

Ročník XII.

newslab

časopis laboratórnej medicíny



2021

Genomická variabilita vírusu SARS-CoV-2

Genomic variability of virus Sars-CoV-2

Príspevok imunohistochemie k histomorfologickej diagnostike COVID-19 pneumónie

Contribution of immunohistochemistry to histomorphological diagnostics of COVID-19 pneumonia

Detekcia mikrosatelitnej instability v nádoroch asociovaných s Lynchovým syndrómom

Detection of microsatellite instability in Lynch syndrome-associated tumours

Porovnanie analýzy doštičkových glykoproteínov v celej krvi a v plazme bohatej na doštičky

Comparison of platelet glycoprotein analysis in the whole blood and plasma rich in platelets

Expresia Tspan1 v adenokarcinóme prostaty

Tspan1 expression in prostatic adenocarcinoma

PocketChem™ UA

močový analyzátor

- špičková japonská kvalita
- 10 parametrové pružky

arkray



Celercare M5

biochemický analyzátor pre ambulancie

MNCHIP

NOVINKA

Miniatúrne biochemické laboratórium
za skvelú cenu!



- plnoautomatický systém
- 27 biochemických parametrov vrátane minerálov



STANDARD F200

multiparametrový
imunofluorescenčný analyzátor

SD BIOSENSOR

- CRP • FOB kvantita • D-Dimer • Troponin I • NT-proBNP • HbA1c • β -hCG
- TSH-II • Influenza A/B • Borelióza a iné
- COVID-19: • protilátky IgM / IgG (postvákcináčn \acute{e} + po prekonanom ochorení)
- vírusový antigén (výter z nosohltana a z nosa)

overená kvalita spoľahlivosť

LabPad® INR

prístroj na
stanovenie PT/INR

avalun®



- jednoduchá hygienická manipulácia
- patentovaná optická metóda merania
- laboratórna presnosť a správnosť výsledku

www.modernaambulancia.sk

Milí priatelia, milí čitatelia,

stretávame sa po prvom roku pandémie. Po roku, ktorý zmenil naše životy. Veci, činnosti a možnosti ktoré sme ešte pred rokom a pol považovali za samozrejme a bežné, sa zrazu stali nepredstaviteľnými a nedosiahnuteľnými. Mnohí z nás sa stretli s pandemiou zoči-voči a pocítili na vlastnej koži jej silu a následky. Aj keď už v minulosti mnohí odborníci varovali, že infekčné choroby tu sú a je len otázka času, kedy sa väčšia pandémia prejaví v celosvetovom rozsahu, nečakali sme to.

Posledná veľká pandémia, ktorá zasiahla takmer všetkých, sa odohrala pred 100 rokmi. Bolo to obdobie po 1. svetovej vojne, charakteristické návratom veľkého počtu vojakov domov. Boli oslabení, cestovali často v nevyhovujúcich podmienkach, za nedostatočnej hygieny, vo väčších skupinách. Vytvorili sa tak ideálne podmienky na šírenie infekčnej choroby. Bolo to obdobie charakteristické aj tým, že nie všetky informácie sa dostávali dostatočne medzi ľuďmi. Poznatky sa posúvali pomaly. Odvtedy sa veľa vecí zmenilo. Dlhú dobu sme žili v pokoji a spokojnosti. Naučili sme sa nevnímať riziká ani mnohé choroby okolo nás, stali sa takými vzdialenými. Epidémie SARS, MERS alebo eboly sa nás vlastne netýkali. Boli ďaleko. Boli akoby z vedecko-fantastického filmu. Preto sme neboli pripravení na všetky zmeny, ktoré prišli. Možno aj preto ich doteraz mnohí popierajú.

Ten rok a pol pandémie ubehol veľmi rýchlo. Veľa sa toho zmenilo. Kým pred rokom sme o tomto víruse vedeli málo, dosiahli sme nepredstaviteľný pokrok. Vidíme, že máme vedecké schopnosti, odborné a technické kapacity a silu na takéto hrozby reagovať. Je skvelé, že aj u nás máme vedecké tímy, ktoré dokážu držať krok so svetovými kapacitami.

V súčasnosti už vírus nepredstavuje takú neznámu. Poznáme jeho vlastnosti. Dopodrobna bol zmapovaný. A ukázalo sa nepredstaviteľné. Za rok dokázali vedci pripraviť, otestovať a do reálnej klinickej praxe zaviesť vakcíny, ktoré dokážu priebeh choroby zvrátiť. Je úžasné, že za taký krátky čas sme získali do rúk takého mocného pomocníka.

Žijeme v dobe informácií, šíria sa jednoducho a rýchlo. Rovnako rýchlo a možno aj jednoduchšie sa šíria i dezinformácie. Ovpľývajú chápanie ľudí, menia ich myslenie aj správanie. Kým v minulosti boli informácie nedostupné, v súčasnosti sme zavalení ich množstvom. Nie je vôbec jednoduché sa medzi nimi orientovať. Nie je vôbec jednoduché odlíšiť tie, ktoré sú nesprávne, prípadne priamo zavádzajúce. Práca s informáciami sa stáva dôležitou súčasťou nášho života, musíme sa ju naučiť my a musíme ju naučiť aj nové generácie. Prispejeme spoločne k vyvracaniu mýtov a nepráv, hľadáme všetky cesty, ako pomôcť ľuďom orientovať sa v tom, čo sa okolo nich deje. Je to jediná cesta, ako nás všetkých posunúť ďalej.

Práve tu majú svoje nezastupiteľné miesto odborné časopisy. Časopisy, ktorých členovia redakčných rád, ako aj autori odborných prác a ich recenzenti sú zárukou kvality informácií.

Dostali sme do rúk prvé číslo časopisu Newslab v roku 2021. Verím, že v ňom každý nájde to, čo ho zaujíma. Môžete si prečítať zaujímavé informácie o genetickej variabilite vírusu SARS-CoV-2 aj o morfológických zmenách, ktoré vyvoláva. Viaceré články sa venujú novým zaujímavým markerom nádorových chorôb. Ďalšie témy sú orientované na hematologickú a infektologickú problematiku. Som presvedčený, že spracovanie a obsah týchto článkov vás zaujmú.

Prajem poučné čítanie.



MUDr. Pavol Janega, PhD.
riaditeľ **MEDIREX GROUP ACADEMY**

Pôvodné práce

- Porovnanie analýzy doštičkových glykoproteínov v celej krvi a v plazme bohatej na doštičky.** 5
Ingrid Škorňová, Ján Staško, Jiří Šinkora, Peter Kubisz, Ľubica Agricolová, Monika Brunclíková
- Expresia Tspan1 v adenokarcinóme prostaty** 8
Andrea Janegová, Viktória Bothová, Iveta Kopecká
- Príspevok imunohistochemie k histomorfologickej diagnostike COVID-19 pneumónie** 12
Lucia Krivošíková, Samuel Horák, Kristína Mikuš-Kuracinová, Pavol Janega, Michal Palkovič, Pavel Babál

Prehľadové práce

- Genomická variabilita vírusu SARS-CoV-2** 18
Diana Rusňáková, Tomáš Szemes
- Glykány ako potenciálny biomarker pri nádorovej transformácii prostaty (systematický prehľad)** 23
Dávid Kocan, Pavol Janega
- Detekcia mikrosatelitnej instability v nádoroch asociovaných s Lynchovým syndrómom** 27
Jakub Styk, Vanda Repiská, Tomáš Szemes
- Molekulárna diagnostika vrodenej neutropénie** 32
Veronika Medová, Andrea Šoltýsová, Ľudevít Kádaši, Andrej Ficek

Kazuistiky

- Nocardia transvalensis ako pôvodca multilokulárneho abscesu mozgu u imunokompetentného pacienta** 38
Miriam Babel'ová, Adrián Kiss, Dávid Toma, Andrej Šteňo, Juraj Mišovič, Miroslav Böhmer, Tomáš Szemes
- Prostatický karcinóm s aberantnou expresiou p63. Kazuistika** 43
Michal Zámečník, Matúš Chocholatý

Ročník 12, 2021, číslo 1
Vychádza 2x ročne
Dátum vydania: august 2021

Redakčná rada:

Šéfredaktorka:

RNDr. Elena Tibenská, PhD.

Členovia:

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

Vydavateľ:

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Sídlo vydavateľa a adresa redakcie:

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

Výkonné redaktorky:

Mgr. Slavomíra Šindelářová
Mgr. Martina Šoltéssová

Technická redaktorka:

Ing. Danica Paulenová

Grafická úprava:

Natália Hobothová

Všetky články sú plne recenzované.

Registrácia MK SR pod číslom EV 5164/15

ISSN 1338-9661 (tlačené vydanie)

ISSN 2454-0021 (online)

Časopis je indexovaný v Bibliographia medica Slovaca (BMS).

Citácie sú spracované v CiBaMed.

Citacia skratka: Newslab

Na informačné a nekomerčné účely je dovolené články v publikácii newslab voľne a bezplatne sťahovať, kopírovať, distribuovať, tlačiť, prehľadávať a odkazovať na ne. Je však potrebné, ak je to podľa spôsobu použitia možné, uvádzať ich autora a zdroj. Použitie článkov na iné účely a iným spôsobom je možné len so súhlasom vydavateľa.

Vydavateľ nenesie zodpovednosť za údaje a názory autorov jednotlivých článkov či inzerátov.

Porovnanie analýzy doštičkových glykoproteínov v celej krvi a v plazme bohatej na doštičky.

Ingrid Škorňová¹, Ján Staško¹, Jiří Šinkora², Peter Kubisz¹, Ľubica Agricolová¹, Monika Brunclíková¹

¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Univerzitná nemocnica Martin, Slovensko

²Becton Dickinson Czechia, s. r. o., Praha, Česká republika

Na povrchu membrány krvnej doštičky sa nachádza veľké množstvo receptorov, ktoré slúžia na zachytenie signálu, zabezpečujú jeho prenos a podieľajú sa na prestupe látok cez membránu. Pomocou prietokovej cytometrie môžeme merať cirkulujúce neaktivované, ale aj aktivované krvné doštičky. Naším cieľom bolo zistiť, či metóda stanovenia doštičkových glykoproteínov v plazme bohatej na doštičky (platelet rich plasma, PRP), ktorá je považovaná za zlatý štandard analýzy trombocytov, spôsobuje zvýšenie povrchovej expresie antigénu CD62P. V článku uvádzame vlastné skúsenosti získané porovnaním analýzy doštičkových glykoproteínov vo vzorkách celej krvi a v PRP.

Kľúčové slová: doštičkové glykoproteíny, prietoková cytometria

Comparison of platelet glycoprotein analysis in the whole blood and plasma rich in platelets

The membrane of a platelet is rich in receptors mediating signal sensing and transmission and participating in substance transport across the membrane. Flow cytometry can measure the circulation of non-activated as well as activated platelets by qualitative and/or quantitative analysis of surface markers expressed at a certain level during the life cycle of platelets. We aimed to determine whether the method of measurement of the platelet glycoproteins expression in the platelet-rich plasma (PRP) results in altered expression of the CD62P activation antigen on the platelet surface. In this article, we present our own experience. We compare platelet glycoprotein analysis in whole blood and PRP.

Keywords: platelet glycoproteins, flow cytometry

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 5 – 7

Úvod

Krvné doštičky sú bezjadrové úlomky cytoplazmy vznikajúce z megakaryocytov v kostnej dreni. Denná produkcia krvných doštičiek je $1,2 - 1,5 \times 10^{11}$, v periférnej krvi sa nachádzajú v priemernom počte $150 - 400 \times 10^9/l$ a majú objem $6 - 12 \text{ fl}^{(1)}$. V panoptickom krvnom nátere sa zobrazujú doštičky ako oválne alebo okrúhle objekty s priemernou veľkosťou $1,5 - 3 \mu\text{m}$. V ich strede sa nachádzajú červenofialové granuly (granuloméry) obklopené jemne bazofilnou cytoplazmou (hyalomérom), ktorá je ohraničená plazmatickou membránou⁽²⁾.

Na povrchu membrány krvnej doštičky sa nachádza veľké množstvo receptorov, ktoré slúžia na zachytenie signálu, zabezpečujú jeho prenos a podieľajú sa na prestupe látok cez membránu. Popri bežných membránových receptoroch majú na povrchu doštičiek dôležitú úlohu glykoproteíny. Zmeny štruktúry a funkcie glykoproteínov krvných doštičiek môžu spôsobovať poruchy zrážania krvi⁽³⁾. Biologické procesy regulované doštičkami sú tiež sprostredkované membránovými glykoproteínmi (GP), ktoré sa označujú rímskymi číslicami, a ich podskupiny malými arabskými písmenami. V súčasnosti je známych viac ako 50 membránových glykoproteínov, pričom každý glykoproteín po obsadení svojho väzbového miesta zabezpečuje priebeh určitého deja. Na

membráne sa nachádzajú aj receptory slúžiace na naviazanie aktivačných a stimulačných látok koagulácie^(4,5).

P-selektín, GMP-140 (CD62P) je membránový glykoproteín granúl krvných doštičiek, patrí k adhezívnym molekulám. V pokojovom stave sa nachádza v membránach α -granúl a v endoteli vo Weibelových-Paladeho telieskach. Po aktivácii je P-selektín uvoľnený z granúl. Pokojové doštičky exprimujú asi 1 000 molekúl P-selektínu, aktivovaných je viac ako 10 000 molekúl. Exponovaný P-selektín sa zúčastňuje na eliminácii aktivovaných krvných doštičiek z cirkulácie a sprostredkuje adhéziu neutrofilov a monocytov na tromby a endotelové bunky^(6,7).

Prietoková cytometria je proces, ktorý umožňuje kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu optických a fluorescenčných vlastností jednotlivých buniek alebo iných častíc v suspenzii. Prietokový cytometer sa skladá z fluidného, optického a počítačového systému. Výsledkom analýzy je v našom prípade graficky znázornená (ko)expresia povrchovej glykoproteínov v populácii krvných doštičiek a dostupná súhrnná štatistika. S cieľom posúdiť aktiváciu krvných doštičiek môžeme použiť testovanie povrchovej expresie aktivačného znaku CD62P pomocou väzby fluorescenčne značenej monoklonálnej protilátky namierenej proti tomuto antigénu, vizualizovanej prietokovou cytometriou.

Le Minh a kolektív sledovali prvé príznaky aktivácie trombocytov po indukcii ADP a porovnali dve metódy založené na morfológických a biochemických markeroch⁽⁸⁾. Skenovacia elektrónová mikroskopia krvných doštičiek sa uskutočňovala paralelne s prietokovou cytometriou, aby sa kvantifikovala povrchová expresia P-selektínu, aktívneho $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -integrínu a fosfatidylserínu. Na základe získaných výsledkov boli sledované zmeny tvaru najcitlivejšie na nízku koncentráciu ADP v porovnaní s biochemickými markermi v nasledujúcom poradí citlivosti: morfológické zmeny > väzbová kapacita fibrinogénu > expresia P-selektínu > expozícia fosfatidylserínu. Tieto výsledky poukazujú na vyššiu citlivosť krvnej doštičky a výhody využitia prietokovej cytometrie na detekciu povrchovej expzie P-selektínu ako markera aktivácie krvných doštičiek.

Využitie prietokovej cytometrie zamerané na štúdium prokoagulačných krvných doštičiek v pokojových a agonistom stimulovaných podmienkach v celej krvi a premytých krvných doštičiek ľudských a myších vzoriek opisuje vo svojej práci Than a kol.⁽⁹⁾

Výšetrenia glykoproteínov trombocytov majú význam v posudzovaní stavov s trombocytovou hypo- a hyperreaktivitou a pri diferenciálnej diagnostike trombocytopenií. Znížená expresia GPIIb/IIIa, t. j. CD41/CD61, svedčí o Glanzmannovej trombasténii, pri zníženej expresii GPIb/V/IX, t. j. CD42b/CD42a, ide o Bernardov-Soulierov syndróm. V uvedených prípadoch ide o hereditárne trombocytopenie, ale výšetrenie glykoproteínov trombocytov sa odporúča aj pri stavoch s ich hyperreaktivitou (aterosklerotické cievne ochorenia, diabetes mellitus, arteriálne a venózne trombózy, umelé chlopne, chronické zápalové črevné ochorenia, systémové ochorenia) alebo hyporeaktivitou (vrodené defekty receptorov trombocytov, renálne a hepatálne insuficiencie, esenciálne trombocytémie. Väčšinou sa hodnotia zmeny adhezívnych receptorov ako GPIb, t. j. CD42b/CD42a, GPIIb/GPIIIa, t. j. CD41/CD61, a aktivačných markerov GMP 140, t. j. CD62P, GP53, t. j. CD63, trombospondínový receptor CD36⁽¹⁰⁾.

Materiál a metodika

Príprava vzorky

Vzorku krvi na analýzu doštičkových glykoproteínov sme pacientom odobrali do jednorazovej vakutajnerovej skúmavky s antikoagulantom 3,2 % (0,109 mol/l) citrónanom sodným.

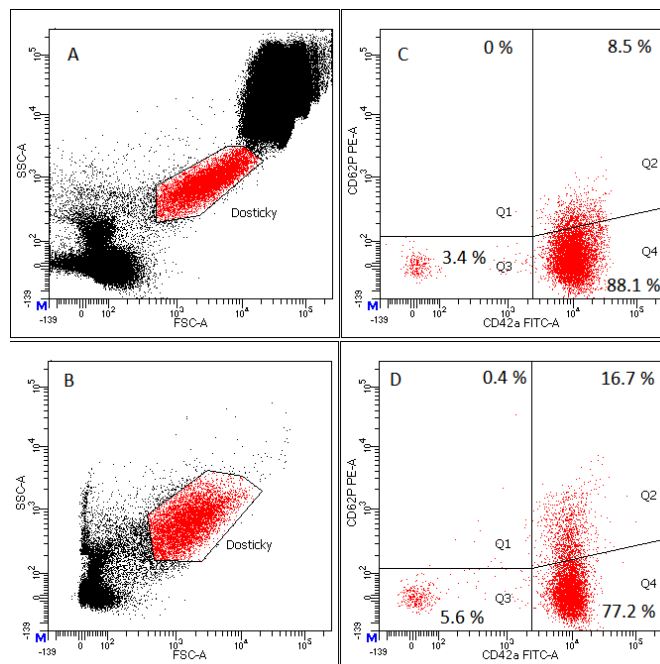
Skúmavku s krvou sme centrifúgovali pri 200 g 10 minút. PRP sme oddelili od krviniek do inej skúmavky.

Metóda

Doštičkové glykoproteíny sme analyzovali na prietokovom cytometri FACSVerse (Becton Dickinson and company, San Jose, USA). Pre povrchovú imunofenotypizáciu sme použili techniku dvojitého priameho značenia fluorinovanými monoklonálnymi protilátkami: anti-CD42a/FITC (clone SZ1, Beckman Coulter, San Diego, USA), anti-CD62P/PE (clone AC1.2, Becton Dickinson).

Naším cieľom bolo zistiť, či metóda stanovenia doštičkových glykoproteínov v PRP, ktorá je považovaná za zlatý štandard, ovplyvňuje expresiu CD62P na doštičkách. Vychádzali sme z predpokladu, že plazmu bohatú na doštičky pripravujeme centrifugáciou celej krvi, čím môžeme spôsobiť čiastoč-

Obrázok 1. Porovnanie koexpresie CD42a a CD62P na krvných elementoch veľkosti doštičiek v celej krvi (A, C) a v PRP (B, D). Bodové diagramy C a D ukazujú (ko)expresiu glykoproteínov CD42a a CD62P na udalostiach z oblasti „doštičky“ v diagramoch A a B.



nú aktiváciu doštičiek. Každému z 50 zdravých darcov krvi bola stanovená expresia CD62P v celej krvi a súčasne v PRP.

Ako pozitívnu kontrolu sme použili aktivované krvné doštičky, ktoré sme aktivovali ADP s finálnou koncentráciou 10 μM (CD42b-FITC/CD62P-PE). Ako negatívnu kontrolu sme použili izotypovú kontrolu IgG1/IgG2 (FITC/PE).

Výsledky

Obrázok 1 ukazuje spôsob analýzy a rozdiel medzi expresiou CD62P na doštičkách charakterizovaných pomocou rozptylových parametrov (FSC a SSC, oblasť „doštičky“) a expresiou antigénu CD42a v celej krvi (A, C) a v PRP (B, D). Čísla v jednotlivých kvadrantoch štatisticky v C a D vyjadrujú percentuálne zastúpenie jednotlivých populácií objektov z oblasti „doštičky“, zastúpenie CD62P – pozitívnych doštičiek bolo určené ako $100\% \times (\%Q2)/(\%Q2 + \%Q4)$. V prípade uvedenom na obrázku č. 1 spôsobila príprava PRP zdvojnásobenie zastúpenia CD42+CD62P+ doštičiek v PRP vzorke (16,7 %) v porovnaní so vzorkou celej krvi (8,5 %).

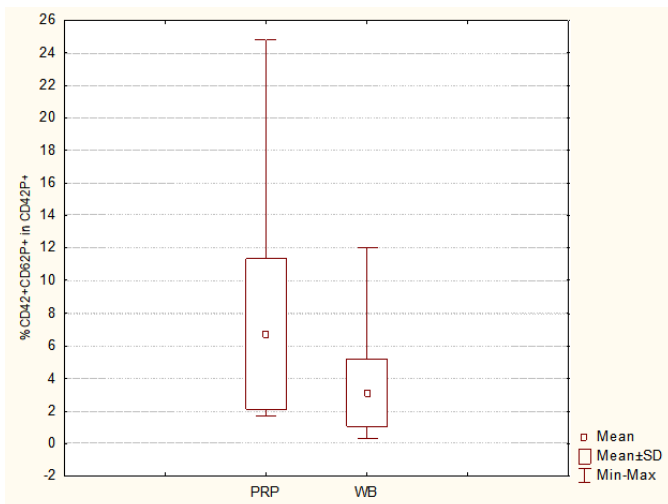
Diskusia

Jedným z cieľov práce bolo porovnať dve metódy analýzy krvných doštičiek, a to stanovenie expzie doštičkových glykoproteínov v celej krvi a v PRP u zdravých darcov (v kontrolnej skupine).

Porovnaním oboch metód na základe stanovenia koexpzie CD42a/CD62P znázornené **na obrázku 1** sme zistili štatistickú významnosť CD42a/CD62P v PRP oproti celej krvi ($P < 0,0005$; **graf 1**).

