribózy) polymerázy, ktoré majú schopnosť katalyzovať prenos ADP-ribózy na cieľové proteíny. PARP hrá dôležitú úlohu v rôznych bunkových procesoch vrátane modulácie štruktúry chromatinu, transkripcie, replikácie, rekombi-

nácie a opravy DNA (Morales a kol., 2014), preto sa naše ďalšie experimenty zamerajú na sledovanie hladiny PARP metódou western blot v bunkách p21 ovplyvnených koncentráciami so významným účinkom, pred a po poškodení peroxidom vodíka.

ZÁVER

Záverom môžeme konštatovať, že vitamín D neovplyvnil prežívanie buniek v pasáži 8 a 21 v nami použitých koncentráciách. Avšak vykazuje na senescentné bunky (p21) nielen protektívne, ale aj reparačné účinky, ktoré dokážu tieto bunky ochrániť pred poškodením peroxidom vodíka. Získané údaje sú dobrým základom pre ďalší výskum v oblasti molekulárnej biológie.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola finančne podporená grantom EU z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014 a grantom VEGA 1/0314/19.

LITERATÚRA

1. Calder, P. C. and Kew, S. (2002): The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*. doi: 10.1079/bjn2002682.
2. Chin, Y. R. and Toker, A. (2010): The Actin-Bundling Protein Palladin Is an Akt1-Specific Substrate that Regulates Breast Cancer Cell Migration. *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.031.
3. Collins, A. R. et al. (1996): Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*. doi: 10.1289/ehp.96104s3465.
4. Fraga, C. G. et al. (1990): Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.87.12.4533.
5. Liu, Q. et al. (2014): Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy. *Neuro-Oncology*. doi: 10.1093/neuonc/nou058.
6. Meehan, M. and Penckofer, S. (2014): The Role of Vitamin D in the Aging Adult. *Journal of Aging and Gerontology*. doi: 10.12974/2309-6128.2014.02.02.1.
7. Morales, J. C. et al. (2014): Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006875.
8. Nair-Shalliker, V., Armstrong, B. K., Fenech, M. (2012): Does vitamin D protect against DNA damage? *Mutation Research—Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2012.02.005.
9. Newberry, S. J. et al. (2014): Vitamin D and Calcium: A Systematic Review of Health Outcomes (Update). *Evidence report/technology assessment*. doi: 10.23970/AHRQEPERTA217.
10. Paes, J. E. and Ringel, M. D. (2008): Dysregulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Thyroid Neoplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. doi: 10.1016/j.ecl.2008.01.001.
11. Pfeffer, P. E. et al. (2018): Effects of Vitamin D on inflammatory and oxidative stress responses of human bronchial epithelial cells exposed to particulate matter. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0200040.
12. Songyang, Y. et al. (2021): Effect of vitamin D on malignant behavior of non-small cell lung cancer cells. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2020.145309.
13. Xie, Y. et al. (2019): PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Molecular Medicine Reports*. doi: 10.3892/mmr.2018.9713.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 53–57

VPLYV AKÚTNEHO STRESU A NANOČASTÍC USPIONS NA AKTIVITU KATALÁZY NORMOTENZNÝCH A SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÝCH POTKANOV

Laubertová L.¹, Žitňanová I.¹, Bališ P.², Bernátová I.², Dvořáková M.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava

²Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV
Bratislava

monika.dvorakova@fmed.uniba.sk

SÚHRN

Ultra malé superparamagnetické nanočastice oxidov železa (USPIONS) vďaka svojim fyzikálno-chemickým vlastnostiam majú veľký potenciál použitia v rôznych biomedicínskych a klinických aplikáciách. Niekoľko štúdií však popisuje, že podávanie rôznych nanočastíc oxidov železa, zvyčajne používaných ako kontrastné látky, môžu vyvolať oxidačný stres. Ich interakcie s biomakromolekulami sa však zriedka študovali a to najmä v podmienkach akútneho stresu. Keďže oxidačný stres zohráva významnú úlohu v patogenéze hypertenzie, je preto potrebné dôkladne poznať všetky mechanizmy, ktoré úzko súvisia s používaním nanočastíc v medicínskych aplikáciách. Táto štúdia bola navrhnutá za účelom sledovania vplyvu akútneho stresu a USPIONS na aktivitu katalázy v erythrocytoch normotenzných (WKY) a spontánne hypertenzných (SHR) potkanov.

Kľúčové slová: kataláza; akútny stres; superparamagnetické nanočastice oxidov železa; USPIONS; hypertenzia

ABSTRACT

Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (USPIONS) have a great potential for use in a variety of biomedical and clinical applications due to their physico-chemical properties. Several studies have reported that the administration of various iron oxide nanoparticles, commonly used as contrast agents, can cause oxidative stress. However, interactions between them have rarely been studied, especially in conditions of acute stress. Because oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of hypertension, it is therefore necessary to understand thoroughly all the mechanisms that are closely related to the use of nanoparticles in medical applications. This study was designed to monitor the effect of acute stress and USPIONS on catalase activity in erythrocytes of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats.

Key words: catalase; acute stress; superparamagnetic iron oxide nanoparticles; USPIONS; hypertension

ÚVOD

Hypertenzia je najčastejším zdravotným problémom vo vyspelých krajinách. Neliečená hypertenzia vedie k mnohým degeneratívnym ochoreniam, vrátane infarktu myokardu, zlyhania srdca, mŕtvice, ochorenia periférnych artérií a je aj príčinou chronického ochorenia obličiek (P e d r o - B o t e t a kol., 2000). Čoraz viac dôkazov potvrdzuje, že antioxidantný stres zohráva rozhodujúcu úlohu v patogenéze hypertenzie, ale mechanizmy prispievajúce k zvýšenej produkcii reaktívnych metabolitov kyslíka (ROS) pri hypertenzii nie sú dostatočne objasnené (A m i r k h i z i a kol., 2010). Reaktívne metabolity kyslíka (ROS) majú vo vaskulárnych redoxných systémoch u pacientov s hypertenziou rôznu úlohu, čo naznačuje, že pre lepšie pochopenie hypertenzie je potrebné brať do úvahy zložitú redoxných systémov v rôznych priestorových spektrách (A h m a d a kol., 2013). Pritom je nevyhnutné sa zaoberať aj samotným vplyvom rôznych endogénnych a exogénnych faktorov, ktorým je pacient s hypertenziou vystavený pri rôznych diagnostických vyšetreniach.

V posledných rokoch sú rôzne nanočastice oxidov železa objektom viacerých štúdií, najmä kvôli ich vlastnostiam využiteľným v biomedicíne. V biomedicínskych aplikáciách sa používajú najčastejšie ako kontrastné látky pri magnetickej rezonancii (R o c h e t t a kol., 2013). Problém pri použití rôznych typov nanočastíc oxidov železa v biomedicínskych aplikáciách môže predstavovať ich potenciálna toxicita a schopnosť zvyšovať oxidačný stres (W i l k i n s o n a kol., 2012).

Oxidačný stres je často spájaný s viacerými biochemickými, fyziologickými a patofyziologickými dejmi. Schopnosť nanočastíc zvyšovať oxidačný stres je najčastejšie prisudzovaná najmä ich schopnosti prispievať k tvorbe ROS (M a n k e a kol., 2013). Netreba však zabúdať na obranný antioxidantný systém zahrňujúci antioxidantné enzýmy, ako je superoxidodismutáza, glutatiónpoxidáza a kataláza, ktoré majú schopnosť eliminácie ROS vrátane superoxidového aniónu a peroxidu vodíka (M i c h i e l s a kol., 1994).

Ultra malé superparamagnetické nanočastice oxidov železa (USPIONS). sú syntetické častice maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) alebo magnetitu (Fe_3O_4) s veľkosťou jadra medzi 10 nm a 100 nm, pričom magnetit je zmesou oxidov FeO a Fe_2O_3 . Nanočastice USPIONS sú obalené polyetylén glykolom (PEG), ktorý zabezpečuje ich stabilitu a biokompatibi-

litu, zlepšuje ich distribúciu a znižuje ich vychytávanie mononukleárnym fagocytárnym systémom (W a h a j u d d i n a kol., 2012).

Úlohou tejto štúdie bolo sledovať vplyv akútneho stresu a ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidov železa (USPIONS) na aktivitu katalázy, jedného z antioxidantných enzýmov v erythrocytoch normotenzných (WKY) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR).

Laboratórne zvieratá

V štúdiu boli použité normotenzné potkany (WKY, Wistar Kyoto) a spontánne hypertenzné potkany (SHR—spontaneously hypertensive rats) z firmy Velaz s. r. o., Česká republika. WKY potkany boli použité ako kontrola k sledovaniu vplyvu rôzneho fenotypu na daný parameter. WKY a SHR potkany (12 až 16 týždňov staré) boli kŕmené granulovaným krmivom vyrábaným firmou Altromin, konkrétne zmesou 1320-variant P, so zníženým obsahom fytoestrogénov, s obsahom železa 192,51 mg/kg zmesi a mali voľný a neobmedzený prístup ku krmivu a vode. Potkany boli držané v štandardných podmienkach s pravidelným striedaním svetla a tmy (12/12 h). Všetky potkany mali implantované katétre do karotickej artérie pre meranie krvného tlaku a do jugulárnej vény pre infúzne podávanie nanočastíc vo fyziologickom roztoku alebo samotného fyziologického roztoku. Kanylácia bola urobená v celkovej anestéze izofluranom (3 %) deň pred samotným experimentom, v prítomnosti látky meloxicam (2 mg/kg hmotnosti tela) na prevenciu pooperačnej bolesti. Všetky experimenty boli schválené štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR.

Model akútneho stresu

Akútny stres bol u laboratórnych zvierat navodený metódou air-jet (prúd vzduchu do hornej časti hlavy potkana) podľa modifikovaného protokolu (N a k a m o t o a kol., 2007). V našich pokusoch sme použili 5 s prúd vzduchu 10 min pred, 10 a 75 min po podaní USPIONS.

Testované nanočastice

Ultra malé superparamagnetické nanočastice oxidov železa (USPIONS) (Sigma-Aldrich, UK) boli pokusným zvieratám podávané intravenózne počas 10 min infúzie do jugulárnej vény. Nanočastice magnetitu (Fe_3O_4) o veľkosti jadra 30 nm (1 mg Fe/ml) boli obalené biokompatibilným obalom z polyetylén glykolu. Po 100 minútach od ich po-

dania bola zvieratám odobraná krv a následne boli zvieratá dekapitované v bezvedomí po krátkej narkóze CO₂.

Rozdelenie laboratórnych zvierat a dizajn experimentu

V každej testovanej skupine bolo 6–8 laboratórnych zvierat. Podrobný dizajn experimentu je uvedený v Tab. 1.

Rozdelenie laboratórnych zvierat do podskupín s rôznym fenotypom (WKY a SHR):

Kontrola – potkanom bol infundovaný iba fyziologický roztok.

Stres – potkanom bol infundovaný fyziologický roztok a boli vystavené akútnemu stresu.

USPIONs – potkanom boli infundované USPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti.

USPIONs + stres – potkanom boli infundované USPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti a boli vystavené akútnemu stresu.

METÓDY

Aktivita katalázy (CAT) v erytrocytoch bola stanovená v lyzátoch erytrocytov komerčným kitom (Cayman Chemical Company, USA).

Na štatistickú analýzu bol použitý štatistický softvér StatsDirect 3, verzia 3.2.109. (StatsDirect® Ltd., UK). Hladina významnosti bola definovaná ako $P < 0,05$. Údaje sú uvedené ako priemer \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Normalita bola analyzovaná Shapiro-Wilk testom. Keďže sa jednalo o normálnu distribúciu hodnôt bola následne použitá analýza rozptylu (ANOVA). Rozdiel medzi kontrolami v jednotlivých fenotypových skupinách bol analyzo-

vaný pomocou One-way ANOVA testu s použitím Bonferroni post hoc testu. Rozdiely medzi podskupinami boli analyzované pomocou Two-way ANOVA testu s použitím Bonferroni post hoc testu. Na detekciu variácií medzi skupinami alebo v rámci vnorených podskupín bola použitá Fully Nested Random ANOVA.

VÝSLEDKY

V skupine potkanov WKY nedošlo k signifikantným zmenám v aktivite CAT v erytrocytoch medzi podskupinami. Akútny stres, USPIONs a kombinácia akútneho stresu a USPIONs nemali žiadny vplyv na aktivitu CAT v erytrocytoch.

V skupine potkanov SHR mali podskupiny vystavené kombinácii akútneho stresu a USPIONs signifikantne vyššiu aktivitu CAT v porovnaní s kontrolnou podskupinou (SHR-C vs. SHR-S + U, $P = 0,0051$) a v porovnaní s podskupinou vystavenou iba akútnemu stresu (SHR-S vs. SHR-S + U, $P = 0,0098$). Akútny stres nemal žiadny vplyv na aktivitu CAT v porovnaní s kontrolou.

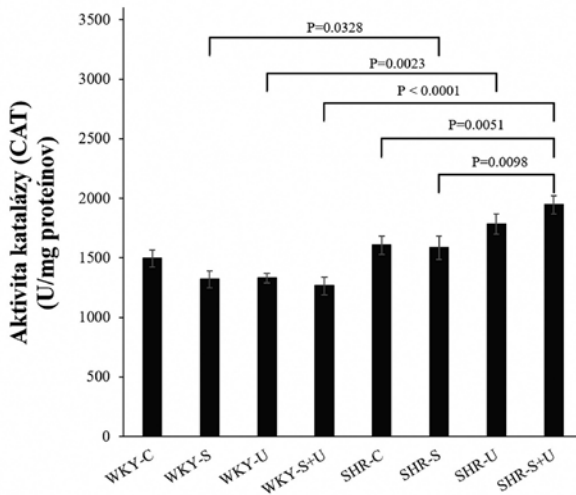
Medzi kontrolnými podskupinami s odlišným fenotypom (WKY-C vs. SHR-C) nedošlo k významnej zmene aktivity CAT v erytrocytoch.

Signifikantné zvýšenie aktivity CAT sme zistili v podskupinách SHR v porovnaní s podskupinami WKY s rovnakou expozíciou (WKY-S vs. SHR-S, $P = 0,0328$; WKY-U vs. SHR-U, $P = 0,0023$; WKY-S + U vs. SHR-S + U, $P \leq 0,0001$).

Vo fenotypových skupinách potkanov WKY a SHR bola štatisticky významná asociácia v aktivite CAT medzi skupinami a podskupinami ($P < 0,0001$, $P = 0,0116$).

Tab. 1. Dizajn experimentu

Skupina	Stabilizácia 20-30 min	5 s	Stabilizácia 10 min	10 min i.v. infúzia	Stabilizácia 10 min	5 s	Stabilizácia 70 min	5 s	Stabilizácia 10 min
Kontrola				Fyziol. roz.					
Stres		Air-jet		Fyziol. roz		Air-jet		Air-jet	
USPIONs				SPIONs					
USPIONs+ Stres		Air-jet		SPIONs		Air-jet		Air-jet	



Obr. 1. Vplyv akútneho stresu, USPIONs a ich kombinácie na aktivitu katalázy (CAT) v erythrocytoch normotenzných Wistar-Kyoto (WKY) a spontánne hypertenzných (SHR) potkanov

C (Kontrola) – potkanom WKY, resp. SHR bol podaný fyziologický roztok v dávke 1 ml/kg telesnej hmotnosti; **S (Akútny stres)** – potkanom WKY, resp. SHR bol podaný fyziologický roztok v dávke 1 ml/kg telesnej hmotnosti a boli vystavené akútnemu stresu; **U (USPIONs)** – potkanom WKY, resp. SHR bol podaný USPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti; **U+S (USPIONs + akútny stres)** – potkanom WKY, resp. SHR bol podaný USPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti a bol vystavený akútnemu stresu. Hodnoty sú udané ako priemer \pm SEM

DISKUSIA

Oxidačný stres je spôsobený nerovnováhou medzi tvorbou oxidantov a antioxidantným obranným systémom, zahŕňajúcim enzýmové, ako aj neenzýmové antioxidanty (Ahmada kol., 2013). Práve oxidačnému stresu sa pripisuje hlavná úloha v mechanizme zodpovednom za vznik a rozvoj hypertenzie (Baradaran kol., 2014). Preto je dôležité sa v prevencii, ako aj liečbe hypertenzie zamerať na zabránenie vzniku a zníženie vplyvu oxidačného stresu, práve elimináciou negatívnych vplyvov vyvolaných rôznymi endogénnymi a exogénnymi faktormi.

Ultra malé superparamagnetické nanočastice oxidov železa USPIONs sú v súčasnosti často študované. V našej štúdií, dávka USPIONs podávaná laboratórnym zvieratám predstavovala ekvivalent dávky, ktorá je používaná v klinickej praxi. Kombinácia USPIONs s akútnym stresom bola zvolená kvôli faktu, že pacienti sú počas intravenózne aplikácie kontrastnej látky, ako aj v dôsledku svojho ochorenia, tak aj samotného vyšetrenia vystavení stresu, ktorý následne môže ovplyvniť fyziologické a biochemické procesy v organizme (Stefánsson kol., 2011).

Pri porovnaní kontrolnej normotenznej WKY a kontrolnej hypertenznej SHR podskupiny potkanov sme ne-

zaznamenali signifikantné zmeny v aktivite katalázy (CAT). Viaceré práce sa zameriavali na štúdium vzťahu medzi hypertenziou a aktivitou antioxidantných enzýmov, avšak výsledky týchto štúdií boli značne protichodné a sú neustále predmetom diskusií (Amirkhizi a kol., 2010).

Signifikantné zvýšenie aktivity CAT sme pozorovali u v hypertenznej podskupine SHR potkanov vystavených kombinácii akútneho stresu a USPIONs v porovnaní s kontrolnou SHR podskupinou. Taktiež sme zaznamenali signifikantné zvýšenie aktivity CAT v SHR podskupine vystavenej kombinácii akútneho stresu a USPIONs v porovnaní s podskupinou vystavenou len stresu. Pritom samotný akútny stres alebo USPIONs nevyvolal zmeny v aktivite CAT. Domnievame sa, že práve súčinnosť oboch faktorov spôsobila sledované zmeny, pričom môže ísť o samotné zvýšenie aktivity CAT alebo indukciu expície tohoto enzýmu. Napriek tomu, že kontrolné podskupiny s rôznym fenotypom nevykazovali signifikantné rozdiely v aktivite CAT, pri porovnaní ostatných podskupín s rôznym fenotypom, ale rovnakou expíciou, sme zaznamenali signifikantné zvýšenie aktivity sledovaného enzýmu. Akútny stres v kombinácii s USPIONs pravdepodobne indukoval tvorbu ROS. Keďže samotná hypertenzia je charakteristická zvýšenou produkciou ROS, miera produkcie ROS vyvolala intenzívnejšie antioxidantné obranné mechanizmy, ktoré sa prejavili na zvýšení aktivity CAT (Madiamala a kol., 2007; Palmer a kol., 1995).

V skupine normotenzných potkanov sme nezaznamenali žiadne zmeny v aktivite CAT. Vzhľadom ku kratšej expícinej dobe sledovaných faktorov je možné predpokladať, že v prípade ich vplyvu na vznik oxidačného stresu, neenzýmová ako aj enzýmová obrana bola postačujúca na elimináciu oxidačných procesov bez zmeny aktivity antioxidantných enzýmov. Antioxidantná obrana v živých systémoch pôsobí na mnohých úrovniach, pričom antioxidantné enzýmy predstavujú prvú úroveň (Ifford a kol., 2017). Viaceré štúdie zistili, že aj dĺžka expíciie nanočasticami je veľmi podstatným faktorom (Arapetants, 1997; Park a kol., 2014). Okrem tohto faktoru zohráva podstatnú úlohu použitá koncentrácia a stabilita použitých nanočastíc, ako aj stabilita ich povrchov (Nqvi a kol., 2010).

Naše výsledky potvrdzujú zistenia viacerých *in vivo* a *in vitro* štúdií, ktoré popisovali nízku mieru toxicity rôznych typov nanočastíc oxidov železa (Jeng a kol., 2006; Karlsson a kol., 2009; Kim a kol., 2006). Výsledky

tejto štúdie ponúkajú nové otázky ohľadne mechanizmov, ktoré indukovali zvýšenie aktivity katalázy u hypertenzných jedincov, ako aj účinku dlhodobšieho vplyvu testovaných nanočastíc na organizmus, ktoré majú veľký potenciál byť súčasťou biomedicínskych aplikácií.

POĎAKOVANIE:

Táto práca vznikla na základe finančnej podpory grantu APVV-16-0263.

LITERATÚRA

1. **Ahmad, A. et al. (2013):** The role of the endogenous antioxidant enzymes and malondialdehyde in essential hypertension. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. doi: 10.7860/JCDR/2013/5829.3091.
2. **Airapetyants, M. G. (1997):** A novel concept concerning participation of cerebral hypoxia in pathogenesis of neuroses. *Zhurnal Vyshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I. P. Pavlova*, 47(2), pp. 412–416.
3. **Amirkhizi, F. et al. (2010):** Assessment of antioxidant enzyme activities in erythrocytes of pre-hypertensive and hypertensive women. *Journal of Research in Medical Sciences*, 15(5), pp. 270–278.
4. **Baradaran, A., Nasri, H. and Rafieian-Kopaei, M. (2014):** Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences*, 19(4), pp. 358–367.
5. **Ighodaro, O. M. and Akinloye, O. A. (2018):** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
6. **Jeng, H. A. and Swanson, J. (2006):** Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health—Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. doi: 10.1080/10934520600966177.
7. **Karlsson, H. L. et al. (2009):** Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.014.
8. **Kim, J. S. et al. (2006):** Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*. doi: 10.1093/toxsci/kfj027.
9. **Manke, A., Wang, L. and Rojanasakul, Y. (2013):** Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/942916.
10. **Medina-Lezama, J. et al. (2007):** Prevalence and patterns of hypertension in Peruvian Andean Hispanics: the PREVENTION study. *Journal of the American Society of Hypertension*. doi: 10.1016/j.jash.2007.02.003.
11. **Michiels, C. et al. (1994):** Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/0891-5849(94)90079-5.
12. **Nakamoto, M. et al. (2007):** Azelnidipine attenuates cardiovascular and sympathetic responses to air-jet stress in genetically hypertensive rats. *Hypertension Research*. doi: 10.1291/hypres.30.359.
13. **Naqvi, S. et al. (2010):** Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*. doi: 10.2147/IJN.S13244.
14. **Palmer, A. et al. (1995):** Risk factors for ischaemic heart disease and stroke mortality in young and old hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension*, 9(8), pp. 695–697.
15. **Park, Y. C. et al. (2014):** Effect of PEG molecular weight on stability, T2 contrast, cytotoxicity, and cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.04.027.
16. **Pedro-Botet, J. et al. (2000):** Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*. doi: 10.1038/sj.jhh.1001034.
17. **Rochette, L. et al. (2013):** Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.07.004.
18. **Stefánsson, B. V., Haraldsson, B. and Nilsson, U. (2011):** Acute oxidative stress following intravenous iron injection in patients on chronic hemodialysis: A comparison of iron-sucrose and iron-dextran. *Nephron—Clinical Practice*. doi: 10.1159/000321645.
19. **Wahajuddin, S. A. (2012):** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*. doi: 10.2147/IJN.S30320.
20. **Wilkinson, K. et al. (2012):** Visualization of custom-tailored iron oxide nanoparticles chemistry, uptake, and toxicity. *Nanoscale*. doi: 10.1039/c2nr32572a.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 58–62

IDENTIFIKÁCIA RÔZNYCH DRUHOV *LACTOBACILLUS SPECIES* POMOCOU MALDI-TOF ANALÝZY V ROZVINUTOM ZUBNOM KAZE

Ohlasová, J.¹, Ohlasová, D.², Kmeť, V.³, Timková, S.¹, Tomečková, V.⁴

¹I. stomatologická klinika LF UPJŠ a UNLP, Košice

²Klinická mikrobiológia, Nemocnica Poprad a. s., Poprad

³Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

⁴Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ, Košice

vladimira.tomeckova@upjs.sk

SÚHRN

Cieľom tejto experimentálnej štúdie bolo odobrať vzorky kariézného dentínu a identifikovať v týchto extrahovaných vzorkách patogény rodu *Lactobacillus*, ktoré majú význam v neskorších rozvinutejších štádiách zubného kazu pomocou modernej netradičnej diagnostickej metódy MALDI-TOF. V ústnej dutine pacientov boli identifikované s vysokým zastúpením nové typy patogénnych kmeňov *Lactobacillus paracasei* zodpovedných za vznik a progres zubného kazu tvrdých zubných tkanív, a ďalej boli diagnostikované aj ďalšie menej zastúpené druhy ako napr. ako *Lactobacillus kitasatonis* DSM 16761T alebo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus* a *Lactobacillus gallinarum* s veľmi podobnými ťažko rozlíšiteľnými vzormi, ktorý je typický pre rod *Lactobacillus*.

Kľúčové slová: MALDI-TOF analýza; *Lactobacillus*; baktérie ústnej dutiny; zubný kaz

ABSTRACT

The aim of this experimental study was to collect samples of carious dentine and to identify in these extracted samples pathogens of the *Lactobacillus* group,

which are important in the later advanced stages of dental caries using the modern non-traditional diagnostic method MALDI-TOF. In the oral cavity of patients, new types of pathogenic strains of *Lactobacillus paracasei* responsible for the formation and progression of dental caries of hard dental tissues were identified with a high proportion, but also other less represented species were analyzed such as *Lactobacillus kitasatonis* DSM 16761T or *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus* and *Lactobacillus gallinarum* with very similar difficult-to-distinguish patterns that are typical of the genus *Lactobacillus*.

Key words: MALDI-TOF analysis; *Lactobacillus*; oral bacteria; tooth decay

ÚVOD

Všetky mäkké a pevné povrchové štruktúry sú v ústnej dutine pokryté pelikulou, ktorá je osídlená baktériami a tvoria spolu zubný plak. Na zloženie zubného plaku má vplyv strava, zloženie slín, rozpadnuté bunky epitelu, mŕtve mikróby, gingiválna tekutina alebo exsudát (B a t h l a, 2011).

Tvorba plaku má 3 stupne (D i g e l a kol., 2020). V pri-

márnom štádiu sa glykoproteíny slín adsorbujú na povrch skloviny a vytvárajú pelikulu. Viaceré patogénne baktérie v ústnej dutine sa viažu na aglutinín, amylázu, fibrinogén, fibronektín, kolagén alebo mucíny pelikuly pomocou špecifických adhezínov. V počiatočných štádiách tvorby plaku in vivo sa podieľajú rôzne baktérie napr. *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Rothia* spp. a iné (Heller a kol., 2016).

Pri sekundárnej kolonizácii je bežný výskyt selektívnych mikroorganizmov pelikuly napr. *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema* spp. a iných (Espinoza a kol., 2018), ktoré sa podieľajú na tvorbe komplexnej extracelulárnej matrix pozostávajúcej zo sekretovaných proteínov, lipidov, exopolysacharidov, extracelulárnej DNA a amyloidných štruktúr (Koo, Falsetta, Klein, 2013). Po 6 hodinách po jedle je v zubnom plaku detegovaných viac ako 90 rôznych baktérií, ktoré tvoria medzidruhovú koexistujúcu spoločnosť (Palmer a kol., 2017; Digel a kol., 2020).

V treťom stupni mikroorganizmy tvoria viaceré spoločnosti vo vrstvách, kde sa uskutočňuje ich výživové kríženie a koordinovaný metabolizmus komplexných substrátov. Nárast hrúbky povlaku je výsledkom kontinuálneho rastu baktérií a množenia a neustálej adhérencie k povrchom povlakov. Baktérie v ústnej dutine regulujú expresiu faktorov virulencie, napríklad génová expresia virulencie *Streptococcus mutans* sú modulované prítomnosťou špecifických orálnych baktérií, ako je *Streptococcus oralis* alebo *Lactobacillus casei* (Wena kol., 2010), ktoré sú významné v neskorších rozvinutejších štádiách zubného kazu.

Cieľom tejto experimentálnej štúdie je identifikovať patogény rodu *Lactobacillus* z extrahovaného kariézneho dentínu, pomocou modernej diagnostickej metódy MALDI-TOF.

MATERIÁL A METÓDY

Štúdia zahŕňala vzorky (n = 10) odobratého kariézneho dentínu s rozvinutou kariéznou léziou z okluzálnych a aproximálnych kavít v trvalej dentícii po exkavácii štandardnými rotačnými inštrumentami (zubným vrtákom diamantovým a tvrdokovovým). V extrahovaných vzorkách kariézneho dentínu (n = 10) boli na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat v Košiciach, Slovenskej Akadémie vied analyzované a identifikované konkrétne druhy bakteriálnych kmeňov *Lactobacillus* sp. pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). Hmotnostná spektrometria umožňuje merať jedinečný proteínový fingerprint prítomných mikroorganizmov. Konkrétne, softvér MALDI Biotyper, Bruker Taxonomy, analyzuje proteíny, ktoré majú veľký výskyt vo všetkých mikroorganizmoch. Charakteristické vzory týchto vysoko sa vyskytujúcich proteínov sa používajú na spoľahlivú a presnú identifikáciu konkrétneho typu mikroorganizmu. Typ mikroorganizmu je identifikovaný pomocou porovnania príslušného vzoru proteínového fingerprintu prítomného mikroorganizmu so vzormi uloženými v on line svetových databázach NCBI (Národné Centrum pre Biotechnologické Informácie), ktoré poskytuje prístup k biomedicínskym a genomickým informáciám a pomáha tak v oblasti vedy a zdravia.

VÝSLEDKY

V ústnej dutine pacientov boli identifikované MALDI-TOF analýzou s vysokou pravdepodobnosťou (Tab. 1) nové typy patogénnych kmeňov *Lactobacillus paracasei* (Tab. 2) zodpovedných za vznik a progres zubného kazu tvrdých zubných tkanív v ústnej dutine pacientov.

Tab. 1. Význam hodnoty skóre

Rozsah	Popis	Symboly	Farba
2,300–3,000	Vysoko pravdepodobná identifikácia typu	(+++)	zelená
2,000–2,299	Spoľahlivá identifikácia rodu, pravdepodobná identifikácia typu	(++)	zelená
1,700–1,999	Pravdepodobná identifikácia rodu	(+)	žltá
0,000–1,699	Nespoľahlivá identifikácia	(-)	červená

Tab. 2. Identifikované typy rodu *Lactobacillus*

Poradie kvality	Zhodný vzor <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp.	Hodnota skóre	NCBI identifikátor
1 (++)	Paracasei 2649 DSM	2,106	47714
2 (++)	Paracasei 20244 DSM	2,092	47714
3 (++)	Paracasei 20258T DSM	2,084	113557
4 (++)	Paracasei 20006 DSM	2,029	47714
5 (+)	Paracasei 20020 DSM	1,992	47714
6 (+)	Paracasei 8742 DSM	1,971	47714
7 (+)	Paracasei 46331 DSM	1,927	47714
8 (+)	Paracasei 20008 DSM	1,902	47714
9 (+)	Paracasei 8741 DSM	1,89	47714
10 (+)	Paracasei 5457 DSM	1,736	47714

Tab. 3. Identifikované typy rodu *Lactobacillus*

Poradie kvality	Zhodný vzor	Hodnota skóre	NCBI identifikátor
1 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 20244 DSM	1,494	47714
2 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 20008 DSM	1,475	47714
3 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 8742 DSM	1,464	47714
4 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 2649 DSM	1,418	47714
5 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 20006 DSM	1,415	47714
6 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Tolerans DSM 20258T DSM	1,383	113557
7 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 5622T DSM	1,373	47714
8 (-)	<i>Lactobacillus kitasatonis</i> DSM 16761T DSM <i>Acidophilus/Amylovorus/Gallinarum</i> ssp.	1,344	237446
9 (-)	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. Paracasei DSM 8741 DSM	1,325	47714
10 (-)	<i>Lactobacillus perolens</i> DSM 12745 DSM	1,309	100468

Ďalej boli analyzované aj menej zastúpené druhy ako napr. ako *Lactobacillus kitasatonis* DSM 16761T (Tab. 3), ktoré obsahovali aj *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus* a *Lactobacillus gallinarum* s veľmi podobnými ťažko rozlíšiteľnými vzormi, ktoré je typický pre rod *Lactobacillus*.

DISKUSIA

Tvorba kazu je dynamický proces. V ústach dochádza k opakovanej demineralizácii a remineralizácii v dôsledku zvyšovania a znižovania pH. Normálne sliny regulujú rast patologických baktérií. Počas tvorby plakov normálna

bakteriálna flóra v ústach premieňa všetky zložky potravy. Škroby a bielkoviny sú polyméry, ktoré majú minimálny vplyv na rast plakov. Sliny tvoria tlmivé roztoky, ktoré udržiavajú stále pH plaku, a tak zabraňujú tvorbe zubného kazu. Normálne tieto vápenaté a fosfátové ióny dopĺňajú sliny, a preto konzumácia sacharózy nespôsobuje zubný kaz priamo, ale častá a vysoká konzumácia sacharózy spôsobuje nerovnováhu v tvorbe mikrobiálnych spoločenstiev zubného plaku na povrchu zuba, čo vedie k vzniku zubného kazu (S t e r z e n b a c h a kol., 2020).

Demineralizácia závisí od koncentrácie kariogénnych baktérií, typu stravy a frekvencie konzumácie sacharózy, viskozity a tlmiacej kapacity slín, koncentrácie minerálov v štruktúre skloviny a dentínu, *Streptococcus mutans* zlepšujú adhéziu na povrch zubov tak, že štiepia sacharózu pomocou glukozyltransferáz na lepkavý extracelulárny glukózový polymér na báze dextransu známeho ako polysacharid (glukán), ktorý im umožňuje koherenciu a podporuje tvorbu plaku. Lepkavé polyméry na povrchu zubov sa zachytávajú o zubné otvory, praskliny v zuboch a kontaktné body medzi zubami (A b r a n c h e s, Z e n g, K a j f a s z, 2018).

Sacharóza ako disacharid s nízkou molekulovou hmotnosťou sa rýchlo metabolizuje invertázou streptokokových baktérií, ktorá štiepia sacharózu na glukózu a fruktózu. V podmienkach nadmerného množstva sacharidov a obmedzenia kyslíka majú streptokoky tendenciu redukovat' pyruvat' na kyselinu mliečnu. Akumulácia kyseliny mliečnej a zníženie pH plaku pod kritickú hodnotu (5,5 pH pre hydroxyapatit; 4,5 pH pre fluorapatit; 6,7 pH pre cement), rozpustí sklovinu a uvoľňuje vápnik a fosfáty obsiahnuté v hydroxyapatite v takom rozsahu, že remineralizácia nie je možná, pretože pri pH nižšom ako 5 a častej konzumácii sacharózy sa zuby demineralizujú a rozpustia (A b r a n c h e s, Z e n g, K a j f a s z, 2018).

Zníženie tvorby slín, zníženie pH, umožňuje množenie baktérií, ktoré tvoria rôzne kyseliny (kyselinu octovú, propionovú a mravčiu). Baktérie *Streptococcus mutans* sú aktívnejšie pri pH 5,0 v porovnaní s inými baktériami (A b r a n c h e s, Z e n g, K a j f a s z, 2018).

Uprednostňuje sa rast laktobacilov v kaze, ktoré sú najúčinnnejšie pri tvorbe plaku v dentíne. Druhy *Lactobacillus* spp. patria do skupiny baktérií mliečneho kvasenia, ktoré premieňajú laktózu laktázou na galaktózu a glukózu, ktorú ďalej metabolizujú na kyselinu mliečnu (A h i r w a r, G u p t a, S n e h i, 2019).

Existuje mnoho diagnostických metód na identifikáciu orálnych anaeróbných baktérií. Konvenčné metódy mikrobiologickej identifikácie sú ťažkopádne a časovo náročné. Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je vysoko citlivá a špecifická metóda, je však nákladná. Väčšina citovaných štúdií využívala na identifikáciu rôznych typov baktérií *Lactobacillus* spp. rôzne molekulárne metódy, vrátane PCR. Tieto metódy sú nákladné, náročné na prácu, identifikácia jednotlivých typov trvá dlhšie a týmito metódami nie je možné určiť všetky anaeróbne druhy (D i c k s o n, R i g g i o, M a c p h e r s o n, 2005).

ZÁVER

Včasná a presná detekcia potenciálnych patogénov zubných povlakov je nevyhnutná, aby sa zabránilo zubnému kazu, prípadne paradentóze. Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF je novou experimentálnou metódou v diagnostike baktérií zubného povlaku (S r i v a s t a v a, S a h a, S a h u, 2020). V ústnej dutine pacientov identifikovala veľmi presne vysoké zastúpenie nových typov patogénnych kmeňov *Lactobacillus paracasei* zodpovedných za vznik a progres zubného kazu tvrdých zubných tkanív. Táto metóda je veľmi rýchla (trvá 15 minút) a je veľmi presná, pretože využíva identifikáciu proteómu baktérií. Priemerná cena za test je tiež veľmi nízka v porovnaní s konvenčnými metódami bakteriálnej identifikácie, čím je táto experimentálna metóda perspektívna v blízke budúcnosti a môže nahradiť konvenčné metódy.

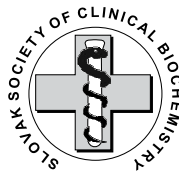
PodĎakovanie

Túto prácu podporil grant VEGA 1/0333/20.

LITERATÚRA

1. **Abranches, J. et al. (2018):** Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum*. doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018.
2. **Singh Ahirwar, S. et al. (2019):** Dental Caries and *Lactobacillus*: Role And Ecology in the Oral Cavity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 4818 IJPSR*. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(11).4818-29.

3. **Bathla, S. C. (2011):** Dental Plaque. In *Periodontics Revisited*, 1e edn. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, p. 544. doi: 10.5005/jp/books/11320_9.
4. **Dickson, E. M., Riggio, M. P. and Macpherson, L. (2005):** A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1099/jmm.0.45770-0.
5. **Espinoza, J. L. et al. (2018):** Supragingival plaque microbiome ecology and functional potential in the context of health and disease. *mBio*. doi: 10.1128/mBio.01631-18.
6. **Heller, D. et al. (2016):** Microbial diversity in the early in vivo-formed dental biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.03984-15.
7. **Koo, H., Falsetta, M. L., Klein, M. I. (2013):** The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/0022034513504218.
8. **Palmer, R. J. et al. (2017):** Interbacterial adhesion networks within early oral biofilms of single human hosts. *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.00407-17.
9. **Sterzenbach, T. et al. (2020):** Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clinical Oral Investigations*. doi: 10.1007/s00784-020-03646-1.
10. **Srivastava, A., Saha, S., Sahu, C. (2020):** Early and accurate detection of bacterial isolates from dental plaque in subjects with primary, mixed, and permanent dentition by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry technique. *Journal of Indian Society of Periodontology*. doi: 10.4103/jisp.jisp_303_19.
11. **Wen, Z. T. et al. (2010):** Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiology*. doi: 10.1186/1471-2180-10-111.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 63–67

HLADINY LIPOPEROXIDOV V SLINÁCH A V PLAZME PRI SYNDRÓME OBŠTRUKČNÉHO SPÁNKOVÉHO APNOE

Žitňanová, I.¹, Hlucháčňová, A.², Janubová, M.¹, Koňariková, K.¹
Klobučníková, K.³, Šiarnik, P.^{*3}, Kollár, B.³

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava

²Neurologická klinika SZU a UNB, Bratislava

³I. neurologická klinika LF UK a UNB, Bratislava

palo.siarnik@gmail.com

SÚHRN

Syndróm obštrukčného spánkového apnoe (OSA) je charakterizovaný opakovanou hypoxiou a následnou reoxygenáciou počas spánku, čo vedie ku vzniku oxidačného stresu a následnej peroxidácii lipidov. Predložená práca stanovuje hladiny biomarkera peroxidácie lipidov u pacientov s OSA a u kontrol a porovnáva tieto hladiny zistené v plazme a v slinách s cieľom nájsť alternatívne, neinvazívne médium na sledovanie oxidačného stresu. Zistili sme signifikantne zvýšené hladiny lipidových parametrov v plazme (okrem HDL) u dobrovoľníkov s OSA oproti kontrolám, ako aj hladín lipoperoxidov v slinách aj v plazme, ktoré navzájom vykazovali signifikantnú koreláciu.

Naše výsledky poukazujú na existenciu zvýšeného oxidačného stresu u jedincov s OSA, ako aj na porušený metabolizmus lipidov u týchto pacientov. Signifikantná korelácia medzi lipoperoxidmi v plazme a slinách naznačuje, že na stanovenie markerov oxidačného stresu môžeme použiť aj iné médium ako plazmu, a to sliny.

Kľúčové slová: obštrukčné spánkové apnoe; oxidačný stres; lipoperoxidy

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea syndrome (OSA) is characterized by repeated episodes of hypoxia and subsequent reoxygenation during sleep, leading to oxidative stress and lipid peroxidation. The present work determines levels of the lipid peroxidation biomarker in patients with OSA and in controls and correlates these levels found in plasma and saliva in order to find an alternative, non-invasive medium for monitoring oxidative stress. We found significantly elevated plasma lipid parameters (excluding HDL) in OSA volunteers compared to controls, as well as salivary and plasma lipoperoxide levels, which showed a significant correlation. Our results suggest the existence of increased oxidative stress in individuals with OSA as well as impaired lipid metabolism. The significant correlation between lipoperoxides in plasma and saliva suggests that in addition to plasma also saliva can be used as a medium for determination of markers of oxidative stress.

Key words: obstructive sleep apnea; oxidative stress; lipoperoxides

ÚVOD

Obštrukčné spánkové apnoe (OSA) je porucha, ktorá vedie k metabolickým abnormalitám a zvýšenému kardiovaskulárnemu a cerebrovaskulárnemu riziku (Š i a r n i k a kol., 2020; Y a r d i m - A k a y d i n a kol., 2013; T o m o r i a kol., 1999). Je charakterizovaná obštrukciou horných dýchacích ciest s opakovanými pauzami v dýchaní počas spánku so znížením saturácie krvi kyslíkom. Často opakovaná hypoxia a následná reoxygénácia počas spánku vedie k vzniku oxidačného stresu a k produkcii reaktívnych foriem kyslíka, ktoré sa môžu podieľať na vzniku cievneho poškodenia a endotelovej dysfunkcii (P a s s a l i a kol., 2015). Voľné radikály produkované vo zvýšenej miere počas oxidačného stresu môžu poškodzovať makromolekuly vrátane lipidov (napr. membrán) a spôsobovať ich peroxidáciu. Produktom a zároveň markerom peroxidácie lipidov sú lipoperoxidy (A l z o g h a i b i, B a H a m m a m, 2005).

Krv sa všeobecne považuje za najvhodnejšiu analytickú telesnú tekutinu na hodnotenie systémových procesov. Avšak odber krvi je invazívny proces a pre mnohých pacientov nepríjemná skúsenosť. Naproti tomu odber slín je v porovnaní s odberom krvi jednoduchý a neinvazívny. Sliny majú veľkú úlohu v homeostáze ústnej dutiny, pretože stabilizujú jej ekosystém. Slinné žľazy majú bohatú vaskulatúru, z ktorej sa sliny filtrujú a následne ďalej spracovávajú. Zložky prítomné v slinách môžu pochádzať buď zo slinných žliaz, alebo môžu byť získané z krvi pasívnou difúziou alebo aktívnym transportom (C h i a p p i n a kol., 2007). Aj keď existujú informácie o jednotlivých biomarkeroch v slinách, ich korešpondencia s hladinami v krvi sa u jednotlivých biomarkerov veľmi líši a doposiaľ bolo publikovaných málo informácií o hladinách rôznych biomarkerov v tomto type vzorky.