Na základe získaných štatistických výsledkov sa javí metóda stanovenia doštičkových glykoproteínov v celej krvi praktickejšia a šetrnejšia pre krvné doštičky než metóda stanovenia v PRP. Porovnaním analýz expzie CD42a-FITC/CD62P-PE v celej krvi a v PRP v kontrolnej skupine sme zistili,

Graf 1. Porovnanie koexpresie CD42a/CD62P v PRP a v WB; PRP – plazma bohatá na doštičky, WB (whole blood) – celá krv



	n	d	Sd	Median	min	max
PRP_% CD42+CD62P+ in CD42P+	50	6,7	4,6	5,5	1,7	24,8
WB_% CD42+CD62P+ in CD42P+	50	3,1	2,1	2,5	0,3	12,0

Wilcoxon test	Z	P
PRP vs WB	5,777	0,000

že izolácia PRP vplyva na aktiváciu doštičiek do takej miery, že rozdiel je oproti metóde v celej krvi štatisticky významný s hodnotou $P \ll 0,0005$. Expresia CD62P na doštičkách v PRP je v porovnaní s expresiou CD62P na doštičkách v celej krvi štatisticky významne zvýšená.

Záver

Porovnaním analýz expresie CD42a-FITC/CD62P-PE v celej krvi a v PRP v kontrolnej skupine sme zistili, že izolácia PRP vplyva na aktiváciu doštičiek do takej miery, že rozdiel je oproti metóde v celej krvi štatisticky významný s hodnotou $P \ll 0,0005$. Expresia CD62P na doštičkách v PRP je v porovnaní s expresiou CD62P na doštičkách v celej krvi štatisticky významne zvýšená.

Použitím metódy analýzy doštičkových glykoproteínov v celej krvi sa priblížime podmienkam in vivo a minimalizujeme aktiváciu doštičiek.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená projektami APVV – 16-0020, Vega 1/0168/16, Vega 1/0187/17 a Centra excelentnosti pre perinatologický výskum (CEPV II, ITMS 26220120036) a Centra excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET).

LITERATÚRA

1. Penka M a kol. Hematologie a transfúzní lékařství I. Grada Publishing, a. s., 2011, 33.
2. Sakalová A a kol. Hematológia a transfúziológia, Vydavateľstvo Osveťa, 1995, 102-103.
3. Nosál R, Jančinová V. Krvné doštičky v biológii a medicíne. Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, 1990, 15-16.
4. Evans WH, Graham JM. Membrane structure and function. Oxford, England: Oxford IRL Press, Oxford University Press, 1988, 11-29.
5. Staško J, Bartošová L, Mýtnik M, Kubisz P. Are the platelets activated in sticky platelet syndrome? Thromb Res, 2011, 128: 96-97.
6. Curvers J, de Wildt-Eggen J, Heeremans J, et al. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. Transfusion. 2008 Jul;48(7):1439-46.

7. Vučetić D, Ilić V, Vojvodić D, et al. Flow cytometry analysis of platelet populations: usefulness for monitoring the storage lesion in pooled buffy-coat platelet concentrates. Blood Transfus. 2018 Jan;16(1):83-92.
8. Le Minh G, Peshkova AD, Andrianova IA, et al. Differential sensitivity of various markers of platelet activation with adenosine diphosphate. Bionanoscience. 2019 marec; 9 (1): 53-58. Epub 2018, 10. decembra.
9. Tan CW, Bourcy M, Pasalic L, Chen VM. Flow Cytometry Assessment of Procoagulant Platelets Using a Dithiol-Reactive Probe. Methods Mol Biol. 2019;1967:305-321.
10. Kubisz P a kol. Hematológia a transfúziológia, Grada Publishing, a. s., 2006, 257-260.



Ing. Ingrid Škorňová, PhD.

Národné centrum hemostázy a trombózy
Klinika hematológie a transfúziológie JLF UK a UNM, Martin
Kollárova 2, 036 01 Martin
e-mail: ingrid.skornova@uniba.sk

Expresia Tspan1 v adenokarcinóme prostaty

Andrea Janegová^{1,2}, Viktória Bothová², Michal Harmaňoš³, Marián Cvik³, Iveta Kopecká¹

¹Patologicko-anatomické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trnava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

³Urologická klinika, Fakultná nemocnica, Trnava

Prediktívny odhad agresivity adenokarcinómu prostaty je podkladom pre efektívny terapeutický manažment pacientov. Výskum nových, spoľahlivých a presných biomarkerov je preto stále aktuálny. Tetraspanín 1 (Tspan1) bol identifikovaný ako jeden z génov v prostate asociovaných s tumorom. Práca je zameraná na hodnotenie imunohistochemickej expresie Tspan1 v adenokarcinómoch prostaty (CaP) a vo vzorkách benígnej hyperplázie prostaty (BHP). Všetky vyšetrené vzorky boli pozitívne na Tspan1, BHP však vykazovala slabú, fokálnu a lumenálnu expresiu, kým v CaP bola pozitívna cytoplazmová, nízkej až vysokej miery expresie. Nádory s vysokým Gleasonovým skóre (GS) a lokálne pokročilé nádory vykazovali v porovnaní s nádormi s nižším GS a lokalizovanými nádormi častejšie nižšiu mieru expresie. Zistená spojitosť zníženej expresie Tspan1 s vyšším Gleasonovým skóre a pokročilým štádiom choroby by naznačovala negatívny prognostický potenciál Tspan1 v adenokarcinóme prostaty. **Kľúčové slová:** adenokarcinóm prostaty, biomarkery, Tspan1

Tspan1 expression in prostatic adenocarcinoma

Accurate prognostic stratification of patients with prostatic adenocarcinoma is substantial for effective therapeutic management. Therefore identification of reliable biomarkers of prostate cancer aggressiveness is still an actual topic. Tetraspanin 1 (TSPAN1) was found to be a tumour associated gene in prostate cancer. This study focused on evaluating immunohistochemical Tspan1 expression in samples of prostate adenocarcinoma (CaP) and benign prostatic hyperplasia (BPH). All samples were positive for Tspan1; showed, however, different degree of expression, BHP being only weakly, focally positive with mainly luminal expression and CaP showing cytoplasmic positivity of low to a high degree. The lower degree of Tspan 1 expression was found in CaP cases with higher Gleason score and locally advanced disease. In conclusion, the inverse association of Tspan1 expression with a higher Gleason score and more advanced tumour stage suggest a possible negative prognostic role of this marker in prostate cancer.

Keywords: prostate adenocarcinoma, biomarkers, Tspan1

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 8 – 11

Úvod

Adenokarcinóm prostaty patrí medzi časté nádorové ochorenia, vo väčšine prípadov je však málo agresívny a pomaly rastúci. Prostatický karcinóm sa však môže správať aj agresívne. Spoľahlivé prediktívne a prognostické biomarkery sú nevyhnutné na odlíšenie menej a viac agresívnych karcinómov a na selekciu pacientov, ktorí vyžadujú aktívnu liečbu, od tých, u ktorých je v danom čase dostatočujúca *active surveillance*. Neadekvátna liečba môže viesť k zhoršeniu kvality života pacientov alebo byť priamo fatálna. V súčasnosti dostupné prognostické biomarkery ako sérová hladina PSA, štádium choroby a Gleasonovo skóre slúžia síce na stratifikáciu pacientov do rizikových skupín, nie sú však dostatočne presné. Hľadanie biomarkerov karcinómu prostaty, ktoré by vedeli spoľahlivo „predpovedať“ agresivitu nádoru, je teda stále aktuálne.

Na identifikáciu potenciálnych biomarkerov v poslednom čase výraznou mierou prispievajú nové metódy molekulovej genetiky. Kristiansen a spol.⁽¹⁾ identifikovali pri porovnaní profilov benígneho tkaniva prostaty s karcinómom odlišných 98 génov, ktoré by mohli zohrávať úlohu v adenokarcinóme prostaty. Gény z tohto zoznamu podnecujú v súčasnosti výskum biomarkerov rakoviny prostaty.

Medzi identifikované gény patrí aj gén pre tetraspanín 1 (Tspan1), člen rodiny tetraspanínov. Superrodinu tetraspanínov tvorí 33 transmembránových glykoproteínov, ktoré sú schopné vytvárať komplexy, membránové mikrodomény obohatené o tetraspaníny (TEMs) s inými tetraspanínmi alebo s inými transmembránovými a cytoplazmovými proteínmi. Táto sieť tetraspanínov môže ovplyvniť prenos signálu do bunky a zohráva úlohu v širokej škále biologických procesov zahŕňujúcich proliferáciu buniek, bunkovú adhéziu, migráciu a motilitu buniek^(2,3).

Zvýšená expresia tetraspanínov bola preukázaná v rôznych malígnych nádoroch zahŕňujúcich karcinómy krčka maternice, endometria, prsníka, pľúc, hrubého čreva, pankreasu a iné⁽³⁻⁸⁾. Úloha tetraspanínov v karcinogenéze sa zdá mnohotvárna. Štúdie preukázali, že v malígnych nádoroch sú tetraspaníny zapojené do procesu proliferácie, migrácie a invázie nádorových buniek a môžu mať pri tom podpornú alebo supresívnu úlohu⁽³⁾.

Štúdie naznačujú aj možnú úlohu tetraspanínov v adenokarcinóme prostaty. Munkley et al.⁽⁹⁾ preukázali, upreguláciu génu Tspan1 v nádorovom tkanive prostaty v porovnaní s nenádorovým a jeho spojitosť s migráciou nádorových buniek, a to pod kontrolou androgénov.

Tabuľka 1. Expresia Tspan1 v adenokarcinómoch prostaty podľa klinickopatologických charakteristík (Gleasonovo skóre, WHO/ISUP Grade Group, pT). n – počet adenokarcinómov prostaty, + – nízka miera expresie, ++ – stredná miera expresie, +++ – vysoká miera expresie

	n	Tspan1		
		+	++	+++
pT				
pT2a	2	0	2	0
pT2c	8	3	3	2
pT3a	3	0	3	0
pT3b	8	4	3	1
WHO/ISUP grade				
1	3	1	2	0
2	9	3	6	0
3	1	0	0	1
4	4	0	2	2
5	4	3	1	0
Gleason score				
6	3	1	2	0
7	10	3	6	1
8	4	0	2	2
9	4	3	1	0

Cieľom tejto práce bolo hodnotenie imunohistochemickej expresie proteínu Tspan1 v bioptických vzorkách adenokarcinómov prostaty, porovnanie s nenádorovým tkanivom prostaty aj porovnanie expresie vzhľadom na prognostické ukazovatele ako Gleasonovo skóre a štádium choroby.

Materiál a metodika

Súbor pacientov

Súbor pacientov tvorilo spolu 21 mužov vo veku od 55 do 74 rokov, u ktorých bola vykonaná radikálna prostatektómia na Urologickej klinike Fakultnej nemocnice Trnava pre biopticky potvrdený adenokarcinóm prostaty. Kontrolnú skupinu tvorilo 5 pacientov po TUR-P s klinickým a bioptickým nálezom benígnej hyperplázie prostaty. Klinickopatologické charakteristiky adenokarcinómov prostaty sú uvedené v tabuľke 1.

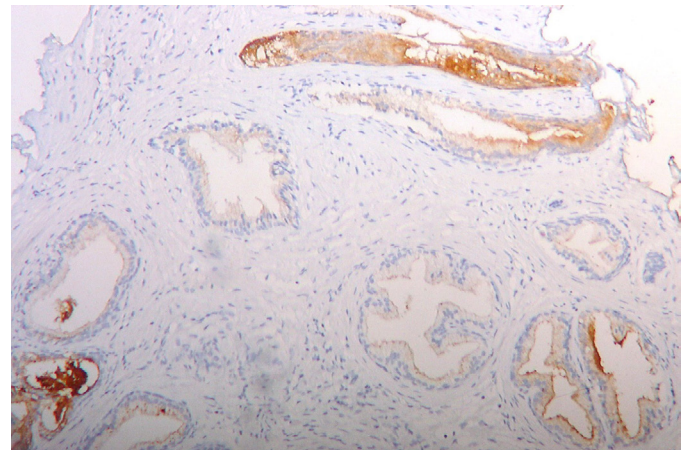
Tkanivové microarray (TMA) bločky

Na imunohistochemické vyšetrenie boli použité tkanivové microarray pripravené z FFPE vzoriek prostat. Od každého pacienta boli analyzované dve vzorky karcinómu z rôznych miest tkaniva prostaty, aby sa podchytila heterogenita nádoru. TMA vzorky s priemerom 3 mm boli odobrané punkčným skalpelom Harris Uni-Core (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Na imunohistochemické farbenie sa z microarray bločkov narezali 4-5 µm rezy tkaniva.

Imunohistochemické farbenie

Po deparafinizácii a revitalizácii s použitím Dako PT Link (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) s roztokom EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, pH 9 (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) boli preparáty v imunostaineri (Autostainer Link 48, Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) inkubované s primárnou protilátkou (Tspan1, klon ab254730, Abcam, Cambridge, UK, polyklonálna králičia, riedenie 1 : 500) počas 60

Obrázok 1. Expresia Tspan1 vo vzorke benígnej hyperplázie prostaty. Žliazky vykazujú fokálnu luminálnu expresiu (hnedá farba), DAB, 100x.



minút, následne so sekundárnou protilátkou a nakoniec farbené diaminobenzidínom DAB+ (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) a dofarbené H & E.

Ako negatívnu kontrolu sme použili rezy inkubované s riediacim roztokom bez primárnej protilátky. Ako pozitívnu kontrolu sme použili vzorky tkaniva obličky a hrubého čreva.

Hodnotenie imunohistochemického farbenia

Ako pozitívnu sme hodnotili cytoplazmovú expresiu Tspan1, pričom sme stanovili histoskóre na základe percenta pozitívnych buniek (0 = 0 % pozitívnych buniek, 1 = < 10 % pozitívnych buniek, 2 = 10 – 50 % pozitívnych buniek, 3 = > 50 % pozitívnych buniek) a intenzity farbenia (0 = negatívne, 1 = slabá pozitivita, 2 = stredne silná pozitivita, 3 = silná pozitivita) podľa Xu et al. (10). Podľa výsledného histoskóre boli vzorky zaradené do kategórie s nízkou (+, histoskóre ≤ 2), so strednou (++, histoskóre 3-5) alebo s vysokou (+++, histoskóre ≥ 6) mierou expresie Tspan1.

Výsledky

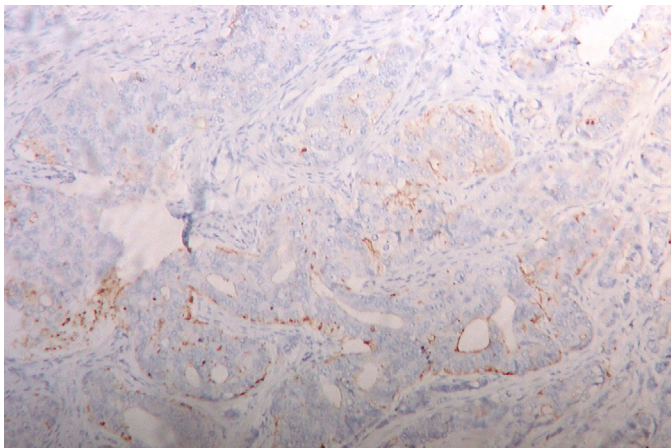
Všetky vyšetrené vzorky boli pozitívne na proteín Tspan1 s rôznou mierou expresie. Prípady benígnej hyperplázie prostaty vykazovali slabú expresiu Tspan1 (obrázok 1), pričom expresia bola prevažne luminálna a len fokálne cytoplazmová.

V adenokarcinómoch prostaty bola pozitivita Tspan1 prevažne cytoplazmová, niekedy s pridruženou luminálnou expresiou a/alebo intraluminálnou pozitivitou sekrétu. Adenokarcinómy prostaty vykazovali rôznu mieru expresie Tspan1, od nízkej (+) v 33,3 % prípadov (obrázok 2) cez strednú (++) v 52,4 % prípadov až po vysokú (+++) v 14,3 % prípadov (obrázok 3).

Vzhľadom na diferencovanosť nádorov vykazovali adenokarcinómy s nižším Gleasonovým skóre (GS 6-7) prevažne strednú mieru expresie (++) , nádory s Gleasonovým skóre 8 strednú až vysokú mieru expresie (+++) a málo diferencované nádory s Gleasonovým skóre 9 prevažne nízku mieru expresie (+) Tspan1. Podobný trend expresie vykazovali adenokarcinómy vzhľadom na WHO/ISUP grade.

Vzhľadom na patologické štádium choroby (pT) vykazovali lokálne pokročilé adenokarcinómy prostaty (pT3b) častejšie

Obrázok 2. Nízka miera expresie Tspan1 (+) vo vzorke adenokarcinómu prostaty (hnedá farba), DAB, 200x.



nízku mieru expresie Tspan1 v porovnaní s nádormi lokalizovanými na tkanivo prostaty (pT2).

Sumár imunohistochemickej expresie Tspan1 v adenokarcinómoch prostaty je uvedený **v tabuľke 1**.

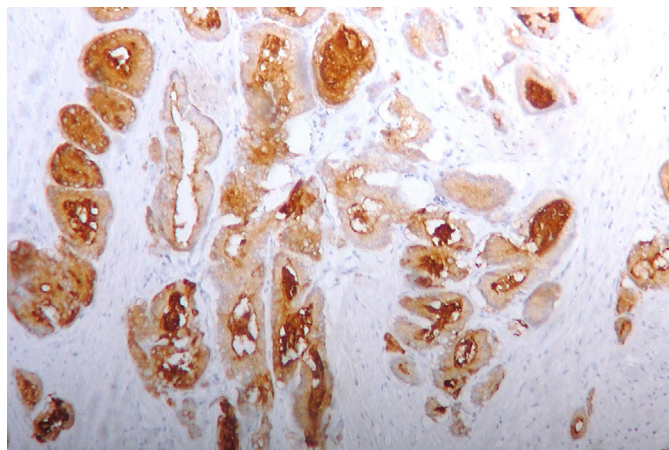
Diskusia

Adenokarcinóm prostaty je časté nádorové ochorenie. Väčšina prípadov je málo agresívnych, pomaly rastúcich. V časti prípadov sa však adenokarcinóm prostaty správa agresívne. V súčasnosti dostupné biomarkery nie sú dostatočne presné na selekciu pacientov, čo môže viesť k podliečeniu agresívnych karcinómov alebo nadliečeniu neagresívnych nádorov, a tak má nemalý vplyv na kvalitu života pacienta. Snaha nájsť čo najpresnejšie a najspoľahlivejšie prediktívne a prognostické biomarkery adenokarcinómu prostaty stále podnecuje nový výskum. Metódy molekulovej genetiky umožňujú identifikovať gény asociované s tumorom. V adenokarcinóme prostaty medzi tieto gény patrí aj Tspan1, kódujúci transmembránový proteín Tspan1, člen rodiny tetraspanínov.

Tetraspaníny zohrávajú úlohu v širokej škále biologických procesov zahrňujúcich predovšetkým proces migrácie a motility, a to v bunkách normálnych, ale aj malígne transformovaných. Migrácia buniek je základným procesom invázie a metastatickej progresie rakoviny. Zmeny expresie tetraspanínov boli opísané v rôznych karcinómoch vrátane adenokarcinómu prostaty^(3,9).

Imunohistochemickú expresiu Tspan1 sme hodnotili v bioptických vzorkách acinárnych adenokarcinómov a benígnej hyperplázie prostaty. Všetky vyšetrené vzorky boli pozitívne na proteín Tspan1, vykazovali však rôznu mieru expresie. Tspan1 exprimujú aj benígne tkanivá, ale zdanlivo v menšej miere, respektíve v nižšej intenzite^(8,10), čo preukazujú aj naše výsledky. Prípady benígnej hyperplázie prostaty vykazovali slabú (+) expresiu Tspan1, ktorá bola fokálna a prevažne lumenálna, kým v karcinómoch bola expresia prevažne cytoplazmová s pridruženou lumenálnou expresiou a/alebo intralumenálnou pozitivitou sekrétu. Podobnú kompartmentáciu Tspan1 pozitivitu opisuje vo svojej štúdii Stinnesbeck et al.⁽¹¹⁾.

Obrázok 3. Vysoká miera expresie Tspan1 (+++) vo vzorke adenokarcinómu prostaty (hnedá farba), DAB, 100x.



Adenokarcinómy prostaty vykazovali rôznu mieru expresie Tspan1, od nízkej (+) až po vysokú (+++), pričom vo vyše polovici prípadov (52,4 %) sme zaznamenali expresiu strednej miery (++). Overexpresiu génu Tspan1 (na úrovni mRNA) v nádorovom tkanive v porovnaní s benígnym tkanivom prostaty potvrdil Stinnesbeck et al.⁽¹¹⁾. Pri imunohistochemickej analýze na úrovni proteínovej expresie však zistili, že časť adenokarcinómov (35 %) vykazuje porovnateľne nízku expresiu ako benígne tkanivo prostaty. V našom súbore sme nízku mieru expresie Tspan1 zaznamenali v 33,3 % prípadov (n = 7) adenokarcinómov. Táto nízka miera expresie Tspan1 v časti adenokarcinómov teda limituje jeho využitie ako diagnostického markera, i keď sme pozorovali odlišnú lokalizáciu pozitivitu v benígnom tkanive (prevažne lumenálna) v porovnaní s malígnym (prevažne cytoplazmová).

Na posúdenie prognostického potenciálu Tspan1 sme korelovali mieru expresie tohto proteínu so známymi prognostickými ukazovateľmi, predovšetkým s Gleasonovým skóre a so štádiom choroby (pT). Kým adenokarcinómy s nižším Gleasonovým skóre (GS 6-7) vykazovali prevažne strednú mieru (++) expresie Tspan1, nádory s Gleasonovým skóre 8 častejšie vysokú mieru (+++) expresie a málo diferencované nádory s Gleasonovým skóre 9 prevažne nízku mieru (+) expresie Tspan1. Signifikantnú inverznú koreláciu medzi nádorovým grade a imunohistochemickou expresiou Tspan1 zaznamenal aj Stinnesbeck et al.⁽¹¹⁾.

Vzhľadom na patologické štádium choroby (pT) vykazovali lokálne pokročilé adenokarcinómy prostaty (pT3b) častejšie nízku mieru expresie Tspan1 v porovnaní s nádormi lokalizovanými na tkanivo prostaty (pT2). Zníženie expresie Tspan1 v pokročilých nádoroch zaznamenal aj Xu et al.⁽¹⁰⁾ spolu so signifikantnou koreláciou tejto zníženej expresie so včasnou biochemickou recidívou choroby. Spojitosť zníženej géovej expresie Tspan1 s pokročilým štádiom choroby preukázali aj Munkley et al.⁽⁹⁾, ktorí pri porovnávaní expresie Tspan1 v primárnom adenokarcinóme prostaty s metastázou pozorovali výrazný pokles expresie v nádorových bunkách metastázy.

Zistená spojitosť zníženej expresie Tspan1 s vyšším Gleasonovým skóre a lokálne pokročilou chorobou by naznačo-

vala negatívny prognostický potenciál Tspan1 v adenokarcinóme prostaty, prispieva tak k poznatkom o biomarkeroch karcinómu prostaty a predstavuje podnet na nadväzujúce výskumy.