Táto štúdia je zameraná na porovnanie oxidačného stresu u pacientov s OSA a kontrolných jedincov a hľadanie alternatívneho, neinvazívne získaného média pre monitorovanie oxidačného stresu.

MATERIÁL A METODIKA

16 zdravých dobrovoľníkov (priemerný vek $30,4 \pm 5,7$ rokov) a 15 pacientov s polysomnograficky potvrdenou spánkovou poruchou dýchania (priemerný vek $41,1 \pm$

$12,2$ rokov) poskytlo do štúdie vzorky krvnej plazmy a sliny skoro ráno po nočnom hladovaní. Exklúznym kritériom bolo u pacientov akékoľvek iné známe chronické ochorenie, užívanie akejkoľvek medicíny a nikotinizmus. Štúdia bola schválená etickou komisiou Lekárskej fakulty Univerzity Komenského. Dobrovoľníci zahrnutí do štúdie podpísali informovaný súhlas s projektom.

Plazma

Vzorky krvi (5 ml) s antikoagulantom EDTA (etyléndiamíntetraoctová kyselina) boli centrifugované po dobu 5 min. pri $1200 \times g$ a $4^\circ C$. Plazma bola uskladnená pri $-80^\circ C$ a použitá na stanovenie lipoperoxidov.

Sliny

Nestimulované sliny (2 ml) sa odobrli účastníkom štúdie do skúmavky. Dobrovoľníci boli poučení, aby dve hodiny pred odberom slín nefajčili, neumývali si zuby, nejedli a nepili. Vzorky slín sa centrifugovali pri $3000 \times g$ a $4^\circ C$ po dobu 10 minút. Získané supernatanty boli uskladnené pri $-80^\circ C$ a použité na stanovenie lipoperoxidov.

Stanovenie lipoperoxidov v slinách a plazme

Stanovenie lipoperoxidov podľa E I - S a a d a n i a kol. (1989) je založené na schopnosti peroxidov oxidačne premieňať jodid (I^-) na jód (I_2). I_2 v reakčnej zmesi následne reaguje s nadbytkom I^- za vzniku I_3^- , ktorého absorpčné maximum je pri 365 nm. Prítomnosť lipoperoxidov sa dokazuje v biologických vzorkách spektrofotometricky. Skrátený postup stanovenia lipoperoxidov upravený pre ELISA platničky je nasledovný: Na stanovenie lipoperoxidov v plazme sme použili detekčný roztok, ktorého zloženie je uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Detekčný roztok stanovenia lipoperoxidov v plazme (E I - S a a d a n i a kol., 1989)

KI	$0,12 \text{ mol.L}^{-1}$
KH_2PO_4	$0,2 \text{ mol.L}^{-1}$
Molybdenan amónny tetrahydrát	$10 \mu\text{mol.L}^{-1}$
Azid sodný	$0,15 \text{ mmol.L}^{-1}$
Igepal	2 mL.L^{-1}
Alkylbenzyl dimetylamónium chlorid (benzalkonium chlorid)	$0,1 \text{ g.L}^{-1}$

Do jamiek ELISA platničiek sme napipetovali 20 µl plazmy (20 µl vody pre slepú vzorku), ku ktorej sme pridali 200 µl detekčného činidla. Vzorky sme pipetovali aspoň v troch paralelkách. Platničku sme dôkladne premiešali na trepačke a nechali inkubovať 30 min na ľade. Následne sme platničku opäť premiešali na trepačke a odmerali absorbanciu jednotlivých jamiek pri vlnovej dĺžke 365 nm (HumaReader HS, Wiesbaden, Germany). Koncentráciu lipoperoxidov v nmol.mL⁻¹ sme vypočítali podľa vzorca:

$$[\text{nmol/ml}] = \frac{A_{\text{vz}} - A_{\text{blank}}}{\epsilon(l_3)} \cdot X$$

kde

A_{vz} – absorbancia vzorky; A_{blank} – absorbancia slepej vzorky; ϵ – mólový absorpčný koeficient pre $I_3 = 24\,600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$; X – zriedňovací faktor

Stanovenie lipidov v plazme

Celkový cholesterol (TC), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol a triacylglyceroly (TAG) v plazme boli stanovené v certifikovanom laboratóriu (Medirex, a. s. Bratislava).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistická analýza bola vykonaná pomocou SPSS ver. 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Naše výsledky sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka (SD). Na porovnanie parametrov medzi skupinou pacientov a kontrol sme použili Studentov nepárový t-test. Hladina významnosti bola nastavená na hodnotu $P < 0,05$. Na koreláciu hladín lipoproteínov v plazme a v slinách sme použili Pearsonov korelačný koeficient.

VÝSLEDKY

V skupine jedincov s potvrdenou spánkovou poruchou dýchania sme sledovali hladiny markera oxidačného poškodenia lipidov – lipoperoxidov. V Tab. 2 sú uvedené lipidové parametre skupiny zdravých kontrol a skupiny pacientov s OSA. Jedinci v skupine pacientov s OSA mali všetky sledované lipidové parametre signifikantne vyššie oproti dobrovoľníkom v kontrolnej skupine, okrem HDL cholesterolu, ktorý bol v skupine pacientov signifikantne nižší.

Hladiny lipoperoxidov boli v skupine pacientov s OSA signifikantne vyššie oproti kontrolnej skupine. Toto signifi-

Tab. 2. Lipidové parametre dobrovoľníkov v skupine zdravých kontrol a v skupine pacientov s OSA

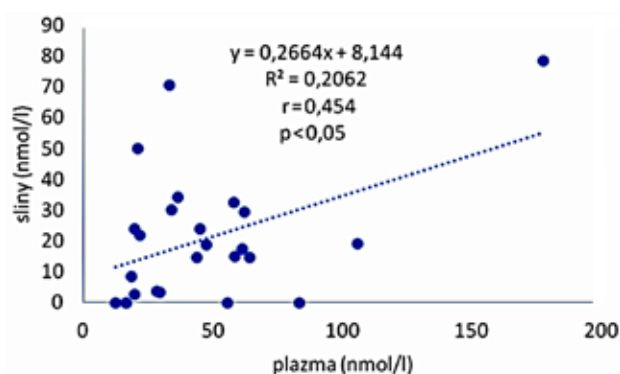
[mmol.L ⁻¹]	Kontroly (n = 16)	Pacienti s OSA (n = 15)	P
TCH	4,35 ± 0,62	5,40 ± 0,94	0,0008
LDL	2,72 ± 0,63	4,11 ± 0,76	> 0,0001
HDL	1,62 ± 0,29	1,22 ± 0,41	0,0027
TAG	0,91 ± 0,38	2,02 ± 0,57	> 0,0001

Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka (SD). P – štatistická hladina významnosti; n – počet jedincov v štúdiu; TCH – celkový cholesterol; LDL – lipoproteíny s nízkou hustotou; HDL – lipoproteíny s vysokou hustotou; TAG – triacylglyceroly; OSA – obštrukčné spánkové apnoe

Tab. 3. Hladiny lipoperoxidov v slinách a plazme v skupine zdravých kontrol a v skupine pacientov s OSA

Lipoperoxidy [nmol.mL ⁻¹]	Kontroly (n = 16)	Pacienti s OSA (n = 15)	P
sliny	10,72 ± 3,83	31,39 ± 6,70	0,0083
plazma	34,72 ± 5,57	63,96 ± 10,73	0,0203

OSA – obštrukčné spánkové apnoe; P – štatistická hladina významnosti; n – počet jedincov v štúdiu



Obr. 1. Korelácia hladín lipoperoxidov v slinách a v plazme u všetkých dobrovoľníkov v našej štúdiu
r – Pearsonov korelačný koeficient, P – štatistická hladina významnosti

kantné zvýšenie bolo pozorované v oboch typoch odobratých vzoriek – v plazme aj v slinách (Tab. 3).

Koreláciu hladín lipoperoxidov v slinách a v plazme sme medzi nimi zistili signifikantnú závislosť ($p < 0,05$).

DISKUSIA

Obštrukčné spánkové apnoe je časté ochorenie (Tomori a kol., 1999). Patogenéza komplikácií pri OSA je multifaktoriálna a nie je úplne známa. Zahŕňa celú škálu mechanizmov vrátane aktivácie zápalových molekulárnych dráh, endotelovej dysfunkcie, metabolickej dysregulácie a oxidačného stresu (Fiedorczuk a kol. 2020). V našej práci sme sa zamerali na jeden z patomechanizmov OSA – oxidačný stres. Porovnali sme hladiny lipoperoxidov ako markera oxidačného poškodenia lipidov v skupine pacientov – trpiacich OSA a v skupine zdravých kontrol. Zistili sme signifikantne zvýšené hladiny lipoperoxidov v plazme ($P = 0,0203$) aj v slinách ($P = 0,0083$) u jedincov s OSA v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naše výsledky sú v zhode s inými prácami stanovujúcimi iné markery oxidačného stresu. U jedincov s OSA boli publikované zvýšené hladiny markerov oxidačného poškodenia lipidov, proteínov a nukleových kyselín. Zistili sa signifikantne zvýšené hladiny malondialdehydu (MDA) a izoprostánov – markerov oxidačného poškodenia lipidov, pokročilých produktov oxidácie proteínov (AOPP) – markera oxidačného poškodenia proteínov, ako aj 8-hydroxy-deoxyguanozínu (8-OHdG) – markera oxidačného poškodenia DNA (Passala a kol. 2015; Yardim - Akaydin a kol. 2013; Lavie a kol. 2004). Tieto zvýšené hladiny markerov oxidačného stresu môžu byť dôsledkom opakujúcich sa krátkych cyklov prerušovanej hypoxie s následnou reperfúziou, počas ktorej dochádza k vzniku voľných radikálov spôsobujúcich oxidačné poškodenia biomakromolekúl a narúšajúcich cievnu homeostázu. Výsledkom týchto procesov môže byť zvýšené kardiovaskulárne a cerebrálne riziko (Šiarnik a kol. 2020; Yardim - Akaydin a kol. 2013).

Krv stále zostáva najvhodnejšou telesnou tekutinou na hodnotenie mnohých biomarkerov odrážajúcich systémové procesy a jej nahradenie slinami je potrebné používať opatrne. Niektoré biomarkery v slinách môžu odrážať ich systémové hladiny, avšak iné biomarkery ako napr. imunitné IL-6 a C-reaktívne proteínové cytokíny, nepreukázali významnú koreláciu so vzorkami plazmy (Fernandez-Botran a kol., 2011; Minetto a kol., 2005). Tieto imunitné biomarkery sú ovplyvňované procesmi lokálnej imunity, odrážajú skôr lokálne ako systémové imunitné odpovede. Hladiny cytokínov v slinách preto nemôžu byť všeobecne použité ako náhradné markery systémovej

imunitnej odpovede. V tejto štúdií sme porovnávali hladiny lipoperoxidov ako markera oxidačného poškodenia lipidov v plazme a v slinách v skupine pacientov – trpiacich OSA a v skupine kontrol. Ich koncentrácie v plazme boli 2–3× vyššie ako v slinách a vykazovali signifikantnú pozitívnu koreláciu ($p < 0,05$). Hoci korelácia bola štatisticky signifikantná, korelačný koeficient bol len 0,454, čo naznačuje, že sa nedajú hodnoty v krvi substituovať hodnotami v slinách.

ZÁVER

Naše výsledky poukazujú na existenciu zvýšeného oxidačného stresu u jedincov s OSA, ako aj na porušenie metabolizmu lipidov u týchto pacientov. Signifikantná korelácia lipoperoxidov v plazme a slinách naznačuje, že na stanovenie markerov oxidačného stresu sa dá použiť aj iné médium ako plazma, a to sliny. Sú však potrebné ešte ďalšie štúdie, ktoré by mali zahrnúť aj merania hladín antioxidantov v plazme, a ktoré by mali tieto výsledky potvrdiť na väčšom súbore pacientov.

LITERATÚRA

1. **Alzoughaibi, M. A. and BaHammam, A. S. O. (2005):** Lipid peroxides, superoxide dismutase and circulating IL-8 and GCP-2 in patients with severe obstructive sleep apnea: A pilot study. *Sleep and Breathing*. doi: 10.1007/s11325-005-0022-1.
2. **Chiappin, S. et al. (2007):** Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.011.
3. **El-Saadani, M. et al. (1989):** A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1016/s0022-2275(20)38354-1.
4. **Fernandez-Botran, R. et al. (2011):** Correlations among inflammatory markers in plasma, saliva and oral mucosal transudate in post-menopausal women with past intimate partner violence. *Brain, Behavior, and Immunity*. doi: 10.1016/j.bbi.2010.09.023.
5. **Fiedorczuk, P., Stróżyński, A., Olszewska, E. (2020):** Is the Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea Associated with Cardiovascular Complications?—Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*. doi: 10.3390/jcm9113734.

6. **Lavie, L., Vishnevsky, A., Lavie, P. (2004):** Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*. doi: 10.1093/sleep/27.1.123.
7. **Minetto, M. et al. (2005):** Differential responses of serum and salivary interleukin-6 to acute strenuous exercise. *European Journal of Applied Physiology*. doi: 10.1007/s00421-004-1241-z.
8. **Passali, D. et al. (2015):** Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta otorhinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*. doi: 10.14639/0392-100X-895.
9. **Šiarnik, P. et al. (2020):** Association of Lipid Profile with Sleep-Disordered Breathing in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Journal of Stroke Medicine*. doi: 10.1177/2516608520919211.
10. **Tomori, Z., Redhammer, R., Donič, V. (1999):** *Základy spánkovej medicíny*. Košice: Vojenská letecká akadémia gen. Milana Rastislava Štefánika.
11. **Yardim-Akaydin, S. et al. (2013):** Lipid peroxidation and DNA damage in apnea patients with or without metabolic syndrome. *Sleep and Biological Rhythms*. doi: 10.1111/sbr.12012.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 68–78

VYBRANÉ HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE POČAS HYPOLIPIDEMICKEJ LIEČBY

Kučera, M.^{1,2}

¹I. interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

²VITACARE, s. r. o., všeobecná ambulancia pre dospelých, Senec

marekucera@gmail.com

SÚHRN

Kvantitatívne a kvalitatívne zmeny lipoproteínov v plazme v prospech aterogénnych častíc významne ovplyvňujú kardiovaskulárne (KV) riziko. Cieľom prezentovanej práce bolo objasniť súvislosť lipoproteínových subpopulácií vo vzťahu k strednému objemu trombocytov (MPV) a k distribučnej šírke erytrocytov (RDW). Vyšetřili sme 80 pacientov s dyslipidémiou (z toho 58 žien, priemerný vek súboru 61 rokov), bez predchádzajúcej hypolipemickej liečby. Liečení boli atorvastatínom 40 mg počas troch mesiacov. Pred liečbou a po 12 týždňoch liečby bol vyšetřený celkový cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-cholesterol (HDL-C), triacylglyceroly (TAG), LDL-subfrakcie (veľké LDL častice 1–2 a malé denzné (sd)-LDL častice 3–7), apolipoproteíny (apoA1, apoB), pomer apoB/apoA1, aterogénny index plazmy (AIP), hematologické parametre (vrátane MPV, RDW) a bezpečnostné parametre (obličkové, pečenevé). Hematologické parametre (MPV a RDW) na začiatku liečby signifikantne korelovali s aterogénnymi ukazovateľmi (LDL 3–7, ApoB, ApoB/ApoA1, AIP). Po dvanástich týždňoch atorvastatínovej liečby hladiny MPV a RDW signifikantne klesli súbežne s hladinami lipidov, pričom v skupine s najvýznamnejším poklesom aterogénnych lipoproteínov poklesli tiež. Možno predpokladať, že hladiny MPV a RDW odrážajú

proaterogénny lipoproteínový profil reprezentovaný prítomnosťou malých denzných LDL častíc.

Kľúčové slová: aterogénna dyslipidémia; atorvastatín; stredný objem trombocytov; distribučná šírka erytrocytov

ABSTRACT

Quantitative and qualitative changes in plasma lipoproteins mainly atherogenic particles can significantly affect the cardiovascular risk. The aim of the present study was to analyze the relation of lipoprotein subpopulations to mean platelet volume (MPV) and erythrocyte distribution width (RDW). Patients (n = 80) with dyslipidemia (58 females, mean age 61 years), without previous hypolipemic treatment, were treated with atorvastatin 40 mg/day for 3 months. Total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density cholesterol (HDL-C), triglycerides (TAG), LDL-C sub-fractions [large LDL-C 1–2 and small dense (sd)-LDL-C 3–7], apolipoproteins (apoA1, apoB), apoB/apoA1 ratio, atherogenic index of plasma (AIP), haematological parameters (including MPV, RDW) and safety parameters (renal, hepatic) were measured before and after 12 weeks

of atorvastatin treatment. Haematological parameters (MPV and RDW) at the baseline of treatment significantly correlated with atherogenic markers (LDL 3–7, ApoB, ApoB/ApoA1, AIP). After 12 weeks of treatment with atorvastatin, MPV and RDW values underwent significant modification simultaneously with other lipids and also in those patients displaying the strongest atherogenic-lowering effect. Values of MPV and RDW seem to reflect a pro-atherogenic lipoprotein profile mainly represented by the presence of sd-LDL-C.

Key words: atherogenic dyslipidemia; atorvastatin; mean platelet volume; red cell distribution width

ÚVOD

Správny manažment dyslipidémie cez jasnú stratifikáciu pacienta so zadenovaním kategórie kardiovaskulárneho (KV) rizika a výber najvhodnejšej liečby podporený medicínou založenou na dôkazoch je nespochybniteľnou súčasťou komplexnej starostlivosti o kardiovaskulárne rizikového pacienta. Veľký dôraz sa stále kladie na LDL cholesterol (LDL-C) a jeho ovplyvnenie najmä statínovou

liečbou v primárnej, ale aj sekundárnej prevencii vaskulárnych ochorení srdca a mozgu (P i e p o l i a kol., 2016). Diskutuje sa, či iba dosiahnutie cieľa LDL-C, hoci včasné a intenzívne, stačí na zníženie kardiovaskulárneho rizika. Poznať odpoveď na túto otázku je zásadné, pretože stále rastie populácia osôb s metabolickým syndrómom a diabetes mellitus 2. typu. Najmä túto skupinu pacientov charakterizuje tzv. aterogénna dyslipidémia, o ktorej vieme, že je v určitej miere zodpovedná za prítomnosť reziduálneho rizika KV komplikácií (F á b r y o v á, 2016). Preto je žiadúce aterogénnu dyslipidémiu včas diagnostikovať, pátrať po jednoduchých markeroch aterogenity plazmy a považovať ju za ďalší možný terapeutický cieľ kardiovaskulárnej prevencie. V klinickej praxi máme rôzne viac, či menej používané spôsoby na zistenie aterogenity plazmy (Tab. 1).

Niet pochyb, že najväčší aterogénny potenciál z lipoproteínových častíc predstavujú malé denzné LDL (sdLDL), niekedy označované aj ako LDL3, resp. fenotyp B veľkosti LDL. V bežnej klinickej praxi sa vzhľadom na technickú, či finančnú náročnosť priameho stanovovania sdLDL, používajú na určenie aterogénneho fenotypu B (prevahu sdLDL) viaceré nepriame diagnostické kritériá (Tab. 2) (C a r r, B r u n z e l l, 2004).

Predmetom odbornej diskusie sú stále otázky, ktoré laboratórne metódy alebo markery sú vhodné pre jasnú identifikáciu aterogénnych lipoproteínov v klinickej praxi. Spoľahlivou laboratórnou metódou, ktorá vie získať informácie o aterogenite plazmy nezávisle od bežne stanovovanej dyslipidémie je metóda delenia lipoproteínov na polyakrylamidovom (PAG) géli Lipoprint® LDL/HDL Systém. Bol úspešne porovnávaný s inými metodikami na diagnostiku lipoproteínových subfrakcií (E n s i g n a kol., 2006; O r a v e c a kol., 2020). Aj napriek používaniu uvedenej metodiky vo viacerých vedeckých prácach, v bežnej klinickej praxi nie je zatiaľ rutinne odporúčaná. Pokiaľ bude možnosť priameho vyšetrovania aterogénnych lipoproteínov v medicínskej praxi, je žiadúce používať iné dostupné nepriame markery aterogenity plazmy. Patria sem rôzne biochemické parametre.

Okrem štandardných biochemických parametrov, je veľmi často súčasťou preventívnych aj diagnostických postupov vo vaskulárnej medicíne vyšetrenie krvného obrazu, ktoré patrí medzi rutinné laboratórne vyšetrovacie metódy. V klinickej praxi sa hematologické veličiny vrátane diferenciálneho krvného obrazu stanovujú a po-

Tab. 1. Markery na hodnotenie aterogenity plazmy (Ensign a kol., 2006)

TAG – triacylglyceroly; HDL-C – high density lipoprotein cholesterol
apo B – apolipoproteín B; apo A₁ – apolipoproteín A₁

bežne dostupné laboratórne markery	↑ TAG
	↓ HDL-C
	↑ non-HDL-C
	↑ apo B
	↓ apo A ₁
vyšetrenie dostupné v experimentálnych podmienkach systémom Lipoprint LDL a HDL	prítomnosť malých denzných LDL častíc a malých denzných HDL častíc

Tab. 2. Nepriame diagnostické kritériá fenotypu B veľkosti LDL (C a r r, B r u n z e l l, 2004)

TG > 1,50 mmol/l
HDL-C < 1,0 mmol/l (resp. 1,30) u mužov (resp. žien)
apo B > 1,30 g/l
LDL-C 3,4 až 4,1 mmol/l
LDL-C/apoB < 0,85
TG/LDL-C > 3,5
TG/HDL-C > 3,8

čítajú pomocou automatizovaných analyzátorov. Niektoré automaticky vyhodnocované testy však môžu byť v praxi prehliadané. Medzi tieto nedostatočne využívané súčasti krvného obrazu patria distribučná šírka erytrocytov (RDW; red cell distribution width) a stredný objem trombocytov (MPV; mean platelet volume) (M a y a kol., 2019).

Distribučná šírka erytrocytov

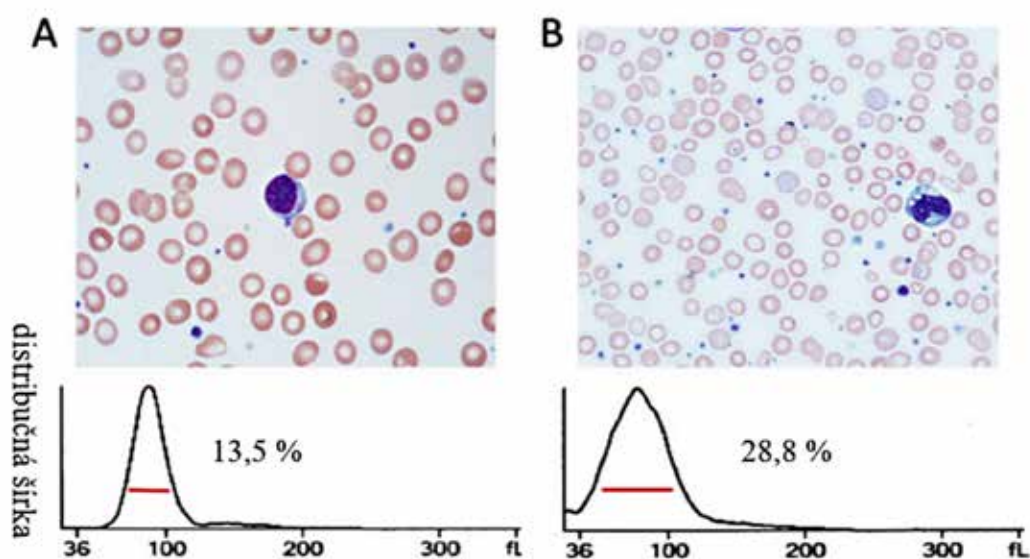
RDW odzrkadľuje rozdelenie erytrocytov podľa objemu a ide teda o parameter, ktorý poukazuje na mieru anizocytózy erytrocytov (M a t ý š k o v á a kol., 2005). Pojem „šírka“ nehovorí o šírke erytrocytov, ale poukazuje na šírku tzv. distribučnej krivky objemu erytrocytov (Obr. 1).

V hematológii je v kombinácii s parametrom MCV (stredný objem erytrocytu) dôležitým pomocníkom v diferenciálnej diagnostike anémií. Väčšina automatizovaných analyzátorov vypočíta RDW ako variačný koeficient v %, eventuálne ako RDW-SD (smerodajná odchýlka) vo femtolitroch (fl; 10–15 l). Fyziologické hodnoty RDW sa pohybujú v referenčnom rozmedzí od 11,0 % do 16,0 %, čo závisí v laboratóriu od technológie spracovania vzoriek a vybavenia laboratória (typ analyzátoru) (M a t ý š k o v á a kol., 2005). Mnohé informácie naznačujú, že RDW môže mať prognostický význam pri viacerých nehematologických ochoreniach (P e d r a z z a n i a kol., 2020). Obmedzené alebo kontroverzné informácie existujú o vzťahu medzi

anizocytózou a plazmatickými lipidmi, pričom najviac bol sledovaný vzťah medzi hypercholesterolémiou a RDW, než medzi jednotlivými lipidmi a lipoproteínmi (L i p p i a kol., 2013). V práci L i p p i a kol. (2013) zistil, že vyššie hodnoty RDW sú spojené vo všeobecnosti s nepriaznivým lipidovým profilom, najmä u žien (L i p p i a kol., 2013). Sledovaných bolo 4874 neselektovaných pacientov z ambulancií všeobecných lekárov. Pri hodnotení výsledkov autori poukázali na presvedčivé interakcie medzi zvýšenou hodnotou RDW a nízkou hladinou HDL-C u oboch pohlaví. Pozitívna korelácia bola potvrdená s aterogénnym indexom plazmy, hypertriacyglycerolémiou a zvýšeným pomerom celkový cholesterol/HDL-C u žien (L i p p i a kol., 2013). Aj napriek viacerým zisteniam o pozitívnom vzťahu medzi RDW a kardiovaskulárnymi ochoreniami, medzi RDW a lipidmi, vzťah medzi RDW a jednotlivými lipoproteínmi s možným vplyvom hypolipemickej liečby nebol doposiaľ podrobne popísaný.

Stredný objem trombocytov

Stredný objem trombocytov (MPV—mean platelet volume) nás informuje o mikrocytóze či makrocytóze s referenčným rozmedzím 7,8–11,5 fl (M a t ý š k o v á a kol., 2005). Vzťah medzi veľkosťou krvných doštičiek a ich funkčnými vlastnosťami vo vzťahu k ich dĺžke životnosti je dobre známy už viac ako 50 rokov (D e t w i l e r a kol., 1962). Nejde však o vzťah jednoduchý, nakoľko ide o pôsobenie



Obr. 1. Distribučná šírka erytrocytov (RDW)
A – normálna, B – zvýšená (Matýšková a kol., 2005)

viacerých faktorov. Čiastočný vplyv na MPV má genetika, čo je využívané v diagnostike hematologických ochorení, ako napríklad vrodené trombocytopenie a trombocytopenie. (D r a c h m a n, 2004). Znížené hodnoty MPV môžu znamenať poruchu kostnej drene u trombocytopenických pacientov (B o w l e s a kol., 2005). Okrem použitia MPV v hematológii pri diferenciálnej diagnostike trombocytopení, sa parameter MPV ukazuje ako možný nezávislý prognostický marker pre kardiovaskulárne príhody a tiež by mohol byť prínosom pre diagnostiku akútneho žilového tromboembolizmu (M a t ý š k o v á a kol., 2005). Väčšie trombocyty sú prítomné u pacientov s dyslipidémiou a metabolickým syndrómom a podľa niektorých autorov práve zvýšený MPV ako ekonomicky nenáročný biomarker môže poukazovať na hroziace aterosklerotické komplikácie (M a r u, K o k a n i, 2018). V práci A k i n a kol. (2014) boli zistené signifikantne zvýšené hladiny MPV v prípade hypercholesterolémie v porovnaní s kontrolnou skupinou (A k i n a kol., 2014). Upozornili na to, že pacienti s hypercholesterolémiou majú zvýšenú aktivitu krvných doštičiek a zároveň priniesli zaujímavé informácie o znížení MPV po liečbe atorvastatínom (A k i n a kol., 2014). V posledných rokoch pribúdajú štúdie, v ktorých sa popisujú možné účinky statín na MPV, pričom neexistujú jednotné závery, respektíve sú kontroverzné. MPV je možné vnímať

ako marker aktivovaných krvných doštičiek v kontexte kardiovaskulárnych príhod, čím pokladáme efekt hypolipemickej liečby na MPV ako povzbudivý a zároveň odvodnený u mnohých KV rizikových osôb (J i a kol., 2019). Efekt statínovej liečby na MPV v súvislosti s ovplyvnením jednotlivých lipoproteínových subpopulácií zatiaľ nebol sledovaný.

Charakteristika súboru

V štúdiu bolo vyšetrených a ďalej sledovaných 80 pacientov, 58 žien (72,5 %) s vekovým priemerom $62 \pm 8,58$ roka a 22 mužov (27,5 %) s vekovým priemerom $59,82 \pm 9,86$ roka (Tab. 3). Išlo o náhodný výber pacientov, u ktorých bola dyslipidémia určená na základe fenotypovej klasifikácie podľa Odborného usmernenia Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky na poskytovanie zdravotnej starostlivosti dospelým pacientom s dyslipidémiou v ambulantnej zdravotnej starostlivosti z roku 2015 (Vestník MZ SR, 2015). Pacienti boli najskôr vyšetrení na všeobecnej ambulancii pre dospelých v rámci preventívnej prehliadky. S poruchou metabolizmu lipidov boli následne odosielaní a ďalej vyšetrení na internej ambulancii I. internej kliniky v Bratislave, kde prebiehalo vstupné aj kontrolné vyšetrenia. Pred zaradením do štúdie boli všetci pacienti informovaní a podpísali informovaný súhlas. V sú-

Tab. 3. Základná charakteristika súboru

	Muži		Ženy	
	min-max	priemer \pm SD	min-max	priemer \pm SD
Počet	22 (27,5%)		58 (72,5%)	
Vek [roky]	42-72	$59,82 \pm 9,86$	44-85	$62 \pm 8,58$
BMI	20,02-36,09	$28,66 \pm 4,28$	19,97-39,10	$26,22 \pm 4,01$
Obvod pása	72-110	$93,91 \pm 10,93$	70-116	$87,19 \pm 10,80$

Tab. 4. Fenotypová klasifikácia dyslipidémie v súbore na začiatku liečby

AH – artériová hypertenzia, ICHS – ischemická choroba srdca

	celkom	pacienti bez AH a ICHS	pacienti liečení na AH a/alebo ICHS
izolovaná hypercholesterolémia	47 (58,75%)	12 (25,53%)	35 (74,47%)
kombinovaná dyslipidémia	33 (41,25%)	9 (27,27%)	24 (72,73%)

bore bolo diagnostikovaných 47 (58,75 %) pacientov s izolovanou hypercholesterolémiou a 33 (41,25 %) pacientov s kombinovanou dyslipidémiou (Tab. 4). Izolovaná hypertriacylglycerolémia v súbore nebola potvrdená. **Pacienti boli rozdelení na dve skupiny:** bez artériovej hypertenzie a ischemickej choroby srdca a na skupinu, v ktorej boli pacienti liečení na artériovú hypertenziu a/alebo ischemickú chorobu srdca.

Z ďalších kardiovaskulárnych rizikových faktorov boli u pacientov sledované telesná hmotnosť a fajčenie. Priemerné hodnoty BMI boli u mužov ($28,66 \pm 4,28$) aj žien ($26,22 \pm 4,01$) v pásme nadváhy a vstupné priemerné hodnoty obvodu pása boli u mužov $93,91 \pm 10,93$, u žien $87,19 \pm 10,80$. Obezitu na základe klasifikácie WHO (World Health Organization) pri $BMI \geq 30$ sme potvrdili u 17 pacientov, z toho u 8 mužov a 9 žien. Pravidelná fyzická aktivita nebola anamnesticky zdokumentovaná ani u jedného pacienta. Opakovaná edukácia zameraná na zdravý životný štýl a stravovanie v manažmente celkového kardiovaskulárneho rizika bola neoddeliteľnou súčasťou liečby. V súbore fajčilo spolu 16 pacientov (20 %), na artériovú hypertenziu boli liečení 60 pacienti (75 %) a ischemická choroba srdca bola potvrdená (koronarografiou–stenóza viac ako 50 % aspoň jednej epikardiálnej koronárnej artérie, pozitívnym záťažovým testom, klinickým stavom) u 15 pacientov (18,8 %). Pacienti po prekonanej cievnej mozgovej príhode ani po infarkte myokardu do štúdie neboli zaradení.

Výberové kritériá boli: Vek nad 18 rokov. Novodiagnostikovaná dyslipidémia. Pacienti minimálne tri mesiace pred zaradením do štúdie neužívali žiadnu hypolipemickú liečbu.

Vylučovacie kritériá boli: Nesplnenie výberových kritérií. Nespolupracujúci pacient, terminálna chronická choroba. Diabetes mellitus. Srdcové zlyhávanie. Ťažké pečenevé a obličkové poškodenie. Gravidita a dojčenie. Akútne koronárny syndróm a cievna mozgová príhoda. Sekundárna dyslipidémia pri hypotyreóze, onkologických ochoreniach, systémových ochoreniach spojiva. Pankreatitída. Abúzus alkoholu. Lieková intolerancia alebo alergia na atorvastatín.

Každý pacient bol vyšetrený (anamnéza, fyzikálne vyšetrenie, rutinné laboratórne vyšetrenia) vstupne a potom do 4 týždňov od nasadenia liečby a následne po 8 týždňoch podľa Odborného usmernenia MZSR. Efekt na hematologické parametre bol teda vyhodnocovaný po 12 týždňoch hypolipidemickú liečby. Súčasťou každého vyšetrenia bolo:

- Anamnéza so zameraním na subjektívne prejavy orgánovovaskulárnych arteriálnych ischemických prejavov, posúdenie tolerancie farmakologickej liečby, osobnú a rodinnú anamnézu familiárnej DLP, chronických ochorení a kontrolu adherencie pacienta k terapeutickým intervenciám. Sledovaná bola aj súbežná liečba, ktorá by mohla ovplyvniť hladiny lipidov.
- Fyzikálne vyšetrenie zamerané na prítomnosť orgánovovaskulárnych arteriálnych ischemických prejavov a kontrolu rizikových faktorov (obvod pása, BMI, krvný tlak).

Realizácia a vyhodnotenie základných laboratórnych vyšetrení: lipidový súbor (LDL-C, celkový cholesterol, TAG, HDL-C), ALT (alanínaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza), CK (kreatínkináza), glykémia, kreatinín, kyselina močová, tyreotropný hormón (TSH) a krvný obraz (vrátane MPV, RDW, MCV).

Vyšetrenie vysoko senzitivného C-reaktívneho proteínu (hsCRP) (faRoche SRN) analyzátorom Hitachi 917 (Japonsko).

Stanovenie aterogénnych parametrov: ApoB, ApoA1, pomer apoB/apoA1 imunoturbidimetrickou metódou (Roche SRN), aterogénny index plazmy (AIP) podľa vzorca: $\log(\text{TAG}/\text{HDL cholesterol})$.

Vyšetrenie jednotlivých lipoproteínových subpopulácií pomocou metódy Lipoprint LDL (Quantimetrix corp., USA) so stanovením neaterogénneho lipoproteínového fenotypu A a aterogénneho lipoproteínového fenotypu B. Častice LDL 1 a 2 sa určili ako veľké a častice LDL 3 až 7 ako malé denzné LDL častice.

Pacientom bola indikovaná a v sledovanom období troch mesiacov podávaná liečba atorvastatínom v dávke 40 mg. Pred liečbou a po troch mesiacoch liečby atorvastatínom boli analyzované: lipoproteínové subpopulácie, apolipoproteíny (ApoB a ApoA1), AIP, hs-CRP.

VÝSLEDKY

Vyšetrením lipoproteínových subpopulácií pred liečbou sme potvrdili neaterogénnu hypercholesterolémiu u 56 osôb (70 % testovaných) a aterogénnu hypercholesterolémiu u 24 osôb (30 % testovaných). Aterogénne malé denzné LDL častice boli častejšie zastúpené v skupine s kombinovanou dyslipidémiou, čo predstavovalo až 75 % všetkých testovaných s aterogénnym profilom fenotypom

Tab. 5. Rozdelenie lipoproteínového fenotypu u pacientov pred liečbou

	Spolu n = 80	Izolovaná hyper- cholesterolémia 47 (58,75%)	Kombinovaná dyslipidémia 33 (41,25%)
Aterogénny profil – fenotyp B	24 (30%)	6 (25%)	18 (75%)
Neaterogénny profil – fenotyp A	56 (70%)	39 (69,64%)	17 (30,36%)

B v porovnaní s 25 % v prípade izolovanej hypercholesterolémie (Tab. 5).

Ovplyvnenie jednotlivých lipidových aj nelipidových parametrov uvádzame v Tab. 6.

Nežiadúce účinky atorvastatínu v súbore neboli zaznamenané. V súbore 80 pacientov pred liečbou a po trojmesačnej liečbe atorvastatínom v dávke 40 mg denne sme sledovali základné súčasti krvného obrazu (Tab. 7).

Po troch mesiacoch liečby atorvastatínom 40 mg sme zaznamenali signifikantný pokles oboch parametrov (RDW: $12,571 \pm 2,447\%$; $p < 0,001$ a MPV: $8,814 \pm 0,833$ fl;

Tab. 6. Ovplyvnenie lipidových a nelipidových parametrov liečbou
NS – nesignifikantný

	Pred liečbou	Po liečbe	Signifikancia
Celkový cholesterol [mmol/l]	$6,783 \pm 1,037$	$4,697 \pm 1,049$	$p < 0,001$
Triacylglyceroly [mmol/l]	$1,813 \pm 0,921$	$1,498 \pm 0,861$	$p < 0,001$
LDL cholesterol [mmol/l]	$4,317 \pm 0,871$	$2,480 \pm 0,778$	$p < 0,001$
HDL cholesterol [mmol/l]	$1,541 \pm 0,372$	$1,435 \pm 0,339$	$p < 0,001$
ApoA1 [g/l]	$1,697 \pm 0,297$	$1,647 \pm 0,285$	NS
ApoB [g/l]	$0,971 \pm 0,287$	$0,700 \pm 0,261$	$p < 0,001$
ApoB/ApoA1 [g/l]	$0,605 \pm 0,261$	$0,449 \pm 0,212$	$p < 0,001$
AIP	$0,021 \pm 0,269$	$-0,029 \pm 0,285$	$p < 0,05$
Glykémia nalačno [mmol/l]	$5,529 \pm 1,127$	$5,505 \pm 1,188$	NS
hs-CRP [mg/l]	$2,836 \pm 2,846$	$2,004 \pm 2,008$	$p < 0,001$
BMI (body mass index)	$26,895 \pm 4,206$	$26,876 \pm 4,084$	NS
Obvod pásu	$89,038 \pm 11,183$	$87,436 \pm 14,087$	NS
Systolický tlak krvi	$131,250 \pm 12,363$	$126,625 \pm 9,372$	$p < 0,05$
Diastolický tlak krvi	$76,375 \pm 8,786$	$72,875 \pm 9,202$	$p < 0,001$
VLDL	$0,943 \pm 0,369$	$0,671 \pm 0,317$	$p < 0,001$
IDL 1–3	$1,812 \pm 0,428$	$1,301 \pm 0,370$	$p < 0,001$
LDL 1–2	$2,543 \pm 0,705$	$1,586 \pm 0,613$	$p < 0,001$
LDL 3–7	$0,264 \pm 0,405$	$0,071 \pm 0,126$	$p < 0,001$

$p < 0,001$). Erytrocyty, hemoglobín, ani leukocyty neboli hypolipemickou liečbou významne ovplyvnené a v prípade trombocytov bol zaznamenaný ich mierny vzostup. U stredného objemu erytrocytov (MCV) nebola po trojmesačnej kontrole sledovaná významná zmena. Korelácia medzi plazmatickými lipidmi a hematologickými parametrami pred liečbou a po liečbe je uvedená v Tab. 8. V našom súbore sme nepotvrdili pred liečbou a ani po nej, že by pacienti s nízkym HDL-C mali vyššiu hodnotu RDW. Zaznamenali sme však negatívnu koreláciu medzi HDL-C a MPV ($r = -0,185$, $p < 0,05$). Signifikantné boli korelácie medzi RDW a celkovým cholesterolom ($r = 0,434$,

$p < 0,001$), LDL-C ($r = 0,327$, $p < 0,05$) a TAG ($r = 0,647$, $p < 0,001$). MPV pozitívne koreloval s celkovým cholesterolom ($r = 0,389$, $p < 0,001$), LDL-C ($r = 0,360$, $p < 0,05$) a TAG ($r = 0,673$, $p < 0,001$).

Štatisticky významný vzťah medzi aterogénnymi markermi a hematologickými parametrami (MPV, RDW) pred liečbou, aj po liečbe bol zistený v prípade malých denzných LDL častíc a aterogénneho indexu plazmy (Tab. 9). Zistili sme, že LDL 3–7 pozitívne korelovali s MPV ($r = 0,724$, $p < 0,001$) aj s RDW ($r = 0,611$, $p < 0,001$). Korelačnou analýzou bol potvrdený aj silný vzťah medzi AIP a RDW ($r = 0,578$, $p < 0,001$) a MPV ($r = 0,634$, $p < 0,001$). MPV na začiatku liečby pozitívne koreloval s Apo B ($r = 0,503$, $p < 0,001$), ApoB/ApoA1 ($r = 0,599$, $p < 0,001$) a negatívne s ApoA1 ($r = -0,486$, $p < 0,001$). RDW na začiatku liečby vykázal pozitívnu koreláciu tiež s ApoB ($r = 0,397$, $p < 0,001$), ApoB/ApoA1 ($r = 0,456$, $p < 0,001$) a negatívnu s ApoA1 ($r = -0,318$, $p < 0,05$). Medzi ostatnými lipoproteínovými subpopuláciami (LDL 1–2, IDL 1–3) a hematologickými markermi (MPV, RDW) neboli preukázané významné korelácie ani na začiatku liečby a ani po 12 týždňoch liečby atorvastatínom.

U štvrtiny pacientov ($n = 20$), u ktorých došlo k najvýznamnejšiemu poklesu malých denzných LDL lipoproteínov a zároveň aj poklesu lipidov sme zrealizovali porovnanie vybraných hematologických parametrov pred liečbou atorvastatínom 40 mg a po liečbe (Tab. 10). Pozoruhodné bolo dokázanie štatisticky významného poklesu MPV ($9,760 \pm 1,648$ vs $9,015 \pm 0,698$, $p < 0,05$) aj RDW ($14,250 \pm 3,318$ vs $13,320 \pm 2,593$, $p < 0,05$) práve v tejto podskupine pacientov. K významným zmenám erytrocytov, leukocytov, trombocytov a ani hemoglobínu nedošlo.

Tab. 7. Porovnanie vybraných hematologických parametrov pred liečbou a po nej

MCV – mean corpuscular volume; RDW – red cell distribution width
MPV – mean platelet volume; IQR – interquartile range
NS – nesignifikantný; fl – femtoliter

Hematologické parametre	Pred liečbou Mean \pm SD/Median [IQR]	Po liečbe Mean \pm SD/Median [IQR]	p
Erytrocyty [$10^{12}/l$]	4,450 \pm 0,425	4,459 \pm 0,431	NS
Hemoglobín [g/l]	143,150 \pm 7,646	143,026 \pm 7,721	NS
MCV [fl]	89,919 \pm 2,954	89,989 \pm 2,982	NS
RDW [%]	13,363 \pm 2,988	12,571 \pm 2,447	$p < 0,001$
Trombocyty [$10^9/l$]	286,700 \pm 63,724	292,425 \pm 60,535	$p < 0,001$
MPV [fl]	9,274 \pm 1,495	8,814 \pm 0,833	$p < 0,001$
Leukocyty [$10^9/l$]	6,250 \pm 1,488	6,272 \pm 1,326	NS

Tab. 8. Korelácie medzi MPV a RDW s lipidmi

LDL – low density lipoprotein; HDL – high density lipoprotein; RDW – red cell distribution width
MPV – medium platelet volume; r – correlation index; NS – nonsignificant

Pred liečbou	MPV	RDW	Po liečbe	MPV	RDW
Celkový cholesterol	$r = 0,389$ $p < 0,001$	$r = 0,434$ $p < 0,001$	Celkový cholesterol	$r = 0,019$ NS	$r = 0,249$ NS
LDL-C	$r = 0,360$ $p < 0,05$	$r = 0,327$ $p < 0,05$	LDL-C	$r = -0,030$ NS	$r = 0,152$ NS
HDL-C	$r = -0,185$ $p < 0,05$	$r = -0,010$ NS	HDL-C	$r = -0,051$ NS	$r = -0,086$ NS
TAG	$r = 0,673$ $p < 0,001$	$r = 0,647$ $p < 0,001$	TAG	$r = 0,347$ $p < 0,05$	$r = 0,332$ $p < 0,05$

Tab. 9. Korelácie aterogénnych parametrov s MPV a RDW

LDL – low density lipoprotein; IDL – intermediate density lipoprotein; apoB – apolipoprotein B; apoA1 – apolipoprotein A1; AIP – atherogenic index of plasma; MPV – medium platelet volume; RDW – red cell distribution width; r – correlation index; NS – nonsignificant

Pred liečbou	MPV	RDW	Po liečbe	MPV	RDW
LDL 1-2	r = -0,158 NS	r = -0,225 NS	LDL 1-2	r = -0,096 NS	r = -0,159 NS
LDL 3-7	r = 0,724 p < 0,001	r = 0,611 p < 0,001	LDL 3-7	r = 0,313 p < 0,05	r = 0,288 p < 0,05
IDL 1-3	r = -0,135 NS	r = -0,019 NS	IDL 1-3	r = -0,201 NS	r = 0,045 NS
apoB	r = 0,503 p < 0,001	r = 0,397 p < 0,001	apoB	r = 0,179 NS	r = 0,249 NS
apoA1	r = -0,486 p < 0,001	r = -0,318 p < 0,05	apoA1	r = -0,267 NS	r = -0,244 NS
apoB/apoA1	r = 0,599 p < 0,001	r = 0,456 p < 0,001	apoB/apoA1	r = 0,235 p < 0,036	r = 0,288 p < 0,05
AIP	r = 0,634 p < 0,001	r = 0,578 p < 0,001	AIP	r = 0,381 p < 0,001	r = 0,334 p < 0,003

Tab. 10. Podskupina pacientov s najvýznamnejšou redukciou LDL3-7 a hematologické ukazovatele pred liečbou a po liečbe

MCV – mean corpuscular volume; RDW – red cell distribution width; MPV – mean platelet volume
IQR – interquartile range; fl – femtoliter; NS – nonsignificant

Hematologické parametre v podskupine (n = 20)	Pred liečbou Mean ± SD/Median [IQR]	Po liečbe Mean ± SD Median [IQR]	P
Erytrocyty [10 ¹² /l]	4,487 ± 0,470	4,469 ± 0,482	NS
Hemoglobín [g/l]	144,450 ± 8,420	143,150 ± 9,483	NS
MCV [fl]	90,470 ± 3,089	90,705 ± 3,003	NS
RDW [%]	14,250 ± 3,318	13,320 ± 2,593	p < 0,05
Trombocyty [10 ⁹ /l]	282,100 ± 70,934	285,850 ± 70,413	NS
MPV [fl]	9,760 ± 1,648	9,015 ± 0,698	p < 0,05
Leukocyty [10 ⁹ /l]	6,550 ± 1,955	6,449 ± 1,645	NS

DISKUSIA

Aterosklerotický proces, ktorý sa spája so zápalom bol vo viacerých štúdiách sprevádzaný predovšetkým zvýšenými hladinami bielych krviniek, C-reaktívneho proteínu, ale aj MPV a RDW v súvislosti so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych príhod (Li a kol., 2012).

Trombocyty predstavujú dôležité spojenie medzi zápalom, trombózou a aterogénozou (Maha a kol., 2015). Počas procesu aktivácie podliehajú dramatickej zmene tvaru a funkcie. Obsahujú hustejšie metabolicky aj enzymatic-

ky aktívne granuly, čím vykazujú väčší protrombogénny potenciál s rizikom kardiovaskulárnych príhod. Viaceré práce preukázali, že krvné doštičky sú vysoko reaktívne v prípade rizikových faktorov (artériová hypertenzia, dyslipidémia, diabetes mellitus, obezita), čím sa rozvoj KV ochorení môže urýchliť (Santilli a kol., 2012). Aktiváciou trombocytov sa často zmení ich objem, čo sa prejaví zvýšením MPV (Elsayed, Mohamed, 2017). U našich pacientov boli priemerné hodnoty MPV pred liečbou 9,274 ± 1,495 fl. Pri korelácií MPV s lipidovými parametrami sme potvrdili vstupne štatisticky významnú pozitív-

nu koreláciu MPV s celkovým cholesterolom ($r = 0,389$, $p < 0,001$), s LDL-C ($r = 0,360$, $p < 0,05$), s TAG ($r = 0,673$, $p < 0,001$) a negatívnu s HDL-C ($r = -0,185$, $p < 0,05$).

Účinok statínov na krvné doštičky je zabezpečený ich interakciou s membránami (M a a kol., 2002), alebo ovplyvňovaním signálnych ciest (pleiotropné účinky) (L u z a k a kol., 2012). Na antiagregačnom efekte statínov sa podieľa inhibícia kalcium dependentnej fosfolipázy A2 (M o s c a r d ó a kol., 2013), zvýšená produkcia oxidu dusnatého aktiváciou NO syntázy a zvýšené koncentrácie cyklického adenosinmonofosfátu (L e e a kol., 2010). S i v r i a kol. (2013) v ich práci dokázali signifikantné zníženie MPV v skupine pacientov liečených statínom bez ohľadu na zníženie lipidov v krvi. V našej práci sme poukázali na to, že atorvastatín môže znížiť priemerný objem krvných doštičiek ($9,274 \pm 1,495$ vs. $8,814 \pm 0,833$, $p < 0,001$) u pacientov s rizikovými faktormi kardiovaskulárnych chorôb, čo nepriamo naznačuje, že statíny môžu inhibovať funkciu krvných doštičiek. Zatiaľ jediná metaanalýza, ktorá systematicky skúmala vplyv statínov na MPV bola realizovaná pred dvoma rokmi (J i a kol., 2019). V práci (2019) sa sledoval účinok viacerých statínov (atorvastatín, pravastatín, rosuvastatín, simvastatín). Bez ohľadu na použitý statín, bola po jeho liečbe zaznamenaná redukcia MPV v plazme (J i a kol., 2019). Záujem viacerých výskumníkov o zmeny stredného objemu trombocytov u dyslipidemických pacientov nie je prekvapivý, nakoľko len zníženie cholesterolu nevysvetľuje aj antiagregačný efekt statínov. Práca, ktorá by však odsledovala zmeny MPV v súvislosti s jednotlivými lipoproteínovými subpopuláciami nebola zatiaľ publikovaná. Zo všetkých lipoproteínových tried sme na začiatku liečby, ale aj po nej zaznamenali signifikantnú pozitívnu koreláciu LDL3-7 len s MPV a RDW. Za zaujímavé stojí tiež zistenie, že v podskupine pacientov, u ktorých došlo k najvýznamnejšiemu poklesu lipidov po 12 týždňoch liečby atorvastatínom sme tiež zaznamenali signifikantné zmeny v hladine MPV ($9,760 \pm 1,648$ vs. $9,015 \pm 0,698$, $p < 0,05$) aj RDW ($14,250 \pm 3,318$ vs. $13,320 \pm 2,593$, $p < 0,05$). Používanie MPV ako prognostického markera je otázkou budúcnosti, nakoľko si túto spojitosť treba ďalej výskumom overiť. Z dostupnej literatúry nie je zatiaľ jasné, či je zmena stredného objemu trombocytov spôsobená samotným KV ochorením, alebo je vzťah medzi KV rizikom a MPV príčinný. Nakoľko sme však použili pomerne homogénny súbor a bez zmeny KV rizika v sledovanom období, predpokladáme, že práve hematologické markery

by mohli spresňovať KV riziko a najmä odhaľovať efekt statínovej liečby. Je preto prínosné, že naša práca potvrdila schopnosti atorvastatínu znižovať MPV, čo nepriamo poukazuje na inhibíciu agregability krvných doštičiek a možný vplyv na KV riziko. Vzhľadom na význam MPV ako markera aktivovaných trombocytov a ako prediktora vaskulárnych príhod je tento účinok liečby atorvastatínom povzbudivý. Naša práca navyše naznačuje, že ak by sme používali parameter MPV ako prediktor KV ochorení, resp. pri ich diagnostike a sledovaní pacientov, mali by sme venovať súčasne pozornosť aj užívaniu statínovej liečby. Okrem toho by tento parameter mohol byť nápomocný pri sledovaní efektivity hypolipemickej liečby, resp. upozorňovať na riziko aterogénnej dyslipidémie.

Parameter RDW odzrkadľuje veľkosť cirkulujúcich erytrocytov v krvi. Okrem jeho využitia pri diferenciálnej diagnostike anémie, sa intenzívne diskutuje aj o jeho použití ako potencionálneho biomarkera KV ochorení. V práci P a t e l a kol. (2013) boli hodnoty RDW nad 14 % spájané so zhoršenou deformovateľnosťou a elasticitou červených krviniek, čo môže zhoršovať prietok krvi mikrocirkuláciou. Následné zhoršenie prívodu kyslíka do tkanív môže vysvetľovať zvýšené riziko KV príhody v spojení so zvýšenou hodnotou RDW (P a t e l a kol., 2013). Na parameter RDW sme sa v našej práci zamerali najmä z dôvodu pribúdania dôkazov o súvisi medzi zvýšeným RDW a výskytom fatálnych aj nefatálnych KV príhod (A n d e r s o n a kol., 2007). Zaujímavou je štúdia realizovaná na skupine 4874 neselektovaných probandov, ktorá potvrdila zvýšenie RDW v prípade nízkeho HDL-C, pri hypertriacylglycerolémii a zvýšenom aterogénnom indexe plazmy (L i p p i a kol., 2013). Hodnoty RDW v našom súbore ($13,363 \pm 2,988$ %) pred liečbou signifikantne korelovali s celkovým cholesterolom ($r = 0,434$, $p < 0,001$), triacylglycerolmi ($r = 0,647$, $p < 0,001$), LDL-C ($r = 0,327$, $p < 0,05$), ale v prípade HDL-C sme významnú súvislosť nezistili. Podobne ako pri MPV, ani v prípade RDW nebola zatiaľ publikovaná práca, ktorá by sledovala súvis medzi RDW a jednotlivými lipoproteínovými subpopuláciami. Zistili sme signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi malými denznými LDL a RDW ($r = 0,611$, $p < 0,001$). Podobne boli štatisticky významné aj korelácie RDW s inými aterogénnymi parametrami, ako apo B ($0,397$, $p < 0,001$), apoB/apoA1 ($0,456$, $p < 0,001$), respektíve AIP ($0,578$, $p < 0,001$). Z uvedeného vyplýva, že parameter RDW by podobne ako v prípade diagnostiky akútneho koronárneho syndrómu, mohol byť

nápomocný v presnejšom hodnotení KV rizika a pravdepodobnosti aterogenity plazmy v spojení s ostatnými lipidovými markermi. Efekt hypolipemickej liečby na RDW bol skúmaný v práci A k i n a kol. (2014) na skupine 79 pacientov, ktorí užívali atorvastatín v dávke od 10 do 80 mg počas 24 týždňov, pričom signifikantné zmeny v danej práci neboli zaznamenané (A k i n a kol., 2014). Výsledky našej práce sa odlišujú, pretože sme po 12 týždňoch liečby atorvastatínom zaznamenali signifikantné zníženie RDW ($13,363 \pm 2,988$ vs $12,571 \pm 2,447$, $p < 0,001$). Patofyziologický proces, ktorý by mohol viesť k vyššie spomínaným účinkom je stále predmetom výskumu. Predpokladá sa však, že zápalový proces môže byť dôležitým hráčom. Preto nemožno vylúčiť aj ďalšie klinicky významné použitie parametra RDW (K u č e r a, 2019).

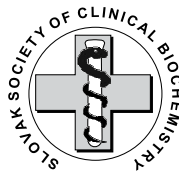
ZÁVER

Aj keď hodnoty RDW a MPV nebudú pravdepodobne zaručovať definitívnu, resp. bezchybnú prognostickú informáciu o kardiovaskulárnom riziku, pri ich správnom použití v praxi vedú poskytnúť dostupné, ekonomicky prijateľné a užitočné informácie, ktoré môžu efektívne dopĺňať a usmerňovať klinické rozhodovanie v praxi. Ich najväčšou výhodou je, že sú relatívne lacné a teda široko a ľahko dostupné v bežnej klinickej praxi. Každý pacient so zvýšenými hematologickými objemami pri splnení príslušnej indikácie, môže byť liečený statínom pre benefit nielen so samotného zníženia lipidov, ale aj pre ich ďalšie pleiotropné účinky. Distribučná šírka erytrocytov aj stredný objem trombocytov sú pomocné markery v diferenciálnej diagnostike hematologických ochorení a majú stanovené referenčné medze. Ich posudzovanie v hematológii je úzko naviazané na ostatné hematologické a biochemické parametre, preto by liečba statínmi nemala zásadne ich interpretáciu v súvislosti s hematologickými ochoreniami ovplyvňovať. Je potrebné však tieto parametre nepodceňovať, pre ich veľký potenciál nielen v samotnej diagnostike KV príhod, odhadovaní prognózy, ale aj pri liečbe. Pre ďalšie odporúčania ich využitia v bežnej praxi bude potrebné vo vedeckom výskume naďalej pokračovať.

LITERATÚRA

1. **Akin, F., Ayça, B. and Köse, N. (2014):** Effect of atorvastatin on hematologic parameters in patients with hypercholesterolemia. *Angiology*. doi: 10.1177/0003319713520419.
2. **Anderson, J. L. et al. (2007):** Usefulness of a Complete Blood Count-Derived Risk Score to Predict Incident Mortality in Patients With Suspected Cardiovascular Disease. *American Journal of Cardiology*. doi: 10.1016/j.amjcard.2006.08.015.
3. **Bowles, K. M. et al. (2005):** Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clinical and Laboratory Haematology*. doi: 10.1111/j.1365-2257.2005.00726.x.
4. **Carr, M. C. and Brunzell, J. D. (2004):** Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: Importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1210/jc.2004-0432.
5. **Detwiler, T. C., Odell, T. T. and MacDonald, T. P. (1962):** Platelet size, ATP content, and clot retraction in relation to platelet age. *The American journal of physiology*. doi: 10.1152/ajplegacy.1962.203.1.107.
6. **Drachman, J. G. (2004):** Inherited thrombocytopenia: When a low platelet count does not mean ITP. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2003-05-1742.
7. **Elsayed, A. M., Mohamed, G. A. (2017):** Mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio as a risk stratification tool in the assessment of severity of acute ischemic stroke. *Alexandria Journal of Medicine*. doi: 10.1016/j.ajme.2016.03.003.
8. **Ensign, W., Hill, N., Heward, C. B. (2006):** Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1373/clinchem.2005.059949.
9. **Fábryová, L. (2016):** Aterogénna dyslipidémia – nový cieľ v kardiovaskulárnej prevencii. *Atheroreview*, 1(3), pp. 126–137.
10. **Ji, S. et al. (2019):** Effects of statin therapy on mean platelet volume in patients with risk of cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis. *Bioscience Reports*. doi: 10.1042/BSR20190180.
11. **Kučera, M. (2019):** Význam hematologických markerov z pohľadu kardiovaskulárneho rizika. *Vaskulárna Medicína*, 11(2), pp. 70–73.

12. Lee, Y. M. et al. (2010): Cyclic nucleotides and mitogen-activated protein kinases: Regulation of simvastatin in platelet activation. *Journal of Biomedical Science*. doi: 10.1186/1423-0127-17-45.
13. Li, J. J. et al. (2012): Impact of 10mg rosuvastatin daily or alternate-day on lipid profile and inflammatory markers. *Clinica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.cca.2011.09.006.
14. Lippi, G. et al. (2013): Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients. *Kardiologia Polska*. doi: 10.5603/KP.2013.0228.
15. Luzak, B. et al. (2012): Pravastatin and simvastatin improves acetylsalicylic acid-mediated in vitro blood platelet inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02661.x.
16. Ma, L. P. et al. (2002): Inhibition of platelet aggregation and expression of alpha granule membrane protein 140 and thromboxane B2 with pravastatin therapy for hypercholesterolemia. *Journal of the Association for Academic Minority Physicians: the official publication of the Association for Academic Minority Physicians*.
17. Mahajan, K. (2015): Microparticles in Atherosclerosis: Biomarkers of Disease (2014). *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*. doi: 10.4172/2155-9880.1000356.
18. Maru, A. M. and Kokani, M. J. B. (2018): A study of correlation between Platelet Volume Indices (PVI) in patients of Dyslipidemia in tertiary care hospital. *Tropical Journal of Pathology and Microbiology*. doi: 10.17511/jopm.2018.i04.03.
19. Matýšková, M., Bourková, L. and Hoblová, J. (2005): Zajištění spolehlivosti vyšetření krevních obrazů. *Vnitřní Lekarství*.
20. May, J. E. et al. (2019): Three neglected numbers in the CBC: The RDW, MPV, and NRBC count. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. doi: 10.3949/ccjm.86a.18072.
21. Moscardó, A. et al. (2013): Reduction of platelet cytosolic phospholipase A2 activity by atorvastatin and simvastatin: Biochemical regulatory mechanisms. *Thrombosis Research*. doi: 10.1016/j.thromres.2013.01.007.
22. Oravec, S.; Jediná, V.; Žitňanová, I.; Gruber, K.; Dostal, E. (2020): Malé denzné LDL u osôb s poruchou metabolizmu lipoproteínov. *Laboratórna diagnostika*, 25(2), pp. 43–46.
23. Patel, K. V. et al. (2013): Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-1-4614-4989-8_29.
24. Pedrazzani, C. et al. (2020): Prognostic value of red cell distribution width (RDW) in colorectal cancer. Results from a single-center cohort on 591 patients. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-020-57721-4.
25. Piepoli, M. F. et al. (2016): 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*. Oxford University Press, pp. 2315–2381. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106.
26. Santilli, F. et al. (2012): Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obesity Reviews*. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00930.x.
27. Sivri, N. et al. (2013): Statins decrease mean platelet volume irrespective of cholesterol lowering effect. *Kardiologia Polska*. doi: 10.5603/KP2013.0259.
28. Vestník MZ SR (2015): Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky na poskytovanie zdravotnej starostlivosti dospelým pacientom s dyslipidémiou v ambulantnej zdravotnej starostlivosti. *Vestník Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky*, čiastka 14–30, ročník 63.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 79–85

SÚLAD A NESÚLAD MEDZI ZÁKLADNÝMI UKAZOVATEĽMI LIPIDOVÉHO METABOLIZMU STANOVENÝMI RUTINNÝMI LABORATÓRNÝMI METÓDAMI A METÓDOU PROTÓNOVEJ NUKLEÁRNEJ MAGNETICKEJ REZONANČNEJ SPEKTROSKOPIE V NÁHODNE VYBRANEJ POPULAČNEJ VZORKE

Rácz, O.¹, Pella, D.², Bilá, E.³

¹Ústav patologickej fyziológie LF UPJŠ, Košice

²II. Kardiologická klinika, VÚSCH a LF UPJŠ, Košice

³Allmedical s. r. o. Košice

olliracz@gmail.com

SÚHRN

Protónová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopie umožňuje meranie počtu častíc jednotlivých lipoproteínov a ich rozmer. Cieľom našej pilotnej štúdie bolo vyšetrenie náhodne vybranej skupiny probandov bez klinicky zjavných príznakov aterosklerotickej choroby srdca touto metódou a porovnanie výsledkov s hodnotami základného lipidového panelu meranými bežnými metódami. Výsledky korelačnej analýzy medzi výsledkami protónovej nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie a základnými ukazovateľmi lipidového metabolizmu potvrdili predpoklad o pridanej hodnote novej metódy vo vzťahu k ateroskleróze. Medzi vybranými parametrami výsledkov protónovej nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie a základnými ukazovateľmi lipidového metabolizmu bol významný nesúlad. Na základe počtu LDL častíc bolo 70 % probandov zaradených do horšej rizikovej triedy, ako na základe LDL cholesterolu. V prípade HDL bol nesúlad menej častý a približne polovica probandov bola zaradená do nižšej rizikovej skupiny podľa počtu častíc v porovnaní s HDL cholesterolom.

Kľúčové slová: Protónová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopie; lipoproteíny; aterosklerotická choroba srdca

ABSTRACT

Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy makes measurement of individual lipoprotein particle number and size possible. The aim of our pilot study was the assessment of a randomly selected group of probands without clinically manifest symptoms of atherosclerotic cardiovascular with this method and the comparison of results with values of basic lipid parameters measured by routine laboratory methods. The correlation analysis between results of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and basic parameters of lipid metabolism confirmed our assumption about the added value of the new method in relation to atherosclerosis. There was a significant discordance between results of selected parameters of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and basic parameters of lipid metabolism. 70 % of probands were ranked into

worse risk classes according to LDL particle number as compared with the LDL cholesterol values. In case of HDL the discordance was less common and about half of the probands was ranked into a better risk class according to the particle number as compared with HDL cholesterol values.

Key words: Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy; lipoproteins; atherosclerotic cardiovascular disease

ÚVOD

Základnými ukazovateľmi rizika aterosklerotickej choroby srdca (ACHS¹) a úspešnosti jej liečby sú podľa spoločných odporúčaní Európskej aterosklerotickej spoločnosti a Európskej federácie laboratórnej medicíny (EAS, EFLM, Nordestgaard a kol., 2019) parametre lipidového metabolizmu – celkový cholesterol (TC), LDL cholesterol (LDLC), HDL cholesterol (HDL), triacylglyceroly (TAG) a počítaná hodnota nonHDL cholesterolu (NHDLC). Súčasné odporúčania EAS a EFLM uvádzajú aj meranie alebo výpočet remnantného cholesterolu, ale tento ukazovateľ

ešte nie je u nás bežne používaný. Uvedené základné parametre však dávajú len hrubý odhad rizika ACHS, pretože okrem TAG poskytujú len informáciu o koncentrácii cholesterolu v lipoproteínoch a nie o ich štruktúre a kauzálneho vzťahu k rozvoju aterosklerózy. V poslednej dobe základný panel bol rozšírený o niekoľko nových metód (Rácz a kol. 2012; Clouet-Foraison a kol., 2017; Huang, Wang, Shen, 2018; Tsimika a kol., 2018; Oravec a kol., 2019 a 2020 – Tab. 1). Patogenéza aterosklerózy je komplexná a pri hodnotení individuálneho rizika je potrebné brať zreteľ aj na iné činitele, z ktorých niektoré sú všeobecne známe epidemiologické údaje (vek, pohlavie, fajčenie, nedostatok pohybu, obezita, diabetes a mnohé iné), ďalšie sú výsledky objektívnych laboratórnych a zobrazovacích vyšetrovacích metód, z ktorých mnohé sú zároveň aj v príčinnej súvislosti s rozvojom aterosklerózy a klinicky manifestnými formami ACHS (Žák, 2002; Kamenský, Studenčan, 2019). Najnovšie k týmto je možné a potrebné pridať aj stanovenie mutácií a polymorfizmov génov a biomarkerov epigenetických pochodov (Tada a kol., 2020).

K novým perspektívnym metódam detailnej analýzy štruktúry lipoproteínov (čo súvisí s ich aterogenicitou) patrí protónová nukleárna magnetická rezonančná spek-

Tab. 1. Rozšírené a pokročilé ukazovatele lipidového metabolizmu vo vzťahu k ateroskleróze

Apoproteín B100	Bielkovina potrebná pre vznik častíc typu LDL a pre ich väzbu na LDL receptor. V jednej častici LDL je jedna molekula B100 a preto jej koncentrácia poskytuje informáciu aj o tom, aký je pomer malých denzných a veľkých LDL častíc.*
Lipoproteín(a)	Nefunkčná, ale aterogénna častica LDL s naviazanou bielkovinou podobnou plazminogénu. Koncentrácia Lp(a) je daná geneticky – je vysoká približne u 20% populácie.*
Apoproteín AI	Tvorí 70% bielkovín HDL. Preberá cholesterol od ABCA1 transportéra. Účast' na modelácii HDL. Aktivuje enzým LCAT, ktorý tvorí estery cholesterolu. ^a
Lipoproteínmi-asociovaná fosfolipáza A2 (LP-PLA2)	Enzým. Zápalový marker, aktivita súvisí s rizikom ruptúry aterosklerotického plaku. ^{a,b}
Stanovenie subfrakcií Lipoproteínov	Elektroforetické delenie modernými metódami poskytuje informáciu o pomere aterogénnych a neaterogénnych frakcií jednotlivých lipoproteínov. ^a
Analýza apoproteínov hmotnostnou spektroskopiou	Detailný obraz o štruktúre všetkých proteínov v jednotlivých lipoproteínoch. ^a

* – dnes už bežne používané ukazovatele, sú uvedené aj v odporúčaníach EAS a EFLM;

^a – používané vo vedeckých štúdiách a v experimentálnej medicíne; ^b – lontroverzné údaje o aterogenicitě

¹ Výraz používaný „Atherosclerotic cardiovascular disease (ACVS) v odporúčaníach EAS a EFLM z roku 2019. U nás používame stále výrazy „koronárna choroba srdca“ a „ischemická choroba srdca“

trokopia (PNMR). Metóda bola vyvinutá v poslednom desaťročí minulého storočia (Otvos a kol., 1991) a dnes pomocou sofistikovanej výpočtovej techniky umožňuje meranie počtu častíc jednotlivých lipoproteínov a ich rozmer (Otvos a kol., 2011; Cromwell a kol., 2007; El Harchaoui a kol., 2007; Monsonis-Centelles a kol., 2017; Aru a kol., 2017).

Cieľom našej pilotnej štúdie bolo stanovenie lipidových parametrov metódou PNMR u probandov bez klinických prejavov ACHS, súvislostí medzi klasickými parametrami metabolizmu a výsledkami PNMR metódy a výpočet súladu a nesúladu medzi týmito hodnotami a klasicky meranými koncentráciami LDLC, HDLC, NHDLC a TAG.

Súbor vyšetrených a metódy

Do pilotnej štúdie bolo zaradených 50 probandov bez klinických známk ACHS vyšetrených na ambulancii vnútorného lekárstva (vek 37–72 rokov, 38 mužov a 12 žien). Vyšetrenie počtu a rozmerov lipoproteínov PNMR bolo robené metódou INFAI NMR spectroscopic assay (Nemecko). V našej analýze sme hodnotili ukazovatele počet častíc VLDLP², LDLP, LLDLP, SLDLP a HDLP, LHDLP a SHDLP a rozmer častíc VLDLS, LDLS a HDLS.

TC, HDLC, priamo meraný LDLC a TAG boli analyzované certifikovanými komerčnými súpravami na automatických analyzátoroch. NHDLC bol počítaný ako rozdiel TC a HDLC. Súlad a nesúlad medzi koncentráciou LDLC a LDLP, NHDLC

Tab. 2. Základné ukazovatele lipidového metabolizmu

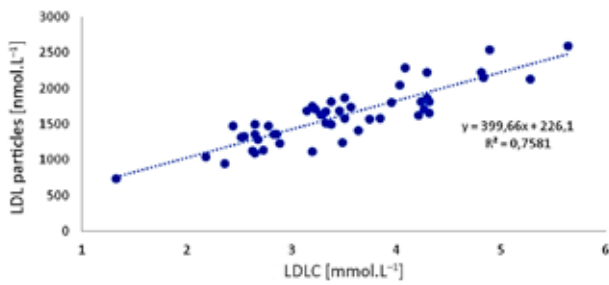
Koncentrácia [mmol·L ⁻¹]	TC	HDLC	LDLC	TAG	NHDLC
Priemer a smerodajná odchýlka	5,63 ± 1,01	1,49 ± 0,36	3,46 ± 0,86	1,71 ± 0,69	4,04 ± 0,94
Minimum–maximum	3,77–7,88	0,83–2,26	1,36–5,64	0,59–4,55	1,87–6,29
Distribúcia hodnôt Nízke/stredné/vysoké riziko	20/16/14 (20/32/28%)	22/22/6 (44/44/12%)	6/30/14 (12/60/28%)	27/13/10 (54/26/20%)	14/14/22 (28/28/44%)

Tab. 3. Počet a rozmer lipoproteínov na základe analýzy PNMR

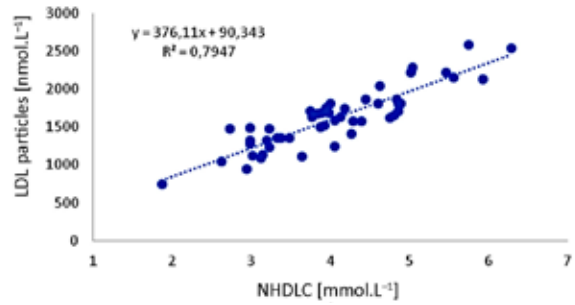
Počet častíc VLDL a LDL [nmol·L ⁻¹]	VLDLP	LDLP	LLDLP	SLDLP
Priemer a smerodajná odchýlka	5,44 ± 4,68	1610 ± 395	918 ± 226	698 ± 325
Minimum-maximum	1,40–23,20	740–2590	461–1407	152–1527
Počet častíc HDL [μmol·L ⁻¹]	HDLP	LHDLP	SHDLP	–
Priemer a smerodajná odchýlka	40,4 ± 5,01	5,79 ± 3,60	35,2 ± 6,05	–
Minimum-maximum	22,8–52,1	2,80–16,8	20,9–43,9	–
Rozmer častíc [nm]	VLDLS	LDLS	HDLS	–
Priemer a smerodajná odchýlka	49,8 ± 4,65	21,0 ± 0,46	8,79 ± 0,53	–
Minimum-maximum	41,1–64,3	20,1–21,8	8,2–10,4	–

Vysvetlivky: Podľa výrobcu horná hranica počtu častíc LDLP je 1300 nmol·L⁻¹; SLDLP častíc 1000 nmol·L⁻¹; HDL častíc 38 μmol·L⁻¹; rozmeru LDL častíc 20,5 nm; HDL častíc 9,0 nm. Pre ostatné parametre zatiaľ nie sú určené hodnoty nízkeho a vysokého rizika manifestácie ACHS

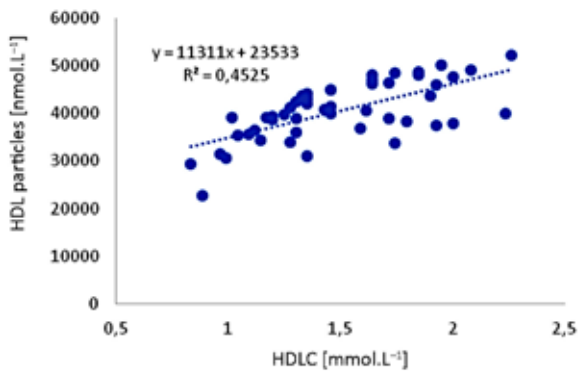
² „P“ na konci skratky znamená počet častíc, „S“ rozmer. Popis v zozname skratiek.



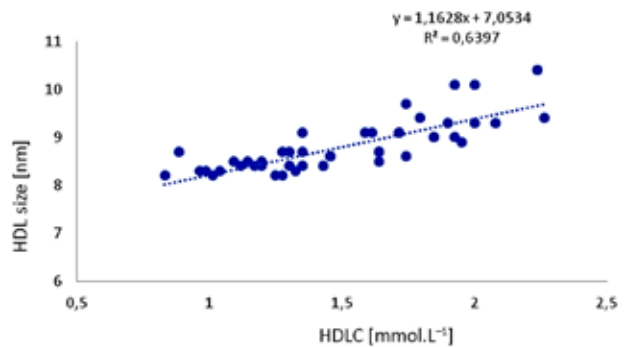
Obr. 1. Súvislosť medzi koncentráciou LDLC a počtom častíc LDLP



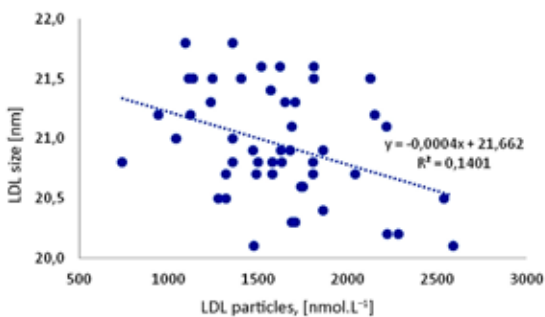
Obr. 2. Súvislosť medzi koncentráciou NHDLC a počtom častíc LDLP



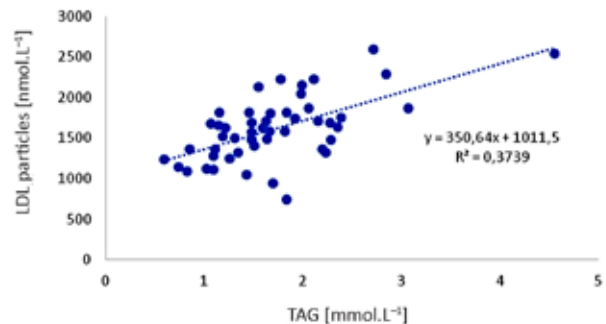
Obr. 3. Súvislosť medzi koncentráciou HDLC a počtom častíc HDLP



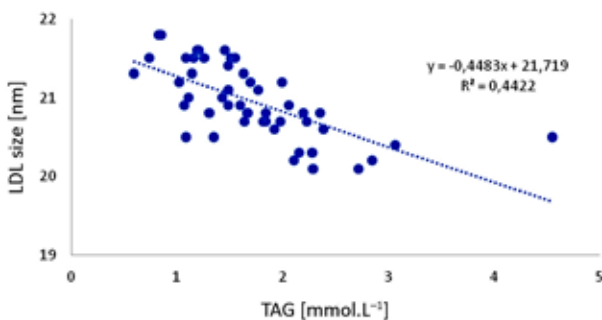
Obr. 4. Súvislosť medzi koncentráciou HDLC a rozmerom častíc HDLS



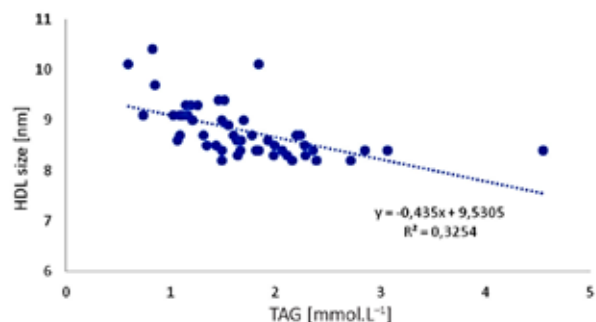
Obr. 5. Súvislosť medzi počtom a rozmerom častíc LDL



Obr. 6. Súvislosť medzi koncentráciou triacylglycerolov a počtom častíc LDLP



Obr. 7. Súvislosť medzi koncentráciou triacylglycerolov a rozmerom častíc LDL



Obr. 8. Súvislosť medzi koncentráciou triacylglycerolov a rozmerom častíc HDL

Tab. 4. Súlad a nesúlad medzi zaradením vyšetrených do rizikových tried

SÚLAD	LDLC/LDLP	HDLC/HDLP
Nízky/nízky	2 (4%)	17 (34%)
Stredný/stredný	1 (2%)	6 (12%)
Vysoký/vysoký	12 (24%)	3 (6%)
SÚLAD SPOLU	15 (30%)	26 (52%)
NESÚLAD	LDLC/LDLP	HDLC/HDLP
Nízky/stredný	7 (14%)	3 (6%)
Stredný/nízky	0	17 (34%)
Stredný/vysoký	10 (20%)	1 (2%)
Vysoký/stredný	0	1 (2%)
Nízky/vysoký	18 (36%)	1 (2%)
Vysoký/nízky	0	1 (2%)
NESÚLAD SPOLU	35 (70%)	24 (48%)

a LDLP a medzi HDLC a HDLP bol hodnotený na základe zaradenia hodnôt analytov ako „nízke, stredne vysoké a vysoké riziko“ podľa medzinárodných odporúčaní a podľa údajov poskytovateľa PNMR metódy.

VÝSLEDKY

Hodnoty základných parametrov lipidového metabolizmu vyšetreného súboru sú uvedené v Tab. 2. a výsledky PNMR analýzy v Tab. 3.

Korelačnou analýzou sme našli vysoko signifikantné súvislosti medzi klasickými parametrami a výsledkami PNMR (LDLC a HDLC oproti počtu častíc LDLP ($r = 0,87$ a $0,89$, $p < 0,001$, Obr. 1 a 2; HDLC a HDLP a HDLS ($r = 0,67$ a $0,80$, $p < 0,001$, Obr. 3 a 4) a jednu slabšiu nepriamu medzi LDLP a HDLS ($r = -0,37$; $p < 0,05$; Obr. 5).

Metóda PNMR neposkytuje informáciu o koncentrácii TAG, ale korelačnou analýzou sme našli signifikantnú priamu súvislosť medzi TAG a LDLP a nepriame medzi TAG a HDLS a HDLP ($r = 0,61$, $-0,64$ a $-0,57$; všetky $p < 0,01$ (Obr. 6–8). Výsledky korelačnej analýzy súvislostí medzi ostatnými základnými lipidovými a PNMR parametrami neboli signifikantné.

Súlad a nesúlad medzi výsledkami klasických parametrov a výsledkami PNMR sú v Tab. 4. Súlad medzi koncentráciou cholesterolu LDL a počtom častíc LDL bol len

30 % a 70 % vyšetrených bolo zaradených o jednu alebo dve triedy rizika horšie. Súlad medzi koncentráciou cholesterolu HDL a počtom častíc HDLP bol 52 % a najviac vyšetrených s nesúlalom (34 %) boli na základe hodnotenia častíc o triedu nižšie, ako na základe koncentrácie HDL cholesterolu.

DISKUSIA

Ukazovatele základného lipidového panelu sú jednoznačne dokázané rizikové faktory rozvoja ACHS a pre základnú informáciu budú ešte dlho využívané, napriek tomu, že neposkytujú informáciu o štruktúre a aterogenicite lipoproteínov. Výsledkom je to, že pomerne veľký počet ľudí s hodnotami základného panelu v oblasti vysokého rizika nemajú klinické prejavy ACHS a na druhej strane akútne formy ACHS sa môžu objaviť aj u tých, ktorí majú hodnoty základného panelu v norme.

Nesúlad medzi rizikom ACHS a jej klinickou manifestáciou je možné riešiť dvoma spôsobmi:

1. Individuálnym komplexným hodnotením reziduálneho rizika na základe analýzy všetkých známych činiteľov rozvoja aterosklerózy a použitím vhodných metód na ich objasnenie.
2. Rozšírením panelu biochemických ukazovateľov rizika, z ktorých niektoré sú už dnes súčasťou rutinného vyšetrenia probandov s vysokým rizikom (predovšetkým ApoB100 a lipoproteín(a)).

Zavedeniu pokročilých ukazovateľov metabolizmu lipidov, ktoré podľa údajov výskumu poskytujú reálny obraz o štruktúre a aterogenicite lipoproteínov do systému bráni:

- nedostatok relevantných údajov o ich pridanej hodnote pri hodnotení rizika ACHS,
- chýbanie certifikovaných a validovaných metód na ich meranie a
- v mnohých prípadoch ich vysoká cena.

V prípade PNMR tieto negatívne faktory sú dnes ešte prítomné, ale napriek tomu je jasné, že ide o perspektívnu metódu, pretože poskytuje detailný obraz o štruktúre lipoproteínov.

Naša pilotná štúdia tento názor potvrdzuje, a to predovšetkým výsledky korelačnej analýzy, konkrétne:

Korelácie medzi koncentráciou LDLC, NONHDLC, HDLC a počtom častíc LDLP a HDLP potvrdzujú správnosť

výsledkov PNMR (Obr. 1–3). Nepriama súvislosť medzi LDLC a rozmerom častíc (Obr. 5) potvrdzuje názor o úlohe malých denzných častíc v patogeneze aterosklerózy. Za významné považujeme súvislosti medzi koncentráciou triacylglycerolov a niektorými ukazovateľmi meranými PNMR (Obr. 6–8), pretože jeden z nedostatkov základného panelu je to, že poskytuje len informáciu o koncentrácii cholesterolu v jednotlivých lipoproteínoch, kým TAG je len súhrnom koncentrácie tejto látky vo všetkých častiach.

Výsledky častého nesúladu medzi zaradením vyšetrených do jednotlivých rizikových kategórií (oveľa viac horšie zaradených podľa PNMR oproti klasickým hodnotám LDL) je predčasné hodnotiť, pretože neexistuje klinická štúdia o tom, či je prísnejšie hodnotenie na základe počtu častíc znamená skutočne vyššie riziko manifestácie ACHS ako hodnota LDLC a NHDLC.

ZÁVER

Metóda PNMR poskytuje informáciu o počte a rozmeroch jednotlivých častíc lipoproteínov a preto z hľadiska objasnenia patobiológie aterosklerózy má oveľa väčšiu výpovednú hodnotu oproti základným parametrom lipidového metabolizmu, ktoré merajú len celkovú koncentraciu triacylglycerolov vo všetkých časticiach a cholesterolu v jednotlivých základných lipoproteínoch. Pred zavedením PNMR do bežného vyšetrovacieho algoritmu stanovenia rizika ACHS je potrebné pomocou klinických štúdií objasniť vzťah jednotlivých parametrov k ostatným rizikovým faktorom a ku klinickým prejavom a koncovými východiskami choroby. Je potrebné skúmať príčinu a podstatu nesúladu medzi zaradením vyšetrených do jednotlivých rizikových skupín na základe výsledkov rôznych (nie len základných a PNMR) metód. Na základe týchto štúdií bude možné v neďalekej budúcnosti vypracovať jednoduchý a pre každodennú prax zrozumiteľný algoritmus hodnotenia rizika ACHS s vyššou výpovednou hodnotou, ako sú súčasné odporúčania.