PodĎakovanie

Článok vznikol s podporou projektu VEGA 1/0684/21 „Prognostický význam zmien inervácie pri hyperplázii a neoplázii prostaty“.

LITERATÚRA

1. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, et al. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol.* 2005; 205: 359–76.
2. Jiang X, Zhang J, Huang Y. Tetraspanins in cell migration. *Cell adhesion & migration.* 2015; 9: 406–415.
3. Hölters S, Anacker J, Jansen L, et al. Tetraspanin 1 promotes invasiveness of cervical cancer cells. *Int J Oncol* 2013; 43: 503-512.
4. Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N, et al: Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 4109–4114.
5. Voss MA, Gordon N, Maloney S, et al: Tetraspanin CD151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104: 1611–1618.
6. Miyake M, Nakano K, Itoi S, et al. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 1244–1249.
7. Chen L, Zhu Y, Zhang X, et al. TSPAN1 protein expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 2270–2276.
8. Hou, FQ, et al. Tetraspanin 1 is involved in survival, proliferation and carcinogenesis of pancreatic cancer. *Oncology reports.* 2015; 34: 3068-3076.
9. Munkley J, McClurg UL, Livermore KE, et al. The cancer-associated cell migration protein TSPAN1 is under control of androgens and its up-regulation increases prostate cancer cell migration. *Sci Rep* 2017; 7: 5249.
10. Xu F, Gao Y, Wang Y, et al. Decreased TSPAN1 promotes prostate cancer progression and is a marker for early biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Oncotarget.* 2016; 7(39): 63294-63305.
11. Stinnesbeck M, Kristiansen A, Ellinger J, et al. Prognostic role of TSPAN1, KIAA1324 and ESRP1 in prostate cancer. *APMIS.* 2021; 129(4): 204-212.



MUDr. Andrea Janegová, PhD.

Ústav patologickej anatómie
Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4, 81108, Bratislava
e-mail: andi.janegova@gmail.com

Príspevok imunohistochemie k histomorfologickej diagnostike COVID-19 pneumónie

Lucia Krivošíková, Samuel Horák, Kristína Mikuš-Kuracinová, Pavol Janega, Michal Palkovič, Pavel Babál

Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

V priebehu pandémie COVID-19 vznikla potreba rýchlo a spoľahlivo objasniť patogenézu ochorenia. Nenahraditeľnú úlohu v tomto procese majú pitevné nálezy. Dostupné práce sa vzhľadom na klinickú manifestáciu zameriavajú hlavne na zmeny na pľúcach, menej v iných orgánoch. Najčastejším nálezom sú rôzne štádiá difúzneho alveolárneho poškodenia, reaktívne i reparatívne zmeny a nezvyčajne frekventované nálezy spojené s poruchou koagulácie. Morfologické zmeny sú, ako pri mnohých iných vírusových pneumóniách, nedostatočne špecifické. Na potvrdenie pôvodcu zmien je potrebné použiť špeciálne metódy. V rutinej praxi je najdostupnejšou metódou imunohistochemia. V prípade ochorenia COVID-19 jej využitie limituje najmä dĺžka trvania ochorenia, výkon pitvy viac ako 30 hodín po smrti a dostupnosť protilátok s dostatočne vysokou špecificitou a senzitivitou.

Kľúčové slová: COVID-19, vírusová pneumónia, pitva, imunohistochemia

Contribution of immunohistochemistry to histomorphological diagnostics of COVID-19 pneumonia

During the COVID-19 pandemic, a need to quickly and reliably elucidate the pathogenesis of the disease emerged. Autopsy findings play an irreplaceable role in this process. Considering the clinical manifestation, current articles focus mainly on changes in the lungs, less in the other organs. The most common findings include various stages of diffuse alveolar damage, reactive and reparatory changes, and unusually frequent findings associated with coagulation impairment. As in many other types of viral pneumonia, the morphological changes are not specific enough. Special methods must be used to confirm the pathogen. Immunohistochemistry is the most available method in routine practice. In COVID-19, its use is limited particularly by the duration of the disease, the time over 30 hours from death to the autopsy, and the availability of antibodies with sufficient specificity and sensitivity.

Keywords: COVID-19, viral pneumonia, autopsy, immunohistochemistry

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 12 – 16

Úvod

Ochorenie COVID-19 sa začalo šíriť koncom roka 2019 z čínskeho mesta Wu-chan v provincii Chu-pej. Ku koncu marca 2021 bolo celosvetovo zaznamenaných viac ako 132 miliónov potvrdených prípadov nákazy, pričom na ochorenie COVID-19 zomreli viac ako 3 milióny ľudí⁽¹⁾. Prejavy ochorenia varujú od asymptomatických prípadov cez pacientov s typickými chrípkovými príznakmi až po vážne prípady zápalu pľúc, neraz s tragickým koncom. Priebeh ochorenia nemožno spoľahlivo predvídať, ale medzi fatálnymi prípadmi dominujú pacienti s vyšším vekom, mužského pohlavia a s komorbiditami ako arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus, obezita, chronické ochorenie pľúc, srdca a iných orgánov, nádorové ochorenie a klinicky významná imunodeficiencia⁽²⁾.

Pre správny terapeutický prístup pri vážnych prípadoch je nevyhnutné poznať patogenézu ochorenia. Klinické údaje dopĺňa, upresňuje aj objasňuje patologickoanatomický nález. Jeho nenahraditeľná úloha sa už potvrdila aj pri iných infekčných ochoreniach v minulosti⁽⁹⁾. V prípade COVID-19 najzávažnejšie dôsledky vyplývajú z poškodenia pľúcneho parenchýmu s rozvojom intersticiálneho, vírusového zápalu pľúc. Skoré i neskoré zmeny majú typický makroskopický aj mikroskopický obraz.

Patologickoanatomický nález pri COVID-19 pneumónii

Makroskopický nález

Makroskopicky sú pľúca vo všeobecnosti ťažké a edematózne, s nálezom difúznej alebo ložiskovej konsolidácie^(3,10). V prípade COVID-19 je častý nález ložísk krvácania a infarktov parenchýmu, nezriedka s nálezom trombózy prívodných ciev⁽¹¹⁾. To sa prejaví tmavofialovým sfarbením na pozadí sivočerveného elastického zápalovo postihnutého tkaniva (**obrázok 1**). Nález pleurálneho výpotku nie je pre COVID-19 typický⁽¹¹⁾.

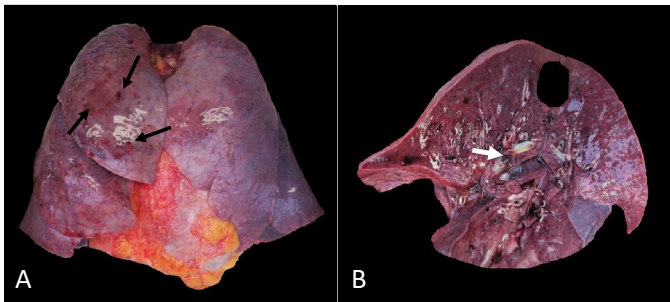
Tracheobronchitída sa vyskytuje u 88 % pacientov s letálnym priebehom COVID-19 nezávisle od intubácie a superinfekcie. Makroskopickým korelátom sú drobné sivobelavé aftózne ulcerácie s priemerom 2-3 mm, v niektorých prípadoch iba fokálne⁽¹⁰⁾.

Nezvyčajne častým nálezom je masívna pľúcna embolizácia z hlbokých žíl dolných končatín, ale aj čerstvá žilová trombóza v tejto oblasti bez embolizácie do pľúc^(3,5).

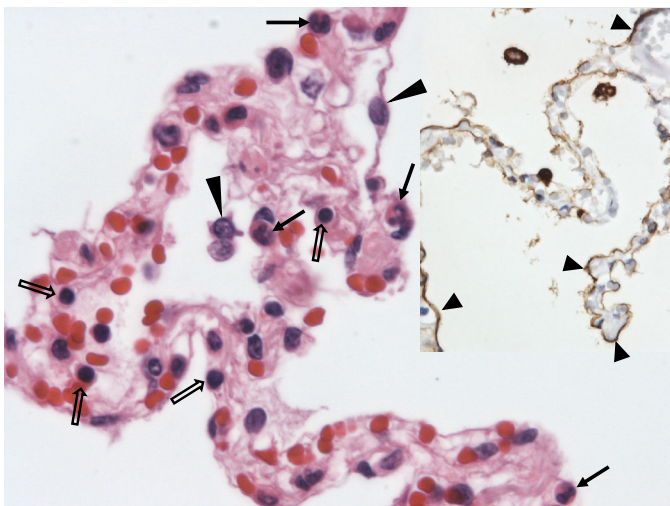
Mikroskopický nález

Mikroskopicky sa vírusové pneumónie prejavujú rôznymi morfológickými zmenami, obvykle ako difúzne alveolárne

Obrázok 1. Makroskopický obraz COVID-19 pneumónie. Pohľad na ventrálnu plochu pľúc a srdca uloženého v epikarde (A). Pľúca sú ťažké, edematózne presiaknuté, tuhoelastickej konzistencie. Subpleurálne sú viditeľné ložiská krvácania (šípky). Na reze (B) sú pľúca nevzdušné, konsolidované, sivočervenej farby. Zachytená trombembolizácia do vetvy arteria pulmonalis (biela šípka).



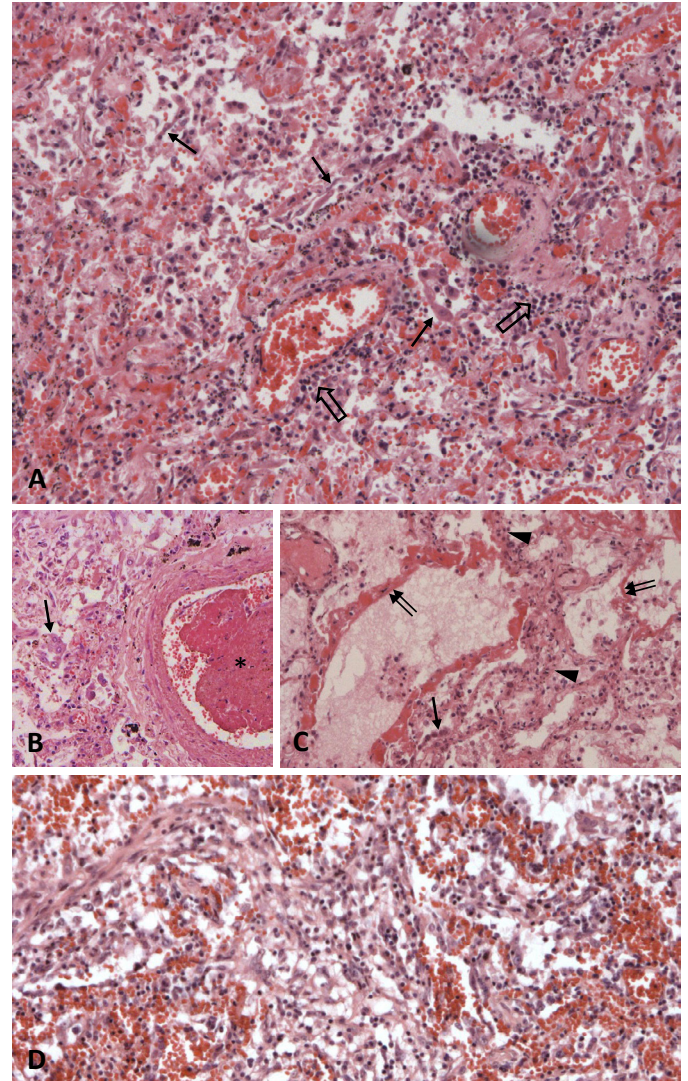
Obrázok 2. Včasné štádium rozvoja pneumónie vyvolanej SARS-CoV-2 s obrazom alveolárnej kapilaritídy. Alveolárne epitéliu sa môžu odlupovať (dlhý hrot šípky), imunohistochemicky s dôkazom SARS-CoV-2 nukleokapsidového proteínu (krátky hrot šípky), v alveolárnych septách je infiltrácia neutrofilmi (šípka) a lymfocytmi (dutá šípka). Hematoxylín a eozín (HE), 600x; výsek: BSB-134, imunoperoxidáza, diaminobenzidín, 400x



poškodenie (DAD, diffuse alveolar damage). Ide o najčastejší histologický korelát klinickej diagnózy syndrómu akútnej respiračnej tiesne (ARDS, acute respiratory distress syndrome). Tak ako klinicky, aj mikroskopicky ide o nešpecifický obraz, ktorý môže byť spôsobený napríklad aj toxickými vplyvmi, baktériami alebo hubami^(6,11). Na vírusový pôvod DAD poukazuje nález cytopatického efektu vírusov, a to najmä intranukleárných, intracytoplazmových inklúzií a mnohojadrových buniek. Tieto sú pri niektorých vírusových pneumóniách vyvolaných pôvodcami ako cytomegalovírus alebo respiračný syncytiálny vírus veľmi výrazné, ale pri mnohých iných, ako napríklad chrípka alebo SARS, ich nenachádzame⁽⁶⁾. Inými typickými nálezmi sú akútna bronchitída, organizujúca sa pneumónia a difúzna intersticiálna pneumónia⁽⁶⁾.

V prípade COVID-19 sú typickým nálezom najmä znaky exsudatívnej a proliferatívnej fázy DAD v rôznom štádiu s poškodením bronchiálneho epitelu, často s progresiou do fibrózy⁽³⁾. Rozvoju DAD v skorých štádiách predchádza nález akútnej alveolárnej kapilaritídy sprevádzanej zmiešanou zápalovou infiltráciou alveolárnych priehradiek lymfocytmi

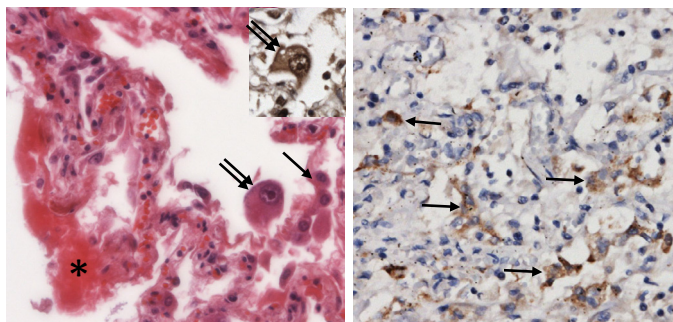
Obrázok 3. Rozvinutý histologický obraz COVID-19 pneumónie (A) s intersticiálnou lymfocytovou infiltráciou s maximom v okolí ciev (otvorená šípka), s reaktívnou hyperpláziou alveolárneho epitelu (šípka) a hromadením odlúpnutých epitelíí a makrofágov v alveolárnom priestore; trombóza (B) v malej artérii (*); difúzne alveolárne poškodenie (C) s alveolárnou kapilaritídou (hrot šípky) a tvorbou hyalínových membrán (dvojitá šípka); počínajúca organizácia (D) a rozsiahle krvácania do tkaniva. HE, 100x



a neutrofilmi (obrázky 2, 3C)⁽¹¹⁾, a to aj bez nápadnejšieho poškodenia mimopľúcnych ciev⁽¹⁰⁾. Histomorfologická diagnostika COVID-19 pneumónie v iniciálnom štádiu vývoja je ťažká a v prípade, že pitva bola vykonaná do 30 hodín po smrti, imunohistochemická detekcia SARS-CoV-2 vírusovej infekcie môže byť kľúčová pre stanovenie správneho diagnostického záveru (obrázok 2).

Nálezy typické pre exsudatívnu fázu DAD, opísané pri ochorení COVID-19, zahŕňajú kongesciu malých ciev, zhrubnutie alveolárnych sept, intraalveolárny edém^(3,8,10), pričom osobitne opísaný je proteínový exsudát v alveolárnych priestoroch s ojedinelými veľkými proteínovými globulami a intraalveolárny fibrín⁽⁵⁾. Typické je formovanie hyalínových membrán, perivaskulárna zápalová infiltrácia lymfocytmi a plazmatickými bunkami a ložiská intraalveolárneho krvácania^(3,8,10) (obrázok 3). Charakteristickým nálezom je aj deskvamácia epitelu a aktivované pneumocyty II. typu s výrazne

Obrázok 4. COVID-19 pneumónia s imunohistochemickým dôkazom nukleokapsidového proteínu SARS-CoV-2 v alveolárnych epitelových bunkách (šípka); zriedkavý nález epitelovej bunky s vírusovými cytopatickými znakmi (zdvojená šípka); rozvoj hyalínovej membrány (*). HE, 200x; BSB-134, imunoperoxidáza, diaminobenzidín, 100x



zväčšeným jadrom a prominentným jadriekom a ojedinelé mnohojadrové syncyciálne bunky vznikajúce ich fúziou^(5,8,10) (obrázky 3A, 4). Niektorí autori opísali nález intracytoplazmových inklúzií, ich vírusový pôvod však nebol jednoznačne potvrdený^(8,10). Nukleárne inklúzie opísané neboli⁽¹⁰⁾, zriedkavo však možno nájsť veľké epitelové bunky s nápadne veľkým jadriekom, čo by mohlo byť výsledkom vírusového cytopatického účinku vzhľadom na imunohistochemicky potvrdenú prítomnosť SARS-CoV-2 vírusovej infekcie v takýchto bunkách (obrázok 4).

Častým nálezom sú fibrínové mikrotromby v pľúcnych kapilárach aj vo väčších cievach⁽¹⁰⁾ (obrázok 3B). Mikrotromby nie sú raritou ani pri iných vírusových pneumóniách, ako to bolo napríklad pri SARS, omnoho zriedkavejšie pri chrípke^(11,14). V prípade COVID-19 je ich výskyt je prekvapivo častý aj u pacientov, ktorí dostávali antikoagulačnú terapiu⁽¹⁴⁾. Endotelové bunky sú často napučané až s tvorbou vakuol a so zdvojením bazálnej membrány. V niektorých prípadoch nachádzame kapilárne poškodenie s nekrozou kapilár, proliferáciou kapilár a zápalovou infiltráciou⁽¹⁰⁾.

Pre proliferatívnu fázu je typické pretrvávanie reaktívnej hyperplázie pneumocytov II. typu a proliferácia fibroblastov sprevádzaná expanziou stien alveolov s následným prestupom do alveol^(3-6,10) (obrázok 3D). Môže byť prítomná aj skvamózna metaplázia^(5,11). Častými nálezmi, ktoré predstavujú komplikácie DAD sú fibróza pľúc a sekundárna bakteriálna, menej často hubová infekcia^(3,10).

Distribúcia DAD vo všetkých fázach v prípade COVID-19 nie je uniformná, súčasne nachádzame zmeny v rôznych štádiách, hlavne v stredných a dolných lalokoch pľúc⁽⁵⁾. Ložiská postihnutého parenchýmu sú rozložené nerovnomerne⁽¹⁰⁾.

Polak a spol. rozdelili nález pri COVID-19 pneumónii odlišne, a to na 3 hlavné histologické vzory: 1. epitelový s reaktívnymi zmenami epitelu, prítomný u 85 % pacientov, 2. vaskulárny s mikrovaskulárnym poškodením, mikrotrombami a akútnou fibrinóznou a organizujúcou sa pneumóniou (59 % pacientov) a 3. fibrotický s fibrózou interstícia (22 % pacientov). Jednotlivé vzory sa aj prekrývali, pričom fibróza sa vyskytuje od 3. týždňa⁽⁴⁾.

Existujú indície, že COVID-19 môže minimálne u časti pacientov ako primárnu odpoveď vyvolávať organizujúcu sa pneumóniu, pričom k rozvoju znakov DAD dochádza až neskôr v dôsledku iných udalostí, napríklad pľúcnej ventilácie

alebo trombotickej mikroangiopatie^(7,10). Organizujúca sa pneumónia vyvolaná vírusmi bola opísaná v minulosti napríklad v súvislosti so SARS, MERS aj H1N1^(7,12). Na preskúmanie tejto možnosti v prípade COVID-19 však nie je dostupné dostatočné množstvo prác opisujúcich nález na pľúcach vo veľmi skorom štádiu ochorenia⁽⁷⁾.

Z našich pozorovaní pri analýze početných pitvaných prípadov úmrtí na COVID-19 môžeme pri mnohých konštatovať prítomnosť všetkých opísaných histologických nálezov, nezriedka súčasne na rozličných miestach pľúc. Táto skutočnosť poukazuje na nástup infekcie v rôznych častiach pľúc s odlišným časovým odstupom. Takéto paralely sa vyskytujúce nálezy COVID-19 pneumónie sú oveľa častejšie u pacientov z 2. vlny pandémie, na rozdiel od 1. vlny (na Slovensku do konca júna 2020), kde spravidla dominovalo masívne a uniformné postihnutie celého tkaniva pľúc.

Nález v iných orgánoch

Maiese a spol. vo svojej prehľadovej štúdií analyzujúcej histologický a pitevný nález v prácach publikovaných do júna roku 2020 nenašli dôkaz špecifických zmien v iných orgánoch okrem pľúc. Medzi mimopľúcny nálezmi dominujú mikrotromby a endotelitída rôznych orgánov, šokové zmeny pečene, obličiek a čriev, hemofagocytóza v kostnej dreni a slezine⁽³⁾.

Zrejme ani kardiálne komplikácie pri ochorení COVID-19 nie sú spôsobené priamym poškodením myokardu vírusom^(3,13). Medzi frekventované zmeny na srdci patria mikrotromby pretrvávajúce aj po klírense vírusu a amyloidóza srdca. Myokarditída máva v prípade nálezu veľmi limitovaný rozsah⁽³⁾.

Časté neurologické príznaky pri ochorení COVID-19 poukazujú na možný neurotropizmus vírusu. Imunohistochemicky sú vzorky nervového tkaniva v drvivej väčšine negatívne, okrem prípadu nálezu pozitIVITY v nervus vagus, nervus glossopharyngeus a ojedinelých buniek v predĺženej mieche celkovo u 16 pacientov. Vo všeobecnosti medzi najčastejšie nálezy patrí intrakraniálne krvácanie a encefalomalácie rôznej lokalizácie a rozsahu a mierny, fokálny, T-lymfocytový infiltrát v okolí ciev, v parenchýme mozgu a leptomeningoch⁽¹⁶⁾.

S výnimkou pľúc boli vírusové partikuly dokázané najmä v obličkách a čreve^(3,14). U pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19 s indikovaným bioptickým vyšetrením boli najčastejšími nálezmi akútne tubulárne poškodenie, fokálna segmentálna glomeruloskleróza, poškodenie endotelu a trombotická mikroangiopatia⁽¹⁵⁾. Časté gastrointestinálne ťažkosti nekorelujú s horšou prognózou pacientov. Mikroskopicky je prítomné poškodenie endotelu ciev submukózy, lymfoplazmocytový zápalový infiltrát a edém lamina propria⁽¹⁴⁾. V prípade známok poškodenia pečene existujú indície, že u časti pacientov môžu byť zmeny spôsobené priamou infekciou vírusom⁽¹⁸⁾.