LITERATÚRA

1. **Aru, V. et al. (2017):** Quantification of lipoprotein profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2017.07.009.
2. **Clouet-Foraion, N. et al. (2017):** Advanced lipoprotein testing for cardiovascular diseases risk assessment: A review of the novel approaches in lipoprotein profiling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. doi: 10.1515/cclm-2017-0091.
3. **Cromwell, W. C. et al. (2007):** LDL particle number and risk of future cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study—Implications for LDL management. *Journal of Clinical Lipidology*. doi: 10.1016/j.jacl.2007.10.001.
4. **El Harchaoui, K. et al. (2007):** Value of Low-Density Lipoprotein Particle Number and Size as Predictors of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women. The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Journal of the American College of Cardiology*. doi: 10.1016/j.jacc.2006.09.043.
5. **Huang, F., Wang, K., Shen, J. (2020):** Lipoprotein-associated phospholipase A2: The story continues. *Medicinal Research Reviews*. doi: 10.1002/med.21597.
6. **Kamenský, G., Studenčan, M. (2019):** Štandardný diagnostický a terapeutický postup na komplexný manažment pacienta so stabilnou koronárnou chorobou srdca. Available at: https://www.mzsr.sk/Zdroje?/Sources/dokumenty/SDTP/standardy/1-5-2020/Kardiologia-Komplexny_manazment_pacienta_so_stabilnou_koronarnou_choroba_srdca.pdf.
7. **Monsonis Centelles, S. et al. (2017):** Toward Reliable Lipoprotein Particle Predictions from NMR Spectra of Human Blood: An Interlaboratory Ring Test. *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01329.
8. **Nordestgaard, B. G. et al. (2020):** Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: Consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.12.005.
9. **Oravec, S. et al. (2019):** Small dense LDL—An important part of the atherogenic lipoprotein profile in individuals with impaired metabolism of lipoproteins. Comparison of two analytical procedures. *Neuroendocrinology Letters*.
10. **Oravec, S. et al. (2020):** Malé denzné LDL u osôb s poruchou metabolizmu lipoproteínov. *Laboratórna Diagnostika*, 25(2), pp. 43–46.
11. **Otvos, J. D., Jeyarajah, E. J., Bennett, D. W. (1991):** Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/37.3.377.
12. **Otvos, J. D. et al. (2011):** Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and parti-

cle number. *Journal of Clinical Lipidology*. doi: 10.1016/j.jacl.2011.02.001.

13. **Rácz, O. et al. (2009):** Apoproteín B100 – významný krok k presnejšej diagnostike rozvoja aterosklerózy a rizika manifestácie jej následkov – 1. časť. *Labor Aktuell*, 8(2), pp. 17–21.

14. **Tada, H., Takamura, M., Kawashiri, M. aki (2020):** What is the mechanism of genetic contributions to the development of atherosclerosis? *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.006.

15. **Žák, A. (2002):** Poruchy metabolizmu lipidů a lipoproteinů. In **Zima, T. (ed.):** *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén, pp. 125–159.

ZOZNAM SKRATIEK	
ACHD	Aterosklerotická choroba srdca
APOB100	Apoproteín B100
EAS	Európska aterosklerotická spoločnosť
EFLM	Európska federácia laboratórnej medicíny
HDL	Lipoproteín o vysokej hustote
HDLC	koncentrácia cholesterolu v HDL
HDLP, LHDL, SHDL	Počet častíc HDL, počet veľkých (L) a malých (S) častíc HDL
HDLS	Rozmer častíc HDL
LP-PLA2)	Lipoproteínmi-asociovaná fosfolipáza A2
LDL	Lipoproteín o nízkej hustote
LDLC	koncentrácia cholesterolu v LDL
LDLP, LLDLP, SLDLP	Počet častíc LDL, počet veľkých (L) a malých (S) častíc LDL
LDLS	Rozmer častíc LDL
NONHDLC	Koncentrácia cholesterolu v lipoproteínoch okrem HDL častíc
PNMR	Protónová nukleárna magnetická rezonancia
TAG	Triacylglyceroly
TC	Celkový cholesterol
VLDL	Lipoproteín o veľmi nízkej hustote
VLDLP	Počet častíc VLDL
VLDLS	Rozmer častíc VLDL



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 86–92

VPLYV HYPOLIPEMICKEJ LIEČBY NA LIPOPROTEINOVÝ PROFIL PACIENTOV S ARTERIÁLNOU HYPERTENZIOU

Oravec, S.¹, Potočárová, M.¹, Kováčová E.¹, Kupčová V.², Bulas J.¹

¹I. Interná klinika LF UK a UNB Staré Mesto, Bratislava

²III. Interná klinika LF UK a UNB, Bratislava

stanislavoravec@yahoo.com

SÚHRN

Kontinuálne sledovanie rizikových faktorov u osôb s diagnostikovaným ochorením kardio-vaskulárneho systému je už rutinnou prácou klinikov. Dokážu ním zabezpečiť a optimalizovať liečbu pacientov. Reziduálne riziko ostáva žiaľ aj naďalej vysoké.

Preto nové, doteraz nie monitorované parametre tukového metabolizmu – akými sú identifikácia aterogénnych lipoproteínov, silne aterogénnych malých denzných LDL (mdLDL) a subfrakcie HDL doteraz nesledované, môžu výrazne zlepšiť liečbu pacientov, pomôžu stabilizovať funkciu ciev a srdca a tým zabezpečiť lepšiu prognózu pacientov s kardio-vaskulárnymi ochoreniami. Určenie neaterogénnych a aterogénnych lipoproteínových subpopulácií predstavuje novú iniciatívu lepšie určiť reziduálne riziko u týchto pacientov-kardiakov.

To je dôvodom, aby sa mdLDL a určovanie aterogénnych subpopulácií lipoproteínov stalo rutinnou laboratórnou analýzou pre precíznejšiu klinickú diagnostiku miery rizika pacienta s ochoreniami kardio-vaskulárneho systému.

Optimálna liečba statínmi a fibrátmi – ako dokazujú analýzy lipidov a lipoproteínov v tejto práci – má stále prioritné miesto v znižovaní rizikových faktorov pacientov s ochoreniami srdca a ciev.

Kľúčové slová: artériová hypertenzia, dyslipoproteinémia, aterogénny lipoproteínový profil, malé denzné LDL, supopulácie HDL

ABSTRACT

Regular monitoring of the risk factors in patients with diagnosed cardio-vascular disease is already a routine work of clinicians. Risk factors monitoring is considered to secure an optimal treatment of patients. However, a residual cardio-vascular risk, remains ever high.

That is why new parameters of lipid metabolism such as small dense LDL, atherogenic lipoprotein subfractions, subfractions of HDL—not monitored till now—can significantly contribute to the treatment of patients, help to stabilise the vessel and heart functions, and thereby secure better prognosis of cardiac patients.

Identification of atherogenic and nonatherogenic lipoprotein subfractions represents a new chance to better determine a residual risk for patients with coronary heart disease (CHD). These are the reasons why sdLDL analysis and identification of atherogenic lipoprotein subfractions should become a routine laboratory practice for more precise diagnosing of risks of patients with cardio-vascular diagnoses.

Treatment with statins and fibrates—according to our study results—takes a priority place in reducing of risk factors in patients with cardio-vascular diseases.

Key words: arterial hypertension, dyslipoproteinemia, atherogenic lipoprotein profile, small dense LDL, HDL subfractions

ÚVOD

Artériová hypertenzia a hyperlipoproteinémia predstavujú dva najčastejšie rizikové faktory rozvoja kardio-vaskulárnych ochorení (rľ KVO) (A i a kol., 2010). Patria medzi ovplyvniteľné rizikové faktory a je priáním zdravotníkov, ako aj pacienta, tieto rizikové faktory odstrániť. Neliečena, ale aj nie optimálne vedená liečba dyslipoproteinémie (T o t h, 2016), rovnako ako aj artériovej hypertenzie, môže mať spravidla fatálne dôsledky pre pacienta (D u k a t a kol., 2012; K a s k o a kol., 2014). Obe ochorenia vyžadujú komplexný liečebný prístup: dietetickú liečbu, zmenu životného režimu, ako aj farmakologickú liečbu. Klinické štúdie potvrdili, že hypolipemická liečba v kombinácii s antihypertenzívnou liečbu účinne znižuje kardio-vaskulárne riziko vzniku náhlych koronárnych a cerebro-vaskulárnych príhod a zlepšuje prognózu postihnutej osoby.

Zavedenie nových laboratórnych diagnostických postupov na identifikáciu rizikových faktorov, ich kontinuálne monitorovanie a znižovanie ich koncentrácie v krvi pacientov, predstavuje významný prínos pre ošetrojúceho lekára a pomoc pri nastavení optimálnej liečby rizikovej osoby. K tradične sledovaným rľ KVO, ako je celkový cholesterol, HDL-, LDL-cholesterol a triacylglyceroly, možno zaradiť vyšetrenie malých denzných LDL (mdLDL), silne aterogénnej subpopulácie LDL triedy (O r a v e c a kol., 2011a; O r a v e c a kol., 2011b) a subfrakcie HDL triedy (K a s k o a kol., 2014; K a s k o a kol., 2018)

Pacienti

Do súboru sledovaných pacientov s liečenou artériovou hypertenziou a dyslipoproteinémiou bolo zaradených 178 osôb. Z toho kontrolnú skupinu tvorilo 42 liečených hypertonikov, (7 mužov a 35 žien, priemerný vek 60 rokov) s krvným tlakom v intervale normotenzie (125/75 torr), s normolipémiou, bez nutnej hypolipemickej liečby.

Do podsúboru s hypolipemickou liečbou bolo zarade-

ných 83 pacientov, (30 mužov a 53 žien, priemerný vek 68 rokov) u ktorých sa upravila hypertenzia antihypertenzívnou liečbou a hypolipemickou liečbou sa navodila normolipémia.

Ďalší podsúbor tvorilo 53 hypertonikov s hyperlipoproteinémiou, (24 mužov a 29 žien, priemerný vek 61 rokov). Arteriálna hypertenzia sa upravila antihypertenzívnou liečbou, ale pre intoleranciu hypolipemickej liečby sa od ďalšej hypolipemickej liečby upustilo. V čase testovania boli pacienti normotenzní, ale pretrvávala hyperlipoproteinémia. Dietetické odporúčania a odporúčená zmena životného štýlu neboli dostatočne účinné a ku korigovaniu hyperlipoproteinémie nedošlo.

Liečba artériovej hypertenzie bola založená prevažne na antagonistoch osi renin-angiotenzín-aldosterón (sartany a inhibítory ACE) v kombinácii s antagonistami kalciového kanála (prevažne amlodipin) a v prípade potreby doplnená o indapamid. U všetkých súborových pacientov bola dosiahnutá normotenzia. V podmienkach rutínnej klinickej práce sme sa zamerali skôr na hypolipemickú liečbu. Pre liečbu hyperlipoproteinémie sa odporúčili statíny a fibráty: *atorvastatin* 40 mg/deň, alternatíva *simvastatin* 40 mg/deň, resp. fenofibrat 215 mg/deň.

Informovaný súhlas s liečbou deklarovali všetky liečebné osoby v súbore.

Štatistické vyhodnotenie sa vykonalo nepárovým Studentovým t-testom. Za signifikantnosť v rozdieloch porovnávaných parametrov sa deklarovala hodnota $p < 0,05$.

METÓDY

Celkový cholesterol a triacylglyceroly sa analyzovali enzymatickou CHOD-PAP metódou (Roche Diagnostics, FRG).

Subfrakcie LDL sa analyzovali systémom Lipoprint LDL System (H o e f n e r a kol., 2001) a subfrakcie HDL systémom Lipoprint HDL System (M o r a i s a kol., 2003), elektroforetickou metódou (Quantimetrix, Ca, USA).

Cieľ štúdie

Cieľom práce bolo testovať u pacientov s ochorením kardio-vaskulárneho systému novo deklarované rizikové faktory rozvoja kardio-vaskulárneho ochorenia: malé denzné LDL (mdLDL) a subpopulácie HDL s akcentom na malé HDL (small HDL).

VÝSLEDKY

V **Tab. 1** sa porovnávajú dva typy normolipémie:

1. *prirodená* (n = 42) vs. 2. *docielená* hypolipemic-kou liečbu v subpopulácii s navodenou normolipémiou (n = 83). Hypolipemická liečba upravuje koncentráciu lipi-dov a lipoproteínov v sére na hodnoty podobné ako v sku-pine kontrolnej. Oproti kontrolnej skupine sa docielili do-konca nižšie hodnoty celkového cholesterolu (p < 0,002)

a LDL-cholesterolu (p < 0,002), ale aj pokles koncentrácie subfrakcie LDL1, ktorá tvorí neaterogénnu súčasť lipopro-teínového spektra (p < 0,0001) na vysokej hladine signifi-kantnosti.

V **Tab. 2** sa porovnávajú dve podskupiny pacientov s dyslipoproteinémiou. V prvej podskupine je normo-lipémia po liečbe. Druhú podskupinu tvoria pacienti s hyperlipoproteinémiou, kde sa pre intoleranciu hypo-lipemickej liečby v liečbe nepokračovalo. Ide o hyperli-

Tab. 1. Súbor hyperlipoproteinemikov s liečbou navodenou normolipémiou
(pacienti s hypolipemickou liečbou, n = 83) v.s. kontrola (n = 42)

Lipidový parameter [mmol/l] ± SD	Pacienti s hypolipemickou liečbou (n = 83)	Kontrola (n = 42)	Pacienti s hypolipemickou liečbou v.s. kontrola
VLDL	0,69 ± 0,24	0,67 ± 0,17	n. s.
IDL1	0,51 ± 0,15	0,51 ± 0,12	n. s.
IDL2	0,28 ± 0,09	0,26 ± 0,08	n. s.
IDL3	0,38 ± 0,14	0,42 ± 0,14	n. s.
LDL1	1,00 ± 0,29	1,20 ± 0,23	p < 0,0001
LDL2	0,41 ± 0,21	0,40 ± 0,25	n. s.
mdLDL	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02	n. s.
HDL	1,19 ± 0,30	1,20 ± 0,27	n. s.
T-Chol	4,50 ± 0,66	4,70 ± 0,44	p < 0,002
LDL	2,62 ± 0,49	2,81 ± 0,37	p < 0,002
TAG	1,45 ± 0,86	1,28 ± 0,56	n. s.

Tab. 2. Súbor hyperlipoproteinemikov s liečbou navodenou normolipémiou (n = 83)
v.s. pacienti s neliečenou hyperlipoproteinémiou (n = 53)

Lipidový parameter [mmol/l] ± SD	Pacienti s hypolipemickou liečbou n = 83	Pacienti bez liečby n = 53	Pacienti s hypolipemickou liečbou v.s. pacienti bez liečby
VLDL	0,69 ± 0,24	0,81 ± 0,31	p < 0,0001
IDL1	0,51 ± 0,15	0,69 ± 0,20	p < 0,0001
IDL2	0,28 ± 0,09	0,38 ± 0,14	p < 0,0001
IDL3	0,38 ± 0,14	0,57 ± 0,40	p < 0,0001
LDL1	1,00 ± 0,29	1,42 ± 0,40	p < 0,0001
LDL2	0,41 ± 0,21	0,69 ± 0,42	p < 0,0001
mdLDL	0,03 ± 0,03	0,14 ± 0,14	p < 0,0001
HDL	1,19 ± 0,30	1,34 ± 0,97	p < 0,001
T-Chol	4,50 ± 0,66	6,04 ± 0,97	p < 0,0001
LDL	2,62 ± 0,49	3,89 ± 0,87	p < 0,0001
TAG	1,45 ± 0,86	1,75 ± 0,43	n. s.

**Tab. 3. Súbor hyperlipoproteinemikov s neliečenou normolipémiou (n = 53)
v.s. kontrola (n = 42)**

Lipidový parameter [mmol/l] ± SD	Pacienti bez liečby (n = 53)	Kontrola (n = 42)	Pacienti bez liečby v.s. kontrola
VLDL	0,81 ± 0,31	0,67 ± 0,17	p < 0,0001
IDL1	0,69 ± 0,20	0,51 ± 0,12	p < 0,0001
IDL2	0,38 ± 0,14	0,26 ± 0,08	p < 0,0001
IDL3	0,57 ± 0,40	0,42 ± 0,14	p < 0,0001
LDL1	1,42 ± 0,40	1,20 ± 0,23	p < 0,0001
LDL2	0,69 ± 0,42	0,40 ± 0,25	p < 0,0001
mdLDL	0,14 ± 0,14	0,02 ± 0,02	p < 0,0001
HDL	1,34 ± 0,97	1,20 ± 0,27	p < 0,002
T-Chol	6,04 ± 0,97	4,70 ± 0,44	p < 0,0001
LDL	3,89 ± 0,87	2,81 ± 0,37	p < 0,002
TAG	1,75 ± 0,43	1,28 ± 0,56	p ≤ 0,05

Tab. 4. HDL subpopulácie v súbore hyperlipoproteinemikov s liečbou navodenou normolipémiou (n = 83) v.s. kontrola (n = 42)

Subpopulácie HDL [mmol/l]	Pacienti s hypolipemickou liečbou (n = 83)	Kontrola (n = 42)	Pacienti s hypolipemickou liečbou v.s. kontrola
Large HDL	0,43	0,43	n.s.
Intermediate HDL	0,58	0,62	n.s.
Small HDL	0,14	0,13	n.s.

Tab. 5. HDL subpopulácie v súbore hyperlipoproteinemikov s normolipémiou (n = 83) v.s. pacienti s neliečenou hyperlipoproteinémiou (n = 53)

Subpopulácie HDL [mmol/l]	Pacienti s hypolipemickou liečbou (n = 83)	Pacienti bez liečby (n = 53)	Pacienti s hypolipemickou liečbou v.s. pacienti bez liečby
Large HDL	0,43	0,30	n.s.
Intermediate HDL	0,58	0,69	p < 0,03
Small HDL	0,14	0,18	p < 0,03

Tab. 6. HDL subpopulácie. Súbor hyperlipoproteinemikov s neliečenou normolipémiou (n = 53) v.s. kontrola (n = 42)

Subpopulácie HDL [mmol/l]	Pacienti bez liečby (n = 53)	Kontrola (n = 42)	Pacienti s hypolipemickou liečbou v.s. pacienti bez liečby
Large HDL	0,30	0,43	n.s.
Intermediate HDL	0,69	0,62	p < 0,01
Small HDL	0,18	0,13	p < 0,02

poproteinému (HLP) so zvýšenými hodnotami celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a hranične zvýšenými hodnotami triacylglycerolov. Malé denzné LDL- silne aterogénne lipoproteínové subpopulácie – dosahujú 7semdnásobne vyššiu koncentráciu nielen oproti hodnotám mdLDL kontrolnej skupiny, ale aj liečenej hypolipemickej podskupiny. Liečba hypolipemikami účinne znižujú koncentráciu mdLDL v sére. Prekvapivé je zistenie, že v neliečenej hyperlipemickej podskupine (n = 53), sú LDL1, LDL2, (p < 0,0001), aj HDL trieda, signifikantne vyššie (p < 0,01), než u liečených pacientov s normolipemiou.

V Tab. 3 sa pre kompletnosť porovnávala podskupina s neliečenou hyperlipoproteinómiou oproti kontrolnej skupine. Rozdiely v koncentráciách sledovaných lipidových parametroch sú vysoko signifikantné. V lipoproteínovom obraze neliečenej hyperlipoproteinémie, v porovnaní s kontrolnou skupinou, dominujú vyššie hladiny LDL1 (p < 0,0001) a tiež vysoké zastúpenie aterogénnych mdLDL (p < 0,0001)

Subpopulácie HDL

Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6. Pri HDL subpopuláciách, najvyššiu koncentráciu malých HDL (small HDL) majú neliečení hyperlipoproteinemici, a to 0,18 mmol/l:

- a) porovnávaná oproti kontrolnej skupine Tab. 6 (p < 0,02)
- b) porovnávaná oproti subpopulácii liečených normolipemikov Tab. 5 (p < 0,03).

DISKUSIA

Kontinuálne sledovanie rizikových parametrov rozvoja degeneratívnych ochorení kardio-vaskulárneho systému (KVS) u osôb s diagnostikovaným ochorením srdca a ciev (A i a kol., 2010; H o o g e v e n a kol., 2014) je už rutinnou prácou klínikov, ktorou dokážu optimalizovať a individuálne nastaviť liečbu pacientov. Ale reziduálne riziko u pacientov aj pri hypolipemickej liečbe ostáva naďalej vysoké. Nové, doteraz nie rutinne monitorované parametre metabolizmu lipoproteínov, ktoré sa podieľajú na kontrole funkcie srdca a ciev, môžu napomôcť zlepšiť liečbu a prognózu pacientov, pokiaľ analyzovanie týchto parametrov by sa stalo rutinnou výzbrojou klínikov. V laboratórnej diagnostike a klinickej praxi je iniciatíva zavádzať stále dostupnejšie metódy analýz malých denzných LDL

(H i r a n o a kol., 2005, T s a i a kol., 2014) a tiež subpopulácií HDL (M o r a i s a kol., 2003; K a s k o a kol., 2014; K a s k o a kol., 2020).

Kvantifikovanie lipoproteínových subfrakcií s aterogénnymi ale aj ateroprotektívnymi vlastnosťami predstavujú nové možnosti posúdenia miery kardio-vaskulárneho rizika liečených osôb a optimalizovať ich liečebno-preventívne odporúčania (O r a v e c a kol., 2014; O r a v e c a kol. 2020). Analýza malých denzných LDL a malých HDL častíc sú reprezentantmi tejto novej iniciatívy (H i r a y a m a, M i d a, 2012). Liečba statínmi a fibrátmi – ako dokazujú výsledky predloženej štúdie – má stále prvotné miesto v liečbe KVO. Avšak, precizovanie ich indikácie, individuálne upravovanie dávkovania a výber typu hypolipemika je významným prínosom, ktorý môže lekár pacientovi poskytnúť. Počas liečby hypolipemikami môže dôjsť aj k zníženiu zastúpenia ateroprotektívnych lipoproteínov v lipoproteínovom spektre, čo nie je v liečbe žiadúce. Monitorovanie subpopulácií aterogénnych lipoproteínov, ktoré aterogénny proces akcelerujú, a naopak ateroprotektívnych lipoproteínov, ktoré proces aterogenézy tlmia, ponúka terapeutovi vyššiu úroveň informácie o tom, ako monitorovať vasoprotektívnu liečbu u každého jedného pacienta individuálne.

Predmetná klinická štúdia predkladá dôkazy, že cieľná hypolipemická liečba významne znižuje sérovú hladinu celkového cholesterolu (p < 0,0001), subfrakcie lipoproteínovej triedy LDL, včítane LDL1, a upravuje ich na hladiny, aké sa analyzovali v kontrolnej skupine (Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3). LDL1 sérová koncentrácia vďaka hypolipemickej liečbe výrazne klesla a v podskupine normolipemickej, navodenej hypolipemickou liečbou, sú LDL1 hladiny ešte nižšie (p < 0,0001), než v kontrolnej skupine. Účinok liečby je prenikavý. Avšak otázka ostáva naďalej otvorenou, či aj zníženie koncentrácie LDL1 (ide o subfrakciu s dokázanými ateroprotektívnymi charakteristikami), navodenej hypolipemickou liečbou, je pre pacienta zdravotným benefitom.

Koncentrácia malých denzných LDL (mdLDL) je vysoká v subpopulácii s neliečenou hyperlipoproteinómiou. (O r a v e c a kol., 2015; O r a v e c a kol., 2019). Po hypolipemickej liečbe sa koncentrácia mdLDL výrazne znižuje, až na hodnoty mdLDL, aké sa namerali v kontrolnej skupine (normolipemici). To je pozitívnym znakom predmetnej hypolipemickej liečby.

Relatívne vysoká koncentrácia HDL (ateroprotektívna súčasť lipoproteínového spektra) sa u liečených hyperlipo-

proteinemikov výrazne znížila ($p < 0,001$) na hladinu, aká sa namerala v kontrolnej skupine. Bolo by iste prínosom predmetnej hypolipemickej liečby, keby výrazný pokles hladiny protektívnych HDL, takáto liečba nenavodzovala.

Testovanie subpopulácií HDL, tradične deklarovanej ateroprotektívnej lipoproteínovej triedy, je ďalším prínosom v určovaní miery aterogénneho rizika pacientov s KVO (K a s k o a kol., 2018). V klinickej štúdii sa analyzovali veľké HDL, intermediárne HDL a malé HDL. V podskupine hyperlipemických pacientov, s upravenými hodnotami krvného tlaku, kde sa k hypolipemickej liečbe pre intoleranciu liečby hypolipemikami nepristúpilo, sa potvrdila nielen vysoká koncentrácia silne aterogénnych mdLDL, ale tiež vysoká koncentrácia malých HDL ($p < 0,003$) – čo je potvrdením aterogénneho charakteru malých HDL = HDL3 subfrakcie. To všetko sú indicie, že vysoká koncentrácia malých HDL-lipoproteínových častíc v lipoproteínovom spektre, v súčinnosti s vysokými hladinami mdLDL, napomáha vzniku aterogénnej dyslipoproteinémie. A čo je ešte alarmujúcejšie, malé HDL napomáhajú k vytvoreniu aterogénneho lipoproteínového profilu aj pri normálnej hladine cholesterolu a triacylglycerolov. Hovoríme o aterogénnej normolipémii, ktorá reprezentuje pre jej nositeľa vysoké kardiovaskulárne riziko so všetkými fatálnymi dôsledkami.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená vedeckými grantmi VEGA 1/0826/18 a VEGA 1/0807/18 Ministerstva školstva Slovenskej republiky.

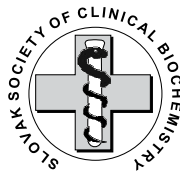
LITERATÚRA

1. **Ai, M. et al. (2010):** Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: Results from the Framingham offspring study. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1373/clinchem.2009.137489.
2. **Dukát, A. et al. (2012):** Size of low-density lipoprotein particles in patients after stroke. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. doi: 10.20452/pamw.1491.
3. **Hirano, T., Ito, Y., Yoshino, G. (2005):** Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. doi: 10.5551/jat.12.67.
4. **Hirayama, S., Miida, T. (2012):** Small dense LDL: An emerg-

ing risk factor for cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.010.

5. **Hoefner, D. M. et al. (2001):** Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the quantimetrix lipoprint LDL system. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/47.2.266.
6. **Hoogeveen, R. C. et al. (2014):** Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303284.
7. **Kasko, M. et al. (2014):** High-density lipoprotein profile in newly-diagnosed lower extremity artery disease in Slovak population without diabetes mellitus. *Neuroendocrinology Letters*.
8. **Kasko, M., Kasko, V., Oravec, S. (2018):** Would Janus' view on HDL be useful? *Bratislava Medical Journal*. doi: 10.4149/BLL_2018_046.
9. **Kaško, M., Oravec, S. (2020):** HDL profil jedincov s aterosklerotickým poškodením periférnych ciev. *Laboratórna Diagnostika*, 25(2), pp. 35–42.
10. **Morais, J., Neyer, G., Muniz, N. (2003):** Measurement and distribution of HDL subclasses with the new Lipoprint HDL Method. *Abstracts of the 55th Annual Meeting of the AACC (American Association of Clinical Chemistry)*. Philadelphia, Pennsylvania, USA. July 20-24, 2003.
11. **Oravec, S. et al. (2011a):** Atherogenic normolipidemia—A new phenomenon in the lipoprotein profile of clinically healthy subjects. *Neuroendocrinology Letters*.
12. **Oravec, S. et al. (2011b):** Hyper-beta lipoproteinemia LDL 1,2: A newly identified nonatherogenic hypercholesterolemia in a group of hypercholesterolemic subjects. *Neuroendocrinology Letters*.
13. **Oravec, S. et al. (2014):** Atherogenic Versus Non-atherogenic Lipoprotein Profiles in Healthy Individuals. Is There a Need to Change Our Approach to Diagnosing Dyslipidemia? *Current Medicinal Chemistry*. doi: 10.2174/0929867321666140303153048.
14. **Oravec, S. et al. (2015):** The Assessment of the Atherogenic Lipoprotein Profile in Cardiovascular Diseases by Lipoprint System Analysis. In *Lipoproteins—From Bench to Bedside*. doi: 10.5772/60989.
15. **Oravec, S. et al. (2019):** Small dense LDL—An important part of the atherogenic lipoprotein profile in individuals with impaired metabolism of lipoproteins. Comparison of two analytical procedures. *Neuroendocrinology Letters*.

16. **Oravec, S. et al. (2020):** Malé denzné LDL u osôb s poruchou metabolizmu lipoproteínov. *Laboratórna Diagnostika*, 25(2), pp. 43–46.
17. **Toth, P. P. (2016):** Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*. doi: 10.2147/VHRM.S104369.
18. **Tsai, M. Y. et al. (2014):** New automated assay of small dense low-density lipoprotein cholesterol identifies risk of coronary heart disease: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302401



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 93–96

NANOČASTICE OXIDU TITANIČITÉHO MODULUJÚ LIPIDY U MLADÝCH POTKANOV

Dvořáková, M.¹, Scsuková, S.², Rollerová, E.³, Žitňanová, I.¹, Laubertová, L.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava

²Oddelenie toxikológie, Fakulta verejného zdravotníctva, SZU, Bratislava

³Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, SAV, Bratislava

lucia.laubertova@fmed.uniba.sk

SÚHRN

Vývoj nanočastíc a nanomateriálov v biomedicíne zažíva v súčasnej dobe obrovskú expanziu. Tie isté vlastnosti, ktoré robia nové nanomateriály nenahraditeľné pre ich využitie, dokážu ovplyvniť ich interakciu s biologickými systémami a spôsobovať nežiaduce účinky.

Cieľom našej štúdie bolo zistiť možný vzťah medzi koncentráciou lipoperoxidov ako predstaviteľov oxidačného poškodenia lipidov a expozíciou 1 % alebo 10 % LD50 TiO₂ v dvoch rôznych životných fázach samíc potkanov.

Pri porovnaní infantilných a dospelých potkanov sa u dospelých potkanov zistil významný pokles hladín lipoperoxidov. Podanie 1 % LD50 TiO₂ infantilným potkanom v porovnaní s kontrolami vyvolalo pokles koncentrácie lipoperoxidov.

Výsledky našich meraní dokazujú, že neonatálne podávanie TiO₂ nanočastíc potkanom môže modulovať hladinu lipoperoxidov u samíc potkanov v závislosti od veku.

Kľúčové slová: nanočastice oxidu titaničitého; oxidačný stres; lipoperoxidy

ABSTRACT

The development of nanoparticles and nanomaterials in biomedicine is currently experiencing a huge expansion. The same properties that make new nanomaterials irreplaceable for their use can affect their interaction with biological systems and cause side effects.

The aim of our study was to determine the possible relationship between the concentration of lipoperoxides as representatives of oxidative damage to lipids and exposure to 1 % or 10 % LD50 TiO₂ in two different life stages of female rats. When comparing infantile and adult rats, a significant decrease in lipoperoxide levels was found in adult rats. Administration of 1 % LD50 TiO₂ to infant rats resulted in a decrease in lipoperoxide levels compared to controls. The results of our measurements demonstrate that neonatal administration of TiO₂ nanoparticles to rats can modulate lipoperoxide levels in female rats with age.

Key words: titanium dioxide nanoparticles; oxidative stress; lipoperoxides

ÚVOD

Nanočastice (NČ) sa vďaka ich unikátnym vlastnostiam, ako je tvar, veľkosť a reaktivita, tešia stále väčšiemu záujmu a nachádzajú svoje využitie v mnohých oblastiach priemyslu. V biomedicíne patria NČ medzi látky bežne využívané v ortopédii a pri diagnostike, ale aj v liečbe a to najmä onkologických ochorení.

NČ oxidu titaničitého (TiO_2) patria k najprodukovanejším nanomateriálom vďaka svojim špeciálnym fotokatalytickým vlastnostiam, vysokej stabilite a bieliacej schopnosti. Štúdie v posledných rokoch preukázali nízku toxicitu TiO_2 NČ, čo ich robí vhodnými pre ich široké použitie v kozmetike (zubné pasty, krémy na opaľovanie), ako prísada do potravín a v biomedicíne ako napr. systém podávania liekov (T a d a - O i k a w a a kol., 2016). Napriek nepopierateľným výhodám používania TiO_2 niekoľko štúdií popísalo tiež jeho vysokú absorpciu, akumuláciu v tkanivách a súvisiace zvýšenie jeho negatívnych vlastností (R o l l e r o v a a kol., 2015; T a d a - O i k a w a a kol., 2016). V skutočnosti je TiO_2 pri vdýchnutí klasifikovaný ako ľudský karcinogén (IARC, 2010; H o u a kol., 2018). Okrem toho sa uvádza, že najvyššie koncentrácie TiO_2 (200–400 nm) po jednorazovom intravenóznom podaní (250 mg/kg) sa zistili v pečeni, slezine, pľúcach a obličkách samíc potkanov Sprague-Dawley (H u g g i n s a kol., 1966).

Na úrovni niekoľkých nanometrov zohráva dôležitú úlohu pomer medzi veľkosťou samotnej NČ a jej povrchom, čo ovplyvňuje vlastnosti a interakciu materiálov. Čím je povrch týchto NČ väčší, tým väčší počet materiálov môže s danou NČ reagovať, čo ovplyvňuje jej reaktivitu. Navyše, na nanoúrovni sa biologické mechanizmy, ako napríklad vychytávanie molekúl, signalizácia a génová transkripcia, neustále menia. Nanotoxicita vyplýva zo zatiaľ nie úplne jasných odpovedí biologických systémov na prienik nanočastíc mnohými fyziologickými bariérami a tiež na tvar a veľkosti nanočastíc (M o s t a f a v i, 2018).

Nanotechnológia v medicíne momentálne prináša mnoho otázok ohľadom ich bezpečnosti a toxicity a je odporúčané ďalšie skúmanie v tejto oblasti, ktoré by odhalilo doteraz nejasné súvislosti. Aj preto sme sa rozhodli stanoviť vplyv neonatálneho podávania TiO_2 na koncentráciu markera oxidačného poškodenia lipidov, lipoperoxidov, u samíc potkanov a to v dvoch vekových kategóriách – infantilné a dospelé jedince.

MATERIÁL A METÓDY

Experiment 1: Infantilné samice potkanov

Novonarodeným samiciam potkanov Wistar boli i. p. injekčne podané denne rôzne dávky TiO_2 NČ: 1 % hodnoty LD50 pre $\text{TiO}_2 = 59,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ hmotnosti (1 % LD50 TiO_2 , $n = 11$) alebo 10 % pre LD50 pre $\text{TiO}_2 = 592 \mu\text{g}/\text{kg}$ hmotnosti (10 % LD50 TiO_2 , $n = 10$) vo fyziologickom roztoku s obsahom 10 % potkanieho séra (v/v), alebo nosič (t. j. fyziologický roztok s obsahom 10 % potkanieho séra, v/v, kontrolná skupina, $n = 11$) v dávke 10 ml/kg telesnej hmotnosti. Látky boli podávané od 4. dňa po narodení (PND 4) do PND 7. Infantilné samice potkanov boli usmrtené na PND 15 dekapitáciou v ketamín/xylazínovej anestézii.

Experiment 2: Dospelé samice potkanov

Novonarodeným samiciam potkanov Wistar boli i. p. injekčne podané denne rôzne dávky TiO_2 NČ: 1 % hodnoty LD50 pre $\text{TiO}_2 = 59,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ hmotnosti (1 % LD50 TiO_2 , $n = 11$) alebo 10 % pre LD50 pre $\text{TiO}_2 = 592 \mu\text{g}/\text{kg}$ hmotnosti (10 % LD50 TiO_2 , $n = 10$) vo fyziologickom roztoku s obsahom 10% potkanieho séra (v/v), alebo nosič (t. j. fyziologický roztok s obsahom 10 % potkanieho séra, v/v, kontrolná skupina, $n = 11$) v dávke 10 ml/kg telesnej hmotnosti. Látky boli podávané od 4. dňa po narodení (PND 4) do PND 7. Dospelé samice potkanov boli usmrtené v deň prvého výskytu estera po PND 220 dekapitáciou v ketamín/xylazínovej anestézii.

Po dekapitácii boli vzorky krvi odobraté do skúmaviek s Li-Heparínom ako antikoagulantom, centrifugované (1200 x g, 5 min, 4 °C) a separovaná plazma bola rozdelená na alikvoty, zmrazená a skladovaná až do ďalšej analýzy (pri -80 °C).

Koncentrácia lipoperoxidov bola stanovená podľa E l - S a a d a n i a kol. (1989). Výsledky meraní sú stanovené ako nmol/ml plazmy.

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou programu StatsDirect3 Statistical Software, verzia 2.3.7. (Stats Direct®Ltd., UK). Výsledky sú vyhodnotené ako median s interkvartilovým rozmedzím. Hladina signifikancie bola nastavená ako $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Pri porovnaní koncentrácie lipoperoxidov infantilných a dospelých jedincov potkanov sme zistili signifikantne nižšiu ($p < 0,001$) hladinu u samíc dospelých potkanov [47,058 (34,708–86,876) nmol/ml u dospelých vs. 239,121 (182,055–273,829) nmol/ml u infantilných jedincov].

V infantilnej skupine spôsobilo neonatálne podanie 1 % LD50 TiO₂ významné zníženie ($p < 0,05$) koncentrácie lipoperoxidov [168,535 (155,226–176,52) nmol/ml] v porovnaní s infantilnými kontrolami (Obr. 1). V porovnaní s kontrolami sa nezistil žiadny významný rozdiel v prípade 10 % LD50 TiO₂ [pre 10 % LD50 TiO₂ 152,88 (147,135–244,018) nmol/ml a pre kontroly 239,121 (182,055–273,829) nmol/ml].

U dospelých potkanov sa v porovnaní so zodpovedajúcimi kontrolami nezistil žiadny signifikantný rozdiel v koncentrácii lipoperoxidov ($p > 0,05$) v ani jednej zo skupín: 1 % LD50 TiO₂ [64,731 (35,985–74,739) nmol/ml] a 10 % LD50 TiO₂ [72,609 (40,031–100,397) nmol/ml].

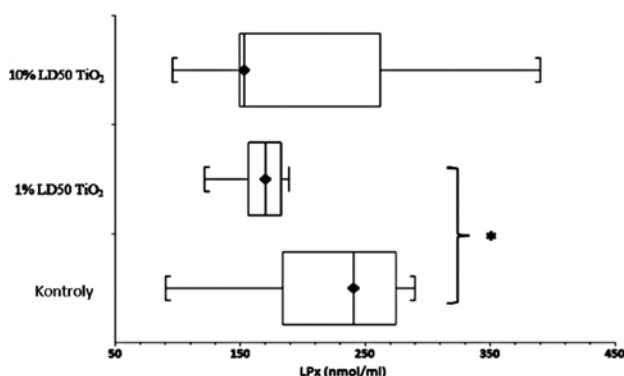
DISKUSIA

Pretože NČ sú schopné prechádzať biologickými membránami a vstupovať tak do cytoplazmy a jadra bunky, existuje veľká pravdepodobnosť vývoja oxidačného stresu v bunkách (S h r i v a s t a v a a kol., 2014). V exponovaných bunkách indukuje TiO₂ oxidačný stres zvýšením intracelulárnej koncentrácie reaktívnych metabolitov a po-

škodením antioxidantnej bunkovej odpovede (K e r m a n i z a d e h a kol., 2015; B i o l a - C l i e r a kol., 2020).

G u t i é r r e z I g l e s i a s a kol. (2014) deklaruje silnú indukciu oxidačného stresu pomocou TiO₂ NČ (veľkosť menšia ako 100 nm, agregáty 300 nm a viac, 20 µg/cm²) v gliových bunkách potkana a človeka a to prostredníctvom zmien v bunkovom redoxnom stave a peroxidáciou lipidov spojenou so zvýšenou expresiou glutatiónpoxidázy, katalázy a superoxidizmutázy. Podobne Hassanein (2018) zistil zvýšenú peroxidáciu lipidov u samcov potkanov Sprague-Dawley intoxikovaných TiO₂ NČ (300 cm²/mg/kg telesnej hmotnosti) v porovnaní s kontrolami. Rovnaké výsledky potvrdili H o u a kol. (2019), ktorého tím tvrdí, že toxický účinok TiO₂ NČ je závislý od dávky a času. Predpokladaným mechanizmom vedúcim k toxicite je oxidačný stres nadmernou produkciou ROS, ktorý vedie k peroxidácii lipidov a poškodeniu bunkovej steny. Naše výsledky naopak naznačujú zníženie peroxidácie lipidov u infantilných potkanov po podaní TiO₂ NČ, čo by mohlo byť výsledkom schopnosti mladého organizmu adaptovať sa na podmienky vyššieho oxidačného stresu vyvolaného TiO₂ NČ. To by mohlo viesť k aktivácii antioxidantných mechanizmov a k zníženiu koncentrácie lipoperoxidov v plazme. U dospelých zvierat nebola zaznamenaná žiadna významná zmena.

Pretože sa TiO₂ NČ a nanomateriály stali neoddeliteľnou súčasťou nášho života v podobe potravinových prísad, látok doručujúcich lieky a v podobe kozmetiky, je zrejmé, že toxicita a potenciálne škodlivé účinky týchto NČ sa stali predmetom ľudského záujmu. Aj keď počet publikovaných prác na túto tému rastie, vplyv NČ na ľudské zdravie je nejasný a vyžaduje si ďalšie skúmanie.



Obr. 1. Hladina lipoperoxidov v plazme infantilných potkanov po neonatálnom podaní TiO₂

hodnoty sú uvedené ako medián s medzikvartilovým rozsahom (Q1–Q3, 25–75 %)

* – $p < 0,05$: kontroly oproti 1 % LD50 TiO₂; LPx – lipoperoxidy

POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená z grantov Slovenskej agentúry pre výskum a vývoj No. APVV-15-0296 a APVV-0404-11 (akronym NANOREPRO) a VEGA grant 2/0162/20.

LITERATÚRA

1. Biola-Clier, M. et al. (2020): Titanium dioxide nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells. *Nanomaterials*. doi: 10.3390/nano10020185.

2. **El-Saadani, M. et al. (1989):** A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1016/s0022-2275(20)38354-1.
3. **Hassanein, K. M. A. and El-Amir, Y. O. (2018):** Ameliorative effects of thymoquinone on titanium dioxide nanoparticles induced acute toxicity in rats. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.02.002.
4. **Hou, J. et al. (2019):** Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Sciences (China)*. doi: 10.1016/j.jes.2018.06.010.
5. **Gutiérrez Iglesias, E. et al. (2014):** Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 73, pp. 84–94. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026.
6. **Huggins, C. B., Froehlich, J. P. (1966):** High concentration of injected titanium dioxide in abdominal lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*. doi: 10.1084/jem.124.6.1099.
7. **IARC (2010):** Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Carbon black, titanium dioxide, and talc. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*.
8. **Kermanizadeh, A. et al. (2015):** The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. doi: 10.1002/em.21926.
9. **Mostafavi, E., Soltantabar, P. and Webster, T. J. (2018):** Nanotechnology and picotechnology: A new arena for translational medicine. *Biomaterials in Translational Medicine: A Biomaterials Approach*. doi: 10.1016/B978-0-12-813477-1.00009-8.
10. **Rollerova, E. et al. (2015):** Titanium dioxide nanoparticles: Some aspects of toxicity/focus on the development. *Endocrine Regulations*. doi: 10.4149/endo_2015_02_97.
11. **Shrivastava, R. et al. (2014):** Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and Chemical Toxicology*. doi: 10.3109/01480545.2013.866134.
12. **Tada-Oikawa, S. et al. (2016):** Titanium dioxide particle type and concentration influence the inflammatory response in Caco-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms17040576.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 97–114

FEOCHROMOCYTÓM, FEOCHROMOBLASTÓM PARAGANGLIÓM, NEUROBLASTÓM

Blažíček, P.¹, Langoš, J.²

¹Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny LF SZU, Bratislava

²Vojenská nemocnica Bratislava

blazicekp@seznam.cz

SÚHRN

Tumory chromafinného tkaniva sú pomerne zriedkavé, ale ich včasná diagnostika umožňuje vyliečenie pacienta. Medzi tumory chromafinného tkaniva zaraďujeme feochromocytóm, feochromoblastóm, paraganglióm, neuroblastóm. Biochemická diagnostika napriek výraznému pokroku zobrazovacích metód je v diferenciálnej diagnostike veľmi dôležitá. Vzťah medzi katecholamínmi a tumormi chromafinného tkaniva je dávno známy. S diagnostikou a liečbou feochromocytómu sa naše pracovisko zaoberá od roku 1970, v ktorom sa nám podarilo diagnostikovať a liečiť prvého pacienta s feochromocytómom a so Sippleho syndrómom. V terajšej práci uvádzame vlastné diagnostické skúsenosti. Treba zdôrazniť, že ak tumory sympatikoneurálneho systému nie sú včas liečené, vedú jednoznačne ku skráteniu života. Na druhej strane, keďže morfológicky a klinicky sú často benígne, ich odstránenie z organizmu vedie k vyliečeniu pacienta.