Imunohistochemická detekcia SARS-CoV-2 infekcie

Mikroskopický obraz v prípade vírusových pneumónií vrátane COVID-19 spravidla nie je dostatočne špecifický. V mnohých prípadoch je potrebné etiologický agens v nekroptických a bioptických vzorkách dokázať metódami ako PCR, in situ hybridizácia, imunofluorescenčnými metódami alebo

Tabuľka 1. Imunohistochemická detekcia infekcie SARS-CoV-2 v humánných tkanivách protilátkami od rôznych producentov.

N°	Kat. N°	typ/klon	Ag	producent	Ag revital.	riedenie	inkubácia	nešpecif.r
1.	40590-T62	Rb-PAb	S2	Sino Biological	citrát	1:1000	noc	n/AE, BE, Le; c/BE, TE
2.	40588-T62	Rp-PAb	NP	Sino Biological	citrát	1:1000	noc	c/AE, BE
3.	NB100-56576	Rb-PAb	NP	Novus Biologicals	citrát	1:20	noc	no, ↓ senzitivita
4.	A2060-50	M-MAb 6F10	NP	BioVision	citrát	1:50	noc	no, ↓ senzitivita
5.	40150-R007	Rb-MAb 007	S1	Sino Biological	citrát/TRIS	1:20	noc	no, ↓ senzitivita
6.	40143-R001	Rp-MAb 001	NP	Sino Biological	citrát/TRIS	1:100	1 h	no
7.	GTX632604	Mo-MAb 1A9	Spike	GeneTex	citrát/TRIS	1:10	noc	-
8.	MBS9141939	Rb-MAb	NP	MyBioSource	citrát	1:2000	noc	c/AE, BE; Er. plazma
9.	BSB134	Mo-MAb 134	NP	BS-Bio	citrát	RTU	1 h	no
10.	DB280	R-MAb C19-Y	NP	DB-Biotech	citrát	1:1000	1 h	c/BE, Dec, nTB, Er

Ag: antigén; n: nukleárna pozitivita; c: cytoplazmová pozitivita; AE: alveolárny epitel; BE: bronchiálny epitel; TE: tubulárny epitel obličky; Le: leukocyty; Er: erytrocyty; Dec: decidua; no: nepozorovaná nešpecifická reaktivita

imunohistochemicky (IHC)⁽⁶⁾. Najjednoduchšia a najlacnejšia je rutinne využívaná imunohistochemia.

V prípade imunohistochemickej diagnostiky COVID-19 vzniká niekoľko problémov. Najzávažnejší je, že IHC detekcia vírusu v pľúcnom tkanive je spoľahlivá len v priebehu prvých 2 týždňov ochorenia, vzácne možno vírus dokázať ešte do 4 týždňov⁽¹⁰⁾. Iným závažným problémom v prípade IHC dôkazu prítomnosti SARS-CoV-2 vo vyšetřovanom tkanive je časový odstup vykonania pitvy po úmrtí. Naše skúsenosti ukazujú, že imunohistochemická reaktivita zostáva zachovaná približne do 30 hodín po smrti. Po tomto období sa imunohistochemická detekcia vírusu stáva nespoľahlivou a so zväčšujúcim sa časovým intervalom výkonu pitvy od úmrtia až nemožnou. Dostupné práce však väčšinou čas pitvy neuvádzajú, preto nie je možné vyjadriť sa k zistenej spoľahlivosti IHC⁽¹⁷⁾.

Ďalšie ťažkosti vyplývajú z existencie množstva komerčne dostupných, ale nedostatočne overených protilátok, často s vysokou skříženou reaktivitou v imunohistochemickej aplikácii. Za použitia týchto protilátok bolo v roku 2020 publikovaných množstvo prác s údajným nálezom priameho vírusového poškodenia rôznych tkanív.

Z tohto dôvodu sme testovali protilátky na tkanivových vzorkách pľúc pacientov zosnulých na následky COVID-19 a na tkanivách z obdobia pred r. 2020. Testovali sme na tkanivových rezoch bez antigénovej revitalizácie a s revitalizáciou 30 min. v citrátovom pufri pH 5 alebo TRIS pufri pH 8, pri teplote varu. Negatívne kontroly boli jednak preparáty inkubované bez primárnej protilátky alebo inkubované s myšacím alebo králičím sérom pri rovnakom riedení ako testovaná protilátka. S cieľom dosiahnutia vyššej špecificity sme protilátky testovali s inkubáciou cez noc pri zvýšených riedeniach. Okrem skřízenej reaktivity niektorých protilátok v tkanivách

získaných roky pred objavením sa SARS-CoV-2 vírusu, viaceré protilátky sa ukázali ako nevhodné pre imunohistochemickú aplikáciu (tabuľka 1). V pľúcnom tkanive sa ukázala spoľahlivá imunohistochemická detekcia SARS-CoV-2 vírusu predovšetkým v skorom štádiu infekcie, v bronchiolárnom, bronchiálnom epiteli a najmä v odlupujúcich sa vírusom napadnutých alveolárnych epiteliách (obrázok 4). Zriedkavejšie sme pozorovali pozitivitu aj v hyperplastických alebo syncytiálnych obrovských alveolárnych epitelových bunkách. Celkom ojedinelo bola pozitivita v cytoplazme veľkých buniek s veľkým mechúrikovým jadrom a veľkým jadriekom, pravdepodobne s vírusovými cytopatickými znakmi (obrázok 4).

Záver

Pandémia spôsobená vírusom SARS-CoV-2, s náhlym nástupom a rýchlym rozšírením po celej zemeguli, odhalila potrebu čo najrýchlejšieho a spoľahlivého objasnenia patologickej podstaty ochorenia. Do popredia sa tak po rokoch zaznávania až odmietania patologickoanatomickej pitvy dostáva posmrtná analýza zosnulých, ktorá je zdrojom základných informácií o patogenéze ochorenia a rozsahu poškodenia v rôznych tkanivách. Analýza pitevných nálezov poskytla základné poznatky o chorobe COVID-19 a prispela okrem pochopenia patológie aj k smerovaniu terapeutických stratégií pri liečbe tohto závažného ochorenia. Imunohistochemický dôkaz prítomnosti infekcie SARS-CoV-2 vo vyšetřovanom tkanive je rýchla a finančne nenáročná metóda. Je však limitovaná časovým odstupom pitvy po smrti a dostupnosťou protilátok s vysokou špecificitou a senzitivitou.

Oznam

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. PP-COVID-20-0051.

LITERATÚRA

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Covid19.who.int. https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAiAm-2BBhANEiwAe7eyFK6TAzBmS-jQHhO-Lf7d3BMDsrF6vSN35KMeJRQnlWh_tG0uDaRpRhoCd7wQAvD_BwE. Published 2021. Accessed April 8, 2021.
2. Gao Y, Ding M, Dong X, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy*. 2020;76(2):428-455. doi:10.1111/all.14657
3. Maiese A, Manetti A, La Russa R, et al. Autopsy findings in COVID-19-related deaths: a literature review. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 2020. doi:10.1007/s12024-020-00310-8

4. Polak S, Van Gool I, Cohen D, von der Thüsen J, van Paassen J. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Modern Pathology*. 2020;33(11):2128-2138. doi:10.1038/s41379-020-0603-3
5. Sessa F, Bertozzi G, Cipolloni L, et al. Clinical-Forensic Autopsy Findings to Defeat COVID-19 Disease: A Literature Review. *J Clin Med*. 2020;9(7):2026. doi:10.3390/jcm9072026
6. Suster S, Moran C. *Biopsy Interpretation Of The Lung*. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013:155-173.

7. Kory P, Kanne J. SARS-CoV-2 organising pneumonia: 'Has there been a widespread failure to identify and treat this prevalent condition in COVID-19?'. *BMJ Open Respir Res.* 2020;7(1):e000724. doi:10.1136/bmjresp-2020-000724
8. Al Nemer A. Histopathologic and Autopsy Findings in Patients Diagnosed With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): What We Know So Far Based on Correlation With Clinical, Morphologic and Pathobiological Aspects. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(6):363-370. doi:10.1097/pap.0000000000000276
9. Salerno M, Sessa F, Piscopo A, et al. No Autopsies on COVID-19 Deaths: A Missed Opportunity and the Lockdown of Science. *J Clin Med.* 2020;9(5):1472. doi:10.3390/jcm9051472
10. Borczuk A, Salvatore S, Seshan S, et al. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. *Modern Pathology.* 2020;33(11):2156-2168. doi:10.1038/s41379-020-00661-1
11. Bösmüller H, Matter M, Fend F, Tzankov A. The pulmonary pathology of COVID-19. *Virchows Archiv.* 2021;478(1):137-150. doi:10.1007/s00428-021-03053-1
12. Shieh W, Hsiao C, Paddock C, et al. Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum Pathol.* 2005;36(3):303-309. doi:10.1016/j.humpath.2004.11.006
13. Bois MC, Boire NA, Layman AJ, et al. COVID-19-Associated Nonocclusive Fibrin Microthrombi in the Heart. *Circulation.* 2021;143(3):230-243. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050754
14. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1017-1032. doi:10.1038/s41591-020-0968-3
15. Akilesh S, Nast CC, Yamashita M, et al. Multicenter Clinicopathologic Correlation of Kidney Biopsies Performed in COVID-19 Patients Presenting With Acute Kidney Injury or Proteinuria. *Am J Kidney Dis.* 2021;77(1):82-93.e1. doi:10.1053/j.ajkd.2020.10.001
16. Mukerji SS, Solomon IH. What can we learn from brain autopsies in COVID-19?. *Neurosci Lett.* 2021;742:135528. doi:10.1016/j.neulet.2020.135528
17. Roden AC, Vrana JA, Koepllin JW, et al. Comparison of In Situ Hybridization, Immunohistochemistry and Reverse Transcription-Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARSCoV-2)-Testing in Tissue [published online ahead of print, 2021 Mar 15]. *Arch Pathol Lab Med.* 2021;10.5858/arpa.2021-0008-SA. doi:10.5858/arpa.2021-0008-SA
18. Wang Y, Liu S, Liu H, et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol.* 2020;73(4):807-816. doi:10.1016/j.jhep.2020.05.002

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

VITAJTE V LABORATÓRIÁCH BUDÚCNOSTI

20

20 rokov
na trhu

7 000

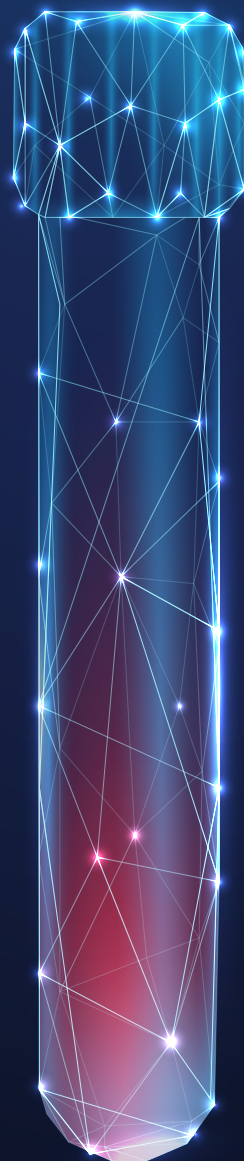
najväčšie laboratórium
v strednej a východnej Európe
s rozlohou 7 000 m²

50 000

50 000 vzoriek denne

800

zamestnávame 800 vysoko
kvalifikovaných
profesionálov



36%

najväčší podiel na trhu
laboratórnej diagnostiky
na Slovensku

4 000

vykonávame viac ako
4 000 typov testov

3

3 centrálna laboratóriá
v Bratislave, Košiciach a Nitre

12

nemocničných
laboratórií

Genomická variabilita vírusu SARS-CoV-2

Diana Rusňáková^{1,2,3}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

¹Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

³Geneton, s. r. o., Bratislava, Slovensko

V ostatných rokoch sa globálnou výzvou pre verejné zdravie stali najmä rozvíjajúce a znovu sa objavujúce patogény. Príkladom sú zoonotické pandémie, ktoré nastávajú po prenose zvieracích vírusov do ľudskej populácie, ako je to v prípade koronavírusu ťažkého akútneho respiračného syndrómu 2 (SARS-CoV-2). Koronavírusy sú najväčšie obalené RNA vírusy, ktoré sú široko distribuované medzi cicavcami a vtákmi, ale aj ľuďmi. Spôsobujú predovšetkým respiračné, ale aj enterické, hepatálne a neurologické ochorenia. V súčasnosti je známych sedem druhov koronavírusov schopných infikovať ľudí, pričom štyri koronavírusy – 229E, OC43, NL63 a HKU1 spôsobujú mierne klinické príznaky podobné nachladnutiu a ďalšie tri kmene – koronavírus spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm (SARS-CoV), koronavírus spôsobujúci blízkovýchodný respiračný syndróm (MERS-CoV) a novo-identifikovaný SARS-CoV-2 sú smrteľné a vyústili do troch pandémieí 21. storočia. Znalosť sekvencie SARS-CoV-2 vírusu je kľúčom k jeho charakterizácii a včasné zistenie jeho genetických údajov umožňuje rýchly rozvoj diagnostiky. Analýza genómu SARS-CoV-2 vykazuje stále nové genómové mutácie. Hlavným zameraním súčasného výskumu genómu SARS-CoV-2 je to, či má niektorá z týchto mutácií potenciál významne zmeniť dôležité vírusové vlastnosti, ktoré by mohli ovplyvniť prejav ochorenia alebo rýchlosť jeho prenosu.

Kľúčové slová: koronavírusy, SARS-CoV-2, COVID-19, variabilita genómu, varianty, sekvenovanie

Genomic variability of SARS-CoV-2

In the past years, emerging and reappearing pathogens have become a significant challenge for global public health. A recent example of this phenomenon is zoonotic pandemics that occur after transmitting animal viruses to the human population, as is the case of the acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Coronaviruses are the most significant encapsulated RNA viruses widely distributed among mammals, birds, and humans. They cause mainly respiratory diseases but also enteric, hepatic and neurological diseases. Currently, seven species of coronaviruses capable of infecting humans are known. Four of them cause mild clinical symptoms – 229E, OC43, NL63 and HKU1, similar to a cold; and three other strains – severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV) and the newly identified severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which are lethal and have led to three pandemics in the 21st century. Knowledge of the SARS-CoV-2 virus sequence is a key to its characterization, and an early sharing of its genetic data allows rapid development of diagnostics. Analysis of the SARS CoV 2 genome continually shows new genome mutations. The main focus of the current research on the SARS-CoV-2 genome is to determine whether any of these mutations can significantly alter the essential viral properties that could affect the manifestation of the disease or its transmission rate.

Keywords: coronaviruses, SARS-Cov-2, COVID-19, genomic variability, variants, sequencing

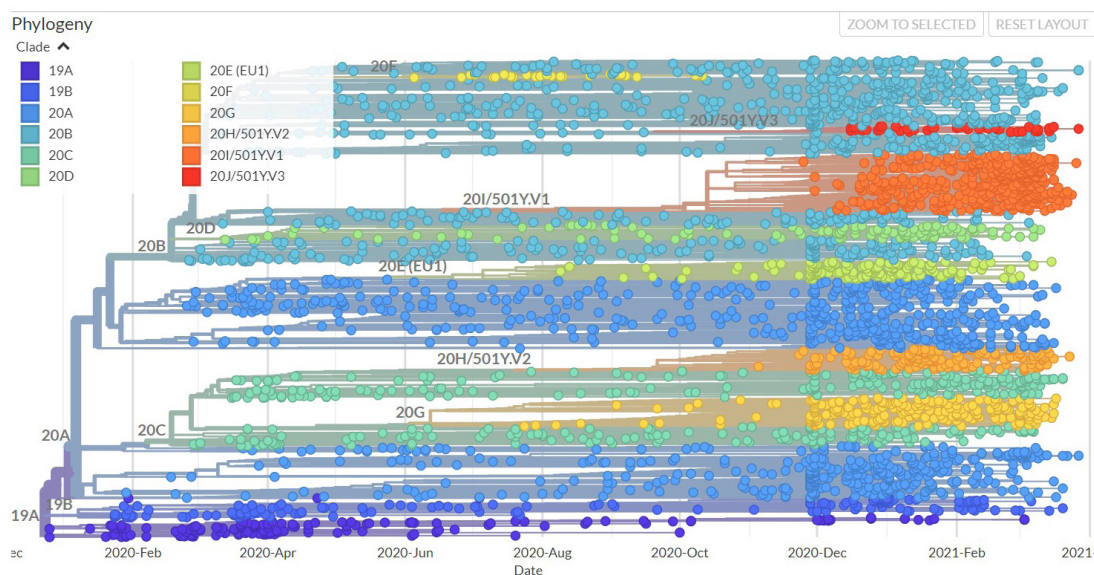
NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 18 – 22

Varianty vírusu SARS-CoV-2

Mutácie sú jeden z najdôležitejších mechanizmov evolúcie RNA vírusov. Podobne ako iné RNA vírusy, aj koronavírusy rutinne akumulujú mutácie a zmeny vo svojej genómovej sekvencii v dôsledku nepresnosti polymerázy⁽¹⁾. SARS-CoV-2 však obsahuje RdRp s *proof-reading* aktivitou, ktorá má za úlohu minimalizovať výskyt nukleotidových mutácií⁽²⁾. Genetická diverzita je však rozhodujúca pre jeho fitness, prežitie aj patogenézu. Bolo vykonané veľké množstvo štúdií na detekciu genómových variácií SARS-CoV-2, čo viedlo k nájdaniu bohatých genetických variácií rôznych typov vrátane nesynonymných, synonymných, inzercií, delécií a nekódujúcich mutácií. Monitorovanie (**obrázok 1**) a charakterizácia mutácií a variabilných oblastí je rozhodujúca najmä pre ich dôsledky, ako napríklad vplyv na rýchlosť šírenia infekcie alebo

schopnosť spôsobiť vážnejší priebeh ochorenia. Mutácie môžu spôsobovať neschopnosť detekcie vírusu pomocou špecifických diagnostických testov alebo znížiť náchylnosť na terapeutické látky, ako sú monoklonálne protilátky, či vyhnúť sa prirodzenej imunite alebo imunite vyvolanej očkovaním. S najväčšou pravdepodobnosťou sa budú prenášať mutácie, ktoré buď posilnia infekčnosť, alebo replikáciu vírusu, alebo tie, ktoré neovplyvňujú negatívne na funkciu vírusu. Keďže sa zvýšil prenos a globálne šírenie SARS-CoV-2, v súčasnosti pozorujeme veľké množstvo akumulovaných mutácií. Podľa údajov získaných z verejnej databázy Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) mal na začiatku pandémie vírus SARS-CoV-2 mieru mutácií asi $1,12 \times 10^{-3}$ nukleotidov/genóm za rok⁽³⁾. Zatiaľ čo sekvencie SARS-CoV-2 z Wu-chanu a okolitých oblastí provincie Chu-pej sa líšili iba niekoľkými

Obrázok 1. Grafické znázornenie mutácií v čase. Pravidelne aktualizovaný fylogenetický strom SARS-CoV-2 je verejne dostupný na nextstrain.org⁽⁶⁾.



nukleotidovými zmenami, ďalšia analýza genómových sekvenčí z databázy GISAID odhalila, že počet a výskyt mutácií je v Európe a Severnej Amerike v porovnaní s Áziou výrazne vyšší⁽⁴⁾. Napriek tomu, že SARS-CoV-2 vykazuje sezónny pokles, perzistencia pandémie môže umožniť akumuláciu imunologicky relevantných mutácií v populácii. Proteíny SARS-CoV-2 mutujú rôznymi rýchlosťami, pričom väčšina vírusových proteínov vykazuje malú mutačnú variabilitu. Niektoré proteíny, ako napríklad Spike, sa zdajú náchylnejšie na mutácie, pravdepodobne pre svoju kľúčovú úlohu pri vstupe do hostiteľských buniek a zmenu infekčnosti⁽⁵⁾.

Významnú pozornosť získala mutácia D614G v S proteíne, keďže sa stala v polovici roku 2020 prevládajúcou formou SARS-CoV-2 na celom svete vrátane Európy. Ide o substitúciu vedúcu k nahradeniu kyseliny asparágovej glycinom v polohe 614 v S proteíne⁽⁷⁾. Doteraz nie sú dôkazy o tom, že by infekcia SARS-CoV-2 obsahujúca tento variant viedla k závažnejšiemu priebehu ochorenia a nemení ani účinnosť existujúcich laboratórných diagnostík, terapeutík, vakcín alebo preventívnych opatrení v oblasti verejného zdravia. Mutácia však pravdepodobne zvýšila afinitu vírusu na ľudský receptor ACE2, čo má za následok jeho vyššiu infekčnosť a rýchlosť prenosu⁽⁸⁾. Je preukázané, že infikovaní pacienti s D614G mali vyššiu hladinu vírusovej RNA, nezistili sa však rozdiely v potrebe hospitalizácie⁽⁷⁾. Ďalšia bežná mutácia v polohe 314 v ORF1b ovplyvňuje komplex RdRp, ktorý je kódovaný nsp12. Mutácie v RdRp sú zriedka životaschopné, pretože RdRp je zodpovedný za transkripčné procesy a jeho štruktúra je preto vysoko zachovávaná. Mutácia vedie k zmene aminokyseliny prolín na leucín a bolo pozorované, že zvyšuje rýchlosť výskytu mutácií⁽⁹⁾. Prolín je spojený s flexibilitou a leucín so stabilizáciou v proteínoch. Zvýšená rigidita v štruktúre RdRp v dôsledku zavedenia leucínu vedie k vyššej miere transkripčnej chyby⁽¹⁰⁾. Vznik mutácie RdRp vo februári 2020 viedol k zvýšeniu tvorby mutácií vrátane mutácií v S a N proteínoch⁽⁴⁾.