Kľúčové slová: tumory chromafinného tkaniva; diagnostika; liečba

ABSTRACT

Chromaffin tissue tumors are relatively rare, but their early diagnosis allows the patient to be "cured." Chromophinous tissue tumors include pheochromocytoma, pheochromoblastoma, paraganglioma, and neuroblastoma. Biochemical diagnostics, despite significant advances in imaging methods, is very important in differential diagnostics. The relationship between catecholamines and chromaffin tissue tumors has long been known. Our department has been dealing with the diagnosis and treatment of pheochromocytoma since 1970, in which we managed to diagnose and treat the first patient with pheochromocytoma and Sipple's syndrome. In the current work we present our own diagnostic experience. It should be emphasized that if tumors of the sympathico-neural system are not treated in time, they clearly lead to a shortening of life. On the other hand, since they are often benign morphologically and clinically, their removal from the body leads to the cure of the patient.

Key words: chromaffin tissue tumors; diagnostics; therapy.

ÚVOD

Tumory chromafinného tkaniva sú pomerne zriedkavé, ale ich včasná diagnostika umožňuje „vyliečenie“ pacienta. Medzi tumory chromafinného tkaniva zaraďujeme feochromocytóm (Feo), feochromoblastóm, paraganglióm, neuroblastóm. Biochemická diagnostika napriek výraznému pokroku zobrazovacích metód je v diferenciálnej diagnostike veľmi dôležitá. Vzťah medzi katecholamínami (KA) a tumormi chromafinného tkaniva je dávno známy, avšak meranie katecholamínov bolo veľmi zložitá (napr. pomocou bioassay na mačkách). V r. 1929 u pacienta s hypertenziou počas jeho života bol odstránený tumor nadobličky a potom došlo k normalizácii predtým vysokého krvného tlaku a tým sa potvrdil prvýkrát priamy vzťah medzi Feo a KA. Významný pokrok v biochemickej diagnostike prinieslo až presné poznanie biosyntézy KA Axelrodom (1960) a poznanie metabolizmu KA (Armstrong et al., 1956). KA sú organické zlúčeniny, ktoré majú vo svojej molekule katecholové jadro (benzénové jadro, ktoré má v polohe 3,4 hydroxilovú skupinu) a v postrannom alifatickom reťazci amínovú skupinu. KA sú prvé chemicky identifikované hormóny a v organizme sú syntetizované v adrenergických neurónoch nervového systému, v bunkách sympatických ganglií a v chromafinných bunkách drene nadobličky. Vzhľadom nato, že sa v biologických tekutinách vyskytujú vo veľmi nízkych koncentráciách (v krvi približne 100 pmol/l, v moči 500 nmol/l), výber analytickej metódy je veľmi dôležitý.

S diagnostikou a liečbou feochromocytómu sa naše pracovisko zaoberá od roku 1970, v ktorom sa nám podarilo diagnostikovať a liečiť prvého pacienta s feochromocytómom a so Sippleho syndrómom. V spolupráci sme prispeli k diagnostike viac ako 100 pacientov. V tejto práci chceme uviesť aj vlastné diagnostické skúsenosti a literárne poznatky. Treba zdôrazniť, že ak tumory sympatikoneurálneho systému nie sú včas liečené, vedú jednoznačne ku skráteniu života. Na druhej strane, keďže morfológicky a klinicky sú často benígne, ich odstránenie z organizmu až v 90 % vedie k vyliečeniu pacienta. Farmakologicky následkom nadmernej produkcie svojich hormónov sú malígne a vedú k vývoju komplikácií a k predčasnej smrti. K diagnostickému a liečebnému úspechu sa možno dopracovať len poznaním jeho prejavov, dôkazom jeho prítomnosti v organizme a v rukách profesionálov sa môže pacient vyliečiť. Hoci tumory sú relatívne zriedkavé, na základe genetických poznatkov dá sa chorobám nimi vyvo-

laných predchádzať pred klinickými prejavmi u pacienta alebo v príbuzenstve a niekedy zabrániť vzniku ochorenia ak sa odstráni cieľový orgán. Najprv treba vysloviť podozrenie, biochemicky potvrdiť a potom tumor lokalizovať. Problém sa týka širokej lekárskej spoločnosti – internistov, biochemikov, pediatrov, pôrodníkov, urológov, chirurgov, anesteziológov, rentgenológov, onkológov, psychiatrov, dermatológov, oftalmológov, neurológov a ostatných zdravotníckych pracovníkov, aby sa minimalizovali potenciálne nebezpečia pri manipulácii s pacientom. Patológovia, genetici, biochemici, farmakológovia, fyziológovia môžu tiež profitovať z vedomostí o Feo.

Takmer bez konca sú subjektívne a objektívne príznaky u pacienta s Feo a niektoré môžu ošetrojúceho lekára pomiasť, ale ak pozná embryologické a genetické vzťahy tohoto ochorenia, môže sa lekár zorientovať a dospieť k správnej diagnóze. Veľmi dôležitý je fakt, že Feo je niekedy vyliečiteľný, ale neliečený skoro vždy končí smrťou.

Anatómia

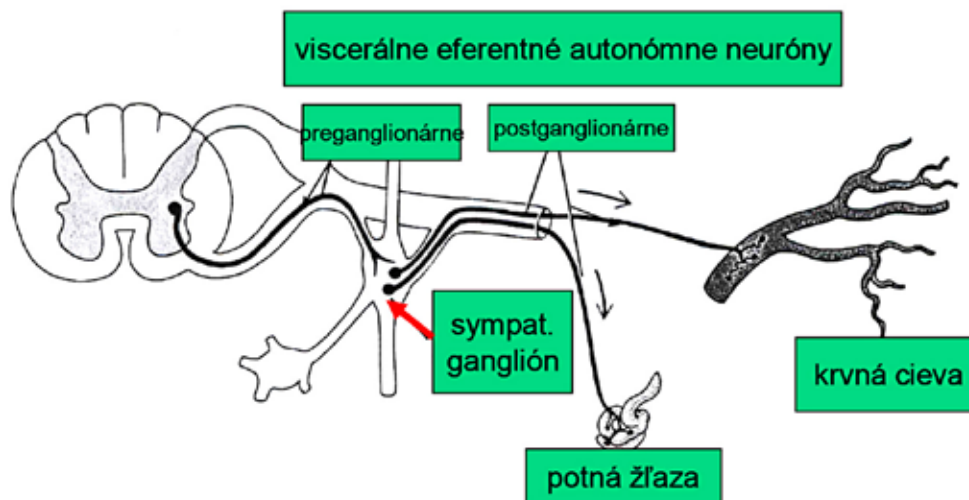
Preganglionárne neuróny parasympatiku (PS) sú v CNS v III., VI., IX. a X. hlavovom nerve a v II. a III. sakrálnom nerve. Preganglionárne neuróny sympatiku (S) vystupujú z miechy medzi Th 1 a L 2 segmentom. Odpovede na S a PS sú antagonistické, koordinované v CNS. Neuróny sú rozdielne v jednotlivých oblastiach neurochemicky aj neurofyziologicky. Preganglionárny neurotransmitter pre S aj PS je ACh, postganglionárny je iba pre potné žľazy a kostrový sval. Jeho gangliá sú anatomicky uložené často v cieľovom orgáne alebo v jeho tesnej blízkosti a jeho účinky sú diskretnéjšie a lokálnejšie. Postganglionárny neurotransmitter NA je pre všetky ostatné funkcie sympatiku.

Autokrinný systém (ANS) pozostáva z centrálného a periférneho nervstva. Inervuje hladkú svalovinu, vnútorné orgány, cievy, kožu. Je relatívne nezávislý na cerebrálnom nervstve a vôli, lebo medzi centrom a viscerálnymi cieľovými orgánmi sú interkalárne neuróny s vlastnými gangliami mimo CNS, ktoré fungujú bez priameho vplyvu vyšších etáží. Schéma autonómnych neurónov je na Obr. 1.

Autokrinný nervový systém

Sympatikus (S) zvyšuje vyplavovanie NA k obrane (útok, útek), zrýchľuje srdcovú činnosť, zvyšuje krvný tlak (TK), rozširuje koronárne cievy, bronchy a znižuje činnosť GIT.

Schéma autonómnych neurónov (transverzálny rez)



Obr. 1. Schéma autonómnych neurónov

Parasympatikus (PS) v pokoji spomaľuje trovenie, srdcovú činnosť, znižuje TK, zužuje koronárne cievy, znižuje činnosť troviaceho systému.

Enterický intramurálny systém v troviacej trubici s vloženými gangliami a gangliami buniek riadi tonus a pohyby žliaz. Len malá časť endokrinného systému je priamo inervovaná S a PS, lebo orgán funguje aj po prerušení S a PS vlákien.

Visceromotorický systému sa začína v CNS ale na rozdiel od somatomotorických nervov neuróny neidú priamo k tkanivám svojho určenia ale prepojuvane cez ďalšie neuróny v gangliách. Vlákna preganglionárnych neurónov prenášajú vzruch z CNS do ganglia, postganglionárne vlákna do ďalšieho neurónu alebo cieľového tkaniva. Preganglionárne vlákna S a PS vychádzajú z CNS sú myelinizované a transmitterom je acetylcholín (ACh). Okrem ACh sa uvoľňujú neuropeptidy (ST, neurotensin, substancia P, VIP) a modelujú s Ach v rôznych kombináciách prenos S vzruchov. Postganglionárne vlákna vylučujú NA. Výnimkou sú potné žľazy a priečne pruhovaný sval. NA sa viaže na A receptor (R) bunkovej membrány. Väzba na R bunky vedie ku kontrakcii hladkej svaloviny ciev, ductus deferens dilatátor pupil. Väzba na B R v srdci zrýchľuje činnosť, svalovú relaxáciu dýchacích ciest, močového mechúra a uteru.

U postganglionárnych vlákien transmitterom je NA,

ale produkujú sa aj iné mediátory a niektoré membrány vytvárajú oxid dusnatý (NO). V cieľových štruktúrach nekončia typickými synapsami, ale pred zakončením sú na vláknach varikozity obsahujúce vezikuly s mediátorom. Mediátor prechádza do tkaniva a v ňom difunduje, čím pôsobí na väčšie množstvo cieľových štruktúr. Účinok autonómnych nervov je súčasne ovplyvňovaný neuropeptidami, preto je difúznnejšia a pomalšie nastupujúca reakcia ako u somatomotorickej inervácie. Hladká svalovina je priamo humorálne ovplyvňovaná NA a A ako aj pôsobkami difúzneho hormonálneho systému GIT.

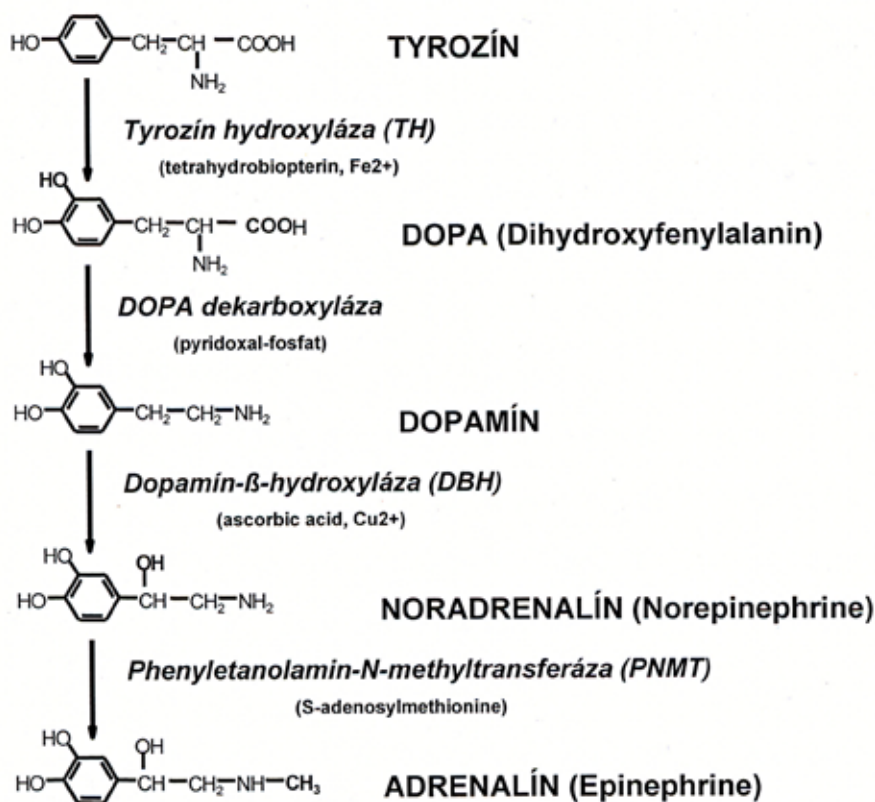
Odlišnosti S a PS systému

S je rozsiahlejší ako PS, zasahuje temer do všetkých orgánov. PS je rozsahovo menší vo vnútorných orgánoch (žľazky GIT, respiračného, urogenitálneho systému, žliaz s vnútornou sekréciou a očných bulbov). Koža, svaly, zhyby končatín, telesné steny sú bez PS. Funkčne vytvára rovnováhu, kým S robí rýchlu mobilizáciu energie a rezerv. Medzi oboma systémami nie je vždy protikladnosť ale aj aktivácia a inhibícia.

Fyziológia

Funkciou ANS je inervácia hladkých svalov ciev, vnútorných orgánov, endo- a exokrinných žliaz, parenchýmových

Syntéza katecholamínov



Obr. 2. Schéma biosyntézy katecholamínov

buniek rôznych orgánových systémov. Pôsobí nezávisle od vôle a reaguje rýchle alebo stálo na výkyvy ohrozujúce konštantnosť vnútorného prostredia. Reguluje distribúciu krvi, udržuje perfúziu, reguluje TK, objem a zloženie extracelulárnych tekutín, potreby metabolickej energie a zásoby substrátov, kontroluje viscerálne svaly a žľazy. Odpovede na S a PS sú antagonistické, koordinované v CNS. Neuróny sú rozdielne v jednotlivých oblastiach neurochemicky aj neurofyziologicky. ACh je preganglionárny neurotransmitter pre S a PS. Postganglionárne je účinný iba pre potné žľazy a kostrový sval. PS ganglia sú anatomicky uložené často v cieľovom orgáne alebo v jeho tesnej blízkosti a jeho účinky sú diskretnejšie a lokálnejšie.

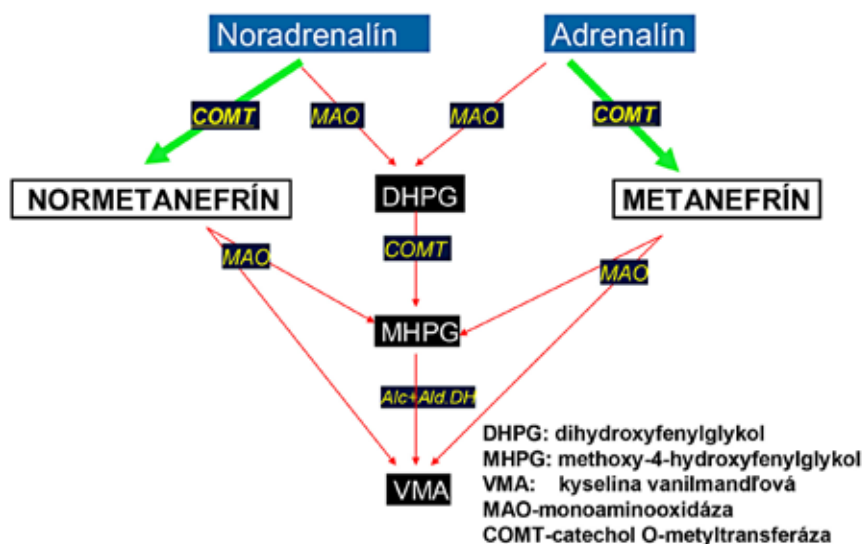
Postganglionárny transmitter je NA pre všetky ostatné sympatálne funkcie. Katecholové amíny dopamín (DA), noradrenalín (NA) a adrenalín (A) sú neurotransmitery. Na postganglionárnom zakončení nervu sú uvoľňované v susedstve receptora cieľového orgánu. A sa vylučuje

z drene nadobličky a ovplyvňuje celé telo. Dopamínergický systém existuje, ale nie je detailne charakterizovaný.

Biosyntéza katecholamínov začína hydroxyláciou tyrozínu pomocou tyrozín hydroxylázy (TH) a vzniká dihydroxyfenylalanín (DOPA). **Účinkom enzýmu DOPA dekarboxyláza I -aromatických aminokyselín vzniká dopamín (DA)** prvý katecholamín. **Účinkom dopamín-beta-hydroxylázy (DBH) vzniká noradrenalín (norepinephrine, NA)** a **pôsobením fenyletanolamín N-metyl transferázy (PNMT) vzniká adrenalín (epinephrine, A)**. Táto posledná reakcia prebieha v dreni nadobličky a v malom množstve aj v dvoch oblastiach mozgu. (Obr. 2).

Metabolická degradácia katecholamínov začína pomocou enzýmu catechol-O-metyl transferáza (COMT) a pôsobením enzýmu monoaminoxidáza (MAO). Účinkom COMT vznikajú metylované deriváty metanefrín (MN), normetanefrín (NMN) a metoxydopamín (MDA). Účinkom MAO vzniká dihydroxyfenylglykol (DHPG). Ak na metylo-

Metabolizmus noradrenalínu a adrenalínu



Obr. 3. Schéma metabolizmu katecholamínov

vané deriváty MN, NMN účinkuje MAO, vzniká prechodná zlúčenina, 3-metoxi-hydroxyfenylaldehyd, ktorý sa oxiduje na 3-metoxi-4-hydroxymandľovú kyselinu (kyselina vanilmandľová VMK), alebo sa redukuje na 3-metoxi-4-hydroxyfenylglykol (MHPG, Obr. 3).

Z MDA vzniká 3-metoxi-4-hydroxyfenylactová kyselina (homovanilová kyselina HVK). Väčší význam má stanovenie metabolitov v krvi. MNM a NMN dávajú takmer 100% špecificitu, pretože pochádzajú prevážne z pôsobenia COMT v tumore, lebo rozhodujúca je na membránu Feo naviazaná COMT a nie COMT v pečeni. Koncentrácia celkových metanefrínov v krvi je až 10 000x vyššia ako koncentrácia KA v krvi (Eisenhofer et al., 1999).

Zakončenie periférneho S nervu tvorí retikulum alebo plexus a kontaktuje sa na efektorovú bunku. Všetok NA je v periférnom nervovom zakončení v granulách alebo v dreni nadobličky v chromaffinných granulách. MAO v mitochondriách nervových zakončení reguluje miestnu koncentráciu. Amíny vo vezikulárnych zásobách sú chránené pred oxidatívnou deamináciou. Amíny v cytoplazme sú deaminované na neaktívne metabolity. Uvoľnenie z nervových zakončení sa robí akčným potenciálom v terminálnom S vlákne.

Periférny dopamínogický systém pôsobí ako inhibičný NT v karotickom teliesku a v S gangliách. Predpokladá sa aj D – ergický systém. Vyvoláva rôzne odpovede necharakteristické pre klasickú stimuláciu adrenergického R. Relaxuje dolný ezofageálny sfinkter, oddiaľuje vyprázdňovanie

žalúdka, robí vazodilatáciu v obličkách a mezenterických arteriolách, znižuje sekréciu aldosterónu, vylučovanie NA na S termináloch presynaptickým inhibičným mechanizmom.

Adrenogenné receptory

KA ovplyvňujú efektorové bunky interakciou medzi špecifickými povrchovými R spojených s G proteínmi. Dve väčšie kategórie odpovedí na KA odzrkadľujú aktiváciu dvoch adrenergických R – A a B. Ďalej sú rozdielne podtypy, ktoré majú odlišné funkcie a citlivosť na rozličné stimúlácie a blokády.

A adrenergický R sprostredkuje vazokonstrikciu, črevnú relaxáciu, rozšírenie pupily. A a NA sú equipotentné ako A aj B R agonisti. Rozdiely medzi A1 a A2 sú známe. Pôvodne postsynaptický alebo postjuncčný AR na efektorovej bunke bol označený ako A1, prejuncčný A R na S nervovom zakončení bol označovaný ako A2. Teraz sa vie, že nie neurónový (posttransynaptický) proces je tiež sprostredkovaný A2R. A1R sprostredkuje klasický alfa efekt vrátane vazokonstrikcie. Fenylefrín a metoxamin sú A agonisti a prazosin je selektívny A1 agonista. A2R sprostredkuje presynaptickú inhibíciu NA vylučovania z adrenergických nervov a ostatné odpovede vrátane vylučovania ACh z cholinergických nervov, inhibuje lipolýzu v adipocytoch, inzulínovú sekréciu, stimuluje agregáciu trombocytov a vazokonstrikciu v niektorých cievnych oblastiach. Špecifický A2 agonista zahŕňa klonidín a αA-m-

-NA. A-m-norepinefrín je derivovaný z a-m-dopy in vivo, znižuje TK v interakcii s A2R v sympatickom centre kmeňa mozgu, ktorý reguluje TK. Yohimbín je špecifický A2 agonistický regulátor.

B adrenergický R robí fyziologickú stimuláciu srdca (kontraktilitu, pulzovú frekvenciu, vazodilatáciu, bronchodilatáciu, lipolýzu). Má dva podtypy. B1R reaguje rovnako na A aj NA a sprostredkuje kardiálnu stimuláciu, lipolýzu. B2R je citlivejší na A a NA a sprostredkuje odpovede ako aj vazodilatáciu, bronchodilatáciu. Izoproterenol stimuluje a propranolol blokuje oba B1 aj B2R. Ďalší adrenergny, antagonistu majú čiastočnú selektivitu pre B1 alebo B3R a používajú sa v liečbe, kde sa žiada prevažne jedna z odpovedí. B3R môžu sa vyskytovať v určitých populáciách združených s tlstnutím, inzulinorezistenciou a cukrovkou II. typu. B3R má väčšiu afinitu k NA ako k A. Syntéza agonistov pre B3R je v rozbehu.

Štrukturálne patria R do rodiny membránových bielkovín, vrátane s rodopsínom, muskarínacetylcholínovým R, ktoré reagujú s G proteínmi. Tieto bielkoviny vykazujú homológnu sekvenciu a odvodené vlastnosti základných aminokyselín, podobnú topografickú štruktúru v bunkovej membráne. Fyziologický účinok sympatoadrenálnych R je priamy na kardiovaskulárny systém, metabolizmus, mobilizáciu substrátu (rozpad alebo štiepenie potravín pre lokálnu spotrebu ako je glykogenolýza v srdci, pečeni, tukoch, v skeletálnych svaloch) uvoľňovanie glukózy, voľných mastných kyselín, laktátu do cirkulácie, regulácia tekutín a elektrolytov v renálnom tubule (NA zvyšuje reabsorpciu Na, chráni extracelulárny objem, zvyšuje exkréciu Na a vychytávanie K, na vnútorné orgány (hladký sval, glandulárny epitel, žľazník, ejakuláciu). Nepriame účinky má na endokrinný systém – hormóny sú distribuované v krvi, na renín, inzulín, glukagón, CT, Tx, gastrín, erythropoetin, progesteron sú regulované feed back kľučkou. Renín zvyšuje cestou B R nezávisle od vaskulárnych zmien v obličke renín-angiotenzínový-aldosteronový systém. B R blokujúce lieky znižujú sekréciu renínu. KA znižujú hladinu inzulínu a zvyšujú glukagón v cirkulácii. Sekrécia inzulínu je sprostredkovaná a2R a glukagón BR.

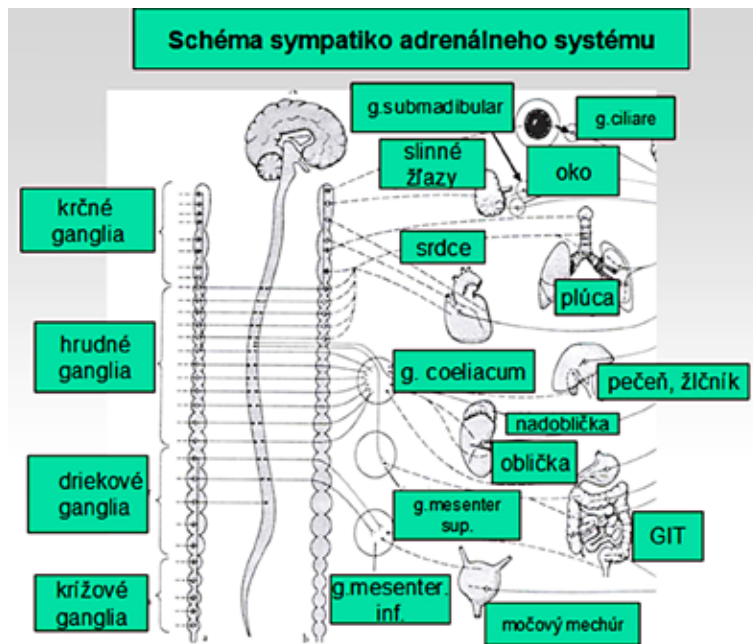
Klinika

Názov feochromocytóm pochádza z poznania, že sa tumor hnedo sfarbuje chrómovými soľami (phaios – hnedý, chroma – farba, cytoma – tumor). Bunky tumoru pochádzajú z neuroektodermy, z časti ktorého sa vytvá-

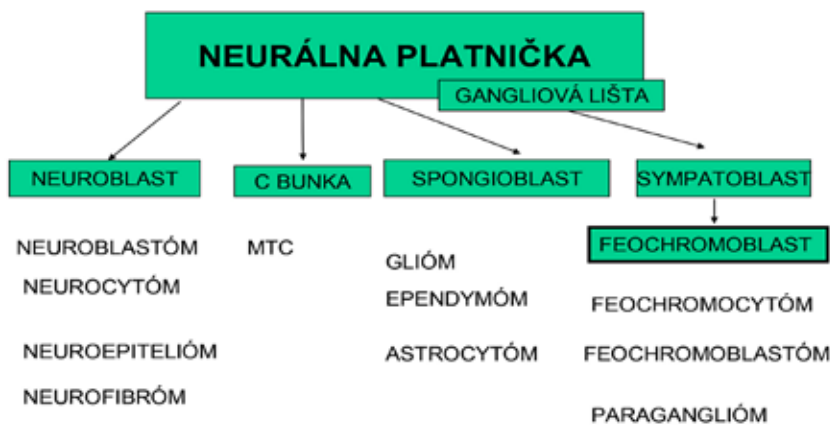
ra neurálna platnička. Táto je zárodkom vývoja všetkých nervových buniek. Každá nervová bunka v ďalšom vývoji sa môže počas genetického delenia zvrhnúť a tvoriť rôzne tumorózne bunky. Sympatický nervový systém je tvorený bunkami pochádzajúcimi z buniek neurálnej platničky, bunky ktorej sa nachádzajú v CNS a sympatických gangliách. Okrem toho bunky NP počas embryonálneho vývoja migrujú do primitívneho čreva. Centrálnou časťou systému je hypotalamus s hypofýzou. Perifériou sú bunky GIT, pankreasu, respiračného a urogenitálneho traktu, tyreoidy, paratyreoidy, týmu, drene nadobličky, paraganglií a sympatoneurálneho systému (Obr. 4).

Tumory pochádzajúce z týchto tkanív sú neuroblastómy, ganglioneurómy, feochromocytóm a zmiešané tumory z buniek neurálnej platničky (Obr. 5).

Pearse a Takor (1979) včleňujú tieto bunky do difúzneho endokrinného APUD systému, pozostávajúceho z buniek, ktoré majú schopnosť vychytávať prekursor amínov a ich dekarboxyláciu (Amine Precursor Uptake and Deamination). Tieto bunky majú zachovaný biochemický mechanizmus syntetizovať, uskladňovať a vylučovať biogénne amíny – neurotransmitery (DA, NA, A, histamín a melatonín) a viac ako 35 fyziologicky aktívnych peptidov (kortikotropín, melanocyty stimulujúci hormón, somatostatín, vazoaktívne intestinálne peptidy, kalcitonín, cholecystokinín, neurón špecifickú enolázu, renín, angiotenzín konvertujúci enzým, vazopresín, ľudský rastový hormón regulujúci faktor, parathormón, substanciu P, motilín, neuropeptid Y, chromogranín A, gastrín, inzulín, glukagón). Tieto vývojové vzťahy vysvetľujú niektoré izolované a familiárne polyglandulárne tumory a početné sekrečné produkty. Gangliové bunky tvoria, uskladňujú a vylučujú katecholové amíny (KA), ktoré sú hormóny a súčasne neurotransmitery, ktoré stimulujú cieľové periférne bunky. SNS je kontrolovaný a riadený CNS. Ak sa ganglioblast alebo gangliocyt prestane riadiť fyziologickými zákonmi genetického delenia nastane nekontrolovaný rast buniek a vzniká tumor, ktorý sa nazýva podľa lokalizácie a charakteru rastu feochromocytóm ak sa nachádza v dreni nadobličky, paraganglióm alebo extraadrenomedulárny Feo ak sa vyskytne mimo drene nadobličky a feochromoblastóm je tumor malígnej povahy a nachádza sa v tkanivách, kde za fyziologických okolností nie sú prítomné gangliové bunky (lymfatické uzliny, kosť, pečeň, pľúca). Feo je neoplastická a snáď najfascinujúcejšia endokrinopatia. Jeho klinické prejavy sú niekedy veľmi pestré, inokedy je nemý



Obr. 4. Schéma sympatiko-adrenomedulárneho systému



Obr. 5. Neurálna platnička. Tumory pochádzajúce z týchto tkanív sú neuroblastómy, ganglioneurómy a zmiešané tumory z buniek neurálnej platničky

a nájde sa iba náhodne pri vyšetrení za iným účelom alebo pri sekcii. Príznaky pri tejto endokrinopatii sú nevypočítateľné a môže byť zmätočný pre klinikov aj patológa, lebo sa nedá histologicky rozlíšiť, či je malígneho alebo benígneho charakteru. Až 90 % tumorov býva benígneho charakteru, zvyšné sú malígne a prejavujú sa ako metastázy. Produkciou svojich hormónov vyvoláva letálne komplikácie ak sa nepodarí ho včas rozpoznať a adekvátne liečiť. Toto konštatovanie je dôležité, aby vyšetrujúci lekár včas postrehol možnosť prítomnosti Feo v organizme, lebo 90 % pacientov môže byť vyliečených. V súčasnosti sú k dispozí-

cii diagnostické možnosti, ktoré temer vylučujú nesprávnu diagnózu tumoru. Napriek veľkému problému hypertenzie v súčasnosti a nízkemu výskytu tumoru, pacienti s neurčitými príznakmi podozrivými na hyperkatecholaminémiu sa majú podrobiť skriningu na túto chorobu. Príznaky sú vyvolané hormónmi tumoru, niekedy dramatické ak sa vyplavia do krvného obehu vo väčšom množstve, alebo sa prejavia až komplikáciami, následkom toho, že tumor bol endokrinne nemý, alebo vyvolával patologické zmeny v organizme a nebol včas rozpoznaný. Symptómy pociťované pacientom z Feo sú podmienené farmakologickým

účinkom nadbytočných koncentrácií KA v obehu alebo komplikáciami (hypertenziou podmienenou presorickými amínmi). Dôležitá je pozorná anamnéza, lebo symptómy sú veľmi variabilné čo do charakteru, častosti, kombinácie, stálosti alebo záchvatovitosti. Pozornosť pacienta aj lekára zvyšujú viac paroxyzmálne formy.

Najčastejšie symptómy sú

- následkom nadbytku KA a / alebo hypertenzie stálej alebo paroxyzmálnej (bolesti hlavy, potivosť, palpitácie, tachykardia)
- následkom komplikácií krvného obehu (signifikantná insuficiencia myokardu, infarkto myokardu, NCMP, šok)

Subjektívne príznaky

Následkom nadprodukcie KA

Stála **bolesť hlavy** sa pozoruje až v 92 %-ách a záchvatová v 72 %-ách. Bolesť vždy býva obojstranná a silná s pocitom prasknutia hlavy počas paroxyzmu HT. Náhle začína a ustupuje, keď klesá TK. Môže ju sprevádzať nauzea a zvracanie. Niekedy je lokalizovaná v okcipitálnej alebo frontálnej oblasti s pocitom intenzívneho tlaku. Pri stálej HT cefalea sa ale nelíši sa od pocitu pri esenciálnej HT. Môžu ju sprevádzať krče so stuhnutosťou šijou a imitovať meningeálny stav a strata vedomia.

Zvýšená potivosť môže byť celotelová, alebo len v hornej polovici tela alebo v menšej ohraničenej oblasti. Pacient sa často potí na trupe, akrách, ktoré môžu byť aj studené a suché. Potenie môže byť výdatné, takže pacient musí niekoľkokrát počas noci meniť posteľné prádlo. KA bývajú zvýšené, TK môže byť zvýšený, normálny alebo aj znížený. Potenie môže byť ako prejav porušenej homeostázy pri zvýšenom metabolizme následkom hyperkatecholaminémie. Mechanizmus potenia nie je vysvetlený. Vegetatívne zánervenie potných atrichiálnych žliaz (bez vlasu) je cholinergické, epitrichiálne (s vlasom – axily, inguiny) sú alfa receptorové. Potivosť nie je vždy združená s HT hoci súčasne sa vyskytuje tachykardia a zvýšené vylučovanie KA močom. Suponuje sa, že potivosť je následkom aktivácie parasympatických centier v mezencefale ako pokus o homeostázu telesnej teploty porušenej prebytkom KA, lebo A a NA regulujú mechanizmus tepelnej straty a objem krvi.

Tretím najčastejším subjektívnym príznakom Feo sú **palpitácie, tachy- a bradykardia**. Palpitácie sa vníma-

jú ako úder kladivom, alebo akoby srdce chcelo vyskočiť z hrudníka.

Anxiozita, tremor, nauzea, zvracanie, slabosť, pocit hroziacej smrti, nervozita, závraty, slabosť môžu vyvolávať zlú predtuchu z mnohorakých nepríjemných pocitov. Po zvracaní sa môže pacientovi uľaviť. Predpokladá sa nepriaznivý účinok KA v mozgu. Zdá sa, že KA nepôsobia na kôru, ale skôr stimulujú mezoencefalický retikulárny systém.

Bolesť hrudníka a brucha býva neurčitá, niekedy ischemického charakteru. V prekordiu môže typická angina pectoris s vyžarovaním do ľavej HK ako u pravej angina pectoris. Predpokladá sa, že v brušnej dutine ide o prekrvenie pečene, alebo spazmus sfinkteru pyloru, v podbrušku spazmus sfinkteru močového mechúra. Bolesť obyčajne nie je ostrá, ale sa pociťuje skôr ako celkové napätie, alebo zovretie v nadbrušku. Môže simulovať žľzníkový zápal, alebo cholelitiázu a viesť k laparotómii.

Ku koncu záchvatu sa dostavuje slabosť, únava a vyčerpanosť. Pacient uľahne pre krajinú slabosť na niekoľko hodín až celý deň. Môže byť podmienená nadbytkom KA, ale niektorí pacienti si sťažujú na stálu slabosť.

Úbytok hmotnosti sa dostavuje aj pri normálnej alebo dokonca zníženej chuti do jedla následkom zvýšeného metabolizmu. Pacienti nemávajú anorexiu s výnimkou pri rozsiahlych metastázach, zriedka býva pacient obézny. Úbytok telesnej hmotnosti máva pri trvalej HT, ale výraznejšie chudne pri paroxyzmálnej HT.

Dýchavica je častejšia pri stálej HT následkom preťaženia ľavej komory srdca a pľúcnej kongescie. Môže dojsť aj k akútnemu edému pľúc aj pri neprítomnosti zväčšenia srdca alebo prejavoch koronárnej choroby.

Pľúcny edém sa pozoruje častejšie pri paroxyzmálnej HT. Dýchavica, sínusová tachykardia a zväčšenie srdca s nešpecifickými zmenami na ekg môžu byť podmienené aktívnou katecholamínovou myokarditídou.

Teplota a intolerancia tepla je následkom hypermetabolizmu, ale aj vazokonstrikcie.

Zrakové poruchy ako je hmlisté videnie následkom neuroretinopatie zo stálej HT. Edém papily znižuje zrakovú ostrosť a vyvoláva skotómy, vlnivé čiary, čierne body, bolesť v očných guliach, najmä pri pohľade hore.

Obstipácia býva podmienená nadpriemerným vylučovaním KA, lebo býva sprevádzaná trvalou HT.

Parestézie a bolesti v končatinách vyskytujú sa súčasne s paroxyzmálnou HT a sú vyvolané veľkou vazokonstrik-

ciou a ischémiou. Často sú bilaterálne a postihujú ruky, tvár, vlasatú časť hlavy. Zriedkavejšie sa objavujú v dolných končatinách, niekedy s kaludikačnými ťažkosťami.

Celotelové záchvaty boli pozorované u pacientov s Feo, ale ich príčina je nevysvetlená ako aj mnohé iné obtiaže ako mravenčenie, mrazenie, polyfágia, husia koža, kašeľ, zívanie, vertigo, synkopa, polydipsia, polyúria, nyktúria, delírium, hnačky, tenezmus, nebolestivá hematúria.

Následkom komplikácií sú podmienené najskôr a najčastejšie zo strany KVA (arytmie, kongestívne zlyhanie podmienené KMP a zvýšeným netabolizmom) a vaskulárnymi zmenami v mozgu.

Cirkulačný šok je vážna porucha obehového aparátu aj centrálneho NS. Nastáva pri obštrukcii prietoku alebo hemorágiách v akejkolvek lokalite, vrátane tumoru. Niekedy nastáva po HT kríze bez zrejmejšieho vysvetlenia. Možno ide o značný pokles KA s následnou vazokonstrikciou, aká býva pri operačnom odstránení Feo. Hypotenzia pri zvýšenej katecholémii môže byť podmienená arytmiou a znížením cirkulačného objemu. Býva častejší pri Feo produkujúcom prevážne A.

Gastrointestinálne poruchy sa prejavujú obstipáciou, nafúknutým bruchom bez peristaltiky. KA relaxujú črevné hladké svalstvo (znížená frekvencia a intenzita peristaltiky, spazmus ileocekálného sfinkteru) a vyvolávajú vazokonstrikciu splanchnických arteriol. Býva u stálej HT, nie u paroxyzmálnej. Po fentolamíne sa môže stav upraviť. Zriedkavo sa môže vytvoriť ischemická enterokolitída s obstipáciou, ileom, hemorágiou, nekrozami prípadne perforáciou tenkého alebo hrubého čreva.

Objektívne príznaky

Najnápadnejšia je **paroxyzmálna hypertenzia** zriedka aj s aurou. Aj u stálej hypertenzie sa môžu objaviť paroxyzmy vysokého krvného tlaku, ale príznaky bývajú menej výrazné. Endokrinne nefunkčné tumory sa nachádzajú ako incidentalómy pri vyšetreniach z iných príčin alebo pri sekcii. Ataky u pacienta môžu vykazovať stálu periodicitu, trvanie s rovnakými príznakmi. Záchvaty môžu vyvolávať rýchlejšiu progresiu komplikácií Feo. Vyvolávajúce príčiny bývajú rozmanité ako sú medicínske zásahy (výplach, diagnostické procedúry, anestézia, gravidita, najmä tretí trimester, nápoje, fajčenie, určité lieky alebo potraviny).

Frekvencia a výskyt môže byť veľmi rozmanité čo do prejavov. Často sú dramatické a výbušné formy, ak tumor náhle vyplaví veľké množstvo KA, niekedy končí smr-

ťou. Inokedy sa prejavuje len príznakmi tumoru ako masy. Asi polovica pacientov má stálu hypertenziu. Symptómové intervaly môžu byť krátke, aj 25-krát počas dňa, alebo iba raz za niekoľko mesiacov. Prejavy u pacienta bývajú rovnakého charakteru, trvanie môže variovať. Spravidla sa dostávajú náhle a potom pomaly ustupujú. Môžu sa dostaviť v noci alebo počas dňa. Vyvolávajúca príčina ráno môže byť ranný zhon, kedy sa vyplaví KA nahromadené v noci, masáž alebo tlak na oblasť tumoru, posturálne zmeny, úzkosť, jedlo, alkohol, fajčenie, nápoje. U pacienta s Feo sa môže vyvinúť rýchla progresia a zrýchlenie čo do frekvencie a intenzity a hypertenzívnych záchvatov (snáď alternáciou hypertenzie a hypotenzie). Taký stav sa označuje ako akútny Feo. Mechanizmus záchvatu pri úzkosti a hyperventilácii nie je známy. Akýkoľvek liek (histamín, glukagón, tyramín, nitroglycerín a iné) stimulujú sympatikus a podnecujú sekréciu KA z Feo alebo zo sympatických neurónov, kde sú nahromadené. Stála hypertenzia je prítomná asi u polovice pacientov, paroxyzmálna asi u 40%, malé percento chorých s Feo má kolísavý, alebo nemá zvýšený TK, ak množstvo vylučovaných KA je malé, alebo Feo je endokrinne nefunkčný. Niektorí pacienti sú asymptomatickí a niekedy umierajú náhle po miernej traume, alebo operácii.

TK počas záchvatu, systolický aj diastolický môže dosahovať extrémne hodnoty. Najvyšší sa uvádza 325/200, 300/240 mm Hg. Hypertenzia pretrváva niekoľko minút až hodiny a môže oscilovať, alebo pomaly vlnovite klesať a stúpať. Kolísavosť TK je vážnym podozrením na Feo. Pri paroxyzme sa môže stať, že TK sa nemôže zmerať sfygmomanometrom.

Ortostatická hypotenzia bez antihypertenznej liečby je podozrivá na Feo a je diferenciálne diagnostickým príznakom esenciálnej hypertenzie. Vyskytuje sa asi u 70 % pacientov s Feo. Mechanizmus hypotenzie je následkom zníženia hladiny cirkulujúcich KA, iní predpokladajú funkčný autonómny blok vazomotorických receptorov a pacient to pociťuje následkom zníženého krvného objemu. Či ide o hypovolémiu, alebo nie, o tom sú iba dohady. Posturálna hypotenzia je najčastejšie u pacientov so stálou HT a paroxyzmálnou. Mnohokrát je hlavnou sťažnosťou pacientov. Vývoj šoku sa vyskytuje zriedka. Odporúča sa merať TK u ležiaceho, sediaceho a stojaceho hypertonika. Tak sa dá lepšie posúdiť liečebný efekt u hypertonika a neliečeného chorého s Feo.

Posturálna tachykardia býva združená s ortostatickou

hypotenziou. U Feo sa zvyšuje frekvencia pulzu o 20 a viac počas minúty pri zmene z ležatej do zvislej polohy. Podozrenie na Feo sa zvyšuje, ak so zrýchlením pulzovej frekvencie sa zvýši aj diastolický TK.

Tachykardia a reflexná bradykardia pri Feo býva predsieňová, zriedka komorová alebo extrasystolická. Bradykardia je vagového pôvodu, lebo reaguje na atropín. Udávač kroku pri bradykardii je nižšie centrum, nie AV uzol.

Flaš a bledosť býva lokalizovaný na hornej polovici tela, alebo len na tvári. Akrá bývajú popolavo sfarbené a môžu byť prezvesťou záchvatu HT.

Strata telesnej hmotnosti býva mierna až stredná, pacienti s Feo nebývajú obézni. Pri stálej HT je konštantná hyperakatecholaminémia a zvýšený bazálny metabolizmus. Rýchlejší a výraznejší býva úbytok telesnej hmotnosti pri malignite.

Raynaudov fenomén sa vyskytuje relatívne často, pravdepodobne zmenenou cirkuláciou na končatinách podmienenou KA. Akra sú vlhké, chladné, husia koža a lôžka nechťov sú cyanotické.

Telesná teplota je mierne zvýšená, najmä počas záchvatov, triaška sa nepozoruje.

Palpačný nález je zriedka pozitívny, lebo tumory obývajú prevažne malé, v bruchu hlboko uložené. Pri silnejšom prehmatávaní brušnej steny môže dôjsť k vyplaveniu KA z tumoru a paroxyzmálnemu záchvatu.

Diferenciálna diagnostika

Počas anamnestického vyšetrenia pacienta s Feo sa lekár stretáva s veľkým počtom príznakov príznačných pre mnohé ochorenia. Žiadny z tumorov alebo ochorení nevytvára väčšiu pestrosť klinického obrazu ako Feo. Práve variabilita symptómov by mala vzbudiť u ošetrojúceho lekára podozrenie na Feo, najmä pri hypertenzii a pri predoperačnom vyšetrení. Jediným najspoľahlivejším diferenciálnym diagnostickým príznakom Feo je stanovenie MN a NMN v krvi, alebo KA a MN v moči a tie majú byť stanovené pred rozhodnutím o operačnej liečbe, lebo súčasné biochemické metódy umožňujú diagnózu Feo približujúcu sa 100 % a operačné riziko pri poznanom Feo pred operáciou klesá voči nepoznanému tumoru na zlomky percenta v rukách erudovaného tímu.

Dôležité je starostlivo brať anamnézu u pacienta s podozrením na Feo a pýtať sa na cenné príznaky, ktoré sprevádzajú Feo, lebo pacienti niektoré príznaky spontánne nekomentujú, lebo môžu byť mierne, takže pacient si

ich nevšimá alebo často nesprávne interpretuje, najmä ak príznakov je málo alebo chýbajú. Subjektívne ťažkosti ako aj objektívne príznaky môžu byť veľmi rôznorodé a môžu simulovať početné syndrómy a zbehlý lekár v problematike môže zobrať do skríningu pacienta s minimálnymi príznakmi aj chronicky chorého pri určitom zoskupení príznakov. Práve pestrosť symptómov by mala podnietiť pozornosť vyšetrujúceho lekára, lebo žiadny tumor ani ochorenie nevytvára pestrejšie klinické obrazy ako Feo. Iste je neúnosné a neekonomické u každého pacienta s HT vyšetrovať MN a NMN v krvi, ale má zmysel urobiť nie drahé ale spoľahlivé vyšetrenie KA, alebo ich metabolitov v moči u pacientov s ťažkou HT, stálou alebo paroxyzmálnou, u rezistentných na doterajšiu liečbu, alebo ak príčina HT doteraz nebola zistená. Finančná úspora za toto vyšetrenie nevyváži nedidiagnostikovanie letálneho tumoru ale často liečiteľného, ktorý sa zvykne nazývať ako „veľký herc“.

Návod na skrining:

- pacient so systolickou alebo paroxyzmálnou HT, ak príčina nie známa, hlavne u pacientov pred operáciou
- u pacienta s ťažkou HT a retinopatiou
- ak je HT rezistentná na liečbu a diagnóza je nejasná
- ak sa HT systolická alebo paroxyzmálna. s rekurentnými atakmi príznakov objavuje aj pri normotenzii
- ak je prítomné chudnutie, hyperglykémia a HT u mladých ľudí (menej ako 35 ročných a HT trvá menej ako 2 roky)
- pri familiárnych endokrinných neopláziách (MEN 2, VHL, NF 1).

Feo okrem HT vyvoláva veľké množstvo rozmanitých príznakov aké nevie žiadny iný tumor, čo má byť naliehavá výzva k diagnostickému úsiliu vyšetrujúceho lekára. Pred liečbou Feo musí byť zistená signifikantne zvýšená hladina MN, NMN, KA a /alebo ich metabolitov v moči alebo v plazme, aby sa prítomnosť Feo v organizme diferenciálne diagnosticky ozrejmila, alebo vylúčila. Starostlivo vzatá anamnéza a fyzikálne vyšetrenie sú veľkou pomocou v rozhodovaní o potrebe hľadať buď samotný tumor alebo aj ďalšie ochorenia, ktoré bývajú s ním združené. Veľmi dôležitá je správna a včasná diagnóza len solitárneho (nie familiárneho) Feo, lebo vedie k 90 – 100 % vyliečeniu, alebo familiárnej formy, ktorá je sprevádzaná ďalšími súputnými tumormi (medulárny tyreoidálny karcinóm, ade-

nóm paratyreidey, karcinoid), lebo ich včasné rozpoznanie vedie k predĺženiu života a ku skríningu v príbuzenstve.

Hypertenzia je veľmi časté ochorenie, ale najčastejšia je esenciálna forma a k jej diagnóze sa dospieva per exclusionem. Pacientov s HT je veľa, ale počet HT podmienených Feo málo. Preto v diferenciálnej diagnostike treba postupovať zodpovedne. Pacienti s labilnou hypertenziou sú často kandidáti na esenciálnu HT a títo nemávajú vazomotorické záchvaty, ale nadmerná potivosť a zvýšená teplota je nezvyčajná. Posturálna hypotenzia a tachykardia sú zriedkavé, pokiaľ neužívajú antihypertenzíva. Krvný tlak u neliečeného pri postavení je rovnaký alebo vyšší ako v ležatej polohe. Úzkostlivosť a psychické poruchy bývajú združené so zvýšenou aktivitou sympatiko-adrenálneho systému a je pochopiteľné, že sa pridružuje aj stredná HT, cefalea, palpitácie, tachykardia, potenie, jemný tras, suchosť v ústach, pupily bývajú dilatované, hyperventilácia a zívanie, štipľavá bolesť v prstoch a karpopedálne spazmy. Pacienti sú spravidla psychicky vzrušení, emocionálne nestáli. Sťažnosti u neurotikov sú často chronické aj osobnosť je psychoneurotická. Pri ťažkej anxiozite a HT je diferenciálna diagnostika problematická. Ak sa nepotvrdí diagnóza Feo pacient potrebuje psychoterapiu. Hyperventilácia, hoci nezriedkavá u pacienta s anxiozitou, môže vyvolať typický paroxysmus ako u pacienta s Feo. Pacienti s Feo majú často búšivú bolesť hlavy z HT a výraznú potivosť. Nie sú anxiózní a súčasne neurotickí. Počas záchvatu HT vylučujú KA do krvného obehu ako sa deje u Feo, obava obyčajne rýchle pomínie akonáhle záchvat prestane. Niekedy panický strach zo smrti prežíva, ale len nakrátko u pacienta s Feo. Depresia, psychóza sa pozorovala aj u sporadického Feo a ustúpila po odstránení Feo (Manger and Gifford, 1980).

Hypertyroidizmus. Tyreotoxikóza pripomína svojimi symptómami zvýšenú stimuláciu SAS (anxieta, tremor, tachykardia, palpitácie, zvýšené potenie, neznášanlivosť tepla, hyperglykémia, chudnutie). Pri hypertyreóze sa zvyšuje systolický aj diastolický TK.

Paroxyzmálna tachykardia atriálna aj nodálna dostávajú sa spontánne, alebo sú urýchlené emočným alebo fyzickým stresom, po káve, tabaku. Palpitácie a dýchavica pripomínajú exces KA. Pri paroxyzmálnom supraventrikulárnej tachykardii býva zvýšený TK. Začiatok aj ukončenie sú náhle a aj objektívne zdokumentované. Môžu byť vyvolané aj tlakom na sinus caroticus alebo po liekoch. Cefalea, potenie, HT nepatria k supraventrikulárnej tachykardii.

Hypotenzia prípadne synkopa sú častejšie s týmto typom tachykardie.

Hypodynamický beta-adrenergický cirkulačný stav je hyperkinetická cirkulácia so zvýšenou ejekčnou frakciou s alebo bez HT, ako následok betareceptorovej odpovede. Obyčajne je mierna tachykardia v pokoji. Pacienti majú periodicky podstatný vzostup pulzovej frekvencie (až 180/min.) s palpitáciami a nezriedka záchvatmi strachu, niekedy úzkosťou a dýchavicou. Záchvaty môžu byť vyvolané vzrušením, státim, fyzickou námahou alebo po liekoch (izoproterenol), pocit nevoľnosti v bruchu. Cefalea, potenie dobre odpovedajú na beta blokátory, pri Feo nie.

Ortostatická hypotenzia sa objavuje pri stálej systolickej, alebo diastolickej HT. TK je často labilný a zvýšený počas epizód tachykardie. Betablokátory môžu vyvolať tachybetadrenergický stav.

Menoopauza môže byť sprevádzaná labilnou HT a podobá sa HT pri Feo. Návaly tepla a flaš, potenie, zvýšený TK, emočná labilita počas dňa a tieto symptómy môžu budiť pacientku v noci. Úľava sa dostavuje po estrogénoch ale pri Feo nie. Bledosť nepatrí k menopauze, palpitácie sa môžu vyskytnúť.

Vazodilatačná cefalea prejavuje sa migrénoznými bolesťami hlavy u anxiózných, snaživých perfekcionista, rigidných poriadkumilovných osôb. Môžu sa dostavovať so zvýšením TK, bledosťou alebo sčervenáním. Metysergid, ergotamín, antagosti serotonínu uľavujú cefaleu.

Koronárny syndróm môže byť sprevádzaný zvýšeným TK, potením a flašom, čím napodobňuje Feo. Zvýšenie KA môže vyvolať také isté príznaky ako pri autentickej srdcovej angíne podmienenej sklerózou vencových tepien. Ale bez sklerózy sa môže vyvinúť atak následkom spazmu koronárnych artérií následkom spazmu a zníženého prerivenia. Ťažko odlíšiť príčinu, lebo nitroglycerín nemusí priniesť úľavu, naopak môže záchvat vyprovokovať.

Akútna hypertenzívna encefalopatia ide obyčajne súčasne so zvýšeným TK. Niekedy s bolesťou hlavy, nauzeou, zvracaním, krátkymi epizódami zatmenia pred očami, konvulziami až kómou. Prechodné neurologické defekty sa môžu objaviť (spazmy retinálnych artérií, edém papily s hemoragiami). Feo môže vyvolať malígnu HT, ale anamnéza dlhších bolestí hlavy, palpitácie, tachykardia, potenie a bledosť sú časté u Feo, ale nie sú typické pre pacienta s HT encefalopatickou z iných príčin.

Cukrovka. Hyperglykémia u pacienta s Feo a HT môžu viesť k mylnej diagnóze cukrovky. Hypertenzia nie

je zriedkavá u cukrovky, u ktorej bývajú prítomné renálne komplikácie. Renálne zmeny sa pozorujú asi po 5 rokoch od diagnostikovania cukrovky. Pacienti s Feo môžu vykazovať abnormality pri GGT s extrémnymi variáciami, zvýšenia alebo zníženia glykémie. Paroxyzmálna HT so súčasťou hyperglykémii vyvoláva podozrenie na Feo. Normotenzia môže kráčať spoločne s normoglykémii aj normálnym GTT. KA majú inhibičný účinok na vylučovanie inzulínu. V diferenciálnej dg. pri cukrovke s nefropatiou je prítomná ketoacidóza, ktorá nie je typická pre Feo.

Renálna parenchýmová alebo artériová HT. Renálne príznaky sú zriedkavé u Feo (PÚ, znížené renálne funkcie). Kolísanie TK môže sa vyskytnúť u nefritíd. Po odstránení Feo sa patologické obličkové nálezy upravujú. Diferenciálna dg. medzi Feo a renálnou HT nemusí byť obtiažna. Proteinúria väčšia ako 3g/24hod svedčí pre glomerulárne ochorenie, nefrotický syndróm sa u Feo nevyskytuje, močový mikroskopický nález (valce, pyúria nie sú charakteristické pre Feo), hematúria pri Feo močového mechúra sa musí odlišiť biochemicky.

Ložisková artériová insuficiencia mozgu. Cerebrálna intermitentná ischemia mozgu môže vyvolať prechodné epizódy fokálnej mozgovej dysfunkcie s neurologickými manifestáciami závislými od poškodenej časti mozgu. Časovo môže byť nepravidelná. Obvyčajne sú podobné, ale môžu variovať v trvaní od minúty až po hodiny. Mnohí trpia na esenciálnu HT. Počas insuficiencie a. vertebralis môže sa TK prechodne zvýšiť a upozorňovať na možnosť Feo. Diferenciálna dg. je ťažká (slabosť, únava končatín, afázia, diplopia, ataxia, poruchy videnia sa prejavujú v oboch prípadoch). Palpitácia, potivosť, tachykardia, bledosť cefalea je častá u Feo, pri cerebrálnej insuficiencii chýbajú a cefalea je zriedkavá.

Intrakraniálne lézie. Komorové obštrukcie sú sprevádzané HT, veľkou cefaleou s náhlym nástupom. Často sú vyprovokované zmenou polohy tela. Zvýšený intrakraniálny tlak vedie k zvýšenému vylučovaniu KA. Tumory zadnej jamy lebkovej môžu simulovať Feo. Diferenciálna dg. HT u Feo je vyššia ako u tumoru mozgu, prítomná je skôr bradykardia, bledosť. Profúzne potenie je atypické. Podlamovanie kolien bez zreteľnej príčiny alebo krátke stavy bezvedomia sú typické pre obštrukciu mozgových komôr tumorom ale nie Feo, iba ak by išlo o NCMP.

Diencefalické záchvaty. Podobajú sa pri Feo na zriedkavé formy diencefalickej epilepsie, ktorá môže prejavovať takmer všetky príznaky Feo (bolesť hlavy, flaš, alebo

bledosť tváre, profúzne potenie, kolísavú HT, tachykardiu, palpitácie, zvýšenú telesnú teplotu, abdominálne kŕče, nauzeu, zvracanie, slabosť, zívanie, čkanie, parestézie. Mechanizmus diencefalického syndrómu nie je známy. Sledovanie počas záchvatu by svedčilo pre epileptickú príčinu ale aj pre Feo so záchvatmi a stratou vedomia. Pri Feo nebýva stratená neschopnosť stáť pre nekoordinovanosť svalstva a dobrá odpoveď na antiepileptiká nesvedčí pre Feo. EEG sa zriedka podarí zaznamenať a zápis nie je špecifický.

HT krízy a inhibitory monoaminoxidázy (MAO). U pacientov poberajúcich MAO sa pozoroval vzostup TK na 200 mmHg a viac pripomínajúci paroxyzmálnu HT krízu ako pri palpitácii Feo (palpitácie, tlaková bolesť v okcipitálnej alebo temporálnej oblasti hlavy, fotofóbia, stuhnutie šije, svrbenie pokožky). Pacient býva bledý, potí sa, má nauzeu, zvracia. Býva prítomná arytmia, inokedy angína pectoris, pľúcny edém. Môže dojsť k subarachnoidálnemu krvácaniu s neurologickými príznakmi a exitu. Trvá 10 min. až hodiny a obtiaže fluktuujú. Zriedkavá je hypotenzia (TK menej ako 90 mm Hg. Dostavuje sa po určitých potravinách obsahujúce tyramín (syry, víno, pivo, droždie, nakladané ryby) s uvedenými symptómami. Fazulové lusky obsahujú I-DOPu vyvolali záchvat (5 HT). Užívanie sympatikomimetík (amfetamíny, efedrín spolu s MAO inhibítormi) môžu indukovať záchvat.

Interakcia medzi imipramínom alebo amitryptilínom a MAO inhibítormi vyvolali hyperpyrexiiu, agitáciu, delírium, kómu, svalovú stuhlosť a konvulzie. Dôležité je vedieť, že pacient poberá MAO inhibítory a niektoré amíny, ktoré vyvolávajú záchvat HT. Dôležité je stanoviť KA, alebo metabolity KA, ktoré pri neprítomnosti Feo v organizme sú v norme.

Hypoglykémia (glykémia menšia ako 2,8 mmol/l) vyvoláva mozgové príznaky a zvyšuje exkréciu KA, pomätenosť, letargiu, neadekvátne afekty, halucinácie, nekoordinované pohyby, hypotermiu, kómu. U Feo sa môže vyskytnúť náhla hypoglykémia, anxieta, tras, tachy- alebo bradykardia, palpitácie, bledosť, pot, prechodné zvýšenie TK. Pacient cíti slabosť, nauzeu, zriedka zvracia, pociťuje hlad. Pri Feo býva cefalea, normoglykémia. Hypoglykémia ustupuje po podaní glukózy alebo glukagónu. Pacient s inzulínom jedáva veľa a býva obézny. Hypoglykémia sa niekedy spontánne upraví po kŕčoch. Hypoglykémia zvyšuje KA alebo metabolity v plazme aj v moči a pri súčasnej hypoglykémii je diferenciálna dg. sťažaná.

Feochromocytóm v gravidite. Môže byť prehliadnutý, lebo jeho symptómy sa môžu podobať komplikáciám pozorovaným počas gravidity rodičky bez Feo. Symptómy sa najčastejšie prejavujú v treťom trimestri, počas pôrodných bolestí, pôrodu alebo až po pôrode. Najčastejšie sa vyskytuje nephropatia gravidarum (proteinúria, edémy dolných končatín, mierna hypertenzia, prípadne patologické pečenné nálezy). Vážnejší býva preeklampsizmus sprevádzaný úpornou bolesťou hlavy, masívnymi edémami, hypertenziou a tachykardiou. Najnebezpečnejšia je eklampsia sprevádzaná záchvatmi krčv objavujúcich sa náhle bez prechádzajúcich prodrómov. V pozdnej gravidite (viac ako 32 týždňov) sa môže manifestovať edémami, HT, proteinúriou, v ťažkých prípadoch konvulziami, eklampsiou. Edém je na rukách, nohách aj periorbitálne. Častá je bolesť hlavy, v mezogastriu a poruchy videnia. Na očnom pozadí pozorovať zúženie arteriol, zriedka exsudáty alebo krvácanie. Zvýšený býva diastolický TK, kyselina močová. Dostaví sa nepokoj, tonicko – klonické spazmy kostrového svalstva, tváre, šije, trupu, dýchacích svalov až kóma. Trvá jednu až dve minúty, potom nasleduje palindromický ústup príznakov. Záchvat môže byť jediný alebo sa opakuje viackrát. Úmrtnosť pri krčoch je 20 % následkom edému pľúc, trombóz v cievach a hemorágie v mozgu, nekrózy v pečeni a v obličkách. Feo v gravidite sa môže počas tehotenstva prejavovať stálou, alebo paroxyzmálnou hypertenziou, preeklamptickými príznakmi, ruptúrou uteru počas pôrodných bolestí alebo pôrodu, hyperpyrexiou po pôrode a šokom až smrťou s/alebo bez predchádzajúcich symptómov. U gravidných žien s hypertenziou, prejavmi eklampsizmu a familiárnymi ochoreniami s Feo je skrining Feo opodstatnený v plnej miere. V pozdnej gravidite (viac ako 32 týždňov) sa môže manifestovať edémami, HT, proteinúriou, v ťažkých prípadoch konvulziami, eklampsiou. Edém je na rukách, nohách aj periorbitálne. Častá je bolesť hlavy, v mezogastriu a poruchy videnia. Na očnom pozadí pozorovať zúženie arteriol, zriedka exsudáty alebo krvácanie. Zvýšený býva diastolický TK, kyselina močová. Palpitácie, potenie, tachykardia, anxiozita, bledosť, bolesti hlavy pri Feo nie sú charakteristické pri gravidite. MgSO₄ je terapeuticky účinný pri eklampsizme, ale nie pri Feo. Počas gravidity sa nepozorovalo významné zvýšené vylučovanie KA u pacientiek s toxémiou eklampsizmu. Dôležitý je fakt, že Feo sa často prejavuje v gravidite a vážnosť je v tom, že hrozí spontánny abort, šok, hyperpyrexia. Smrť matky aj plodu hrozí vo viac ako v 50 %.

Zriedkavé príčiny paroxyzmálnej HT. Eklampsia, otrava olovom, esenciálna HT, nefritída, rôzne ochorenie CNS (epilepsia, tabes, traumy mozgu, NCMP, meningitis, kompresia n.vagi), LIS, neuritis, akútna infekcia, niektoré alergické choroby zriedka vedú k mylnej diagnóze Feo.

Simulované paroxyzmálne HT. Sú zriedkavé, ale treba ich brať na vedomie. Pacienti, ktorí majú prístup k rozličným liekom, môžu ich zneužitím vyvolať chorobné príznaky. Sem patria amfetamíny (alfa a beta aktivita), ktoré môžu vyvolať HT, tachykardiu, arytmiu, potenie a iné symptómy, ak je liek používaný bez vedomia lekára. Prítomnosť psychických odchýliek, vylučovanie rôznych KA (raz A, inokedy NA), negatívne provokačné testy, negatívne výsledky pri zobrazovacích metódach zvyšujú podozrenie, že príznaky sú následkom predávkovania pri samobsluže presorickým agensom, najmä u osôb, ktoré majú prístup k liekom. Treba starostlivo urobiť všetky vyšetrenia pred exploratívnou laparotómiou na vylúčenie pseudofeochromocytómu.

Aj používanie metyldopy (Aldomet) pri liečbe HT môže vykazovať falošné zvýšenie vylučovania KA (pri fluorometrickom vyšetrení interferencia m-DOPA a KA).

Náhodné nálezy simulujúce Feo. Pozorovali sa pacienti s koarktáciou abdominálnej aorty v oblasti obličiek, pri cyste obličky, adrenokortikálnych tumoroch.

Feochromocytóm a s ním združené syndrómy

Incidencia Feo u hypertonikov sa odhaduje na 0,4/100 000 pacientov s TKd viac ako 95 mmHg (Sheps et al., 1988). Častejší je výskyt v rodinách s bilaterálnym feochromocytómom v nadobličkách u detí. Autozomálne dominantná dedičnosť sa pozoruje u MEN 2, v združení s tumorami Langerhansových ostrovkov pankreasu a neuroektodermálnych syndrómov ako je NF-1, von Hippel Lindauovej choroby. Známe sú aj adrenálne a extraadrenálne Feo bez prítomnosti ostatných žľazových alebo platničkových syndrómov.

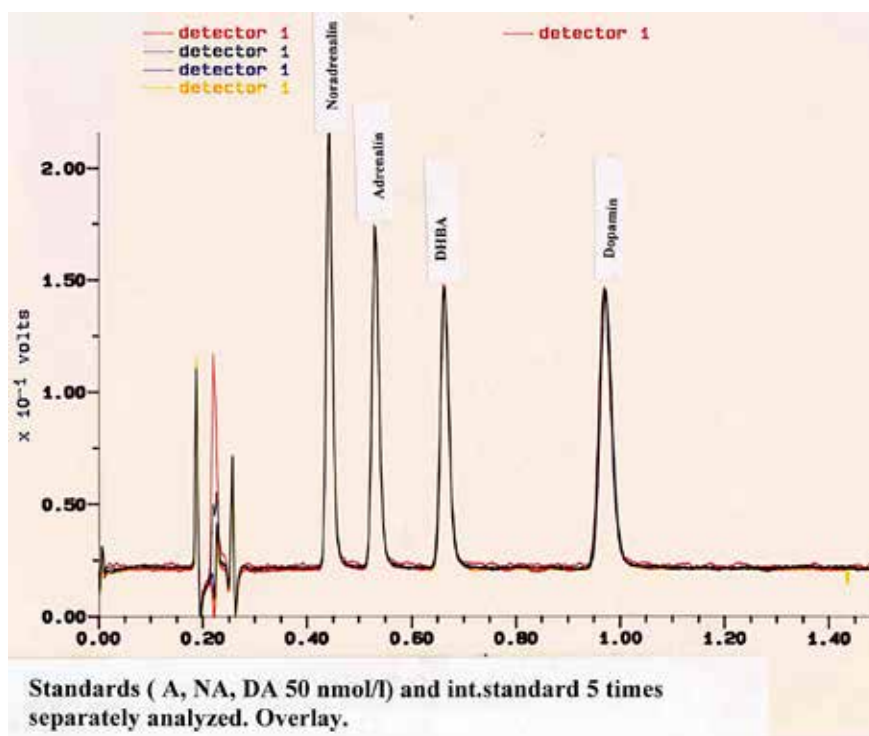
Diagnostika feochromocytómu

Biochemická diagnostika feochromocytómu

Hoci sa nenašiel gén zodpovedný za vznik chromafiných tumorov, ich častá prítomnosť u syndrómov MEN, hlavne MEN 2, vyžaduje stanovovanie vylučovania KA a ich metabolitov. Keďže ich stanovovanie nie je dosť široko prístupné v klinickej praxi, najčastejšie sa meria exkrécia kyseliny vanilmandľovej (VMK) močom počas 24 hodín.

Považuje sa za dobrú skriningovú metódu (Blažíček a kol., 1977). Môže odhaliť tumor chromafinného tkaniva až v 60%, lebo VMK tvorí 40 % degradačných produktov KA. Citlivejšie a špecifickejšie je meranie metanefrínov (MN, NMN) a KA v 24 hod. moči (Blažíček, Langoš, 1986). Na presné stanovenie KA existuje HPLC (high pressure liquid chromatography) metóda s elektrochemickou prípadne coulochemickou detekciou. Táto metóda dovoľuje stanovenie jednotlivých KA (A, NA, DA) a metabolitov (MN, NMN). U niektorých neuroblastómov sa do moču vylučujú aj dopamín (DA) a jeho metabolity (kys. homovanilová) spolu s metabolitmi A a NA (Goldsstein et al., 1986). Ani stanovovanie uvedených metabolitov nemusí dať úplnú istotu o prítomnosti tumoru v organizme, lebo tumor nie je inervovaný a vylučuje KA z buniek exocytózou nepravidelne, nezávisle od jeho veľkosti alebo lokalizácie, takže mimo záchvat môžu byť hodnoty v plazme normálne, alebo hraničné. V takýchto situáciách treba vyšetrenie opakovať, prípadne pacienta poučiť o zbere moču po záchvate (zbierať moč do nádoby s 10 ml 6 ml/kys. soľnej). Menej spoľahlivé je samotné meranie KA v plazme. Tieto môžu byť zvýšené, aj keď nie je prítomný endokrinne aktívny tumor pri akomkoľvek druhu akútne-

ho stresu (telesná námaha, emócia, arteriografia, intubácia pred narkózou, niektoré farmaká, akútny infarkt myokardu, náhla ischémia mozgu). Preto pri odbere venóznej krvi na stanovenie KA treba dbať na šetrný odber (poloha vleže, najlepšie zo zakanylovej žily odber o 30 minút po zavedení). Najpresnejšie je stanovenie metanefrínov v plazme (Lenders et al., 1993, Lenders et al., 1995, Lenders et al., 2002). Ak hodnoty KA v moči, resp. v plazme sú hraničné, treba vyšetrenie po určitom čase zopakovať, alebo vyšetriť pomocou farmakologických testov. Zavádzanie špecifickejších biochemických metód na stanovenie KA a ich metabolitov znižuje počet falošných výsledkov, najmä pri chemických interferenciách po požití určitých potravín, alebo liekov. Takou metódou je práve vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC) s elektrochemickou detekciou a najnovšie s coulochemickou detekciou. Jednotlivé KA sú od seba oddelené a presne identifikované. V ostatnom období sa používajú tiež techniky RIA (Mantz et al., 1990) a ELISA (Smith et al., 1997), ktoré sú už komerčne dostupné. Stanovenie katecholamínov a ich metabolitov hrá dôležitú úlohu napriek významnému pokroku zobrazovacích metód (CT, USG, MIBG, MRI, PET scan) v diagnostike tumorov



Obr. 6. HPLC chromatogram analýza NA, A, DA (koncentrácia štandard 50 nmol.l⁻¹)

chromafinného tkaniva. L e n d e r s a kol. (1993, 1995), E i s e n h o f e r a kol. (1999), R o d e n a kol. (2001), P a c á k a kol. (2002) dokázali, že metanefrín a normetanefrín v krvi pochádza prevažne z katecholamínov z tumoru, a preto záujem o ich stanovenie v krvi narástol a teraz sa považuje za najšpecifickejšie (100 % senzitivita pri 96 % špecificite).

Na Obr. 6 je chromatogram štandardnej zmesi adrenalin, noradrenalin, DHBA (dihydroxibenzylamin), dopamin. Vzorka bola spracovaná päťkrát a päťkrát analyzovaná. Chromatogramy sú nanesené spôsobom overlay (sú nanesené na seba). Z obrázku vidieť, že metóda je skutočne reprodukovateľná.

Na základe našich skúseností možno povedať, že použitie HPLC systému s elektrochemickou detekciou má na analýzu katecholamínov a ich metabolitov v moči veľký prínos a momentálne je to najpoužívanejšie a nakoniec aj najlacnejšie riešenie. V ostatnom období sa za najpresnejšiu diagnostickú metódu považuje stanovenie metanefrínov v krvi. Na našom oddelení sme stanovovali katecholamíny a metabolity v krvi a v moči už dávnejšie, ale veľký prínos bol, keď sme začali analyzovať aj metanefríny v plazme. Vychádzali sme z práce L e n d e r s a kol. (1993) v modifikácii R o d e n a kol. (2001).

Zobrazovacie techniky

Medzi najpoužívanejšiu nebiochemickú metódu patria klasické rtg vyšetrenia, novšie počítačová tomografia bez, alebo podľa potreby aj s kontrastom (Obr. 7). CT sa považuje za spoľahlivú, pacienta okrem rtg žiarenia, nezaťažujúcou metódou. Pri hľadaní Feo odporúča sa urobiť najprv CT nadobličiek, a ak tam sa tumor nenachádza, treba vyšetriť brušnú dutinu a nakoniec hľadať tumor v nadbráničnej oblasti. Nie vždy sa možno zaobísť bez kontrastu, ktorý môže byť škodlivý pre pacienta a nemá sa používať u tehotných. Neinvazívne vyšetrenie pomocou jadrovej magnetickej rezonancie (MRI) sa osvedčuje pri presnejšej diferenciácii tumoru, najmä ak sa chceme vyhnúť použitiu kontrastnej látky. Možno vyšetriť celé telo (van Gils et al., 1994). Ultrazvukové vyšetrenie nezaťažuje pacienta. Tumor sa javí ako hypo-, izo-, alebo hyperechické ložisko. Na základe akustických metód nie je možná diskriminácia medzi benígnym a malígnym tumorom okrem nálezu metastáz (S c h w e r k et al., 1994). Špecifickou pomocnou metódou je rádioscintigrafia pomocou ¹²³I – metajodobenzylguanidínu (MIBG), ktorý sa vychytáva v granulách

chromafinných buniek, podobne ako KA. Ak je nakopené dostatočné množstvo takých buniek, môžu sa prejaviť ako tumorózne ložisko (Obr. 8).

M o z l e y a kol. (1994) ju považoval za najšpecifickejšiu skriningovú metódu pre Feo. Pacienta málo zaťažuje a je vhodná na hľadanie paragangliómov a metastáz. Tak sme zistili nadbráničný paranglióm u našej pacientky s medulárnym karcinómom štítnej žľazy.

Momentálne za najvhodnejšiu metódu sa považuje PET scan, ktorá umožňuje diagnostiku tumoru buniek z NP, zvýšenou akumuláciou dopamínu značeného pomocou izotopu dopamínu (F-18) (P a c a k a kol., 2001). Ani jedna z týchto metód nie je absolútne spoľahlivá a preto klinici sú často nútení použiť aj dve–tri metódy pred definitívnym diagnostickým záverom. Ak sa nepodarí nájsť tumor uvedenými metódami, môže pomôcť katetrizácia dutých žíl. Berú sa vzorky z dutých žíl, resp. z pravej predsiene srdca a stanovujú sa KA vo vzorkách krvi odobratej z rôznych výšok.

Asi 90 % Feo sa nachádza v dreni nadobličiek, paragangliómy sa môžu vyskytovať kdekoľvek sú bunky sympatického nervstva, teda od bázy lebky až po hrázdzu a v sympatikom zanervných orgánoch (močový mechúr, medzipredsieňové septum srdca). Ak je potvrdená zvýšená tvorba KA, treba zistiť, kde sa nachádza tumor. Pri hypersekrécii A aj NA, dá sa usudzovať, že tumor je v dreni nadobličiek, pri nadprodukcii len NA pravdepodobne pôjde o extraadrenálnu lokalizáciu. Predoperačná lokalizácia tumoru, resp. tumorov je dôležitá pre chirurga, aby sa predišlo reoperácii, ale aj zistenie metastáz, obrazovacie techniky sú početné.

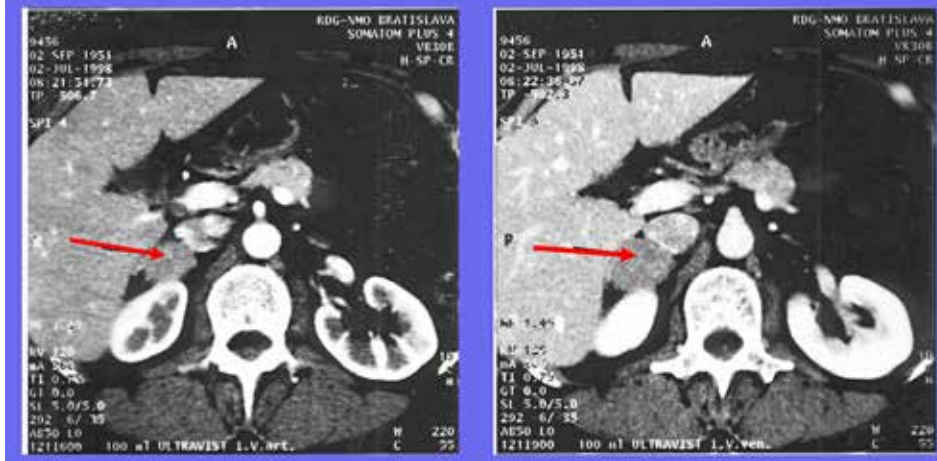
Farmakologické testy

Používajú sa zriedka, odkedy meranie vylučovaných KA a/alebo ich metabolitov je vysoko špecifické a citlivé v krvi aj v moči. Môžu byť potrebné v diagnostike Feo s paroxyzmálnou sekréciou, lebo asi 37 % pacientov máva normálne hodnoty vylučovaných KA alebo aj počas operácie alebo po nej, či neostal ďalší tumor Feo v organizme.

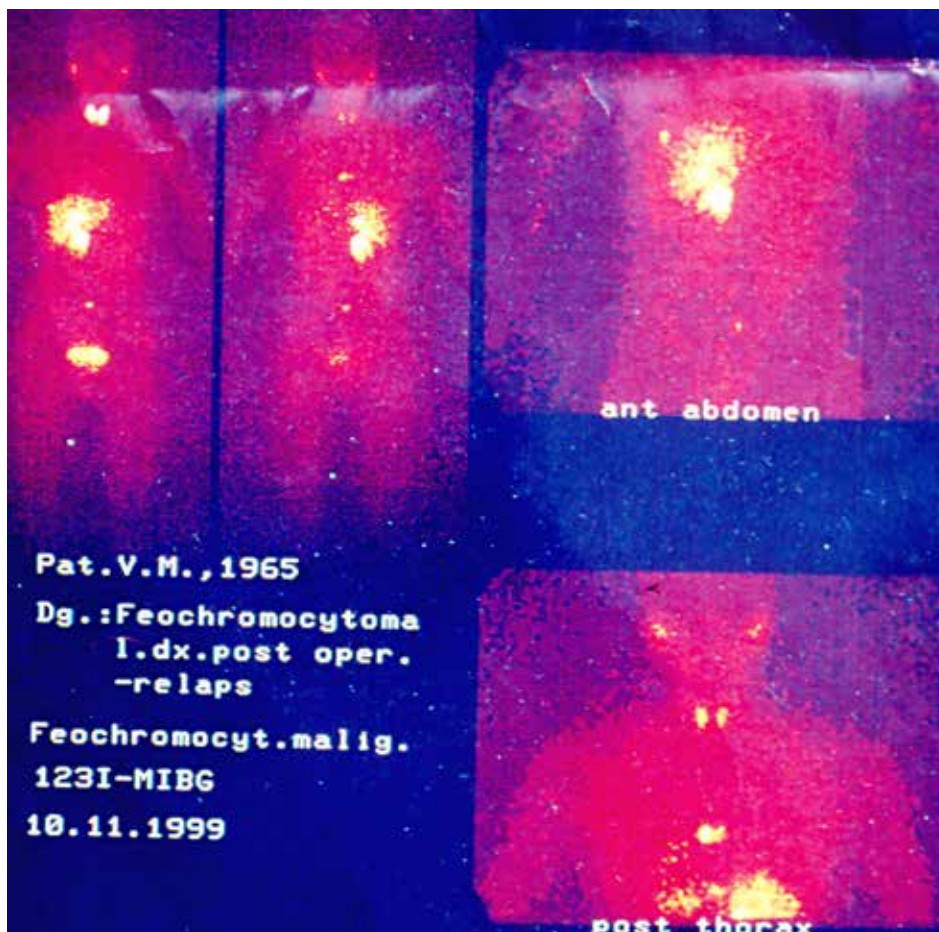
Liečba feochromocytómu

Kauzálne je len chirurgické odstránenie tumoru/ov vždy čo najskôr, ak nie je chirurgický zákrok kontraindikovaný. Dôležitá je tímová práca. Internista, chirurg, anesteziológ by mali poznať patofyziológiu KA secernujúceho tumoru. Pred a peroperačná adrenergná blokáda a úprava

CT nálež pacientky A.I.



Obr. 7. CT nálež pacienta s feochromocytómom



Obr. 8. ¹²³I-MIBG nálež pacienta s extraadrenálnym feochromocytómom

cirkulačného objemu je potrebná. Počas operácie monitorovať TK, EKG, a okamžitá úprava výkyvov TK a zastavenie srdcových arytmií znižuje riziko operačného zákroku.

ZÁVER

Napriek významnému pokroku zobrazovacích metód (CT, USG, I123MIBG, PET scan 18F-dopamín) stanovenie katecholamínov a ich metabolitov hrá dôležitú úlohu v diagnostike tumorov chromafinného tkaniva. Významný pokrok v biochemickej diagnostike prinieslo až presné poznanie biosyntézy katecholamínov, Axelrod objasnil ich biosyntézu (1960), Armstrong degradáciu katecholamínov (1956) a Lenders, Pacák a Eisenhofer dokázali, že metabolity katecholamínov (metanefrín a normetanefrín) v krvi pacientov s Feo pochádzajú prevažne z katecholamínov z tumoru. Záujem o ich stanovenie v krvi narástol a teraz sa považuje za najšpecifickejšiu diagnostiku Feo (100 % senzitivita pri 96 % špecificite, Lenders et al., 2002). Napriek úžasnému pokroku zobrazovacích metód je potrebná úzka spolupráca viacerých odborníkov. Spolupracovali sme s prof. K r e z e m, doc. H n i l i c o m, doc. Podobom a momentálne úzko spolupracujeme s prof. MUDr. B r e z o m, DrSc. a prof. MUDr. P a c á k o m, DrSc.

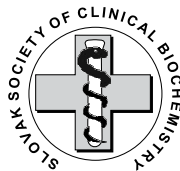
PodĎakovanie

Touto prácou dovoľujem si spomenúť a poďakovať môjmu úžasnému spolupracovníkovi a kamarátovi plk. MUDr. Jankovi Langošovi, CSc., ktorý ma uviedol do problematiky katecholamínov, pomáhal mi a radil a naša spoločná láska ku katecholamínom umožnila vyliečenie 126 pacientov s feochromocytómom z celého Československa.

LITERATÚRA

1. **Axelrod, J. (1960):** N-methyladrenaline, a new catecholamine in the adrenal gland. *BBA—Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/0006-3002(60)91507-9.
2. **Armstrong, M. D., Shaw, K. N. and Wall, P. E. (1956):** The phenolic acids of human urine; paper chromatography of phenolic acids. *The Journal of biological chemistry*.
3. **Blažíček, P., Langoš, J., a Vencel, P. (1977):** Rýchla a citlivá ionomeničová metóda na stanovenie vanilmandľovej kyseliny v moči u ľudí. *Biochem. clin. bohemoslov.* 3, 1977, s. 137–145.
4. **Blažíček, P., Langoš, J. (1986):** Katecholamíny v diagnostike tumorov neurálnej platničky. *Biochem. clin. bohemoslov.* 15, 1986, s. 105–117.
5. **Eisenhofer, G. et al. (1999):** Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJM199906173402404.
6. **Goldstein, D. S. et al. (1986):** Plasma 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa) and catecholamines in neuroblastoma or pheochromocytoma. *Annals of Internal Medicine*. doi: 10.7326/0003-4819-105-6-887.
7. **Lenders, J. W. M. et al. (1993):** Determination of metanephrines in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/39.1.97.
8. **Lenders, J. W. M. et al. (1995):** Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Annals of Internal Medicine*. doi: 10.7326/0003-4819-123-2-199507150-00004.
9. **Lenders, J. W. M., Pacak, K., Eisenhofer, G. (2002):** New advances in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma: Moving beyond catecholamines. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04410.x.
10. **Pacak, K. et al. (2001):** A “Pheo” lurks: Novel approaches for locating occult pheochromocytoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1210/jc.86.8.3641.
11. **Manz, B. et al. (1990):** New radioimmunoassays for epinephrine and norepinephrine in plasma and urine as well as metanephrines and normetanephrines in urine. *GIT Labor-Medizin*, (5), pp. 245–253.
12. **Manger, W. M., Gifford, R. W. (1980):** Pheochromocytoma. Diagnosis and management. *New York State Journal of Medicine*. doi: 10.5694/j.1326-5377.1959.tb76452.x.
13. **Mozley, P. D. et al. (1994):** The efficacy of iodine-123-MIBG as a screening test for pheochromocytoma. *Journal of Nuclear Medicine*.
14. **Pearse, A. G. E., Takor, T. (1979):** Embryology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. Federation Proceedings.
15. **Roden, M. et al. (2001):** Quantification of unconjugated metanephrines in human plasma without interference by

- acetaminophen. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/47.6.1061.
16. Sheps, S. G., Jiang, N. S., Klee, G. G. (1988): Diagnostic evaluation of pheochromocytoma. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. doi: 10.1016/s0889-8529(18)30426-2.
17. Schwert, W. B. et al. (1994): Adrenal pheochromocytomas: A broad spectrum of sonographic presentation. *Journal of Ultrasound in Medicine*. doi: 10.7863/jum.1994.13.7.517.
18. Smythe, G. A., Duncan, M. W. (1997): Immunoassay of catecholamines and metabolites. *Clinical chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/43.10.2011.
19. van Gils, A. P. G. et al. (1994): Magnetic resonance imaging or metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the demonstration of paragangliomas?—Correlations and disparities. *European Journal of Nuclear Medicine*. doi: 10.1007/BF00188673.