Na konci jesene 2020 viaceré krajiny hlásili, že detegujú varianty SARS-CoV-2 s veľkým počtom mutácií, ktoré sa šíria

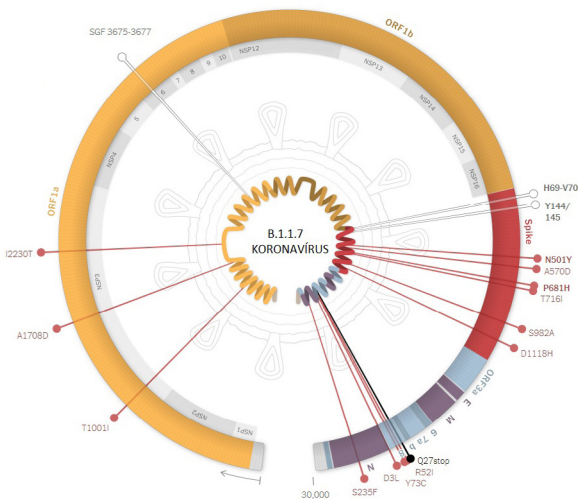
efektívnejšie. Nový variant B.1. 1. 7 s veľkým počtom mutácií identifikovali na jeseň 2020 v Británii⁽¹¹⁾. Následne bola ohlásená línia B.1.351 v Južnej Afrike⁽¹²⁾. Nedávno boli identifikované ďalšie varianty, a to B.1. 1. 28 označovaný ako P.1 v Brazílii⁽¹³⁾ a B.1.526 vyskytujúci sa najmä v New Yorku⁽¹⁴⁾. V súčasnosti tieto varianty SARS-CoV-2 predstavujú najväčšiu hrozbu. O funkčných a evolučných významoch väčšiny mutácií SARS CoV-2 sa stále diskutuje.

Línia B.1.1.7

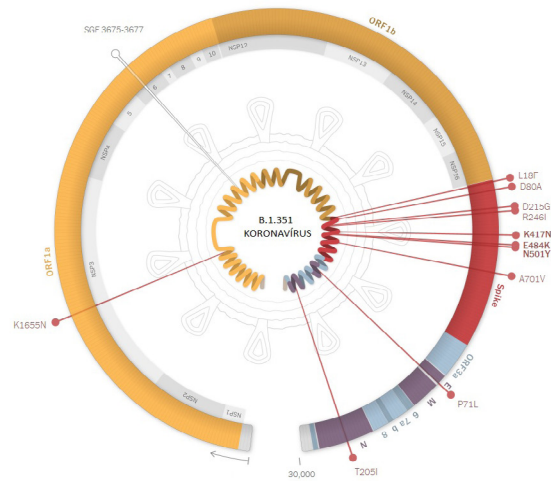
B.1. 1. 7 rodová línia, alias 20I/501Y.V1 Variant of Concern (VOC) 202012/01. Patrí do skupiny Nextstrain – 20 B, GISAID klad GR. Rodová línia B.1. 1. 7 nesie väčší počet genetických zmien vírusu, ako bolo obvyklé⁽¹¹⁾. Ako a kde vznikol, je zatiaľ nejasné. Predpokladaný vznik neobvyklej genetickej divergencie línie B.1. 1. 7 je v imunodeficientných alebo imunosuprimovaných pacientoch, ktorí sú chronicky infikovaní SARS-CoV-2⁽¹⁵⁾. V takýchto prípadoch evolučná dynamika a selektívne tlaky na populáciu vírusov medzi pacientmi sú veľmi odlišné od tých, ktoré sa vyskytujú pri typickej infekcii. Odhaduje sa, že variant sa objavil v juhovýchodnej časti Veľkej Británie v septembri 2020, pričom nie je fylogeneticky príbuzný s vírusom SARS-CoV-2 cirkulujúcim v Spojenom kráľovstve v čase zistenia variantu⁽¹⁶⁾.

Nukleotidové zmeny sú prevažne pozmeňujúce aminokyseliny, pričom nastalo až 14 nesynonymných mutácií a 3 delécie (**obrázok 2**). V línii sa pozoruje aj 6 synonymných mutácií. Množstvo genetických zmien je najmä v proteíne Spike vrátane delécie šiestich nukleotidov, čo vedie k delícii 2 aminokyselín v pozíciách 69 a 70 – del69–70. Táto mutácia sa spontánne vyvinula aj v iných variantoch SARS-CoV-2 a predpokladá sa, že zvyšuje prenosnosť. Významnou mutáciou je aj zmena, ktorá vedie k zmene aminokyseliny z asparagínu na tyrozín v polohe 501 – N501Y v doméne viažucej receptor proteínu Spike. Ukázalo sa, že zvyšuje pevnosť väzby Spike proteínu koronavírusu na enzým konvertujúci angiotenzín 2 – ACE2, ktorý sprostredkúva vstup vírusu do ľudských buniek. Potenciálne biologické účinky môže mať aj zmena prolínu

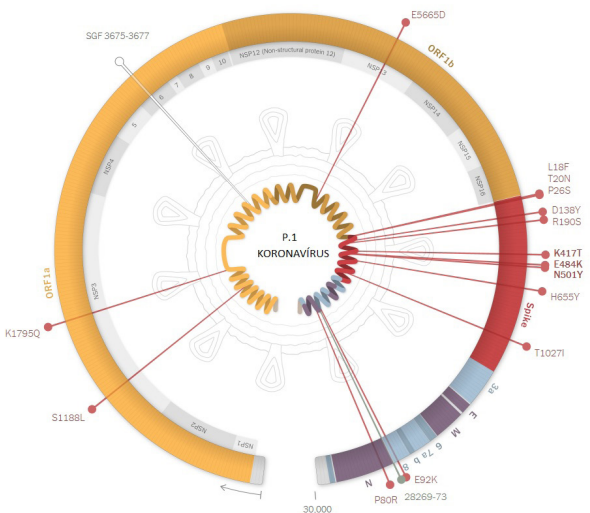
Obrázok 2. Mutácie vo variante B.1.1.7 vírusu SARS-CoV-2. Upravené podľa Corum a Zimmer, 2021⁽²⁰⁾.



Obrázok 3. Mutácie vo variante B.1.351 vírusu SARS-CoV-2. Upravené podľa Corum a Zimmer, 2021⁽²⁰⁾.



Obrázok 4. Mutácie vo variante P.1 vírusu SARS-CoV-2. Upravené podľa Corum a Zimmer, 2021⁽²⁰⁾.



B.1. 1. 7 s ďalšími mutáciami E484K v S proteíne, L730F v ORF1ab aj A173V a A398T v proteíne N. Nezávislé štúdie dospeli k záveru, že E484K najmä v kombinácii s N501Y má medzi jednotlivými mutáciami najväčší vplyv na antigénne zmeny a je spojený aj so zvýšenou väzbou na ľudský ACE2. Mutácia E484K bola nezávisle opísaná vo viacerých variantoch vrátane B.1.351 v Južnej Afrike, ale aj pri variante P1 v Brazílii⁽¹⁹⁾.

Línia B 1.351

B.1.351 rodová línia, známa ako 20H/501Y.V2 (predtým 20C/501Y.V2), VOC – 202012/02 patrí do triedy Nextstrain – 20C, GISAID klad GH a línia PANGO B.1.351. Podobne ako predchádzajúca B1. 1. 7 patrí k líniám s veľkým množstvom mutácií (**obrázok 3**), pričom prvýkrát bola opísaná v októbri v Južnej Afrike⁽¹²⁾. Variant je definovaný viacerými nesynonymnými aminokyselinovými zamenami v S proteíne. Napríklad v N-koncovkej doméne S proteínu sa nachádza delícia 242-244del a aminokyselinová zámena arginínu za izoleucín – R246I. V RBD sa vyskytujú tri mutácie K417N, E484K a N501Y a jedna mutácia A701V je lokalizovaná v blízkosti miesta štiepenia furínom⁽¹²⁾. Mutácia N501Y, ktorá je rovnaká aj v prípade variantu B.1. 1. 7, pravdepodobne spôsobuje zvýšenú vírusovú záťaž, a teda aj prenosnosť oboch variantov. Obzvlášť dôležitá je mutácia E484K v RBD, ktorá je považovaná za mutáciu, ktorej výsledkom je schopnosť vyhnúť sa monoklonálnym a sérovým protilátkovým odpoveďiam. Viac ako 90 % prípadov sekvenovaných v Južnej Afrike od konca novembra bolo spôsobených týmto variantom⁽¹²⁾. Infekcie týmto variantom boli nedávno hlásené z Rakúska a rýchly nárast prípadov je pozorovaný aj vo Francúzsku⁽²¹⁾. Prvé sporadické prípady sú zachytené aj na Slovensku.

Línia P1

Línia P1, známa ako 20 J/501Y.V3, patrí do triedy Nextstrain – 20 B, GISAID klad GR a línia PANGO P.1. Dňa 12. januára 2021 bol definovaný ďalší variant SARS-CoV-2 v severnej Brazílii. Líniu P1 definuje 17 aminokyselinových zmien, 3 delície, 4 synonymné mutácie a jedna 4-nukleotidová inzercia (**obrázok 4**). Z tohto počtu sa 10 mutácií nachádza v S proteíne. Má však množstvo jedinečných mutácií

na aminokyselinu histidínu v polohe 681 v S proteíne – P681H, ktorá bezprostredne susedí s miestom štiepenia furínom⁽¹¹⁾.

Doterajšie analýzy ukázali, že variant B.1. 1. 7 sa prenáša efektívnejšie v porovnaní s inými variantmi SARS-CoV-2, ktoré kolujú vo Veľkej Británii, keďže regióny Spojeného kráľovstva s vyšším podielom sekvencií B.1. 1. 7 mali rýchlejší epidemický rast ako iné oblasti. Odhaduje sa, že prenosnosť tohto kmeňa sa mohla zvýšiť až o 56 % a primárne reprodukčné číslo šírenia sa zvýšilo o 0,4 – 0,7⁽¹⁷⁾. V januári 2021 bola publikovaná správa, v ktorej vedci naznačili, že variant B.1. 1. 7 môže byť spojený so zvýšeným rizikom úmrtia v porovnaní s inými variantmi⁽¹⁸⁾. Na potvrdenie tohto zistenia sú potrebné ďalšie štúdie. Počas posledných týždňov pomer prípadov B.1. 1. 7 medzi všetkými detegovanými prípadmi výrazne stúpa každý deň, čo naznačuje, že tento variant sa stáva dominantným, minimálne v EÚ vrátane Slovenska.

Ukázalo sa, že sa vyskytol aj variant B.1. 1. 7, ktorý obsahoval navyše významnú mutáciu E484K, pri ktorej sa preukázalo, že redukuje neutralizáciu rekonvalescentnými sérami a monoklonálnymi protilátkami. Ide o klaster s označením VOC 202102/02 a obsahuje všetky mutácie opísané pre líniu

definujúcich líniu vrátane niekoľkých totožných mutácií s líniou B. 1.351 známeho biologického významu, ako sú E484K, K417T a N501Y⁽¹³⁾.

Línia B.1.526

Línia B.1.526 patrí do triedy Nextstrain – 20C a línia PANGO B.1.526. Analýza sekvencií vírusu nedávno identifikovala nový variant B.1.526, ktorý sa veľmi rýchlo rozšíril v oblasti New Yorku. Línia má päť charakteristických aminokyselinových substitúcií v Spike proteíne L5F, T95I, D253G, D614G a A701V. Mutácia D253G nastala práve v jednom z dvoch kľúčových zvyškov N-terminálnej domény Spike proteínu. V druhom aminokyselinovom zvyšku R246 sa pozorovala mutácia v línii B.1.351, ktorá pravdepodobne prispela k úniku pred neutralizačnými protilátkami. Predpokladá sa, že mutácia D253G môže mať podobný efekt⁽¹⁴⁾. Navyše boli identifikované dve verzie variantu s mutáciou E484K alebo S477N vo väzbovej doméne pre receptor. Práve s kombináciou mutácie D253G vyvolávajú obavy z možnej rezistencie proti terapeutickým a vakcínami vyvolaným protilátkam⁽²²⁾.

Línia B.1.617

Súčasný (datovaný k aprílu 2021) drastický nárast počtu prípadov na ochorenie COVID-19 je zapríčinený z veľkej časti líniou B.1.617. Táto mutácia sa vyskytuje najmä v Indii a je označovaná ako „dvojitá mutácia“, keďže okrem línií charakteristických mutácií sa v RBD Spike proteínu nachádzajú dve významné aminokyselinové substitúcie E484Q a L452R, ktoré boli detegované vo dvoch známych líniách⁽²³⁾. Obe mutá-

cie majú zvýšenú pevnosť väzby na ACE2 receptory⁽²⁴⁾. Vedci sa obávajú, že práve línia B.1.617 by mohla zvýšiť pravdepodobnosť reinfekcií.

Záver

Vo viacerých známych líniách môžeme pozorovať prelínanie rovnakých mutácií. Napríklad mutácia E484K je pozorovaná v líniách P.1, B.1.351 a B.1.525. V líniách B.1. 1. 7, B.1.351 aj P1 sa vyskytujú mutácie N501Y a delícia ORF1b del11288–11296. Súbor mutácií či delícií medzi líniami sa však javí ako úplne samostatný a predpokladá sa, že súvisí s rýchlym nárastom prípadov v lokalitách výskytu. Vzhľadom na súčasnú situáciu je preto nevyhnutné vírus naďalej skúmať a odhaľovať prípadné nové línie vírusu. Na základe sekvenčných analýz odhaľujúcich mutačné správanie vírusu SARS-CoV-2 existujú určité obavy týkajúce sa stále novoobjavujúcich sa mutácií, ktoré môžu významne ovplyvniť ciele terapeutie a, čo je dôležitejšie, práve vývoj vakcín. Preto veľká časť vedeckej komunity upriamila pozornosť na pochopenie vírusu, keďže práve vývoj účinnej a bezpečnej vakcíny môže zabrániť závažnosti ochorenia a znížiť úmrtnosť spojenú s týmto ochorením.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra ITMS:313011ATL7, ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a s podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. PP-COVID-20-0051.

LITERATÚRA

- Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, et al. Viral mutation rates. *J Virol*. 2010;84(19):9733-9748.
- Hillen HS, Kocic G, Farnung L, et al. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature*. 2020;584(7819):154-156.
- Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bull World Health Organ*. 2020;98(7):495-504.
- Pachetti M, Marini B, Benedetti F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med*. 2020;18(1):179.
- Vilar S, Isom DG. One Year of SARS-CoV-2: How Much Has the Virus Changed? *Biology*. 2021;10(2):91. doi:10.3390/biology10020091
- Hadfield J, Megill C, Bell SM, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018;34(23):4121-4123.
- Volz E, Hill V, McCrone JT, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell*. 2021;184(1):64-75.e11.
- Baric RS. Emergence of a Highly Fit SARS-CoV-2 Variant. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2684-2686.
- Eskier D, Karakülah G, Suner A, Oktay Y. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. *PeerJ*. 2020;8:e9587.
- Begum F, Mukherjee D, Das S, et al. Specific mutations in SARS-CoV2 RNA dependent RNA polymerase and helicase alter protein structure, dynamics and thus function: Effect on viral RNA replication. doi:10.1101/2020.04.26.063024
- Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Published December 18, 2020. Accessed February 22, 2021. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>
- Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *bioRxiv*. Published online December 22, 2020. doi:10.1101/2020.12.21.20248640

- Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. Published January 12, 2021. Accessed February 23, 2021. <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>
- Lasek-Nesselquist E, Lapierre P, Schneider E, et al. The localized rise of a B.1.526 SARS-CoV-2 variant containing an E484K mutation in New York State. Published online March 1, 2021. doi:10.1101/2021.02.26.21251868
- Kemp SA, Collier DA, Datir R, et al. Neutralising antibodies in Spike mediated SARS-CoV-2 adaptation. *medRxiv*. Published online December 29, 2020. doi:10.1101/2020.12.05.20241927
- WHO | SARS-CoV-2 Variants. Published online January 22, 2021. Accessed February 22, 2021. <https://www.who.int/csr/don/31-december-2020-sars-cov2-variants/en/>
- Volz E, Mishra S, Chand M, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. doi:10.1101/2020.12.30.20249034
- Horby P, Huntley C, Davies N, et al. NERVTAG note on B. 1.1. 7 severity. *New & Emerging Threats Advisory Group*, Jan. 2021;21.
- Chand M, Others. Investigation of novel SARS-COV-2 variant: Variant of Concern 202012/01 (PDF). *Public Health England PHE*. Published online 2020.
- Corum J, Zimmer C. Coronavirus Variants and Mutations. *The New York Times*. <https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html>. Published March 22, 2021. Accessed April 20, 2021.
- SPF. COVID-19: point épidémiologique à Mayotte du 11 février 2021. Accessed February 22, 2021. <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2021/covid-19-point-epidemiologique-a-mayotte-du-11-fevrier-2021>
- Zhou H, Dcosta BM, Samanovic MI, Mulligan MJ, Landau NR, Tada T. B.1.526 SARS-CoV-2 variants identified in New York City are neutralized by vaccine-elicited and therapeutic monoclonal antibodies. *bioRxiv*. Published online March 24, 2021. doi:10.1101/2021.03.24.436620

23. Yadav PD, Sapkal GN, Abraham P, et al. Neutralization of variant under investigation B.1.617 with sera of BBV152 vaccinees. *bioRxiv*. Published online April 23, 2021:2021.04.23.441101. doi:10.1101/2021.04.23.441101

24. Tchesnokova V, Kulakesara H, Larson L, et al. Acquisition of the L452R mutation in the ACE2-binding interface of Spike protein triggers recent massive expansion of SARS-Cov-2 variants. *bioRxiv*. Published online March 11, 2021. doi:10.1101/2021.02.22.432189



Mgr. Diana Rusňáková

Vedecký park Univerzity Komenského
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
e-mail: rusnakova.diana@gmail.com

RADIOMETER



YOUR FIRST CHOICE FOR ACUTE CARE TESTING



WHATEVER COMES NEXT, WE MAKE SURE LIFE COMES FIRST

RADIOMETER s.r.o. | zastoupení pro ČR a SR | Křenova 3, 162 00 Praha 6, Tel.: +420 220 400 300, www.radiometer.cz

Glykány ako potenciálny biomarker pri nádorovej transformácii prostaty (systematický prehľad)

Dávid Kocan^{1,2*}, Pavol Janega^{1,3,4}

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

²Klinika diagnostickej a intervenčnej rádiológie LF SZU a NÚSCH, a. s.

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

⁴MEDIREX GROUP ACADEMY, Trnava, n. p. o.

Cieľom tohto prehľadového článku je zhodnotiť súčasné postavenie a potenciál glykánov ako diagnostických a prognostických markerov pri nádoroch prostaty. Zároveň korelujeme úlohu glykánov ako biomarkerov v nádoroch pľúc a kolorektálneho karcinómu, kde sa ukazuje, že hladiny vybraných glykoproteínov môžu byť považované aj za markery predikcie terapeutickú odpovede. V súčasnosti používané markery nádorov prostaty nevykazujú dostatočnú špecifickosť a senzitivitu pri stanovení diagnózy, a to hlavne s ohľadom na diferenciálnu diagnostiku benígnych a malígnych chorôb. Diagnostická biopsia predstavuje často jedinou možnosť spoľahlivo odlíšiť dignitu zmien. Z tohto dôvodu predstavuje výskum glykokonjugátov pri nádorovej transformácii potenciálne novú nádej na zjednodušenie diagnostického procesu s využitím menej invazívnych, pacientom lepšie tolerovaných diagnostických metód. Realizované výskumy sa sústreďujú prevažne na odlíšenie tumorov s indolentným priebehom od invazívnych agresívnych tumorov. Hodnotenie glykoproteínov môže v budúcnosti zmeniť náš pohľad na diagnostiku, ale aj terapiu karcinómov prostaty.

Kľúčové slová: glykozylácia, nádory prostaty, prostatický špecifický antigén, kyselina sialová, biomarker, prognoza

Glycans as potential markers in malignant prostate transformation

This review article aims to evaluate glycans' current position and potential as diagnostic and prognostic markers in prostate tumours. We also compare the role of the glycans as biomarkers in lung and colorectal carcinoma, where the levels of selected glycoproteins are shown to be considered the therapeutic markers. Currently used prostate tumour markers do not show sufficient specificity and sensitivity to determine the diagnosis, mainly concerning the differential diagnosis of benign and malignant disease. The diagnostic biopsy is often the only opportunity to reliably distinguish the dignity of changes. For this reason, represents the research of glycoconjugates in the tumour transformation potentially new hope to simplify the diagnostic process using less invasive and by patients better tolerated diagnostic method. Current research is focused mainly on distinguishing tumours with indolent behaviour from aggressive invasive tumours. Glycoproteins can change our view of diagnosis, but also therapy of prostate cancer in the future.

Keywords: Glycosylation, Prostate Cancer, Prostate-Specific Antigen, Sialic Acid, Biomarker, Prognosis

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 23 – 26

Úvod

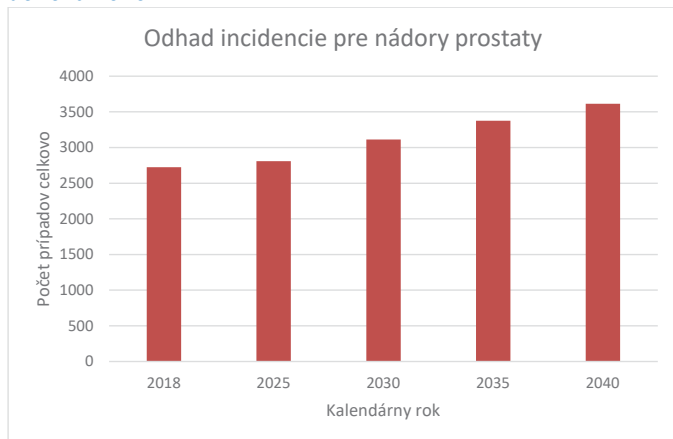
Nádory prostaty (PCa) predstavujú významnú skupinu onkologických ochorení u mužov, pričom ich incidencia a mortalita v populácii neustále narastá vzhľadom na predlžujúcu sa strednú dĺžku života. Uvedený trend potvrdzujú aj údaje z Global Cancer Observatory (**graf 1**), kde v rámci predikcie incidencie odhadujú nárast novodiagnostikovaných prípadov v Slovenskej republike v roku 2040 na 3 614 oproti 2 724 prípadom zaznamenaným v roku 2018. Odhadovaný nárast bude teda viac ako 32 %.

PCa predstavujú heterogénnu skupinu chorôb a preto vzniká otázka potreby viacerých biomarkerov pri rozhodovaní o stratégii terapie. Glykány sa ukazujú ako sľubné biomarkery nádorovej transformácie, pričom dostupné dáta ukazujú, že zmeny v glykóme môžu byť nápomocné pri stratifikácii

pacientov. Aberantná glykozylácia je typickou črtou nádorových buniek a glykány asociované s nádorom môžu pomôcť identifikovať malignitu. V rámci nádorov prostaty nachádzame široké spektrum alterácií glykánov, ako je glykozylácia prostatického špecifického antigénu (PSA), zvýšená sialyzácia, fukozylácia jadra, zvýšená O-GlcN-acylácia, zmeny galektínov a proteoglykánov⁽¹⁾.