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 115–122

DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL NEKÓDUJÚCICH RNA V KULTIVAČNOM MÉDIU EMBRYÍ

Klepcová, Z.¹, Peterová, L.³, Toporcerová, S.², Rabajdová, M.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ, Košice

²Gynekologicko-pôrodnická klinika, LF UPJŠ a UNLP, Košice

³Gyncare – centrum reprodukčnej medicíny, Košice

silvia.toporcerova@upjs.sk

SÚHRN

Asistovaná reprodukcia sa vďaka zvyšujúcemu trendu neplodnosti vo svete stáva bežnou súčasťou zdravotníckej starostlivosti aj u nás. Úspešnosť procesu *in vitro* fertilizácie (IVF) je podmienená mnohými faktormi, k najdôležitejším z nich patria: receptívne endometrium, určenie implantačného okna a výber kompetentného embrya pre transfer. Extracelulárne molekuly, vylúčené embryom do kultivačného média, ktorými sú aj krátke nekódujúce RNA, predstavujú vhodný biomarker využiteľný pri štúdiu kvality embrya a úspešnosti IVF. Odber kultivačného média predstavuje neinvazívny spôsob získavania biologického materiálu, z ktorého je možné pomocou vybraných molekulových metód určiť kvalitu potenciálne implantovaného embrya.

Kľúčové slová: mikroRNA; piwiRNA; IVF; kultivačné médium

ABSTRACT

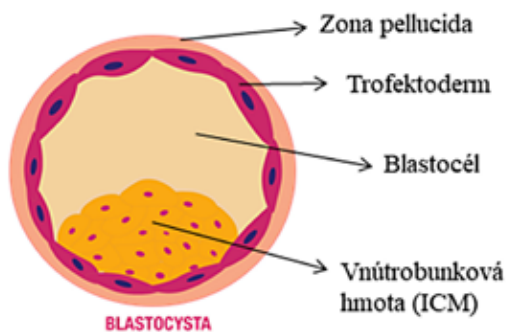
Thanks to the increasing trend of infertility in the world, assisted reproduction technology is becoming a common part of health care in our country as well.

The success of the *in vitro* fertilization (IVF) process is affected by many factors, the most important of which include: the receptive endometrium, the determination of the implantation window, and the selection of a competent embryo for transfer. Extracellular molecules secreted by the embryo into the culture medium including small non-coding RNAs represent a suitable biomarker useful in studying embryo quality and success of IVF. Collection of the culture medium is a non-invasive method of obtaining biological material, from which it is possible to improve the percentage of success of the IVF process using selected molecular methods.

Key words: microRNA; piwiRNA; IVF; culture media

ÚVOD

Neplodnosť (infertilita) je porucha reprodukčného systému s následnou neschopnosťou otehotnieť po jednom roku nechráneného pohlavného styku. Neplodnosť môže byť spôsobená mužskými i ženskými faktormi, alebo kombináciou oboch (Walker, Töbler, 2021). Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO, World Health Organisation) je celosvetovo neplodnosťou postihnutých viac než 10% všetkých párov (WHO, n. d.). Najčastejšie prí-



Obr. 1. Plne expandovaná blastocysta. Embryo v štádiu blastocysty je tvorené z dvoch rôznych typov buniek, a to trofektoderm, ktorý vytvára extraembryonálne tkanivo a ICM (tzv. embryoblast), ktorá sa vyvinie do fetálneho a extraembryonálneho tkaniva. Dutina blastocysty sa nazýva blastocél

činy spôsobujúce neplodnosť môžeme rozdeliť do šiestich kategórií: **gynekologické** (panvové adhézie, nepriechodnosť vajcovodov, endometrióza, defekty maternice a jej infekcie), **andrologické** (nízka/chýbajúca produkcia spermií, erektilná dysfunkcia, nedostatočná pohyblivosť spermií, abnormality tvaru spermií), **hormonálne** (syndróm polycystických ovarií, hypothyreóza, hypotalamická amenorea), **imunologické** (protilátky napádajúce spermie), **hematologické** (trombofilné polymorfizmy) a **genetické** (chromozomálne abnormality) (B r a z d o v á a kol., 2016; S t a n č i a k o v á a kol., 2017; W a l k e r, T o b l e r, 2021).

Technológie asistovanej reprodukcie (ART, Assisted reproductive technology) sú riešením pre čoraz viac neplodných párov. Asistovaná reprodukcia – mimomaternicové otehotnenie (IVF, *in vitro* fertilisation) môže predchádzať mnohým dedičným poruchám, taktiež vyriešiť mužský faktor, znížiť riziko prenosu vírusu ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV, Human Immunodeficiency Virus), umožniť rodičovstvo vo vyššom veku, či pomôcť tým, ktorí sa liečia na rôzne závažné ochorenia (napr. onkologické ochorenia) a zároveň sa pokúšajú o potomstvo (A l m a s i - H a s h i a n i a kol., 2019). IVF proces začína ovariálnou stimuláciou, pokračuje indukciou dozretia vajíčok, transvaginálnym odberom vajíčok, fertilizáciou vajíčok, zhodnotením fertilizácie a následnou kultiváciou embrya až do 6. dňa vývoja za prísne stanovených podmienok. Celý proces je ukončený prenosom embrya do maternice ženy, a v súčasnosti sa najčastejšie realizuje piaty deň po oplodnení vajíčok, kedy je embryo v štádiu blastocysty (Obr. 1). Blastocysta je charakteristická viditeľnou

dutinou (blastocél), a jej bunky sú rozdelené na dve časti – bunky budúceho embrya – embryoblast (ICM, inner cell mass) a trofoblast (TE, trofektoderm) (K h o s r a v i a kol., 2019). Pre úspešný embryo transfer je najdôležitejšie vybrať kvalitné euploidné embryo (embryo so správnym počtom chromozómov) vhodné na prenos do dutiny maternice (C i m a d o m o a kol., 2016).

Súčasný spôsob hodnotenia kvality embryí

Dôležitým krokom pri asistovanej reprodukcii je nielen určenie okna receptivity (R a b a j d o v á a kol., 2019), ale aj správny výber embrya na transfer a predikcia úspešnej implantácie (C i m a d o m o a kol., 2016). V súčasnosti sa hodnotenie kvality embrya uskutočňuje na základe jeho morfológického zhodnotenia, eventuálne za pomoci morfológického zhodnotenia pomocou metódy time-lapse monitoring (tzv. časozber), kedy sa sleduje dynamika delenia, kompaktizácia a kavitácia (M i l e w s k i, A j d u k, 2017). Ďalšou možnosťou výberu optimálneho embrya je jeho genetické vyšetrenie, ktoré však už predstavuje invazívny zásah do embrya – najčastejšie odber niekoľkých buniek trofektodermu v štádiu expandovanej blastocysty.

Hodnotenie kvality embrya na základe jeho morfológie embrya znamená jeho morfológické zhodnotenie raz za 24-48 hodín. V štádiu zygoty, prvý deň po oplodnení, sa sleduje počet, veľkosť a distribúcia jadierka, veľkosť a usporiadanie prvojadier, čas rozpadu prvojadier a prítomnosť alebo neprítomnosť cytoplazmatického zdrsenia. Hodnotenie embryí od 3. dňa od fertilizácie, kedy pozostávajú zo 6 až 8 buniek, sa sústreďí predovšetkým na hodnotenie počtu a tvaru blastomér a stupňa cytoplazmatickej fragmentácie. Na hodnotenie kvality blastocyst sa používa viacero hodnotiacich škál. Väčšina z nich hodnotí stupeň vývoja blastocysty (hatchujúca blastocysta, expandovaná blastocysta, včasná blastocysta), stav embryoblastu alebo ICM a stav trofoblastu. Na základe zhodnotenia týchto parametrov embryológ priradzuje blastocyste príslušné tripletové skóre (N a s i r i, E f t e k h a r i - Y a z d i, 2015). Čím morfológicky kvalitnejšie embryo transferujeme do maternice, tým je vyššia jeho pravdepodobnosť uhniesdenia v maternici a vyššia úspešnosť liečby (I r a n i a kol., 2017). Bohužiaľ, morfológické zhodnotenie kvality embrya je vysoko subjektívna metóda, ktorá má svoje výrazné limitácie. Podľa väčšiny štúdií morfológia embrya nehovorí absolútne nič o ich genetickej kvalite. Na druhej strane genetické vyšetrenie embryí už so sebou

prináša invazívny proces, ktorý môže negatívne ovplyvniť ďalší vývoj embrya, čo je okrem ceny jeho najväčšou limitáciou v rámci bežného klinického využitia. V súčasnosti sa preto kladie dôraz na zavádzanie takých metód hodnotenia kvality embrya, ktoré by neboli subjektívne, boli by neinvazívne a reprodukovateľné (Rødgara kol., 2015).

Nový pohľad na hodnotenie kvality embryí z kultivačného média

Embryo vylučuje do extracelulárneho prostredia niektoré látky (tzv. sekretóm), ktoré by mohli mať vlastnosti potenciálnych biomarkerov. Extracelulárnym prostredím pre včasné embryo v rámci jeho kultivácie v procese *in vitro* fertilizácie je kultivačné médium. Na kvalitu kultivačných médií sa v reprodukčnej medicíne kladú veľmi vysoké nároky, optimálne kultivačné médium je jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúci kvalitu a úspešnosť liečby neplodnosti. Ideálny embryonálny biomarker by mal byť neinvazívny, stabilný, špecifický k embryu a ľahko detekovateľný. Navyše, odber kultivačného média (Spent blastocyst medium, SBM), v ktorom sa preimplantačné embryo vyvíja, predstavuje neinvazívny spôsob a je ľahko zberateľným biologickým materiálom (Cpapalbo kol., 2016). SBM je vhodné na štúdium proteomiky, metabolomiky a v neposlednom rade aj malých nekódujúcich RNA (small non-coding RNA, sncRNA) (Rødgara kol., 2015).

Malé nekódujúce RNA v kultivačnom médiu

Za posledné roky pribudlo mnoho štúdií zaoberajúcich sa dôležitou úlohou malých nekódujúcich RNA, vrátane mikroRNA (miRNA) a piwi-interagujúcich RNA (piRNA), v reprodukčnom systéme. Okrem iného sa miRNA využívajú aj pri štúdiu karcinómov (Klepová kol., 2020). Pochopenie ich funkcie v rámci gametogenézy a embryogenézy by mohlo byť prospešné v rámci určenia možných príčin neúspešnosti implantácie v IVF procese (Timofeva kol., 2019). Dôležitou regulačnou úlohou miRNA je utišovanie génov priamym naviazaním sa na špecifické molekuly mRNA, čím umožnia ich degradáciu, resp. translačnú represiu a piwiRNA utlmujú transpozóny (Timofeva kol., 2020).

Ľudské embryá secernujú špecifické mikroRNA a piwiRNA molekuly do extracelulárneho prostredia a sprostredkujú tak interakciu medzi blastocystou a endometriom, esenciálnu pre úspešnú implantáciu embrya. Najväčším

zdrojom miRNA v SBM sú bunky trofektodermu. Komunikácia medzi embryom a endometriom je obojstranná, preto exozómy vylučované epitelom ľudského endometria transportujú svoj obsah do blastocysty, resp. do priľahlého endometria a ovplyvňujú tak génovú expresiu v endometriu. Neplodnosť je z istej miery charakterizovaná dereguláciou biochemických dráh s následným zmeneným profilom expresie sncRNA (Ciamdomo kol., 2019). Viacero skupín autorov porovnávalo zmeny v expresii miRNA v SBM u implantovaných blastocýst voči blastocýstám, u ktorých ku implantácii nedošlo. Zoznam týchto markerov je sumarizovaný na Obr. 2. Tieto sncRNA môžu odzrkadľovať viabilitu embrya, ploidity ako aj implantačný potenciál.

Vybrané miRNA z SBM regulujú gény v súvislosti s embryogenézou, implantáciou a s procesmi, ktoré s nimi úzko súvisia, ako napríklad proliferácia, angiogenéza, bunkový cyklus a apoptóza (Rosenbluth kol., 2014; Cumana kol., 2015; Borges kol., 2016; Cpapalbo kol., 2016; Abu-Halima kol., 2017; Kim kol., 2019; Ciamdomo kol., 2019; Timofeva kol., 2020). Kultivačné médium, v ktorom sa embryo vyvíja, predstavuje ľahko dostupný biologický materiál, pričom miRNA profil z kultivačného média môže predstavovať prediktívny biomarker klinického výstupu pri IVF cykloch (Cpapalbo kol., 2016).

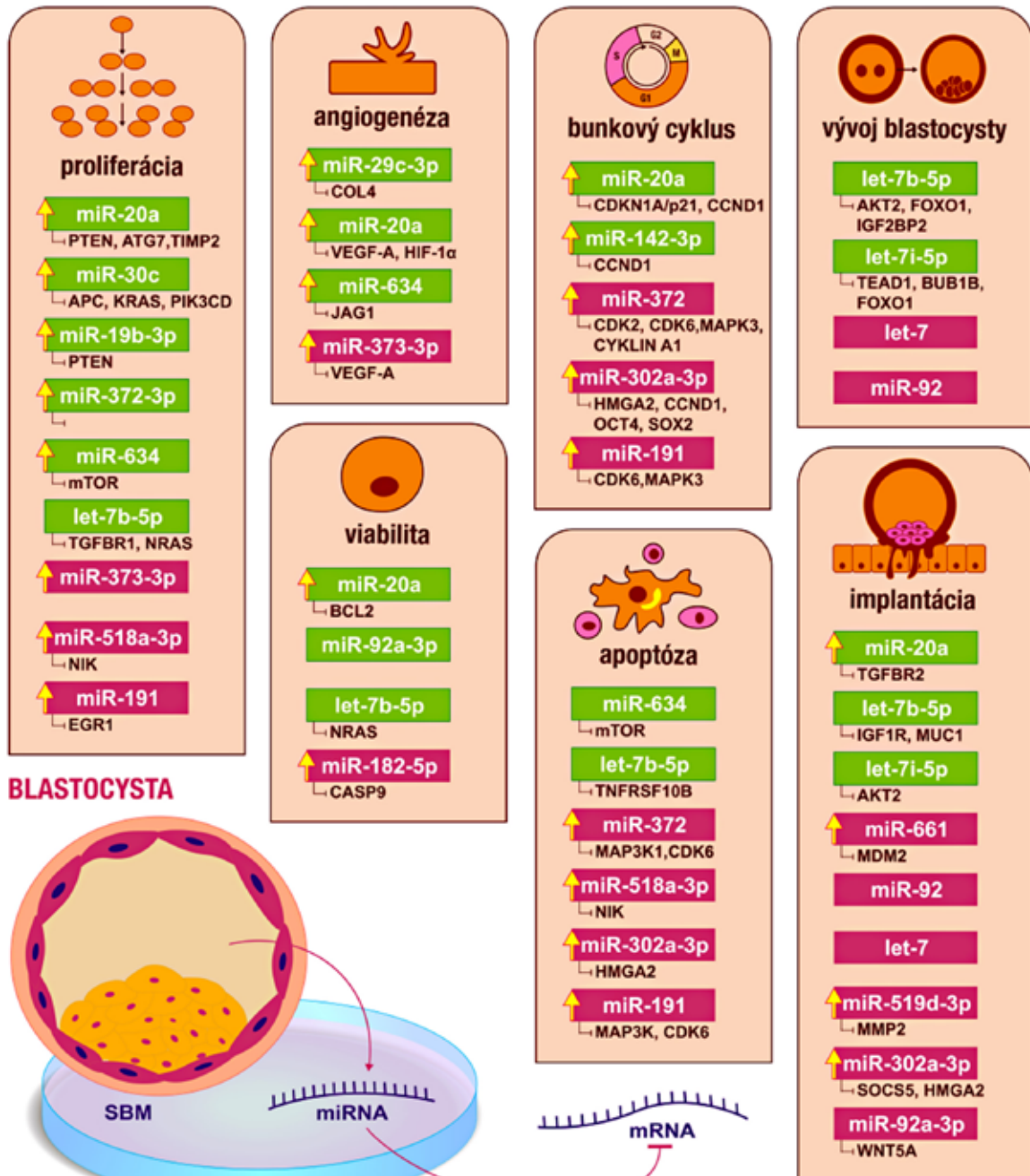
Vybrané metódy sekvenovania malých nekódujúcich RNA

Malé nekódujúce RNA molekuly sú pomerne krátke (približne 22 nukleotidov), majú vzájomnú sekvenčnú podobnosť, veľký dynamický rozsah a sú tkanivovo špecifické, čo sťažuje ich detekciu. Medzi štandardné molekulové metódy na detekciu miRNA patrí Northern blot (hybridizácia RNA), modifikácie PCR a rôzne typy sekvenovania. Pomocou vybraných molekulárnych metodík sa určí expresia príslušných génov a mikroRNA v kultivačnom médiu (Bartošík, Jiráková, 2018). Nový pohľad na analýzu kultivačných médií by mohli priniesť rôzne druhy sekvenovania, ako napríklad sekvenovanie novej generácie, pyrosekvenovanie, MinION-Oxford nanopore a sekvenovanie z jednej bunky.

Sekvenovanie novej generácie (NGS)

Sekvenovanie novej generácie (NGS, Next-generation sequencing) predstavuje paralelné sekvenovanie väčšieho

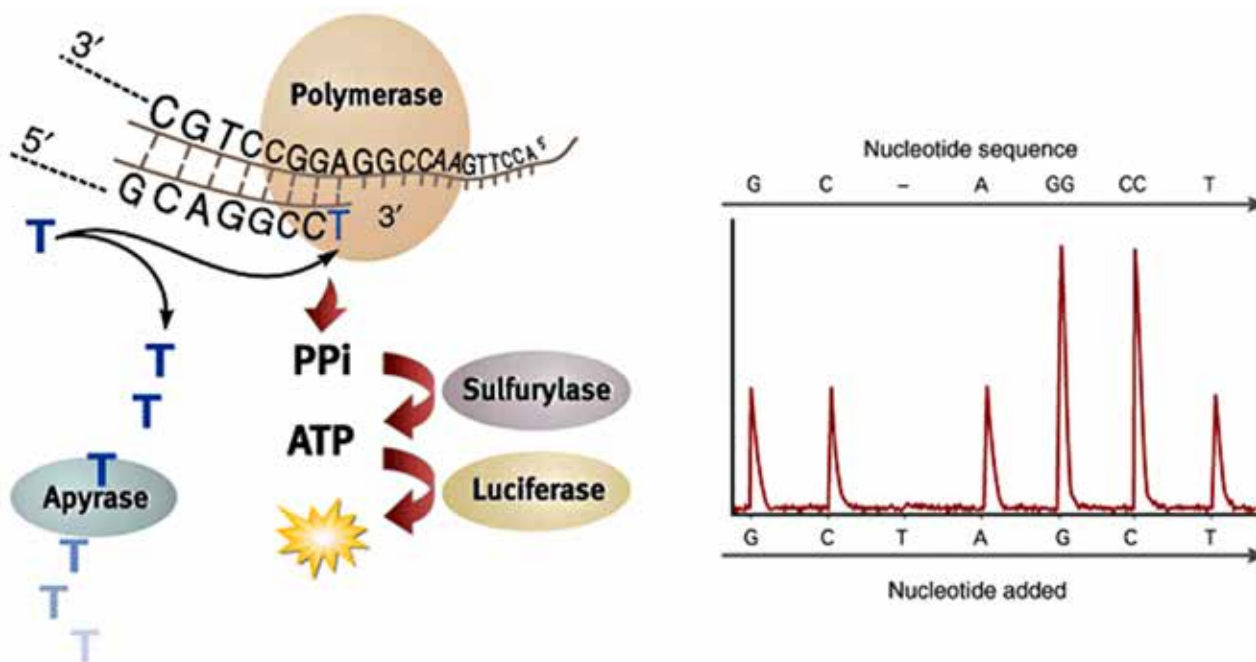
Efektorové mikroRNA pri úspešne a neúspešne implantovaných blastocystách



Obr. 2. Vybrané miRNA z kultivačného média blastocyst a ich príslušné cieľové gény

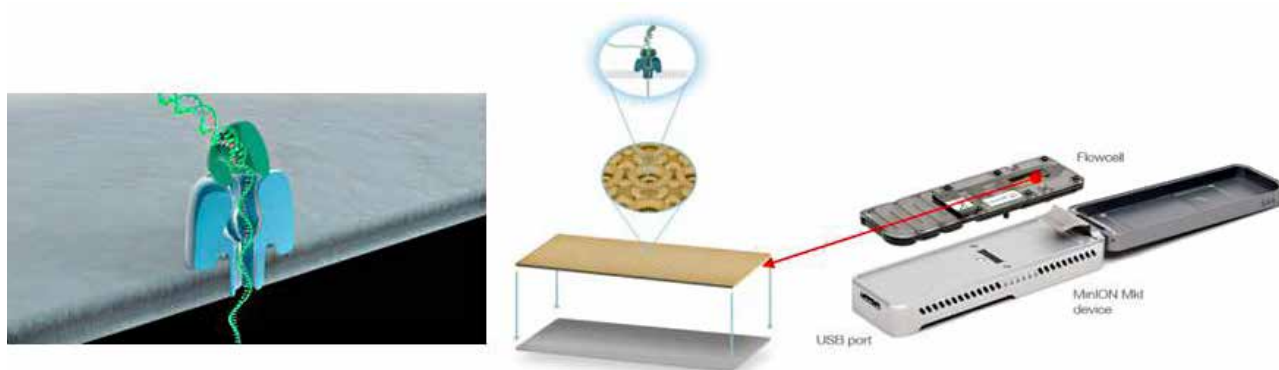
miRNA z kultivačného média (SBM) implantovaných a neimplantovaných blastocyst ovplyvňujú expresiu génov zúčastňujúcich sa rôznych bunkových procesov súvisiacich s embryogenézou a implantáciou (proliferácia, angiogenéza, prežívanie, apoptóza, bunkového cyklu, ako aj v procese implantácie embrya do uteru alebo v predimplantačnom vývoji (zvýšená expresia génov je znázornená šípkou hore)

Vysvetlivky: **AKT2** (proteínkináza B); **APC** (APC regulátor WNTsignálnej dráhy); **ATG7** (7 súvisiaci s autofágiou); **BCL2** (B-cell leukemia/lymphoma2); **BUB1B** (BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B); **CASP9** (kaspáza 9), **CCND1** (cyklín D1), **CDK2/6** (cyklín-dependentná kináza 2/6), **CDKN1A** (inhibitor 1A cyklín-dependentnej kinázy), **COL4** (kolagén typu IV alfa 1), **EGR1** (Early growth response protein 1=ZNF268), **FOXO1** (Forkhead Box O1), **HIF-1α** (hypoxiu indukujúci faktor-1 α), **HMGA2** (High Mobility Group AT-Hook 2), **IGF1R** (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor), **IGF2BP2** (insulin like growth factor 2 mRNA-binding protein 2), **JAG1** (Jagged Canonical Notch Ligand 1), **KRAS** (protoonkogén), **MAPK3** (mitogénom aktivovaná proteínkináza 3), **MDM2** (E3 ubikvitín proteín-ligáza), **mTOR** (mechanistický cieľ rapamycínu), **MUC1** (Mucin1), **NIK** (MAP3K14 – mitogénom aktivovaná proteínkináza kináza kináza 14), **NRAS** (Neuroblastoma RAS protoonkogén), **OCT4** (transkripčný faktor), **PIK3CD** (fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát 3-kináza katalytická podjednotka delta), **PTEN** (homológ fosfatázy a tenzínu), **SOCS5** (supresor 2 cytokinovej signalizácie), **SOX2** (box 2 génu SRY-pohlavie určujúci región), **TEAD1**(transkripčný zosilňovací faktor TEF-1), **TGFBR1** (receptor 1 transformujúceho rastového faktora), **TIMP2** (tkanivový inhibitor metaloproteináz 2), **TNFRSF10B** (tumor necrosis factor Receptor Superfamily Member 10b), **VEGF-A** (vaskulárny endotelový rastový faktor), **WNT5A** (člen rodiny WNT)



Obr. 3. Schéma pyrosekvenovania

Princíp spočíva na detekcii luminiscencie uvoľnených pyrofosfátov pri inkorporácii do reťazca pomocou DNA polymerázy. Vpravo sú zaznamenané signály príslušných nukleotidov (upravené podľa Technology Overview)



Obr. 4. MinION Oxford Nanopore sekvenovanie

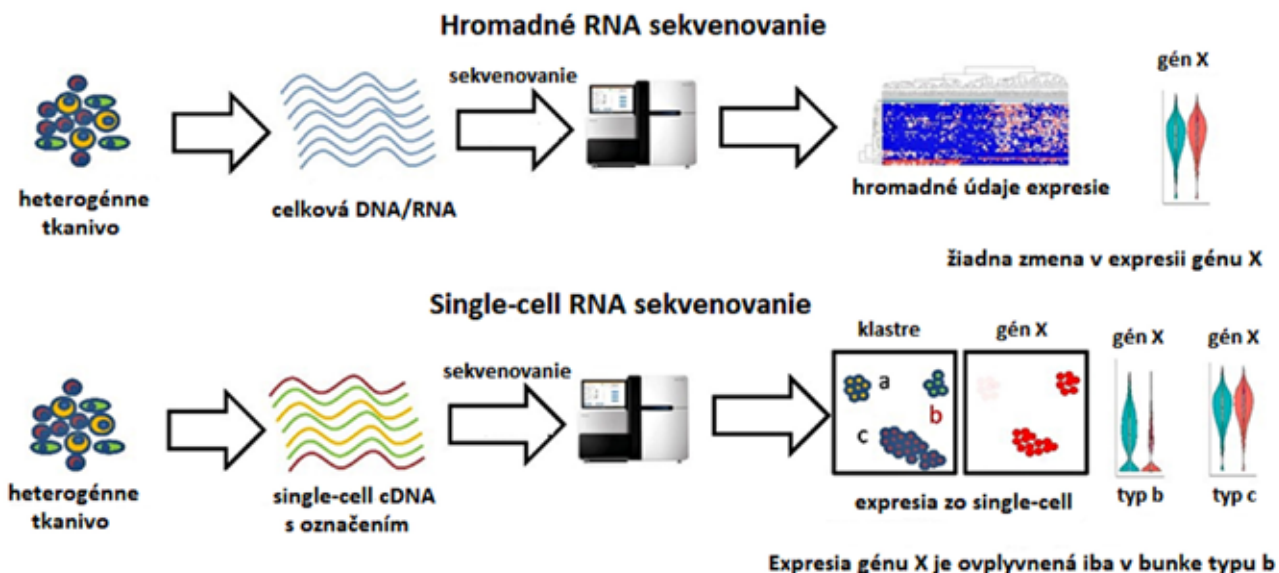
Na obrázku je znázornený princíp sekvenovania, nanopór a prenosný sekvenátor (upravené podľa: Lu a kol., 2016)

množstva dát, ktoré je možno rozdeliť do dvoch kategórií: sekvenovanie druhej generácie, ktoré je založené na PCR amplifikácii templátu a sekvenovanie tretej generácie, ktoré využíva tzv. sekvenovanie jednej molekuly bez nutnosti amplifikačného kroku. Pomocou NGS vieme sekvenovať celý genóm, alebo len špecifickú časť genómu (Tomášová a kol., 2015). Pred samotným sekvenovaním je nutné pripraviť sekvenačnú knižnicu a následne uskutočniť jej amplifikáciu. Príprava sekvenačnej knižnice sa skladá z dvoch krokov, a to fragmentácie východiskovej DNA a ligácie adaptorových primérov na fragmenty. Po sekvenácii sa prostredníctvom bioinformatickej analýzy spracuje nasnímaný signál, následne sa transformuje

do čiastkových nukleotidových sekvencií a porovná sa výsledná DNA sekvencia s referenčnou. Analýza a charakterizácia nie je možná bez tvorby knižníc a databáz (Gerková Bujalková a kol., 2016).

Pyrosekvenovanie

Pyrosekvenovanie je metóda sekvenovania „druhej generácie“ založená na detekcii luminiscencie uvoľnených pyrofosfátov pri inkorporácii nukleotidov do komplementárneho vlákna. Ide o real-time sekvenovanie, pri ktorom sa sledom enzymatických reakcií deteguje svetelný signál, ktorý sa uvoľnil pri zabudovaní deoxynukleotidfosfátov (dNTP) do reťazca DNA. Nevyžaduje sa prítomnosť flu-



Obr. 5. Single-cell RNA sekvenovanie

Porovnanie medzi hromadným RNA sekvenovaním (tzv. bulk RNA sekvenovanie) a single-cell RNA sekvenovaním, ktorého význam spočíva v značení molekúl pochádzajúcich z jednotlivých buniek, čo umožňuje vysoko výkonnú molekulárnu analýzu pri rozlíšení jednej bunky (upravené podľa: *Recent Advances in Single-cell Genomics Techniques|Technology Networks*)+

orescencne značených nukleotidov, rozpoznávanie jednotlivých nukleotidov je dané postupným pridávaním len konkrétnych nukleotidov do každého cyklu reakcie. Zariadením komplementárneho nukleotidu DNA-polymerázou vzniká pyrofosfát, ktorý využíva enzým ATP sulfuryláza na tvorbu ATP z adenosín-5-fosfosulfátu (APS). Vytvorené ATP využíva enzým luciferáza premieňajúca luciferín na oxyluciferín, ktorý svieti. Množstvo svetelného signálu je priamo úmerné množstvu inkorporovaných nukleotidov z každej jednej jamky (Obr. 3). Apyráza štípe ATP a nespotrebované nukleotidy, čím zanikne signál a začne celý cyklus s novým nukleotidom (T o m á š o v á a kol., 2015).

MinION-Oxford nanopore

Táto technológia v rámci sekvenovania „tretej generácie“ predstavuje priamu real-time analýzu dlhých DNA alebo fragmentov RNA v nanopóroch, ktoré vyvinuli v Oxford Nanopore Technologies. Sekvenovanie prebieha na čipe (Obr. 4), ktorý obsahuje množstvo mikrojamiek pokrytých membránou s modifikovaným proteínovým nanopórom a senzorm. Táto sekvenačná technológia je založená na princípe prechodu nukleovej kyseliny cez proteínový nanopór, čím sa mení tok iónov a tým aj elektrické napätie v rámci kanála. Výsledný signál je potom dekodovaný na špecifickú DNA alebo RNA sekvenciu (L u a kol., 2016).

Single cell sekvenovanie

Sekvenovanie z jednej bunky tzv. single-cell RNA sekvenovanie je metóda, pomocou ktorej osekvenujeme genóm alebo transkriptóm jednej bunky. V porovnaní s ostatnými sekvenačnými metódami, má táto metóda výhody v detekcii heterogenity medzi bunkami a rozoznáva aj malé množstvo buniek. Single cell RNA sekvenovanie zahŕňa označenie cDNA pochádzajúcich z jednotlivých buniek, čo umožní vysokú analýzu s rozpoznaním jednotlivých buniek. Na obrázku 5 je porovnanie s hromadným RNA sekvenovaním (tzv. bulk RNA sequencing), kedy sa meria priemerná expresia génov v jednotlivých bunkách. Pri single-cell sekvenovaní sa meria expresia RNA molekúl vzhľadom na pôvod bunky, teda odhalí sa expresia génu v zhluku buniek. Táto metodika umožní identifikáciu stavu v zdravých bunkách a v bunkách postihnutých ochorením (T a n g a kol., 2019).

ZÁVER

Pre úspešný single embryo transfer v procese *in vitro* fertilizácie je nevyhnutné vybrať kvalitné euploidné embryo, ktoré má vysoký potenciál implantácie v endometriu matrice. Hlavnými limitujúcimi krokmi v procese IVF sú výber kvalitného embrya a správne zosynchronizovanie

embrya a endometria, teda vystihnutie implantačného okna endometria. Výmena biomolekúl medzi včasným embryom a kultivačným roztokom v čase embryogenézy vedie ku možnosti identifikácie ideálneho biomarkera v kultivačnom médiu, ktorý by mohol byť v klinickej praxi využiteľný v rámci výberu optimálneho embrya na transfer. Neinvazívna odberu kultivačného média a jeho následnej analýzy sa preto stáva vhodným nástrojom štúdia a charakterizácie embrya, ktoré vylučuje do kultivačného média molekuly využiteľné ako prognosticko-prediktívne biomarkery priamo v klinickej praxi.

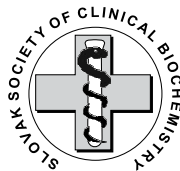
POĎAKOVANIE

Táto práca je súčasťou riešenia projektov VEGA 1/0873/18 a VEGA 1/0620/19, ktoré sú realizované v spolupráci s Gynekologicko-pôrodnickou klinikou UPJŠ LF a UNLP v Košiciach a Centrom pre asistovanú reprodukciu Gyncare v Košiciach.

LITERATÚRA

1. **Abu-Halima, M. et al. (2017):** Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing *In Vitro* Fertilization. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-13683-8.
2. **Almasi-Hashiani, A. et al. (2019):** Assisted reproductive technology and the risk of preeclampsia: An updated systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. doi: 10.1186/s12884-019-2291-x.
3. **Bartošík, M., Jiráková, L. (2018):** Current methods of microRNA analysis. *Klinická Onkologie*. doi: 10.14735/AMKO20182S93.
4. **Borges, E. et al. (2016):** miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure—a pilot study. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. doi: 10.5935/1518-0557.20160039.
5. **Brazdova, A. et al. (2016):** Immune aspects of female infertility. *International Journal of Fertility and Sterility*. doi: 10.1016/j.jfri.2013.12.091.
6. **Capalbo, A. et al. (2016):** MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoblast cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertility and Sterility*. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.014.
7. **Cimadomo, D. et al. (2016):** The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2016/7193075.
8. **Cimadomo, D. et al. (2019):** Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: Searching for biomarkers of implantation. *Human Reproduction*. doi: 10.1093/humrep/dez119.
9. **Cuman, C. et al. (2015):** Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine*. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.09.003.
10. **Geryková Bujalková, M. et al. (2015):** Sekvenovanie novej generácie a jeho využitie v klinickej genetike Next Generation Sequencing and its Application in Clinical Genetics. *NewsLab*, 1(1), pp. 15–20.
11. **Irani, M. et al. (2017):** Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.11.012.
12. **Khosravi, P. et al. (2019):** Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after *in vitro* fertilization. *npj Digital Medicine*. doi: 10.1038/s41746-019-0096-y.
13. **Kim, J., Lee, J. and Jun, J. H. (2019):** Identification of differentially expressed microRNAs in outgrowth embryos compared with blastocysts and non-outgrowth embryos in mice. *Reproduction, Fertility and Development*. doi: 10.1071/RD18161.
14. **Klepčová, Z. a kol. (2020):** MikroRNA a triple negatívny karcinóm prsníka. *Lekársky obzor*, 69(4), pp. 134–139.
15. **Lu, H., Giordano, F. and Ning, Z. (2016):** Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. doi: 10.1016/j.gpb.2016.05.004.
16. **Milewski, R. and Ajduk, A. (2017):** Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction*. doi: 10.1530/REP-17-0004.
17. **Nasiri, N. and Eftekhari-Yazdi, P. (2015):** An overview of the available methods for morphological scoring of pre-Implantation embryos in *in vitro* fertilization. *Cell Journal*. doi: 10.22074/cellj.2015.486.
18. **Rabajdová, M. a kol. (2019):** Nová výzva v diagnostike neplodnosti v procese *in vitro* fertilizácie. *Lekársky Obzor*, 69(3), pp. 95–98.
19. **Recent Advances in Single-cell Genomics Techniques** [Technology Networks (no date)]. Available at: <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/recent-advances-in-single-cell-genomics-techniques-324695> (Accessed: 1 April 2021).

20. Rødgaard, T., Heegaard, P. M. H. and Callesen, H. (2015): Non-invasive assessment of *in vitro* embryo quality to improve transfer success. *Reproductive BioMedicine Online*. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.08.003.
21. Rosenbluth, E. M. et al. (2014): Human embryos secrete microRNAs into culture media—A potential biomarker for implantation. *Fertility and Sterility*. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.058.
22. Stančiaková, L. a kol. (2017): Trombofilné stavy vo vzťahu ku gravidite. *Vaskulárna medicína*, 9 (2), pp. 59–65.
23. Tang, X. et al. (2019): The single-cell sequencing: New developments and medical applications. *Cell and Bioscience*. doi: 10.1186/s13578-019-0314-y.
24. *Technology Overview* (no date). Available at: <http://cgs.hku.hk/portal/index.php/pyrosequencing/technology-overview> (Accessed: 1 April 2021).
25. Timofeeva, A. et al. (2020): Small noncoding rna signatures for determining the developmental potential of an embryo at the morula stage. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms21249399.
26. Timofeeva, A. V. et al. (2019): Cell-free, embryo-specific sncRNA as a molecular biological bridge between patient fertility and IVF efficiency. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms20122912.
27. Tomášová R. a kol. (2015): Odysea čítania DNA. *NewsLab*, 2(1), pp. 7–10.
28. Walker, M. H. and Tobler, K. J. (2021): *Female Infertility, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310493> (Accessed: 1 April 2021).
29. WHO|*Global prevalence of infertility, infecundity and childlessness* (no date). Available at: <https://www.who.int/reproductive-health/topics/infertility/burden/en/> (Accessed: 1 April 2021).



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 123–132

DETEKCIA EXPRESIE miRNA V IVF PROCESSE – MOŽNOSŤ VYUŽITIA V DIAGNOSTIKE NEPLODNOSTI

Kalinová, K.¹, Remešová D.³, Špaková I.¹, Toporcerová, S.², Rabajdová, M.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ, Košice

²Gynekologicko-pôrodná klinika, LF UPJŠ, Košice

³Gyncare – centrum pre reprodukčnú medicínu, Košice

miroslava.rabajdova@upjs.sk

SÚHRN

Neploďnosť v súčasnosti postihuje približne 10% populácie a na základe vysokej prevalencie je zaradovaná Svetovou zdravotníckou organizáciou medzi populačné ochorenia. Za fyziologických okolností sú v reprodukcii kľúčovými procesmi okno implantácie a receptivita endometria, ktoré podliehajú regulácii na génovej úrovni. Narušením tejto regulácie, môže následne dôjsť k patologickým zmenám, ktoré prispievajú k poruchám plodnosti. Hlavnými faktormi, ktoré ovplyvňujú reguláciu génovej expresie sú nekódujúce RNA, ktoré modifikujú génovú expresiu najmä na posttranskripčnej úrovni. Posttranskripčná úroveň regulácie sa považuje za kľúčovú pri vzniku rôznych deregulácií. Ich naakumulovaním môže dôjsť k vzniku rôznych patologických procesov. Objasnením mechanizmu pôsobenia konkrétnych nekódujúcich RNA v rámci infertility sa ukazuje ako možnosť ich využitia v diagnostike. Využitím detekcie citlivých miRNA markerov sa celý proces diagnostiky môže významne urýchliť a tiež prispieť k zlepšeniu výsledku liečby neplodnosti.

Kľúčové slová: miRNA; neplodnosť; RT-PCR; miREIA

ABSTRACT

Infertility affects about 10% of the population currently and, due to its high prevalence, is classified by the World Health Organization as a population disease. Under physiological circumstances, the key processes in reproduction are implantation window and endometrial receptivity, which are regulated at the gene level. By disrupting this regulation, pathological changes can subsequently occur, which contribute to fertility disorders. The main factors that influence the regulation of gene expression are non-coding RNAs that modify gene expression, especially at the post-transcriptional level. The post-transcriptional level of regulation is considered to be key in the emergence of various dysregulations. Accumulation of this dysregulations can lead to various pathological processes. By elucidating the mechanism of action of specific non-coding RNAs in the context of infertility, is possible to use them in diagnostic process. By using the detection of sensitive miRNA markers, the whole diagnostic process can be significantly accelerated and also contribute to improving the outcome of infertility treatment.

Key words: miRNA; infertility; RT-PCR; miREIA

ÚVOD

Neploďnosť je spôsobená abnormalitami a defektami reprodukčných orgánov, hormonálne poruchy, genetické poruchy, ale aj faktory životného prostredia a životného štýlu. V princípe každý z uvedených faktorov môže istým spôsobom narušiť receptivitu endometria a okno implantácie, čím je následne ovplyvnená schopnosť otehotnieť. Je známe, že nekódujúce RNA, konkrétne miRNA, majú za úlohu regulovať bunkové procesy na posttranskripčnej úrovni a dereguláciou miRNA môže dochádzať k dereguláciám aj na vyšších úrovniach. Naakumulovaním týchto deregulácií môže dochádzať až k vzniku patologických procesov na systémovej úrovni, a k rozvoju rôznych ochorení (napr. onkologického charakteru). Aktuálne sú nekódujúce RNA spájané aj s poruchami plodnosti. Objasnením špecifického pôsobenia miRNA v rámci infertility sa ukazuje potenciál využitia týchto RNA ako biomarkerov. Využitie správnej metodiky detekcie citlivého miRNA markera môže zaručiť vyššiu pravdepodobnosť detekcie špecifickej miRNA, zodpovednej za kaskádu procesov narúšajúcich plodnosť ženy. Urýchlenie diagnostického procesu môže byť v tomto prípade prínosné, keďže zmeny nastávajú v rámci každého menštruačného cyklu a vyhodnocovanie aktuálne používaných metodík môže toto obdobie výrazne presahovať. Zlepšenie diagnostického procesu môže zároveň znamenať zníženie ekonomického zaťaženia pacienta a zefektívnenie práce diagnostického pracoviska.

Úloha nekódujúcich RNA v procese neploďnosti

Nekódujúce RNA (ncRNA) sú molekuly RNA, ktoré nie sú prekladané do štruktúry proteínu. Aj keď ncRNA väčšinou nekódujú proteíny, sú zapojené do mnohých biologických

procesov, ako vývoj embryí, proliferácia a diferenciácia buniek, alebo apoptóza. Spomedzi ncRNA sú miRNA najčastejšie študované v rámci receptivity endometria. Ich funkcia v regulácii génovej expresie zahŕňa reguláciu génov bunkového cyklu a mnoho ďalších biologických aspektov (H u a n g a kol., 2020).

V organizme majú nekódujúce RNA (ncRNA) regulačnú úlohu najmä na posttranskripčnej úrovni (Tab. 1), čím ovplyvňujú bunkové procesy aj na vyšších úrovniach a ich dereguláciou môže dochádzať k nežiadúcim procesom s negatívnym vplyvom na celý organizmus. Dôsledkom takýchto deregulácií je vznik a rozvoj rôznych ochorení, napr. onkologického charakteru (K l e p c o v á a kol., 2020). Nekódujúce RNA sú tiež spájané s gynekologickými malignitami a poruchami plodnosti (K a m a l i d e h g h a n a kol., 2020). Objasnením špecifického pôsobenia konkrétnych nekódujúcich RNA v rámci infertility sa ukazuje potenciál využitia týchto RNA ako biomarkerov (H a l e a kol., 2015).

Mikro RNA

Mikro RNA (miRNA), patriace medzi ncRNA molekuly, sú malé jednovláknové reťazce o dĺžke 18–24 nukleotidov zapojené do regulácie génovej expresie. Mechanizmus regulácie spočíva v naviazaní molekuly miRNA na molekulu mRNA, čím sa zabráni translácii a vytvoreniu proteínového produktu. miRNA sa vyskytuje vo väčšine eukaryotických organizmov, predpokladá sa, že v ľudskom organizme tvorí 1–5 % genómu a môže regulovať približne 30 % proteín-kódujúcich génov. Hoci sa o presnom pôsobení miRNA vie málo, je evidentné, že svojim účinkom zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie (M a t s u y a m a, S u z u k i, 2020).

Tab. 1. Charakterizácia ncRNA a funkcia v organizme

Vlastnosť	miRNA	piRNA	siRNA
dĺžka	~22 nukleotidov	~24-30 nukleotidov	~21 nukleotidov
enzým	Drosha, Dicer	Zucchini	Dicer
AGO (Argonaut proteín) podskupina	AGO	PIWI	AGO
mechanizmus aktivity	translačná represia, degradácia mRNA	transkripčná/posttranskripčná represia transpozónov	štiepenie RNA
funkcia	regulácia proteín-kódujúcich génov	silencing transpozónov	regulácia proteín-kódujúcich génov, transpozónov; ochrana proti vírusom

Biogenéza a funkcia miRNA

Mikro RNA je syntetizovaná z miRNA-DNA lokusu prostredníctvom polymerázy II. Transkribovaný región vytvára vlásočnicovú štruktúru nazývanú primárna miRNA (pri-miRNA). Štruktúra pozostáva z kmeňovej časti (33-35 bp), koncovej slučky a jednovláknových segmentov, poly-A sekvencie na 3' konci reťazca a tzv. čiapočky na 5' konci (Ö n e r, 2019).

Aby sa z pri-miRNA stala funkčná miRNA, je potrebný sled niekoľkých maturačných krokov (Obr. 1). Proces maturácie začína v jadre pôsobením tzv. mikroprocesoru, ktorý je zložený z RNAza III-Drosha a RNA viažuceho proteínu asociovaného s DiGeorge syndróm-kritickým regiónom 8 (DGCR8, double-stranded RNA-binding protein Di-George syndrome critical region 8). Po iniciácii maturácie pri-miRNA prechádza niekoľkými úpravami.

Dochádza k odštiepeniu jednovláknových koncov endonukleázou Drosha a vzniku prekurzorovej miRNA (pre-miRNA), ktorá má vlásočnicovú štruktúru dlhú cca 65 nukleotidov (M a t s u y a m a, S u z u k i, 2020).

Pre-miRNA prestupuje z bunkového jadra do cytoplazmy aktívnym transportom cez exportín 5 transportný systém (Ö n e r, 2019). Exportín 5 vytvára komplex s GTP-viažucim proteínom Ran (RanGTP, GTP-binding nuclear protein Ran), ktorý prechodom cez jadrový kanálový komplex hydrolyzuje, rozpadá sa Drosha-RanGTP-pre-miRNA komplex a uvoľňuje sa pre-miRNA do cytoplazmy, kde sa docieli maturácia miRNA (H a, K i m, 2014). Predpokladá

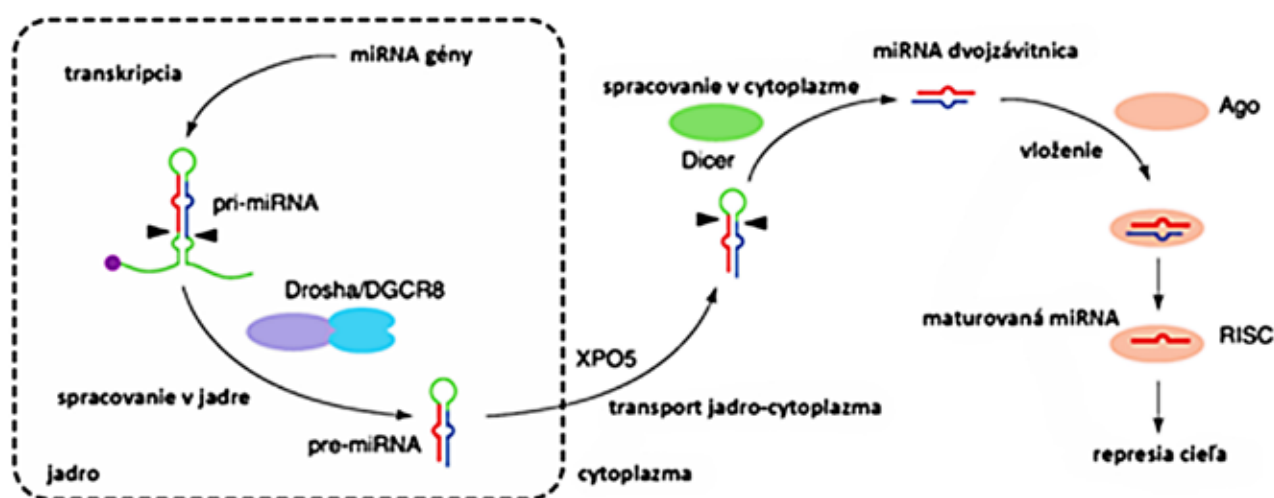
sa, že RanGTP sa zúčastňuje transportu pre-miRNA do cytoplazmy, zároveň má ochrannú funkciu a zabraňuje degradácii pre-miRNA v jadre (M a c F a r l a n e, M u r p h y, 2010).

Dvojreťazcová RNA štruktúra je stabilizovaná vodíkovými väzbami, po prestupe do cytoplazmy podlieha vonkajším faktorom, deštruuje sa a vzniká zrelá miRNA (mature, mat-miRNA), druhý reťazec je okamžite degradovaný. Mat-miRNA sa následne viaže na proteínový RNA tlmiači komplex (RISC, RNA-induced silencing complex), ktorý pozostáva z troch podjednotiek: **Argonaut proteínu** (Argonaute 2), **TAR RNA-viažuceho proteínu** (TRBP, TAR RNA binding protein) a **Dicer endonukleázy** (Ö n e r, 2019). Dicer spadá, podobne ako Drosha, do skupiny RNA-III endonukleáz, viaže sa na dvojláknovú pre-miRNA a štiepi ju ATP dependentným spôsobom (H a, K i m, 2014).

Aktivovaný RISC rozpoznáva 3' UTR (untranslated) koniec cieľovej mRNA a tým dochádza buď k degradácii cieľovej mRNA, k transkripčnej represii alebo k inhibícii translácie (Ö n e r, 2019).

Charakteristika endometria

Endometrium sa skladá zo stĺpcového luminálneho epitelu podporovaného bunkovou strómou obsahujúcou tubulárne žľazy a lemuje dutinu maternice, ktorá poskytuje prostredie pre vývoj plodu. Endometrium je rozdelené na *stratum basalis* (bazálna vrstva) a *stratum functionalis* (funkčná vrstva). *Stratum functionalis* je hrubá povrcho-



Obr. 1. Schematicky znázornená biogenéza miRNA upravené podľa Matsuyama, Suzuki, 2020

vá/vnútorňa vrstva, ktorú možno ďalej rozdeliť na dve zóny, *stratum compactum* a *stratum spongiosum*: ***stratum compactum*** je najbližšie k dutine maternice s hustou strómou, ktorá priamo podporuje bunky luminálneho epitelu; ***stratum spongiosum*** je stredná vrstva medzi *stratum compactum* a *stratum basalis*, ktorá sa skladá z rozšírených a stočených častí maternicových žliaz. *Stratum basalis* susedí s myometriom a obsahuje trvalú strómu s bazálnymi časťami žliaz, ktoré počas menštruačného odlupovania endometria ostávajú zachované (K u r i t a, T e r a k a w a, 2020).

Receptivita endometria

Hormonálna regulácia endometria vedie k cyklickým morfológickým a funkčným zmenám. Počas väčšiny menštruačného cyklu je endometrium neschopné prijať embryo, adhezívne sa stáva len na niekoľko hodín. Toto krátke obdobie prebieha uprostred sekrečnej fázy a je známe ako okno implantácie (Window of implantation, WOI). Prvýkrát túto koncepciu navrhli H e r t i g a R o c k v roku 1956 (R u i z - A l o n s o, B l e s a, S i m ó n, 2012).

Jednou z najdôležitejších zmien, ktoré endometrium podstupuje počas nadobúdania receptivity, je transformácia plazmatickej membrány z neadhezívnej na adhezívnu, čo zahŕňa remodeláciu endometriálneho povrchu, kedy sa na apikálnej membráne vytvoria ektoplazmatické výbežky tzv. pinopódy (M u r p h y, 2004).

Deliace sa embryo po transfere do dutiny maternice začína produkovať niekoľko typov molekúl, ktoré ovplyvňujú implantáciu prostredníctvom interakcií s endometriom. Keďže je endometrium receptívne len krátky čas, je na implantáciu potrebná synchronizácia medzi vývojom embrya a maturáciou endometria. Ak dôjde k tejto synchronizácii súčasne, spustí sa proces implantácie, ktorý postupuje v štyroch fázach: apozícia, adhézia, penetrácia a invázia (R u i z - A l o n s o, B l e s a, S i m ó n, 2012).

miRNA a receptivita endometria

Prostredníctvom analýzy miRNA-mRNA, bolo zistené, že miRNA regulujú molekulové signálne dráhy súvisiace s endometriálnou receptivitou, napr. signálne dráhy bunkovej adhézie, gény WNT rastových faktorov (Wingless-related integration site growth factor), p53 a ďalšie gény bunkového cyklu (H u a n g a kol., 2020). Tiež sa ukázalo, že miRNA môžu ovplyvňovať receptivitu endometria reguláciou génov a signálnych dráh zapojených do procesov im-

plantácie embrya a do procesov, ktoré sú súčasťou „okna implantácie“. Bolo tiež pozorované, že napr. miRNA-135a a miRNA-135b dokážu inhibovať expresiu HOXA10 (Homeobox A10) a tiež môžu mať inhibičný účinok na cyklooxygenázu 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) (P e t r a c c o a kol., 2011).

Expresia miRNA je závislá od štádia menštruačného cyklu a hladina expresie kolíše medzi jednotlivými fázami tohto cyklu. Na základe zmien, vyskytujúcich sa v týchto fázach, dochádza k zmene expresie cieľových génov a tým aj regulujúcich miRNA (L a m, S h a h, B r o s e n s, 2012).

V organizme je receptivita endometria regulovaná hladinami progesterónu a estrogénov; expresia miRNA úzko súvisí s receptormi spomenutých hormónov (P a n a kol., 2007).

Expresia 12 rôznych miRNA (miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30d, miR-31, miR-193a-3p, miR-203, miR204, miR-200c, miR-210, miR-582-5p a miR-345) bola v sekrečnej fáze porovnateľne vyššia ako v proliferáčnej fáze (L a m, S h a h, B r o s e n s, 2012). Niektoré miRNA (miR15b, miR-20a a miR-21) majú vyššiu expresiu práve v proliferáčnej fáze, zatiaľ čo iné (napr. miR-135a) sú v proliferáčnej fáze downregulované (H u a n g a kol., 2020). Preto môže rozdielna expresia miRNA hrať dôležitú úlohu pri regulovaní, vytváraní a udržiavaní endometriálnej receptivity.

Nekódujúce RNA ako biomarkery neplodnosti

Je známe, že krátke nekódujúce RNA majú dopad na celé spektrum procesov v rámci reprodukčného systému. Ovplyvňujú expresiu génov na úrovni zárodočných buniek, ako aj procesov patogenézy ochorení asociovaných s neplodnosťou.

Porovnanie profilu miRNA pacientov s PCOS so zdravými kontrolami ukazuje, že miRNA môžu prispievať k patogenéze tejto diagnózy. Expresia miRNA v sére žien s PCOS ukazuje zmeny na úrovni regulácie koncentrácie inzulínu, glukózového receptora a v regulácii androgénnych hormónov. Napríklad expresia miR-21, miR-27b, miR-103 a miR-155 je zmenená pri obezite aj pri PCOS v porovnaní so zdravou kontrolou. MiR-93 sa tiež podieľa na znižovaní expresie SLC2A4 (Solute Carrier Family 2 Member 4) – pomocného transportéra glukózy citlivého na inzulín v tukovom tkanive, kde je nadmerne exprimovaný u žien s PCOS s inzulínovou rezistenciou (B u t l e r a kol., 2020). miRNA majú tiež dopad na reguláciu androgénnych hormónov, v súvislosti s tým sa ukázala korelácia medzi hladinami tes-

Tab. 2. Prehľad miRNA izolovaných z plazmy s uvedenými cieľovými génni

mi RNA	Biol. materiál	Up/Down regulácia	Cieľové gény	Mechanizmus	Diagnóza	Zdroj
135a	plazma	Up	IL8, SYT1, IRS2	Znižovanie hladiny progesterónu a testosterónu	PCOS	(Sørensen a kol., 2014)
		Up	ER beta	Zvýšená proliferácia granulárnych buniek ovárií, represia apoptózy		(Song a kol., 2019)
		Dow	Represia HOXA10	Narušenie receptivity endometria		(Wang a kol., 2021)
186		Up	ER beta	Zvýšená proliferácia granulárnych buniek ovárií, represia apoptózy	PCOS	(Song a kol., 2019)
145	plazma	Up	IGF-1R	Narušenie implantácie	Hydrosalpinx	(Wang a kol., 2021)
155	sérum	Up	SMAD2, BCL2	Rast kumulárnych buniek, vývoj folikulu; maturácia oocyty	PCOS	(Dehghan a kol., 2020)
93	plazma	Up	NGF, HGF	Súvislosť s inzulínovou rezistenciou	PCOS	(Sathyapalan a kol., 2015)
			GLUT4	Downregulácia inzulín senzitívneho glukózového transportéru 4		(Chen a kol., 2013)
222	plazma	Up	ER1	Súvislosť so zvýšenou sekréciou estradiolu	PCOS	(Hosseini a kol., 2017)
223	plazma	Up	PPAR, IGF-1, angiopoietín	Inzulínová rezistencia, hyperandrogenizmus, endometriálna receptivita, dozrievanie ovariálneho folikulu	PCOS	(Sathyapalan a kol., 2015)
146a	plazma	Up		Inhibícia syntézy progesterónu, androgénov, estrogénu	PCOS	(Hosseini a kol., 2017)
Let-7i-3p	sérum	Up			PCOS	(Ding a kol., 2015)
5706	sérum	Up			PCOS	(Ding a kol., 2015)
4463	sérum	Up			PCOS	(Ding a kol., 2015)
3665	sérum	Up			PCOS	(Ding a kol., 2015)
638	sérum	Up			PCOS	(Ding a kol., 2015)
124-3p	sérum	Down		Zvýšenie hladiny testosterónu, zníženie hladiny estradiolu	PCOS	(Sirotkin a kol., 2009; Ding a kol., 2015)
128	sérum	Down		Zvýšenie hladiny progesterónu, testosterónu, estradiolu	PCOS	(Sirotkin a kol., 2009; Ding a kol., 2015)
29a-3p	sérum	Down		Zvýšenie hladiny progesterónu, testosterónu	PCOS	(Sirotkin a kol., 2009; Ding a kol., 2015)
Let-7c	sérum	Down		Zvýšenie hladiny progesterónu, testosterónu, estradiolu	PCOS	(Sirotkin a kol., 2009; Ding a kol., 2015)
27a	plazma	Up	SMAD5, PPAR- γ	Inzulínová rezistencia,	PCOS, POF	(Tabrizi a kol., 2020)
301	plazma	Up	PPAR- γ	Ovplyvňovanie glykémie	PCOS	(Tabrizi a kol., 2020)
130b	plazma	Down	DENND1	Syntéza androgénov prostredníctvom 17 α -hydroxylase (CYP17A1)	PCOS	(McAllister a kol., 2019)
592		Down	LHCGR	Zvýšenie expície LHCGR (luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor)	PCOS	(Song, Luo a Li, 2015)

Tab. 2. Pokraovanie

mi RNA	Biol. materiál	Up/Down regulácia	Cieľové gény	Mechanizmus	Diagnóza	Zdroj
17-5p	plazma	Down	BCL2, CDKN1A/p21, TGF beta, IL-8, HIF-1 alfa VEGF	Zvýšené prežívanie buniek, potlačenie proliferácie, zvýšená indukcia lokálneho zápalu	endometrióza	(Jia a kol., 2013)
20a	plazma	Down	BCL2, CDKN1A/p21, TGF beta, IL-8, HIF-1 alfa VEGF	Zvýšené prežívanie buniek, potlačenie proliferácie, zvýšená indukcia lokálneho zápalu	endometrióza	(Jia a kol., 2013)
22	plazma	Down	HIF-1 alfa VEGF	Pro-zápalový a pro-angiogénny efekt	endometrióza	(Jia a kol., 2013)
Let-7	plazma	Down	KRAS	Indukcia proliferácie a invazivity	endometrióza	(Cho a kol., 2015)
135-a	plazma	Down	HOXA10	Regulácia endometriálnej receptivity	endometrióza	(Cho a kol., 2015)
154-5p	plazma	Down		Bunková proliferácia, diferenciácia, neo-vaskularizácia, motilita	endometrióza	(Pateisky a kol., 2018)
200a	plazma	Down	ZEB1/2, E-kadherín	Indukcia EMT procesu	endometrióza	(Rekker a kol., 2015)
200b	plazma	Down	ZEB1/2, E-kadherín	Indukcia EMT procesu	endometrióza	(Rekker a kol., 2015)

tosterónu v sére a miR-21, miR-27b a miR-155. Iné miRNA, napríklad miR-222, miR-520c-3p a miR-193b môžu ovplyvňovať nielen sekréciu steroidných hormónov, ale majú dopad aj na estrogénové receptory (Sørensen a kol., 2014).

Mnoho štúdií uvádza súvislosť medzi endometriózou a subfertilitou, najmä kvôli ovplyvňovaniu vývoja oocytov a embryí, abnormálnemu peritoneálnemu prostrediu a zníženej receptivite endometria. Existujú silné dôkazy, že miRNA sú neoddeliteľnou súčasťou regulácie týchto faktorov. V priamej súvislosti s neplodnosťou figuruje miR-199a, ktorej cieľovými molekulami sú COX-2 a leukémiu inhibujúci faktor (LIF), ktoré sú považované za markery receptivity endometria (Ohlsson, Teague, Prinnt, Hill, 2009). COX-2 je tiež považovaná za dôležitý indukčný enzým v procese angiogenézy, najmä prostredníctvom podporovania syntézy prostaglandínov. Tým sa indukuje produkcia napr. vaskulárneho endotelialného rastového faktora (vascular endothelial growth factor – VEGF) a podporuje sa tak angiogénny proces. Angiogenéza je kľúčový faktor pre normálny rast plodu a pri jej dereguláciách môže dochádzať k predčasnému pôrodu (Rabaldová a kol., 2017).

Identifikácia odlišných krátkych nekódujúcich RNA prítomných v cirkulácii by mohla slúžiť ako nástroj na diagnostiku a potenciálne aj na liečbu ochorení spojených s infertilitou. Prehľad miRNA asociovaných s neplodnosťou sumarizuje Tab. 2.

Molekulové metódy detekcie nekódujúcich RNA

V súčasnosti existuje široké spektrum molekulových techník, vhodných na detekciu a kvantifikáciu miRNA, napr. PCR (polymerázová reťazová reakcia), RT-PCR (polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou), kvantitatívna PCR (qPCR), hybridizačné techniky (Northern blott), sekvenovanie (RNAseq) alebo microarray technológie. V dnešnej dobe sú k dispozícii aj hybridné metódy kvantifikácie miRNA na princípe imunotestu – miREIA.

Kvantitatívna PCR

Kvantitatívna PCR (qPCR), tiež nazývaná aj real-time PCR (PCR v reálnom čase), ponúka oproti bežnej PCR niekoľko výhod. Je možné detegovať produkt PCR v reálnom čase, a nie je potrebná vizualizácia použitím agarózového gélu (Obr. 2). Tiež je možné určiť špecifickosť prebiehajúcej reakcie.

Počiatkové množstvá sledovanej sekvencie je možné určiť porovnaním vzoriek so štandardnou krivkou známych množstiev DNA. Zvýšená špecifita sa dosahuje použitím špecifických sond nukleových kyselín (NK) a/alebo analýzou krivky topenia. Prítomnosť jedného píku indikuje prítomnosť jediného amplikónu na konci PCR reakcie. Ak je detegovaných viacero píkov, indikuje to prítomnosť viacerých produktov PCR, alebo variáciu sledovanej sekvencie nukleotidov (B e n e s, C a s t o l d i, 2010).

Na realizáciu qPCR sú k dispozícii komerčné súpravy od rôznych výrobcov (napr. Cell-to-CT 1-Step TaqMan Kit, Thermo Fisher; Qiagen OneStep Ahead RT – PCR). Je nutné použitie tzv. housekeeping génov (napr. ľudská glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza; GAPDH, Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) na kontrolu prebiehajúcej reakcie a následné vyhodnotenie exprese sledovaného génu.

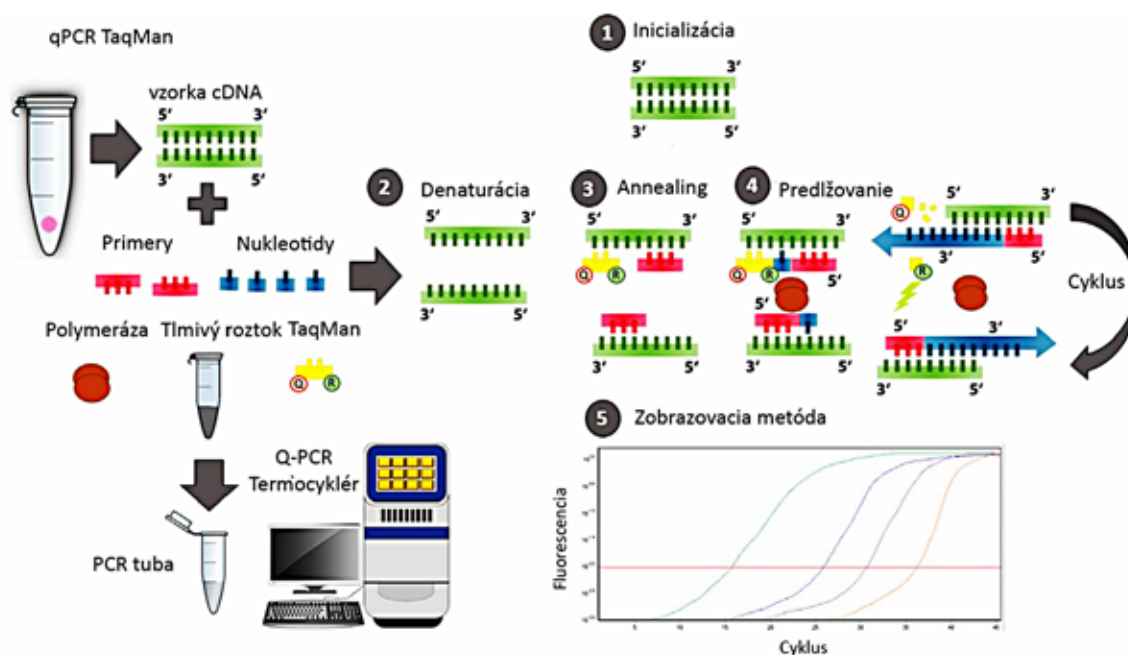
Pokiaľ je cieľovou molekulou určenou na diagnostiku RNA, je nutné pred začatím qPCR uskutočniť prepis molekuly RNA do sekvencie komplementárnej cDNA prostredníctvom enzýmu reverznej transkriptázy. Až molekula cDNA je vhodná na použitie v ďalšej diagnostike qPCR. Na reverznú transkripciu je nutné použitie primerov, ktoré rozpoznávajú sekvenciu RNA reťazca a umožňujú nadviazanie enzýmu reverznej transkriptázy. Je možné využiť tzv. oligo(dT), náhodný primer (random primer) alebo špeci-

fický primer, rozpoznávajúci známu sekvenciu danej RNA (Z e k a, M e s t d a g h, V a n d e s o m p e l e, 2015).

V rámci real-time PCR reakcie sa využívajú sekvencne špecifické, fluorescenčne značené sondy na detekciu vznikajúceho produktu. Tieto sondy môžu byť nukleázo-dependntné alebo môžu fungovať na procese jednoduchej hybridizácie. Sondy štiepené nukleázou zahŕňajú napr. TaqMan, HybProbe (dva oligonukleotidy), sondy viažuce sa na malé žliabky NK (MGB, Minor Groove Binder) a sondy tzv. uzamknutej nukleovej kyseliny (LNA, Locked Nucleic Acid). Tieto sondy sú komplementárne k cieľovej sekvencii nukleových kyselín v rámci amplikónu PCR (D e v e s a - P e i r ó, S á n c h e z - R e y e s, D í a z - G i m e n o, 2020).

Sonda sa napája na vnútornú sekvenciu pri väzbových miestach PCR primerov, a aktivitou Taq polymerázy (5'exonukleázová aktivita) sa štiepi koniec sondy. Štiepenie odstraňuje „zhášací“ faktor a umožňuje excitáciu reportérového farbiva, čo vedie k fluorescenčnému signálu. Technológie cyklických sond (CPT, Cycling Probe Technology) sa líšia od sond typu TaqMan tým, že obsahujú nukleotid RNA. Na vyvolanie fluorescenčného signálu je potrebná RNáza H, ktorá štiepi „zhášací faktor“ (B u h G a š p a r i č a kol., 2010).

V dnešnej dobe sú k dispozícii inovované postupy qPCR, ktoré sa zásadne líšia v použití špecifických dizajnov



Obr. 2. Schéma qPCR
upravené podľa (Devesa-Peiró, Sánchez-Reyes, Díaz-Gimeno, 2020)

použitých primerov. Jedným z nich je MiRXES miRNA RT-qPCR, kde je využívaný troj-primerový dizajn testu, čím sa zvyšuje jednak senzitivita testu, ale zároveň aj jeho špecificita. Tiež je možná selekcia knižnic miRNA z rôznych organizmov – človek, myš, vírus. Two-tailed RT-qPCR test má taktiež unikátny primer, ktorý je štandardizovaný na detekciu a kvantifikáciu miRNA, s použitím tzv. hemisond. Oba spomenuté testy sú časovo nenáročné (dĺžka trvania cca 2 hod.) ale zároveň vysoko špecifické a nenárodné na realizáciu za potreby malého množstva vzorky (≥ 1 pg) (BioVendor, 2021a, 2021b).

Enzymový imunotest miRNA

Enzymový imunotest miRNA (miREIA, miRNA enzyme immunoassay) je nová metóda kvantifikácie miRNA založená na imunoteste, ktorá zahŕňa hybridizáciu miRNA izolovanej zo vzorky pacienta s komplementárnou biotinylovanou oligonukleotidovou DNA sondou (S t e j s k a l a kol., 2019). Princíp tejto metódy využíva hybridizáciu molekuly DNA a miRNA (K a p p e l a kol., 2015).

Hybridné molekuly DNA/RNA sú zachytávané na povrchu mikrotitračnej doštičky (Obr. 3) prostredníctvom imobilizovanej monoklonálnej protilátky, ktorá je špecifická pre hybrid DNA/miRNA a imobilizuje ich. Pevná fáza tvorená monoklonálnou protilátkou a hybridmi DNA/miRNA sa inkubuje s konjugátom streptavidín-HRP. Následne sa postupuje ako pri štandardnej ELISA metóde (K r e p e l k o v a a kol., 2019).

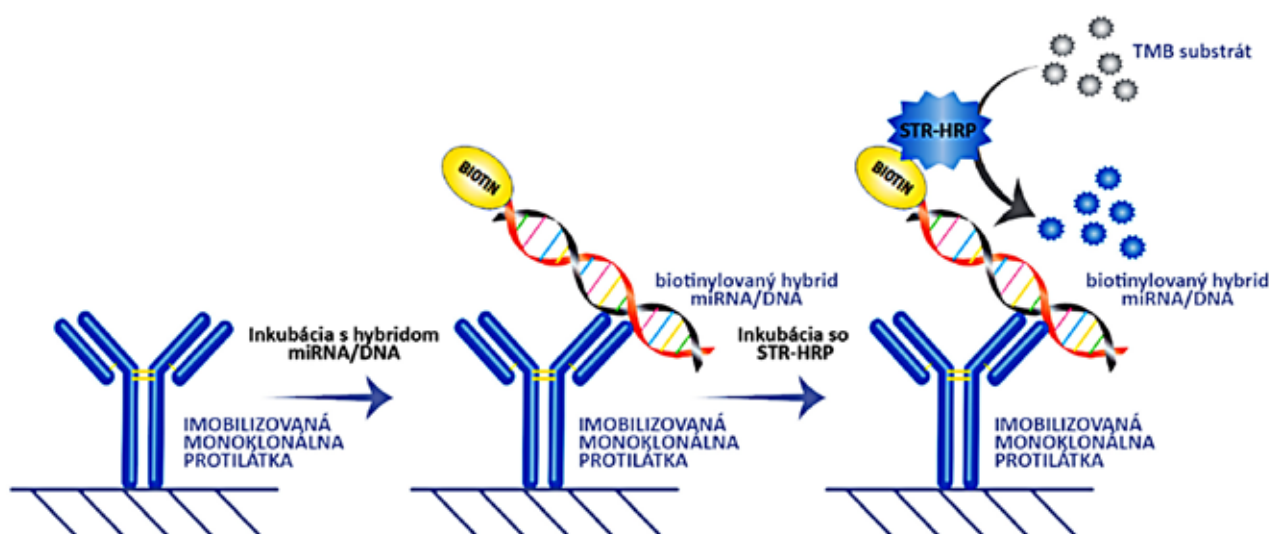
Na vizualizáciu výsledných komplexov sa používa chromogénny substrát. Absorbancia je úmerná koncentrácii

špecifickej miRNA. Meranie nevyžaduje amplifikačné kroky a výsledky je možné stanoviť za menej ako tri hodiny vrátane profilovania miRNA (S t e j s k a l a kol., 2019).

Možno povedať, že výsledky získané použitím komerčných súprav miREIA vykazovali výrazne nižšie variácie medzi jednotlivými analýzami v porovnaní so štandardnou RT-qPCR metódou. Výhodou miREIA metódy je, že kvantifikáciu merania je možné uskutočniť na akomkoľvek zariadení, ktoré „číta“ platne ELISA, a je nenárodné na realizáciu (S t e j s k a l a kol., 2019). Obdobným spôsobom je možné vytvoriť akékoľvek DNA/ncRNA hybridy, ktoré sa následne môžu použiť na kvantifikáciu sledovanej ncRNA (I z a k o v a, 2018).

ZÁVER

Pochopenie príčiny neplodnosti a zlepšenie diagnostického procesu – detekcie miRNA, zodpovedných za dereguláciu fyziologických procesov – môže skvalitniť a najmä skrátiť celkový proces liečby neplodnosti a zvýšiť počet úspešných tehotenstiev. Pokrok v molekulových technológiách ponúka nové možnosti pre charakterizáciu konkrétnych RNA tak vo vzťahu k špecifickým biologickým funkciám, ako aj k dereguláciám pri neplodnosti. Doposiaľ publikované štúdie naznačujú, že molekuly miRNA by mohli byť v budúcnosti využívané ako predikčné biomarkery úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu, respektíve, pripravenosti ženy na transfer embrya do matrice. Aktuálne dostupné mole-



Obr. 3. Schematické znázornenie princípu miREIA testu

kulovo-biochemické metódy spĺňajú požiadavky na rýchlu a vysoko špecifickú diagnostiku týchto nekódujúcich RNA.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla na základe grantovej podpory: VEGA 1/0873/18 a VEGA 1/0620/19. Tieto projekty sú realizované v spolupráci s Gynekologicko-pôrodnickou klinikou UPIŠ LF a UNLP v Košiciach a Centrom pre asistovanú reprodukciu Gynccare v Košiciach.

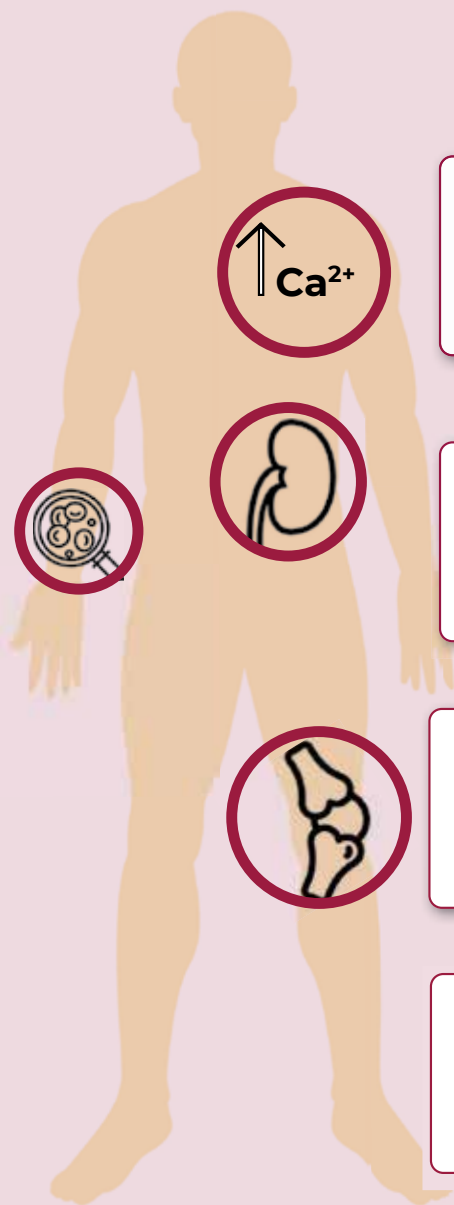
LITERATÚRA

- BioVendor (2021a):** *miRNA-RT-qPCR*. Dostupné na: <https://www.biovendor.com/mirna-rt-qpcr> (Accessed: 7 March 2021).
- BioVendor (2021b):** *Two-Tailed RT-qPCR*. Dostupné na: <https://www.biovendor.com/two-tailed-rt-qpcr> (Accessed: 7 March 2021).
- Buh Gašparič, M. et al. (2010):** Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), pp. 2023–2029. doi: 10.1007/s00216-009-3418-0.
- Butler, A. E. et al. (2020):** Increased MicroRNA Levels in Women With Polycystic Ovarian Syndrome but Without Insulin Resistance: A Pilot Prospective Study. *Frontiers in Endocrinology*, 11. doi: 10.3389/fendo.2020.571357.
- Benes, V., Castoldi, M. (2010):** Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. *Methods*, pp. 244–249. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.026.
- Chen, Y. H. et al. (2013):** miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes*, 62(7), pp. 2278–2286. doi: 10.2337/db12-0963.
- Cho, S. et al. (2015):** Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertility and Sterility*, 103(5), pp. 1252–1260.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.013.
- Dehghan, Z., Mohammadi-Yeganeh, S. and Salehi, M. (2020):** miRNA-155 regulates cumulus cells function, oocyte maturation, and blastocyst formation. *Biology of Reproduction*, 103(3), pp. 548–559. doi: 10.1093/biolre/iaaa098.
- Devesa-Peiró, A., Sánchez-Reyes, J. M. and Díaz-Gimeno, P. (2020):** Molecular biology approaches utilized in preimplantation genetics: real-time PCR, microarrays, next-generation sequencing, karyomapping, and others. in *Human Reproductive Genetics*. Elsevier, pp. 49–67. doi: 10.1016/b978-0-12-816561-4.00004-1.
- Ding, C. F. et al. (2015):** Circulating microRNAs in patients with polycystic ovary syndrome. *Human Fertility*, 18(1), pp. 22–29. doi: 10.3109/14647273.2014.956811.
- Ha, M. and Kim, V. N. (2014):** Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 509–524. doi: 10.1038/nrm3838.
- Hale, B. J. et al. (2015):** Small RNAs: Their possible roles in reproductive failure. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 49–79. doi: 10.1007/978-3-319-18881-2_3.
- Hosseini, A. H. et al. (2017):** Association of miR-146a rs2910164 and miR-222 rs2858060 polymorphisms with the risk of polycystic ovary syndrome in Iranian women: A case-control study. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(5), pp. 652–656. doi: 10.1016/j.tjog.2017.08.014.
- Huang, J. et al. (2020):** Endometrium Gene Expression and Epigenetic Regulation in Reproductive Failure. In *Endometrial Gene Expression*. Springer International Publishing, pp. 103–116. doi: 10.1007/978-3-030-28584-5_7.
- Izakova, J. (2018):** *miREIA—microRNA Enzyme Immunoassay* (Technical note). Available at: https://www.biovendor.com/mireia--microRNA-enzyme-immunoassay-technical-note?utm_source=google&utm_medium=organic (Accessed: 31 January 2021).
- Jia, S. Z. et al. (2013):** Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Human Reproduction*, 28(2), pp. 322–330. doi: 10.1093/humrep/des413.
- Kamalidehghan, B. et al. (2020):** The importance of small non-coding RNAs in human reproduction: A review article. *Application of Clinical Genetics*. Dove Medical Press Ltd., pp. 1–11. doi: 10.2147/TACG.S207491.
- Kappel, A. et al. (2015):** MicroRNA in vitro diagnostics using immunoassay analyzers. *Clinical Chemistry*, 61(4), pp. 600–607. doi: 10.1373/clinchem.2014.232165.
- Klepčová, Z. et al. (2020):** MikroRNA a triple negatívny karcinóm prsníka. *Lekársky Obzor*, 69(4), pp. 134–139.
- Krepelkova, I. et al. (2019):** Evaluation of miRNA detection methods for the analytical characteristics necessary for clinical utilization. *BioTechniques*, 66(6), pp. 277–284. doi: 10.2144/btn-2019-0021.

21. Kurita, T., Terakawa, J. (2020): Endometrial Development and Its Fine Structure. In *Endometrial Gene Expression*. Springer International Publishing, pp. 1–32. doi: 10.1007/978-3-030-28584-5_1.
22. Lam, E. W. F., Shah, K. and Brosens, J. J. (2012): The diversity of sex steroid action: The role of micro-RNAs and FOXO transcription factors in cycling endometrium and cancer. *J. Endocrinol.*, pp. 13–25. doi: 10.1530/JOE-10-0480.
23. MacFarlane, L.-A., R. Murphy, P. (2010): MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), pp. 537–561. doi: 10.2174/138920210793175895.
24. Matsuyama, H. and Suzuki, H. I. (2020): Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms21010132.
25. Mcallister, J. M. et al. (2019): miRNA Profiling Reveals miRNA-130b-3p Mediates DENND1A Variant 2 Expression and Androgen Biosynthesis. *Endocrinology*, 160(8), pp. 1964–1981. doi: 10.1210/en.2019-00013.
26. Murphy, C. R. (2004): Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Research*, pp. 259–267. doi: 10.1038/sj.cr.7290227.
27. Ohlsson Teague, E. M. C., Print, C. G., Hull, M. L. (2009): The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*, pp. 142–165. doi: 10.1093/humupd/dmp034.
28. Öner, Ç. (2019): Two different mechanisms of two different non-coding RNAs—MicroRNAs and PIWI-interacting RNAs: From origin to cancer. In *AGO-Driven Non-Coding RNAs*. Elsevier, pp. 3–34. doi: 10.1016/b978-0-12-815669-8.00001-4.
29. Pan, Q. et al. (2007): The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Molecular Human Reproduction*, 13(11), pp. 797–806. doi: 10.1093/molehr/gam063.
30. Pateisky, P. et al. (2018): hsa-miRNA-154-5p expression in plasma of endometriosis patients is a potential diagnostic marker for the disease. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(4), pp. 449–466. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.007.
31. Petracco, R. et al. (2011): MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(12). doi: 10.1210/jc.2011-1231.
32. Rabajdová, M. et al. (2017): Analysis of transcriptional activities of angiogenic biomarkers during intrauterine complications leading to preterm birth. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(7), pp. 1433–1442.
33. Rekker, K. et al. (2015): Circulating miR-200-family micro-RNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertility and Sterility*, 104(4), pp. 938–946.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.029.
34. Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Simón, C. (2012): The genomics of the human endometrium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Basis of Disease*, 1822(12), pp. 1931–1942. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.05.004.
35. Sathyapalan, T. et al. (2015): Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. *Endocrine Abstracts*. doi: 10.1530/endoabs.38.p354.
36. Sirotkin, A. V. et al. (2009): Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), pp. 415–420. doi: 10.1002/jcp.21689.
37. Song, J., Luo, S., Li, S. W. (2015): miRNA-592 is downregulated and may target LHCGR in polycystic ovary syndrome patients. *Reproductive Biology*, 15(4), pp. 229–237. doi: 10.1016/j.repbio.2015.10.005.
38. Song, Y. et al. (2019): Altered miR-186 and miR-135a contribute to granulosa cell dysfunction by targeting ESR2: A possible role in polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 494, p. 110478. doi: 10.1016/j.mce.2019.110478.
39. Sørensen, A. E. et al. (2014): MicroRNAs related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Genes*. MDPI AG, pp. 684–708. doi: 10.3390/genes5030684.
40. Stejskal, D. et al. (2019): Comparison of a new immunoassay and PCR-based method for quantification of microRNAs in whole blood. A pilot methodical study. *Biomedical Papers*, 163(1), pp. 39–44. doi: 10.5507/bp.2018.080.
41. Tabrizi, Z. P. F. et al. (2020): Plasma Levels of miR-27a, miR-130b, and miR-301a in Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 9(3), pp. 198–206. doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.9.3.198.
42. Wang, Q. et al. (2021): Association of miRNA-145 with the occurrence and prognosis of hydrosalpinx-induced defective endometrial receptivity. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(1), pp. 81–92. doi: 10.17305/bjbms.2020.4538.
43. Zeka, F., Mestdagh, P., Vandesomepele, J. (2015): RT-qPCR-based quantification of small non-coding RNAs. *Methods in Molecular Biology*, 1296, pp. 85–102. doi: 10.1007/978-1-4939-2547-6_9.

Môže to byť myelóm?

V rámci skríningu mnohočetného myelómu je odporúčané vykonať základné laboratórne vyšetrenia, RTG skeletu cieleňé na bolestivú oblasť a elektroforézu sérových proteínov.¹



CRAB kritériá¹:

Včasné varovné príznaky¹:

HyperCalcémia

Hladina Ca v sére o >0,25 mmol/l vyššia ako horná hranica normálnych hodnôt alebo >2,75 mmol

Zvracanie,
nevoľnosť,
zápcha,
zmätenosť,
bolesť kostí
a polyúria

Renálna insuficiencia

Clearance kreatinínu <40 ml/min alebo hladina kreatinínu v sére >177 µmol/l

Zvýšená
hladina
kreatinínu

Anémia

Hb >20 g/l pod dolnou hranicou normálnych hodnôt alebo Hb <100 g/l

Únava
a
dýchavičnosť

Kostné (Bone) ložiská

Nález 1 alebo viac osteolytických ložísk rádiografickými zobrazovacími metódami, CT alebo PET-CT

Bolesť kostí,
nižšia telesná
výška,
patologické
zlomeniny
a miechová
kompresia

Až 50 % pacientov s myelómom je diagnostikovaných kvôli akútnym zdravotným problémom²

¹ Diagnostika a liečba mnohočetného myelómu, TRANSFUZE HEMATOL. DNES 24, SUPLEMENT 1, 2018

² Podľa údajů z registru CMG

Ďalšie číslo odborného recenzovaného časopisu Laboratórna Diagnostika je naplánované na november 2021, v ktorom budú uverejnené príspevky zaslané na adresu odborného redaktora do 15. 09. 2021.