Cieľom tohto prehľadového článku je zhrnutie aktuálnych poznatkov o glykánoch ako potenciálnych diagnostických a prognostických markeroch. Výsledky prebiehajúceho výskumu naznačujú, že analýza glykánov by mohla byť realizovaná v budúcnosti v tzv. liquid based minimálne invazívnych odberoch z moču, respektíve krvi pacienta. Ak sa preukáže dostatočná senzitivita a špecifickosť týchto metód, majú potenciál zjednodušiť diagnostiku nádorových chorôb prostaty.

Graf 1. Predikcia vývoja incidence pre nádory prostaty do roku 2040



Zdroj: vlastné spracovanie podľa <<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>>

Glykány a ich postavenie v rámci nádorovej transformácie

Glykány hrajú kľúčovú úlohu v rámci základných bunkových molekulárnych dejov vrátane bunkovej signalizácie, ovplyvňujú invazivitu nádorových buniek, metastázovanie, imunomoduláciu, angiogénu a interakcie s bunkovým matrixom⁽¹⁾.

Zmeny glykozylácie sú charakteristickou črtou malígne transformácie a progresie ochorenia. Je známe, že nádorové bunky nesú výrazne zmenené glykánové profily v porovnaní s nemalígnymi bunkami. Glykoproteíny môžu mať glykány viazané na proteíny prostredníctvom N-glykozylácie (tzv. N-glykány, glykány viazané na -NH₂ of Asn) alebo prostredníctvom O-glykozylácie (tzv. O-glykány, glykány viazané na -OH of Ser/Thr). Zmeny v glykozylácii sú často výsledkom pozmenenej aktivity glykozyltransferáz a glykozidáz, čo je zrejmé zo zastúpenia glykokonjugátov na bunkách nádoru⁽³⁾. Často opísanou zmenou glykozylácie pri nádorovej transformácii je zvýšená α 2,3-sialyzácia a fukozylácia, hlavne fukozylácia jadra⁽²⁾. Nejde však o jediné zmeny, vzhľadom na variabilitu sacharidového reťazca môžu byť nádorové vzory pomerne komplexné.

PSA glykozylácia a sialyzácia glykánov

PSA je glykoproteín produkovaný epiteliálnymi bunkami prostaty. Gén pre PSA patrí do rodiny kalikreínových génov kódujúcich serínové proteázy. V súčasnosti je tento marker používaný na detekciu a monitorovanie chorôb prostaty. Zvýšené sérové hladiny PSA sú spôsobené disrupciou membrán postihnutých prostatických buniek, resp. jeho zvýšenou produkciou. Väčšina epiteliálnych buniek prostaty vrátane hyperplastických a nádorovo transformovaných produkuje PSA. Preto sérové hladiny PSA nemajú dostatočnú špecifitu a neodiferencujú zmeny prostaty spôsobené nádorom, benígnou hyperpláziou prostaty (BPH) či prostatitídou, keďže pri všetkých dochádza k elevácii hodnôt PSA v krvi⁽⁴⁾.

PSA je teda všeobecne používaný ako biomarker nádorov prostaty, ktorý však má pre svoju nízku špecifitu zároveň nízku prognostickú hodnotu. Viaceré dostupné práce sa zaoberajú skúmaním glykozylovaných foriem PSA a ich asociáciou s nádorovou transformáciou. Cieľom je nájsť vhodnejší marker na identifikáciu agresívnych invazívnych foriem PCa, respektíve odlíšiť agresívne od indolentných foriem malignít.

Celkovo bolo opísaných vyše 50 glykoforiem PSA, ale iba niektoré typy sú detegované pri invazívnych formách karcinómov. Realizované výskumy ukazujú, že práve komplexy PSA s naviazanou 2,3-kyselinou sialovou sú úzko spojené s invazívnymi formami nádorov. V kombinácii Prostate Health Index (PHI) a detekcie glykoforiem PSA s 2,3-kyselinou sialovou v kohorte 79 pacientov bola preukázaná 100 % senzitivita a 94,7 % špecifita pri odlíšení high-risk nádorov od low-risk a benígnych foriem⁽¹⁾.

Súčasný výskum sa zameriava práve na identifikáciu PCa biomarkerov z jednotlivých izoforiem s cieľom vyvinúť čo najpresnejšiu metodiku testovania. V práci Yoneyama a kol. publikovali vývoj imunotestu na báze magnetických mikrogulôčok s detekciou α 2,3-asociovannej sialyzácie na voľnej PSA (s2,3-PSA). Senzitivita, respektíve špecifita testu bola 95 %, respektíve 72 % napriek limitácii štúdie nízkym počtom zahrnutých pacientov. Výsledky však ukazujú, že detekcia alterovaných glykánov asociovaných s nádorom vrátane s2,3-PSA zvyšuje presnosť odhalenia včasných štádií PCa a redukuje tak riziko nevyťažnosti biopsie prostaty⁽⁵⁾.

Gratacós-Mulleras a kol. vo svojej štúdií identifikovali významné sialyzované PSA glykoformy z krvného séra u pacientov s pokročilým PCa a porovnávali ich so štandardným PSA zo seminálnej plazmy od zdravých jedincov. Výsledky ukázali, že krvné séra s obsahom sialyzovaných PSA glykoforiem s obsahom GalNAc zvyškov sa vyskytovali u pacientov s invazívnym PCa, zatiaľ čo zvýšené α 2,6-SAPSA glykoformy vyskytujúce sa u zdravých jedincov boli asociované s výrazne nižším rizikom invazívneho PCa. Preto detekcia týchto špecifických alterovaných PSA glykoforiem pri invazívnom PCa je cestou lepšej stratifikácie pacientov z hľadiska rizikovosti ochorenia⁽⁶⁾.

Podobná publikovaná práca Pihikova a kol. vyvinula imunotest na báze lektínov, charakterizujúci glykozylačný status PSA zo séra. Kľúčová bola diferenciácia medzi -2,3- a -2,6-viazanou kyselinou sialovou. Výsledky preukázali významný nárast 2,3-viazanej kyseliny sialovej na PSA rozpoznateľnej lektínom MAA – *Maackia amurensis leucoaglutinínom* a nevýznamný nárast 2,6-viazanej kyseliny sialovej na PSA detegovanej pomocou SNA lektínu – *Sambucus nigra aglutinínu*. Tieto konštatovania sú v súlade s predošlými publikovanými štúdiami, kde nárast 2,6-viazanej kyseliny sialovej na PSA vo vzorkách pacientov s PCa v porovnaní so vzorkami zdravých jedincov bol spájaný so zvýšenou mierou väzby glykánov na PSA v diagnostikovaných prípadoch. Zvýšená sialyzácia PSA je pritom výsledkom upregulácie enzýmov 2,3- a -2,6-sialyltransferáz u pacientov s PCa⁽⁷⁾.

Kammeijer a kol. uverejnili tzv. PSA Glycomics Assay (PGA), teda test umožňujúci diferenciáciu 2,6- a 2,3-sialyzovaných izomérov z moču jedincov, teda markerov asociovaných s invazívnym typom PCa. Imunotest na báze lektínov bol použitý celkovo v 25 vzorkách moču pacientov so suspektným výskytom PCa. Celkovo 67 N-glykopeptidov bolo identifikovaných z PSA, pričom konštatovali, že išlo v tomto prípade o prvý test, ktorý umožnil kvantifikáciu jednotlivých PSA foriem z moču. Túto PGA metodiku teda považujú za sľubný nástroj odhalovania glykomarkerov v rámci diferenciácie medzi invazívnymi, respektíve indolentnými formami a BPH⁽⁸⁾.

Sialyzácia je proces, keď sú zvyšky kyseliny sialovej (kyseliny N-acetylneuraminovej) nadväzované na glykány ako koncový monosacharid. Zdá sa, že práve nadmerná sialyzácia je asociovaná so zlou prognózou choroby a s metastázovaním. Realizované experimentálne analýzy ukazujú, že zvýšené hladiny kyseliny sialovej sú zaznamenávané na sérových glykoproteínoch u pacientov s nádorom prostaty na rozdiel od benígnej prostatickej hyperplázie (BPH). Môžu tak predikovať Gleasonovo skóre s vyššou senzitivitou a špecificitou ako PSA. Zároveň vyššie sérové hladiny kyseliny sialovej sú spojené s vyšším gradingom nádoru, môžu súčasne predikovať výskyt kostných metastáz⁽¹⁾.

Ferrer-Batallé a kol. porovnávali PHI s vyvinutou metódou pre glykoformy PSA založenou na stanovení percentuálneho zastúpenia sérovej 2,3-sialovej kyseliny v sére (%2,3-SA) v skupine 79 pacientov. Kohorta zahŕňala 50 pacientov s PCa a 29 pacientov s BPH. Publikované výsledky ukázali, že 2,3-SA môže odlíšiť pacientov s vysokorizikovým karcinómom prostaty od zvyšku pacientov lepšie ako PHI, hoci PHI lepšie koreluje s Gleasonovým skóre oproti % 2,3-SA. Kombinácia oboch determinantov však významne zvyšuje senzitivitu a špecificitu diferenciácie high-risk pacientov od low a intermediate-risk pacientov či pacientov s benígnou hyperpláziou prostaty. Z uvedeného vyplýva, že oba sérové markery sú navzájom komplementárne a zvyšujú presnosť diagnostiky v prípade identifikácie high-risk PCa⁽⁹⁾.

Fukozylácia jadra

Llop a kol. prezentovali dve metodiky na analýzu fukozylácie jadra a kyseliny sialovej viazaných PSA N-glykánov v sérach 29 pacientov s BPH a 44 pacientov s PCa s rôznym štádiom ochorenia. Zaznamenali významný nárast jadrovej fukózy a nárast percenta α 2,3-sialyzovaného PSA pri high-risk PCa na rozdiel od BPH a low-risk PCa, resp. high-risk PCa pacientov. Pri cut-off hodnote pomeru PSA k jadrovej fukóze 0,86, môžu odlíšiť high-risk PCa pacientov od BPH s vyše 90 % senzitivitou a 95 % špecificitou. V prípade α 2,3-sialyzovanej PSA, pri cut-off hodnote na úrovni 30 % odlišoval test medzi high-risk PCa a skupinou pacientov s BPH, low- a intermediate-risk PCa so senzitivitou 85,7 % a špecificitou 95,5 %. Túto metódu teda možno do budúcnosti použiť na diferenciáciu medzi invazívnymi a neinvazívnymi formami PCa⁽¹¹⁾. Uvedené poznatky konštatuje aj Munkley a kol., že zvýšená fukozylácia jadra je zaznamenávaná v sérach pacientov s PCa na rozdiel od zdravej kontroly⁽¹²⁾.

Fujita a kol. skúmali, či fukozylovaná PSA (Fuc-PSA) v moči môže byť použitá pri detekcii PCa s vysokým Gleasonovým skóre. Vzorky moču zbierali u pacientov abnormálnym digitálnym rektálnym vyšetrením alebo u pacientov so zvýšenou hladinou sérového PSA. ELISA s lektínovou protilátkou bola použitá na identifikáciu Lewis-typu alebo core-typu fukozylovanej PSA (PSA-AAL) a core-typu fukozylovanej PSA (PSA-PhoSL) vo vzorkách moču. Hladiny oboch typov Fuc-PSA boli významne znížené u pacientov s PCa oproti tým, u ktorých biopsia nakoniec preukázala negatívitu PCa. Oba typy Fuc-PSA boli výrazne asociované s vysokým Gleasonovým skóre v biopsovaných vzorkách. Teda PSA-AAL a PSA-PhoSL boli identifikované ako nezávislé prediktory pokročilých PCa⁽¹³⁾.

Štúdiom fukozylovannej PSA v sére pacientov s invazívnym PCa sa zaoberal aj Wang a kol. Použitím PSA imunitného testu na báze lektínov *Lens culinaris agglutinin* (LCA) a *Aleuria aurantia lectin* (AAL) boli zaznamenávané hladiny fukozylovaných glykoforiem vo vzorkách séra pacientov s PCa a rôznym Gleasonovým skóre. Výsledky meraní ukázali, že LCA aj AAL testy zaznamenali zvýšene hladiny fukozylovannej PSA, ale iba v prípade AAL metodiky výsledky korelovali s vyšším Gleasonovým skóre. Výsledkom štúdie bolo, že kvantitatívne imunitné testy na báze lektínov na stanovenie percenta fukozylovannej PSA s použitím lektínu AAL môžu byť efektívnym biomarkrom na diferenciáciu invazívnych PCa, obzvlášť tých s Gleasonovým skóre > 7, od neinvazívnych⁽¹³⁾.

Význam hodnotenia zmien glykánov pri nádorovej transformácii aj v iných orgánoch

Problematike glykozylácie a fukozylácie ako známej modifikácii glykoproteínov sa venujú mnohé výskumy aj u iných nádorov. Ako uvádza Jia a kol., aberantná aktivita a1,6-fukozyltransferázy pri over-expresii FUT-8 génu bola pozorovaná u pacientov v I. štádiu nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC). Práve inhibícia FUT8 môže znamenať inhibíciu rastu nádoru a metastázovania bez zásahu do proliferácie normálneho epitelu. Existuje teda silná asociácia over-expresie FUT8 a celkového prežívania u pacientov s NSCLC a zároveň s potenciálnym terapeutickým cieľom⁽¹⁴⁾.

Fukozylovaným α 1-glykoproteínom ako biomarkrom pre predikciu efektu imunoterapie u pacientov s nádorom pľúc sa zaoberala práca Yokobori a kol. Zaznamenali výraznú zmenu v glykánovej štruktúre sérového α 1-glykoproteínu (AGP) a zvýšené hladiny α 1,3-fukozylovaného AGP (fAGP), ktoré boli u pacientov asociované s progresiou ochorenia a so zníženou odpoveďou na chemoterapiu. Boli analyzované hladiny fAGP v sére u 39 pacientov s pokročilým nádorom pľúc s imunoterapiou nivolumabom. Celkovo 23 pacientov malo zvýšenú hladinu jeden mesiac po začatí liečby a u 20 pacientov v skupine, kde nedošlo k zmenšeniu nádoru, boli zaznamenané vysoké hladiny fAGP s následným úmrtím v tejto skupine. Šestnásť pacientov, u ktorých došlo k zníženiu hladiny fAGP alebo k jej stagnácii, preživalo v ďalšom 2-ročnom sledovanom období. Z uvedeného vyplýva, že hladina fAGP môže byť považovaná za zaujímavý marker pre odhad klinickej efektivity imunoterapie nivolumabu⁽¹⁵⁾.

Štúdia publikovaná Doherty a kol. sa snažila objasniť N-glykozyláciu plazmy medzi pacientmi s kolorektálnym karcinómom (CRC) a so zdravou kontrolnou skupinou. Zahŕnuli 633 prípadov CRC (rozdelných do 4 štádií) a 478 zdravých kontrol. Štatisticky signifikantný rozdiel v N-glykóme plazmy pozorovali v rámci všetkých štyroch štádií CRC, pričom v prvom štádiu bol na rozdiel od štádií 2 až 4 zaznamenaný výrazný pokles fukozylovaných glykánov F(6)A2G2 a F(6)A2G2S(6)1. Výsledkom je teda konštatovanie, že N-glykómové biomarkery môžu byť súčasťou klinického hodnotenia štádia ochorenia a zároveň potenciálnym terapeutickým cieľom⁽¹⁶⁾.

Pilotná štúdia de Freitas Junior a kol. potvrdila, že α 2,3-sialyzované povrchové glykolipidy, O-glykány a N-glykány boli exprimované najmä na histopatologických vzorkách asociovaných s malígnou transformáciou CRC, obzvlášť pri podtypoch s tendenciou k metastázovaniu do regionálnych lymfatických uzlín. Preto analýza glykánov má svoje postavenie

pri stratégii detekcie CRC s výrazným metastatickým potenciálom⁽¹⁷⁾.

Zmenami N-glykozylácie asociovanými s CRC malignitami sa zaoberala aj Sethi a kol. štúdiou na bunkových líniách CRC (LIM1215, LIM1899, and LIM2405). Detegovali výraznú prítomnosť manózových a α 2,6-sialyzovalých N-glykánov, pričom β 1,4-GlcNAcyllácia a α 2,3-sialyziácia boli identifikované v rámci metastatickej (LIM1215) a invazívnej (LIM2405) CRC bunkovej línie. Zároveň sa ukázala silná asociácia s expresiou receptora epidermálneho rastového faktora (EGFR)⁽¹⁸⁾.

Záver

Význam hodnotenia glykokonjugátov ako potenciálnych biomarkerov pri nádorovej transformácii v tkanive prostaty neustále narastá. Dôkazom je viacero publikovaných

postupov a laboratórnych metód založených na báze lektínov, ktoré naznačili svoj praktický potenciálny význam pre klinickú prax. Práve ich detekcia v moči, resp. krvnom sére môže priniesť nové menej invazívne diagnostické postupy. Primárnym cieľom je identifikácia a odlíšenie vysokomaligných agresívnych foriem nádorov prostaty od tých indolentných. Očakáva sa ďalšie spresňovanie metodík na báze lektínov a ich zaradenie do štandardného diagnostického algoritmu prinesie nové poznatky s významom nielen pre diagnostiku a posúdenie prognózy nádorov prostaty, ale identifikuje aj nové terapeutické ciele.

Podakovanie

Prehľadový článok vznikol s podporou projektu VEGA 1/0684/21.

LITERATÚRA

1. Scott E, Munkley J. Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6). doi:10.3390/ijms20061389
2. Tkac J, Bertok T, Hires M, et al. Glycomics of prostate cancer: updates. *Expert Rev Proteomics.* 2019;16(1):65-76. doi:10.1080/14789450.2019.1549993
3. Kluková L, Bertok T, Tkáč J. Glykomika ako nástroj na diagnostiku rôznych chorôb. *Chemické listy.* 2014;108(10):942-948.
4. Llop E, Ferrer-Batallé M, Barrabés S, et al. Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes. *The-ranostics.* 2016;6(8):1190-1204. doi:10.7150/thno.15226
5. Hatakeyama S, Yoneyama T, Tobisawa Y, Ohyama C. Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers. *Int J Clin Oncol.* 2017;22(2):214-221. doi:10.1007/s10147-016-1049-y
6. Gratacós-Mulleras A, Duran A, AsadiShehni A, et al. Characterisation of the main PSA glycoforms in aggressive prostate cancer. *SciRep.* 2020;10. doi:10.1038/s41598-020-75526-3
7. Pihikova D, Kasak P, Kubanikova P, et al. Aberrant sialylation of a prostate-specific antigen: Electrochemical label-free glycoprofiling in prostate cancer serum samples. *Anal Chim Acta.* 2016;934:72-79. doi:10.1016/j.aca.2016.06.043
8. Kammeijer GSM, Nouta J, de la Rosette JJMCH, et al. An In-Depth Glycosylation Assay for Urinary Prostate-Specific Antigen. *Anal Chem.* 2018;90(7):4414-4421. doi:10.1021/acs.analchem.7b04281
9. Ferrer-Batallé M, Llop E, Ramírez M, et al. Comparative Study of Blood-Based Biomarkers, α 2,3-Sialic Acid PSA and PHI, for High-Risk Prostate Cancer Detection. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4). doi:10.3390/ijms18040845
10. Llop E, Ferrer-Batallé M, Barrabés S, et al. Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes. *The-ranostics.* 2016;6(8):1190-1204. doi:10.7150/thno.15226
11. Munkley J, Mills IG, Elliott DJ. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nature Reviews Urology.* 2016;13(6):324-333. doi:10.1038/nrurol.2016.65
12. Fujita K, Hayashi T, Matsuzaki K, et al. Decreased fucosylated PSA as a urinary marker for high Gleason score prostate cancer. *Oncotarget.* 2016;7(35):56643-56649. doi:10.18632/oncotarget.10987
13. Wang C, Höti N, Lih T-SM, et al. Development of a glycoproteomic strategy to detect more aggressive prostate cancer using lectin-immunoassays for serum fucosylated PSA. *Clin Proteomics.* 2019;16. doi:10.1186/s12014-019-9234-4
14. Jia L, Zhang J, Ma T, et al. The Function of Fucosylation in Progression of Lung Cancer. *Front Oncol.* 2018;8. doi:10.3389/fonc.2018.00565
15. Yokobori T, Yazawa S, Asao T, et al. Fucosylated α 1-acid glycoprotein as a biomarker to predict prognosis following tumor immunotherapy of patients with lung cancer. *SciRep.* 2019;9. doi:10.1038/s41598-019-51021-2
16. Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, et al. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. *SciRep.* 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-26805-7
17. de Freitas Junior JCM, Morgado-Díaz JA. The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. *Oncotarget.* 2015;7(15):19395-19413. doi:10.18632/oncotarget.6283
18. Sethi MK, Hancock WS, Fanayan S. Identifying N-Glycan Biomarkers in Colorectal Cancer by Mass Spectrometry. *Acc Chem Res.* 2016;49(10):2099-2106. doi:10.1021/acs.accounts.6b00193



MUDr. Dávid Kocan
Klinika diagnostickej a intervenčnej rádiológie LF SZU a NÚSCH, a. s.
Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a. s.
Pod Krásnou hôrkou 1, 833 48 Bratislava
e-mail: david.kocan@nusch.sk

Detekcia mikrosatelitnej instability v nádoroch asociovaných s Lynchovým syndrómom

Jakub Styk^{1,2}, Vanda Repiská¹, Tomáš Szemes^{2,3,4}

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

³Geneton, s. r. o., Bratislava

⁴Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Mikrosatelitná instabilita (MSI) predstavuje stav genomickej alterácie vyskytujúcej sa v oblasti mikrosatelitov, tvorených zvyčajne 1 – 6 nukleotidovými opakovaniami. Je všeobecne známe, že determinácia stupňa MSI je kritickým parametrom pre celoživotný skrining pacientov s Lynchovým syndrómom. Aktuálne dostupné diagnostické prístupy v klinickej praxi, ktoré slúžia na detekciu MSI, však vykazujú isté limitácie. Moderné technológie sekvenovania novej generácie majú v kombinácii s analýzou tekutej biopsie veľký potenciál tieto obmedzenia prekonať. Viaceré štúdie preukazujú, že technológia masívne paralelného sekvenovania môže poskytnúť presnejší, cenovo efektívnejší a dostupnejší prístup detekcie a skriningu MSI v nádoroch asociovaných s Lynchovým syndrómom.

Kľúčové slová: Lynchov syndróm, mikrosatelitná instabilita, masívne paralelné sekvenovanie

Detection of microsatellite instability in Lynch syndrome-associated tumours

Microsatellite instability (MSI) is a state of genomic alteration occurring in the region of microsatellites, usually formed by 1 - 6 nucleotide repeats, which accumulate indels of several base pair sizes. It is well known that the determination of the degree of MSI is a critical parameter for lifelong screening of patients with Lynch syndrome. Currently available diagnostic approaches in clinical practice, which are used to detect MSI, have certain limitations. Modern next-generation sequencing technologies, combined with liquid biopsy analysis, have great potential to overcome these limitations. Several studies have shown that massively parallel sequencing technology, coupled with appropriate bioinformatics tools, can provide a more accurate, cost-effective, and affordable approach to detecting and screening MSI in Lynch syndrome-associated tumours.

Keywords: Lynch syndrome, microsatellite instability, massively parallel sequencing

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 27 – 31

Lynchov syndróm je autozomálne dominantné dedičné ochorenie charakterizované defektmi v systéme opravy chybné spárovaných báz – MMR systéme (*mismatch repair system*). Ide o postreplikatívny opravný systém zaisťujúci integritu genómu prostredníctvom reparácie chybné inkorporovaných nukleotidov, tvorený predovšetkým štyrmi hlavnými génmi *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Je známe, že pacienti s diagnostikovaným Lynchovým syndrómom sú vystavení zvýšenému riziku rozvoja viacnásobných synchronných alebo metachrónnych kolonických a/alebo extrakolonických malignít so včasným nástupom fenotypu. U pacientov s Lynchovým syndrómom sa tieto typy malignít objavujú pomerne skoro, a to priemerne okolo 40. až 50. roku života (**tabuľka 1**). Medzi najčastejšie typy nádorov asociovaných s Lynchovým syndrómom patrí kolorektálny karcinóm, a to pri oboch pohlaviach, a karcinóm endometria u žien, ale aj rakovina žalúdka, ovárií, tenkého čreva, hepatobiliárneho a urinárneho traktu, mozgu a CNS a tiež široké spektrum ďalších onkologických ochorení⁽¹⁾.

Mikrosatelity a ich instabilita u pacientov s Lynchovým syndrómom

Mikrosatelity alebo aj krátke tandemové repetície (STR; *short tandem repeats*) sú vo všeobecnosti definované ako sekvenčné opakovania až do dĺžky 100 bázových párov⁽²⁾. Sú tvorené opakujúcimi sa sekvenciami pozostávajúcimi z motívov veľkosti 1 – 6 nukleotidov, pričom pokrývajú zhruba 2,5 % ľudského genómu s počtom ~ 2,5 milióna lokusov⁽³⁾. Sú označované za genetické *hotspots* s mierou mutability 10- až 100 000× vyššou v porovnaní so zvyškom genómu⁽⁴⁾. Udávaná frekvencia mutácií na generáciu je oproti jednonukleotidovým polymorfizmom rádovo vyššia⁽⁵⁾. Predpokladá sa, že variácie dĺžky STR oblastí sú podmienené prekĺznutiu DNA v procese replikácie, čo v konečnom dôsledku vedie k indeľom veľkosti jedného alebo viacerých mikrosatelitných motívov. Vzniknuté indeľy sú v oblastiach mikrosatelitných lokusov opravované najmä funkčným MMR systémom⁽⁶⁾. Keďže mikrosatelity predstavujú veľmi nestabilné časti genómu, prítomnosť patologických zárodočných mutácií v *MMR* génoch a následná dysfunkcia MMR opravného systému u pacientov s Lynchovým syndrómom môžu vyústiť do mikrosatelitnej

Tabuľka 1. Riziko vzniku rakoviny v bežnej populácii a u pacientov s mutáciami v génoch *MLH1* a *MSH2*, spolu s priemerným nástupom veku ochorenia.

Typ nádoru	Riziko v bežnej populácii	Lynchov syndróm (heterozygot <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i>)	
		Riziko	Priemerný vek nástupu
Kolorektálny karcinóm	4 – 5 %	52 – 82 %	41 – 46 rokov
Endometrium	2,7 %	25 – 60 %	48 – 62 rokov
Prostata	11,6 %	~ 30 %	NA
Žalúdok	< 1 %	6 – 13 %	58 rokov
Ováriá	1,3 %	<i>MLH1</i> – 11 – 20 % <i>MSH2</i> – 15 – 24 %	43 rokov
Hepatobiliárny trakt	< 1 %	1,4 – 4 %	NA
Urínárny trakt	4 %	~ 7 %	~ 55 rokov
Tenké črevo	0,3 %	3 – 6 %	49 rokov
Mozog/CNS	0,6 %	1 – 3 %	~ 50 rokov
Pankreas	1 %	< 5 %	NA

*NA – not available/dáta nie sú k dispozícii

instability (MSI, *microsatellite instability*) (obrázok 1), pričom jej detekcia predstavuje v klinickej praxi dôležitý prognostický a diagnostický marker.

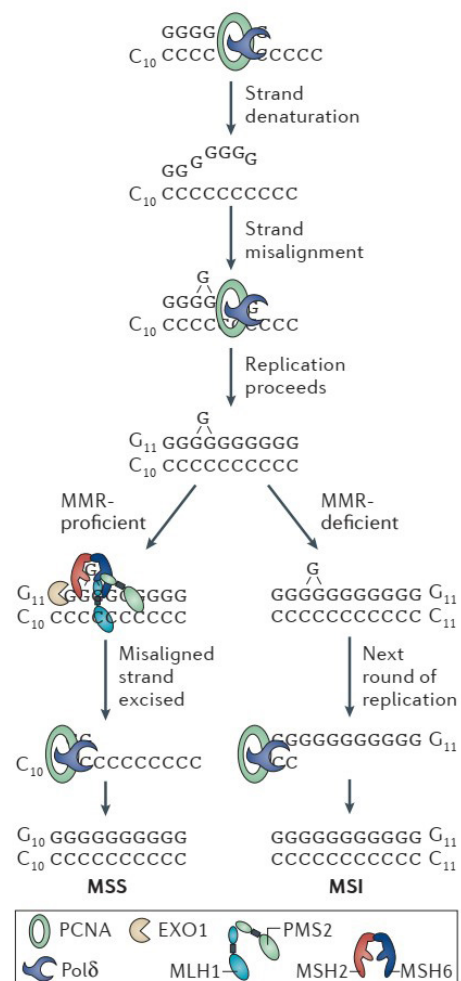
Aktuálne skrínigové prístupy detekcie MSI v klinickej praxi

Detekcia MSI a skrínig pacientov s Lynchovým syndrómom sú založené na dvoch základných prístupoch. Prvý, vychádzajúci z imunohistochemie (IHC; *immunohistochemistry*) proteínov zahrnutých v MMR systéme, a druhý, využívajúci PCR amplifikáciu vybraného počtu mikrosatelitových markerov (MSI-PCR) (tabuľka 2). Detekcia MSI predstavuje skrínigový test, ktorý umožňuje z pomerne rozsiahlej vzorky nádorov vybrať tie, ktoré môžu byť asociované s Lynchovým syndrómom. Uvádza sa, že MSI vykazuje ~ 90 % Lynchových asociovaných nádorov v porovnaní s ~ 15 % sporadických kolorektálnych karcinómov, spôsobených najmä hypermetyláciou promotora génu *MLH1*⁽⁷⁾. Vhodným markerom na selekciu sporadických nádorov je vyšetrenie na prítomnosť daných metylácií *MLH1* alebo analýza mutácie p. V600E v géne *BRAF*⁽⁸⁾.

Metóda MSI-PCR kombinuje fluorescenčnú multiplex PCR a kapilárovú elektroforézu, čím umožňuje detegovať status MSI porovnaním fragmentačného profilu amplifikovaných markerov medzi zdravým a nádorovým tkanivom získaným od toho istého pacienta. V priebehu dekád boli predstavené viaceré panely, súčasné testy široko využívané v klinickej diagnostike sa však spoliehajú predovšetkým na lokusy tvorené mononukleotidovými opakovaniami – homopolymérmí. V súčasnosti najpoužívanejšou esejou založenou na tomto princípe je metóda fragmentačnej analýzy MSI Analysis System verzia 1.2 (Promega), ktorá využíva panel 5 kvázi-monomorfných homopolymérnych markerov BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 a MONO-27⁽⁹⁾.

Na druhej strane IHC sa odporúča ako prvotné skrínigové vyšetrenie pri liečbe pacientov, u ktorých existuje podozrenie na prítomnosť mutácií v *MMR* génoch, s cieľom identifikovať pacientov, ktorí sú vhodní na ďalšie molekulárnogenetické analýzy. IHC predstavuje rýchlu a relatívne jednoduchú esej, ktorá deteguje expresiu MMR proteínov *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6* v tkanive odobratého z reprezentatívnej časti biopsie⁽¹⁰⁾. Výraznejšou limitáciou IHC je nevyhnutná prítomnosť vysokokvalifikovaného personálu, a to pri odbere biopsie

Obrázok 1. Molekulárny mechanizmus MSI. Počas replikácie STR oblasti (*C10*) môže dôjsť k reanelácii DNA reťazca mimo pôvodného miesta s následnou inzerciou alebo deléciou jedného alebo viacerých nukleotidov (G11). Heterodimér *MSH2-MSH6*, ktorý rozpoznáva chybné spárované bázy, spolu s heterodimérom *MLH1-PMS2* podporuje excíziu tejto časti chybného vlákna, a to aj za pomoci exonukleázy *EXO1*. Pri absencii aktivity MMR systému zostáva tento úsek neopravený. V priebehu nasledujúcej replikácie DNA sa vlákno obsahujúce G11 stáva templátom, pričom jeho úspešná replikácia vedie k trvalej fixácii nukleotidu a ku generovaniu novej alely *C11*. Komplex *PCNA* a DNA polymeráza δ zabezpečujú syntézu nového vlákna. MSI – mikrosatelitná nestabilita; MSS – mikrosatelitná stabilita.



Tabuľka 2. Porovnanie IHC a MSI-PCR.

Metóda	Výhody	Limitácie
IHC	<ul style="list-style-type: none"> výsledok v rámci 4 – 6 h identifikácia MMR génov pre sekvenčné analýzy ľahko aplikovateľná metóda realizovateľná na vzorkách s < 20 % neoplastických buniek cenová efektivita 	<ul style="list-style-type: none"> separátna analýza 4 MMR proteínov (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) potreba špecialistu na interpretáciu výsledkov falošná pozitivita: artifičné straty expresie ako príčina preanalytických faktorov alebo v dôsledku technických limitácií zriedkavá falošná negativita: žiadna zjavná strata expresie v dôsledku missense mutácií v MMR génoch s intaktnou imunoreaktivitou v ~ 10 % prípadov prítomnosť špecialistu
MSI-PCR	<ul style="list-style-type: none"> výsledok v rámci < 5 h multiplex PCR ľahká reprodukovateľnosť experimentov cenová efektivita 	<ul style="list-style-type: none"> žiadna indikácia o MMR génoch vzorky najmenej s 20 % neoplastických buniek zriedkavá falošná pozitivita: mikrosatelitné polymorfizmy informatívna iba pre limitovaný typ nádorov

aj pri vyhodnocovaní analýz. Bolo pozorované, že medzi výsledkami MSI a IHC analýzami existuje nesúlad, pričom uvádzaná citlivosť IHC pri predpovedaní MSI je ~ 92 %^(11,12). Negatívami IHC sú takisto falošne pozitívne výsledky, ktoré vznikajú pri takých mutáciách v MMR génoch, ktoré vo výsledku neovplyvňujú transláciu, stabilitu a antigenicitu proteínu, čím dochádza k jeho intaktnému zafarbeniu⁽¹²⁾. Porovnanie technických a metodologických aspektov MSI-PCR a IHC aj ich limitácie sumarizuje **tabuľka 2**.

MSI ako indikátor prognózy odpovede na imunoterapiu

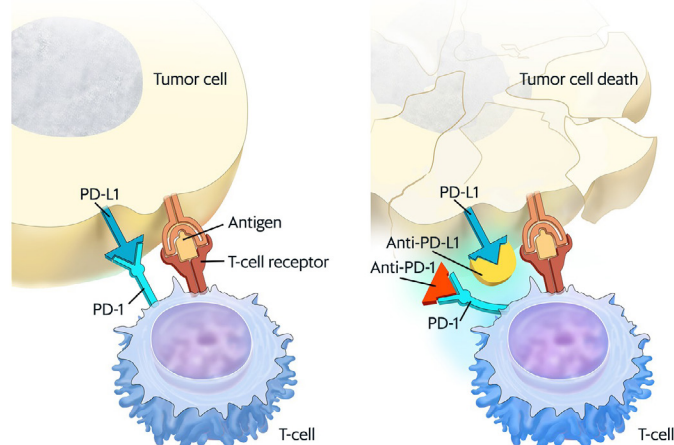
Okrem iného detekcia MSI pomáha pri selekcii pacientov na zaradenie na imunoterapiu. Preukázalo sa, že pri metastatickom kolorektálnom karcinóme je ~ 10 % pacientov nesprávne zaradených do imunoterapeutických štúdií v dôsledku falošne pozitívnych výsledkov IHC alebo MSI-PCR⁽¹³⁾. Na posúdenie adekvátnosti liečby pomocou inhibítorov imunitného kontrolného bodu (ICI; *immune checkpoint inhibitors*) sa odporúča kombinácia prístupu IHC a MSI-PCR pri metastatickom CRC aj pri iných druhoch nádorov spadajúcich do spektra Lynchovho syndrómu⁽¹⁴⁾. Preukázalo sa, že nádory s vysokým stupňom MSI majú vo všeobecnosti vysokú pravdepodobnosť reakcie na inhibíciu PD-1/PD-L1 dráhy (*programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1*), ktorá je považovaná za jeden z kontrolných bodov imunitnej odpovede. Proteín PD-1, vysokoexprimovaný aktivovanými T-bunkami, B-bunkami, dendritickými bunkami a NK bunkami, ktorý po väzbe na PD-L1 receptor, nachádzajúci sa vo veľkom množstve na niektorých rakovinových bunkách, pomáha takýmto bunkám uniknúť pred imunitným systémom hostiteľa. Monoklonálne protilátky, akými sú inhibítory anti-PD-1 alebo anti-PD-L1 môžu takúto väzbu blokovať a zvyšovať tak imunitnú odpoveď proti bunkám nádoru (**obrázok 2**). Na základe predklinických štúdií je tento typ liečby účinný v kombinácii s rádioterapiou, chemoterapiou, inhibítormi kináz a epigenetickými liečivami⁽¹⁵⁾.

Využitie masívne paralelného sekvenovania v MSI diagnostike

Aktuálne sa dostáva do popredia názor, že použitie panelového sekvenovania ako prvotného skríningu MSI predstavuje v klinickej praxi cenovo efektívny spôsob diagnostiky Lynchovho syndrómu a iných nádorových a polypóznych syn-

drómov⁽¹⁶⁾, pričom sekvenovanie nádoru ako prvotný krok pri skríningu Lynchovho syndrómu môže nahradiť súčasne používané prístupy⁽¹⁷⁾. Veľkou výhodou NGS metód oproti MSI-PCR je predovšetkým súbor analyzovaných markerov, ktorý varíruje až po niekoľko tisíc. Okrem vyššej citlivosti je to v niektorých prípadoch absencia párovej vzorky kontrolného nenádorového tkaniva, ktorá je pre prístupy MSI-PCR nevyhnutná. Dôkazy o adekvátnosti masívne paralelného sekvenovania pri detekcii MSI poskytlo sekvenovanie štandardne používaného génového panela Bethesda/NCI. Získané výsledky korelovali s metódou MSI-PCR analýzy, čo demonštruje, že prístupy založené na vysokoparalelnom sekvenovaní predstavujú vhodnú skrínigovú a diagnostickú metódou na testovanie MSI⁽¹⁸⁾. Detekcia MSI vychádzajúca z rozličných sekvenačných platforiem dosahuje vysokú špecifitu a senzitivitu, čo demonštruje, že tento prístup môže v blízkom čase plnohodnotne nahradiť konvenčne používané skrínigové metódy⁽¹⁹⁾. Vybrané štúdie zaoberajúce sa detekciou MSI v nádoroch kolorekta pomocou masívne paralelného

Obrázok 2. Mechanizmus účinku anti-PD-1 a anti-PD-L1 liečiv. Keď sa PD-L1 (ligand programovanej bunkovej smrti 1) na nádorovej bunke naviaže na receptor PD-1 (receptor programovanej bunkovej smrti 1) na T-bunke, sú apoptické mechanizmy T-buniek inhibované a bránia imunitnému systému pri napadnutí nádorovej bunky. Blokovanie PD-L1 alebo PD-1 umožňuje T-bunkám po naviazaní antigénu napadnúť nádorové bunky.



Tabuľka 3. Štúdie zaoberajúce sa detekciou MSI pomocou masívne paralelného sekvenovania.

Štúdia	Platforma	Typ nádoru	Vstup
Lee et al. (2021) ²⁶	Illumina NextSeq 500	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo
Kim et al. (2019) ²⁷	Illumina MiSeq	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo
Nowak et al. (2017) ²⁸	Illumina HiSeq 2500	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo
Hempelmann et al. (2015) ²⁹	Illumina MiSeq	Kolorektálny karcinóm	Tkanivo

sekvenovania zobrazuje **tabuľka 3**. Napriek širokému spektru nástrojov na vyhodnocovanie MSI zo sekvenčných dát vykazujúcich v porovnaní s MSI-PCR konkordanciu, ktorá varíruje od 92,3 % do 100 %⁽¹⁹⁻²¹⁾, neboli doposiaľ predstavené konsenzuálne kritériá na vyhodnocovanie MSI, čo do istej miery limituje ich zavedenie do rutínnej klinickej praxe.

Potenciál cirkulujúcej nádorovej DNA v MSI diagnostike

Potenciál cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA, *circulating tumour DNA*) je pripisovaný vlastnostiam, ako je schopnosť sledovať progresiu nádorového ochorenia, možnosť predpovedať recidívu nádoru a v neposlednom rade schopnosť odrážať stav nádorovej heterogenity⁽²²⁾. Zároveň medzi MSI fenotypom v ctDNA a nádorovom tkanive existuje vysoká miera korelácie. Keďže len malá časť z fragmentov ctDNA v cirkulácii pochádza z nádorových buniek, detekcia MSI založená na báze tekutej biopsie si vyžaduje veľmi citlivý prístup. Presnosť a citlivosť menej invazívnych metód založených na analýze voľných cirkulujúcich nukleových kyselín je ovplyvnená faktormi, medzi ktoré patria napríklad technické a bioinformatické výzvy pre efektívne sekvenovanie, mapovanie, volanie variantov a korekciu chýb v oblasti vysokorepetitívnych mikrosatelitných lokusov, nízka frakcia ctDNA v cirkulácii, respektíve chyby vznikajúce pri replikácii génomu⁽²³⁾.

Prístupy na hodnotenie stavu MSI prostredníctvom analýzy ctDNA dosahujú konkordanciu na úrovni ~ 99 % pre status MSI medzi vzorkami tkaniva a ctDNA^(12,24). Kritickým parametrom esejí vychádzajúcich z analýzy voľných cirkulujúcich nukleových kyselín je frakcia nádorových buniek, pretože účinnosť detekcie MSI vo vzorkách s vysokou kontamináciou zdravých buniek významne klesá⁽²⁴⁾. V neposlednom rade je to heterogenita a dynamika nádoru, pri ktorej inter- a intratumorová variabilita sú kľúčovým faktorom prispievajúcim k nesúladu medzi pacientmi/kohortami. Ná-

dorové bunky prechádzajú v odpovedi na stres spôsobený prostredím a terapiou klonálnou evolúciou, ktorá môže meniť ich genetickú informáciu. Napriek tomu sa predpokladá, že tekutá biopsia má v porovnaní s tkanivom potenciál niekoľkonásobne lepšieho záchytu tumorovej heterogenity⁽²³⁾. Najnovšie validácie preukazujú 100 % senzitivitu a špecifitu, a to aj v prípade 0,05 % obsahu ctDNA⁽²⁵⁾. Napriek evidencii, že prístupy založené na analýze ctDNA poskytujú pri detekcii MSI pomocou vysokoparalelného sekvenovania mikrosatelitných lokusov dostatočnú citlivosť, sú pre ich zavedenie do klinickej praxe potrebné ďalšie funkčné validácie.

Záver

Široká dostupnosť detekcie MSI pomocou vysokoparalelného sekvenovania v klinickej praxi môže v konečnom dôsledku eliminovať spektrum komplikácií, ktoré sú spojené s aktuálne zaužívanými prístupmi. Zároveň, neustále inovácie vo výpočtových algoritmoch umožňujú rozsiahly skrining v desiatkach až stovkách vzoriek súčasne, so senzitivitou na úrovni konvenčne používaných skriningových nástrojov. Analýza telových tekutín okrem iného vedie ku kvalitnejšiemu manažmentu pacientovho ochorenia, a to pri monitorovaní odpovede tumoru na protinádorovú terapiu aj pri sledovaní jeho prípadnej recidívy.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0319 a projektom VEGA 1/0305/19

Konflikt záujmov

Autori vyhlasujú, že nemajú žiadny konflikt záujmov.

LITERATÚRA

1. Tamura K, Kaneda M, Futagawa M, et al. Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. *Int J Clin Oncol*. 2019;24(9):999-1011.
2. Nadir E, Margalit H, Gallily T, Ben-Sasson SA. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(13):6470-6475.
3. Avvaru AK, Sharma D, Verma A, et al. MSDB: a comprehensive, annotated database of microsatellites. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D155-D159
4. Balzano E, Pelliccia F, Giunta S. Genome (in)stability at tandem repeats. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Published online 2020.
5. Sun JX, Helgason A, Masson G, et al. A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat Genet*. 2012;44(10):1161-1165.
6. Murat P, Guilbaud G, Sale JE. DNA polymerase stalling at structured DNA constrains the expansion of short tandem repeats. *Genome Biol*. 2020;21(1):209.

7. Copija A, Waniczek D, Witkoš A, et al. Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1).
8. Hegde M, Ferber M, Mao R, et al. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med*. 2014;16(1):101-116.
9. Arulananda S, Thapa B, Walkiewicz M, et al. Mismatch Repair Protein Defects and Microsatellite Instability in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2018;13(10):1588-1594.
10. McCarthy AJ, Capo-Chichi J, Spence T, et al. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2019;5(2):115-129.
11. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):293-300.

12. Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):301-307.
13. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol*. 2019;5(4):551-555.
14. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals of Oncology*. 2019;30(8):1232-1243.
15. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*. 2015;28(6):690-714.
16. Gallego CJ, Shirts BH, Bennette CS, et al. Next-generation sequencing panels for the diagnosis of colorectal cancer and polyposis syndromes: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Oncol*. 2015;33(18):2084.
17. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, et al. Assessment of Tumor Sequencing as a Replacement for Lynch Syndrome Screening and Current Molecular Tests for Patients With Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(6):806-813.
18. Gan C, Love C, Beshay V, et al. Applicability of next generation sequencing technology in microsatellite instability testing. *Genes*. 2015;6(1):46-59
19. Zhu L, Huang Y, Fang X, et al. A Novel and Reliable Method to Detect Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2018;20(2):225-231.
20. Niu B, Ye K, Zhang Q, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(7):1015-1016.
21. Kautto EA, Bonneville R, Miya J, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget*. 2017;8(5):7452-7463.
22. Myint NNM, Verma AM, Fernandez-Garcia D, et al. Circulating tumor DNA in patients with colorectal adenomas: assessment of detectability and genetic heterogeneity. *Cell Death & Disease*. 2018;9(9).
23. Wang L, Ajani JA. Ushering in Liquid Biopsy for the Microsatellite Status: Advantages and Caveats. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(23):6887-6889.
24. Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, et al. Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(23):7035-7045.
25. Han X, Zhang S, Zhou DC, et al. MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data. *Brief Bioinform*. Published online 18 January 2021.
26. Lee Y, Lee JA, Park HE, et al. Targeted next-generation sequencing-based detection of microsatellite instability in colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2021;16(2):e0246356.
27. Kim JE, Chun S-M, Hong YS, et al. Mutation Burden and I Index for Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2019;21(2):241-250.
28. Nowak JA, Yurgelun MB, Bruce JL, et al. Detection of Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):84-91.
29. Hempelmann JA, Scroggins SM, Pritchard CC, Salipante SJ. MSIplus for Integrated Colorectal Cancer Molecular Testing by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2015;17(6):705-714.

Mgr. Jakub Styk

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

Molekulárna diagnostika vrodenej neutropénie

Veronika Medová¹, Andrea Šoltýsová^{1,2}, Ľudevít Kádaši^{1,2}, Andrej Ficek²

¹Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

²Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Vrodená neutropénia predstavuje skupinu ochorení v rámci primárnych imunodeficiencií, ktorá je charakterizovaná nízkym počtom neutrofilov, pričom viaceré typy môžu mať syndrómový charakter s výskytom rôznych extrahematologických znakov. Vzhľadom na klinickú i genetickú variabilitu vrodenej neutropénie, s ktorou je v súčasnosti asociovaných viac ako 50 génov, sa v molekulárnej diagnostike dostávajú do popredia najmä techniky sekvenovania novej generácie. Tie, či už vo forme panelov, celoexómového, či celogenómového sekvenovania, umožňujú cenovo i časovo účinnú diagnostiku aj identifikáciu nových génov spojených so vznikom neutropénií. I keď na porovnanie diagnostickej účinnosti jednotlivých spomenutých prístupov nie je dostatok dát, dostupné štúdie ukazujú, že v súčasnosti ide o najúčinnější diagnostický prístup pri genotypovo i fenotypovo heterogénnych ochoreniach, ako je neutropénia.

Kľúčové slová: neutropénia, molekulárna genetika, *ELANE*, sekvenovanie novej generácie, WES

Molecular diagnosis of congenital neutropenia

Congenital neutropenia is a group of primary immunodeficiency disorders characterized by a low neutrophil count, which may be syndromic with the presence of various extrahematological features. Due to the clinical and genetic heterogeneity of congenital neutropenia, currently associated with more than 50 genes, next-generation sequencing techniques are at the forefront of the molecular diagnosis of neutropenia. In the form of panel, whole exome or whole genome sequencing, these techniques enable cost-effective and time-efficient diagnostics and the identification of new genes associated with the development of neutropenia. Although there are not enough data to compare the diagnostic yield of these approaches, available studies currently show it as the most effective diagnostic approach for genotypic and phenotypic heterogeneous diseases, such as neutropenia.

Keywords: neutropenia, molecular genetics, *ELANE*, next-generation sequencing, WES

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 32 – 36

Úvod

Molekulárna diagnostika zriedkavých vrodených ochorení sa každý rok zlepšuje, k čomu najmä posledné desaťročie prispievajú techniky sekvenovania novej generácie (NGS, *next generation sequencing*). Napriek tomu efektivita alebo tzv. diagnostický účinok dosahuje celkovo pri mnohých vrodených ochoreniach aj s využitím NGS asi len 25 %⁽¹⁾. Vrodené poruchy imunity sú skupinou ochorení, kde sa NGS vzhľadom na genetickú variabilitu využíva často. Do tejto skupiny ochorení patrí i vrodená neutropénia, ktorá je charakterizovaná redukciami absolútneho počtu neutrofilov (ANC, *absolute neutrophil count*) v periférnej krvi, ktorú radíme k poruchám fagocytov. Neutropénia je často klinicky asymptomatická až do momentu, keď sa u pacienta začne prejavovať rekurentnými infekciami, ktoré mnohokrát vedú k chronickým, závažným až život ohrozujúcim stavom⁽²⁾.

Vrodená neutropénia

Neutropénia je relatívne častým nálezom u približne 1 % populácie, pričom v niektorých populáciách môže jej výskyt dosahovať až 8 %. Vrodená forma neutropénie sa vyskytuje u menej ako 1/100 000 ľudí, čo tvorí približne 1 z 1 000 prípadov všetkých neutropénií⁽³⁾. Z analýzy dát zozbieraných Medzinárodným registrom závažných chronických neutropénií (SCNIR, *Severe Chronic Neutropenia International Registry*) sa prevalencia vrodenej a idiopatickej neutropénie pohybovala

v štátoch prispievajúcich do registra v rozmedzí od 0,006 až po 8,5 prípadu na milión obyvateľov s priemerom 1,65. Slovensko v tom čase do registra neprispievalo i keď v súčasnosti je partnerom tejto organizácie⁽³⁾. Monogénová kongenitálna neutropénia predstavuje klinicky a geneticky veľmi heterogénnu skupinu, pričom toto označenie sa vzťahuje na chronickú závažnú neutropéniu bez iných abnormalít, tzv. izolovanú, nesyndrómovú neutropéniu, ako aj na syndrómové genetické ochorenia spojené s rôznymi extrahematologickými fenotypovými prejavmi⁽⁴⁾. Neutropénia sa zároveň môže vyskytovať pri iných ochoreniach imunitného systému postihujúcich napríklad získanú imunitu ako ich pridružený prejav alebo ako súčasť klinického obrazu zlyhania kostnej drene⁽⁵⁾.

Genetika vrodenej neutropénie

Závažná kongenitálna neutropénia (SCN, *severe congenital neutropenia*) sa prejavuje ako chronické alebo intermitentné ochorenie, pričom pacienti, ktorí ňou trpia, majú zároveň sklon k rozvoju akútnej myeloidnej leukémie (AML) a myelodysplázie (MDS)⁽⁶⁾. S izolovanou formou ochorenia je doposiaľ spojených viacero génov (**tabuľka 1**), z ktorých najvýznamnejší je gén *ELANE*, ktorého mutácie sú zodpovedné približne až za 40 % prípadov ťažkej vrodenej neutropénie (**obrázok 1**) a vyše 50 % prípadov cyklickej neutropénie charakterizovanej osciláciou počtu neutrofilov zvyčajne v 21-dňových cykloch⁽⁷⁾. V súčasnosti je známych takmer 200 rôznych

Tabuľka 1. Zoznam izolovaných neutropénií a syndrómových neutropénií^(4,5,13,15)

Gén	Syndróm	Dedičnosť	Extrahematologické znaky
IZOLOVANÉ NEUTROPÉNIE			
ELANE	SCN1	AD	-
GFI1	SCN2	AD	-
HAX1	SCN3	AR	-
G6PC3	SCN4	AR	-
VPS45	SCN5	AR	-
JAGN1	SCN6	AR	Osteopénia
CSF3R	SCN7	AR	-
SRP54	SCN8	AD	Exokrinná pankreatická insuficiencia
WAS	X-viazaná SCN	XR	-
TCIRG1	TCIRG1 neutropénia	AD	Osteopetróza
CXCR2	CXCR2 chronická neutropénia	AR	Exokrinná pankreatická deficiencia
SYNDRÓMOVÉ NEUTROPÉNIE			
SBDS	Shwachmanov-Diamondov syndróm	AD	Exokrinná pankreatická insuficiencia, chondrodysplázia
SLC37A4	Porucha ukladania glykogénu	AR	Laktátová acidóza, hyperlipidémia
TAZ	Barthov syndróm	XR	Kardiomyopatia, retardácia rastu
VPS13B	Cohenov syndróm	AR	Mentálna retardácia, obezita, hluchota
CXCR4	WHIM	AD	Bradavice
GATA2	GATA2 deficiencia	AD	Lymfedéma, hluchota
AP3B1	Hermanského-Pudlakov syndróm	AR	Parciálny albinizmus, pulmonálna fibróza
LAMTOR2	p14 deficiencia	AR	Parciálny albinizmus, growth failure
USB1	Poilkiloderma s neutropéniou	AR	Retinopatia, vývojové zaostávanie
LYST	Chediakov-Higashiho syndróm	AR	Parciálny albinizmus, neurologická dysfunkcia
RAB27A	Griscelliho syndróm typ 2	AR	Parciálny albinizmus
AP3D1	Hermanského-Pudlakov syndróm typ 10	AR	Okulokutánný albinizmus, hluchota
EIF2AK3	Wolcottov-Rallisonov syndróm	AR	Neonatálny diabetes dependentný od nzulínu
TCN2	Transkobalamín 2 deficiencia	AR	Mentálne postihnutie
EFL1	Syndróm typu Shwachman-Diamond	AR	-
CLPB	Metylglytakonická acidúria	AR	Neurovývojové poruchy, katarakta, IUGR
CEBPE	Deficiencia špecifických granúl	AR	-
SMARCD2	Deficiencia špecifických granúl 2	AR	Vývojové poruchy
RMRP	Hypoplázia vlasov a chrupky	AR	Krátke končatiny, jemné a riedke vlasy
GINS1	GINS1 deficiencia	AR	IUGR
MTHFD1	MTHFD1 deficiencia	AR	Záchvaty, postihnutie intelektu
PSTPIP1	PAMI	AD	Hepatosplenomegália, neprosperovanie
WDR1	WDR1 deficiencia	AR	Zlé hojenie rán, závažná stomatitída
MKL1	MKL1 deficiencia	AR	-
PGM3	PGM3 deficiencia	AR	Nízky vzrast, brachydaktília
IVD	Izovalerická acidémia	AR	Acidóza, ketóza
MMUT	Metylmalonická acidúria	AR	Závažná metabolická dekompenzácia, poškodenie kostrových svalov a pečene
PCCA	Propionikacidémia	AR	
PCCB	Propionikacidémia	AR	
GATA1	Anémia s neutropéniou a bez nej	XR	-
DNM2	Charcotov-Marieho-Toothov syndróm s neutropéniou	AD	Centronukleárna myopatia
MGCA8	3-metylglytakonická acidúria	AR	Hypotónia, respiračná nedostatočnosť
LMBRD1	Metylmalonová acidúria a homocystinúria	AR	Vývojové zaostávanie
mtDNA _{del}	Pearsonov syndróm	mt	Exokrinná pankreatická insuficiencia
AK2	AK2 deficiencia	AR	Hluchota
RAC2	Aktivovaný RAC2 defekt	AD	-
CD40LG	CD40LG deficiencia	XR	Hepatitída, periférne neuroektodermálne tumory
CD40	CD40 deficiencia	AR	-
ICOSLG	ICOSL deficiencia	AR	-
STK4	STK4 deficiencia	AR	Vrodené poruchy srdca
MSN	Moezínová deficiencia	XR	-
TFRC	TFRC deficiencia	AR	-
TNFSF12	TWEAK deficiencia	AD	-
IRAK4	IRAK4 deficiencia	AR	-
MYD88	MyD88 deficiencia	AR	-
SEC61A1	Tubulointerstitial kidney disease	AD	Chronické ochorenie obličiek, IUGR

ZLYHANIA KOSTNEJ DRENE

FANCA, FANCB, FANCC, BRCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, XRCC9, FANCI, BRIP1, FANCL, FANCM, PALB2, RAD51C, SLX4, ERCC4, RAD51, BRCA1, UBE2T, XRCC2, MAD2L2, RFW3, SAMD9	Fanconiho anémia typ A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, O, P, Q, R, S, T, U, V, W	AD, AR, XR	Nízky vzrast, hyper/hypopigmentácia, faciálny dysmorfizmus, srdcové anomálie, CNS anomálie
DKC1, TERC, TERT, TIN2, RTEL1, ACD, NOLA2, NOLA3, WRAP53, PARN, ACD	Dyskeratosis congenital	AD, AR, XR	Dystrofia nechytov, abnormality kožnej pigmentácie, orálna leukoplakia, pulmonálna fibróza, vaskulárne abnormality
SAMD9L	Ataxia pancytopénia syndróm	AD	Neurologické zmeny
SAMD9	MIRAGE	AD	IUGR, gonadálne abnormality

AD – autozomálne dominantná dedičnosť, AR – autozomálne recesívna dedičnosť, XR – X-viazaná recesívna dedičnosť, IUGR – retardácia intrauterinného rastu

mutácií v tomto géne⁽⁸⁾ a každý rok pribúdajú nové varianty vrátane variantov vo forme mozaiky⁽⁹⁾. Ďalším z asociovaných génov je *HAX1*, ktorého mutácie spôsobujú vznik autozomálne recesívnej formy SCN, nazývanej aj Kostmannov syndróm, ktorý bol prvýkrát zaznamenaný u švédskej konsangvinačnej rodiny⁽¹⁰⁾. Aj keď je výskyt zriedkavého Kostmannovho syndrómu častejší u pacientov z konsangvinačných rodín, nie je na ne obmedzený a jeho incidencia je vzhľadom na autozomálne recesívny charakter a rôznu frekvenciu *HAX1* mutácií geograficky a etnicky závislá. V populáciách s vyššou mierou konsangvinačných manželstiev môžu byť *HAX1* varianty zodpovedné dokonca za viac SCN prípadov ako *ELANE*. Mutácie v iných génoch sú vo vzťahu k vzniku izolovanej kongenitálnej neutropénie identifikované vo výrazne menšej miere (**obrázok 1**). Navyše gény, ktorých varianty spôsobujú rôzne mierne alebo adultné formy ochorenia, ako je napríklad adultná neutropénia s monocytózou⁽¹¹⁾,

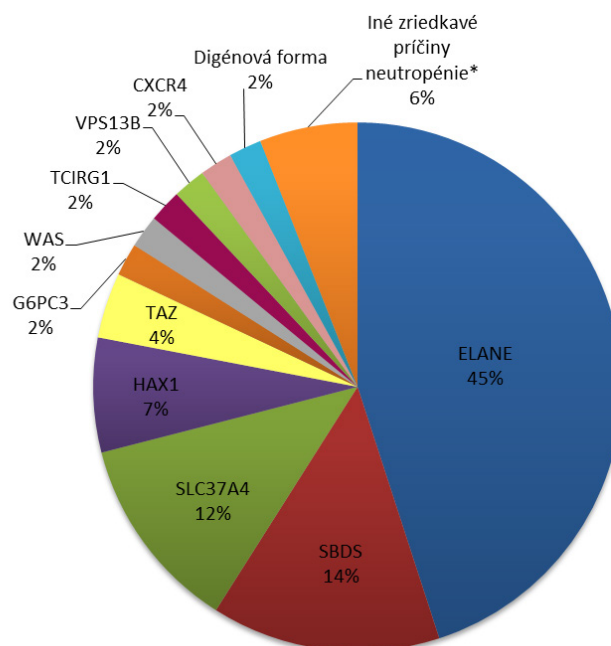
znižujú záchytnosť samotného ochorenia a tým aj možnosť identifikácie molekulárnej príčiny.

Syndrómové neutropénie sú ochorenia spojené s poruchami metabolizmu, vezikulového transportu, imunologických funkcií či s ribozómovou dysfunkciou, ktorých spoločným prejavom je neutropénia⁽¹²⁾. Ide o monogénovo podmienené syndrómy s rôznym typom dedičnosti a ich vznik je spájaný s variantmi vo viac ako 30 rôznych génoch (**tabuľka 1**). Najčastejšie sa vyskytujúcou syndrómovou neutropéniou je Shwachmanov-Diamondov syndróm (SDS), multiorgánové ochorenie spôsobené variantmi v géne *SBDS*. Varianty v tomto géne sú zároveň po mutáciách v géne *ELANE* druhou najčastejšou príčinou závažnej kongenitálnej neutropénie (izolovanej i syndrómovej) a sú zodpovedné za 14 % ťažkých vrodených neutropénií (**obrázok 1**)⁽¹³⁾. Vznik závažnej vrodenej neutropénie je výrazne spájaný aj s variantmi v géne *SLC37A4* spôsobujúcimi vznik glykogenózy⁽¹⁴⁾, variantmi v *TAZ* spôsobujúcimi vznik Barthovho syndrómu či variantmi

Obrázok 1. Gény asociované so vznikom SCN, prevzaté a upravené⁽¹³⁾

Dáta 650 pacientov s SCN registrovaných v SCNIR registri z Európy a zo Severnej Ameriky

*Mutácie v *JAGN1*, *LAMTOR2*, *GFI1*, *LYST*, *USB1* alebo mutácie v mitochondriálnej DNA



v géne *CXCR4* asociovanými so vznikom syndrómu WHIM. Ostatné syndrómové poruchy s prejavmi SCN sú menej časté a predstavujú len malú časť vrodených neutropénií⁽¹³⁾. Rovnako je to pri neutropéniách pozorovaných pri iných imunodeficienciách, ktoré spoločne so zlyhaniami kostnej drene, ako je Fanconioho anémia či Dyskeratosis congenita⁽¹⁵⁾, prispievajú k celkovému počtu neutropénií iba minimálne. Aj keď je doposiaľ známych viac ako 50 génov asociovaných so vznikom niektorej z foriem SCN, pre väčšinu platí, že ich mutácie sú veľmi zriedkavé⁽⁵⁾.

Molekulárna diagnostika

Genetické testovanie s identifikáciou kauzálneho variantu by malo byť štandardnou stratégiou u pacientov s neutropéniou, keďže identifikácia génu môže napríklad predikovať reakciu na terapiu faktorom stimulujúcim kolónie granulocytov (G-CSF) aj identifikovať pacientov s rizikom zlyhania kostnej drene, predispozíciou na vznik AML, MDS alebo vzácnej akútnej lymfoblastickej leukémie⁽⁶⁾. Molekulárna diagnostika je čoraz dôležitejšia aj vzhľadom na rýchle napredovanie prístupov gébovej terapie, a to obzvlášť pri ochoreniach imunitného systému. Wiskottov-Aldrichov syndróm je jedno z ochorení, kde je génová terapia už v štádiu klinického testovania a úspešne bola podaná viacerým pacientom⁽¹⁶⁾.

Identifikácia kauzálneho géboveho variantu zodpovedného za vznik neutropénie je komplexný proces, kde prvotné zhodnotenie leží na klinickej diagnostike, pri ktorej je potrebné vylúčenie získanej formy ochorenia. Prístup Sangerovho sekvenovania je využiteľný v prípade izolovanej alebo cyklickej neutropénie, pri ktorej je predpoklad prítomnosti variantov v géne *ELANE*⁽¹³⁾. V prípade potvrdenej cyklickej formy SCN je kandidátnym génom *GFI1*⁽¹¹⁾, sekvenovanie kandidátneho génu *HAX1* je možné najmä v prípade konsanguinity rodičov. Ak je neutropénia súčasťou syndrómu, identifikácia príčiny sa často opiera o ostatné symptómy, ktoré sú typické pre dané ochorenie. Ani prítomnosť extrahematologických znakov však nemusí vždy jednoznačne ukazovať na konkrétny syndróm a rozsiahle testovanie viacerých génov Sangerovým sekvenovaním je časovo a finančne neefektívne, pričom pacient často zostáva bez genetickej diagnózy. Aj z nášho pozorovania môžeme povedať, že priame sekvenovanie je účinné len u pacientov s mutáciou v géne *ELANE*. Dokonca ani u pacientov s fenotypom špecifického syndrómu, napríklad klinicky diagnostikovaným Shwachmanovým-Diamondovým syndrómom, často nedochádza k identifikácii molekulárnej príčiny ochorenia. Pomocou Sangerovho sekvenovania zároveň nemožno odhaliť variácie počtu kópií (CNV, copy number variant) a delécie na úrovni exónov či celého génu.

Panel, exóm či genóm?

Sangerovo sekvenovanie je pri takýchto geneticky rôznych ochoreniach neúčinné a v diagnostickom procese sa čoraz častejšie pristupuje k technikám masívneho paralelného sekvenovania novej generácie vo forme gébových panelov, celoexómového (WES, whole exome sequencing) alebo celogenómového (WGS, whole genome sequencing) sekve-

novania. Génové panely sa zameriavajú na známe gény spájané so vznikom izolovanej a syndrómovej SCN aj na gény asociované so vznikom AML a MDS⁽¹³⁾. V porovnaní s WES alebo WGS prístupmi panelové testovanie redukuje náhodné nálezy, poskytujú lepšie pokrytie a výhodou je i ľahšia interpretácia výsledkov a nižšia cena⁽¹⁷⁾. Na druhej strane panely génov vyžadujú častú aktualizáciu vzhľadom na neustále pribúdajúce poznatky o nových kauzálnych génoch. Len za posledné štyri roky bolo vďaka NGS prístupom identifikovaných viacero nových génov (*EFL1*, *HYOU1*, *SRP54*, *SMARCD2*) asociovaných so vznikom SCN a môžeme predpokladať, že ich počet bude narastať aj v budúcnosti^(4,18). Väčšina komerčne dostupných panelov neposkytuje sekvenovanie viac ako 30 génov (Invitae Corporation, PreventionGenetics, Blueprint Genetics Oy., Fulgent Genetics a iné), a preto cieľové sekvenovanie nemusí odhaliť príčinu ochorenia až u 40 % pacientov⁽⁴⁾, pričom toto číslo môže byť vyššie v prípade, že panelové sekvenovanie sa vykoná len u *ELANE* negatívnych pacientov. V súčasnosti však chýba dostatok štúdií, ktoré by porovnávali diagnostickú účinnosť panelového sekvenovania a jednotlivých panelov u pacientov s neutropéniou.

Z hľadiska identifikácie kauzálneho variantu, ako aj identifikácie nových génov asociovaných s SCN je najlepšou voľbou prístup WES alebo WGS. Tie sa v súčasnosti využívajú najmä na výskumné účely, ale postupne si hľadajú cestu aj do bežného diagnostického procesu. V diagnostike vrodených porúch imunity môžu dané prístupy dosahovať diagnostickú účinnosť od 10 až po takmer 90 %^(19,20). WGS poskytuje uniformné pokrytie genómu so všetkými kódujúcimi i regulačnými sekvenciami, intragébovými regiónmi aj identifikáciu CNV, ale za vyššiu cenu a celkovo zvýšenú náročnosť analýzy. WES predstavuje akýsi kompromis medzi panelovým sekvenovaním a WGS a jeho použitie na začiatku diagnostického procesu môže strojnásobiť počet pacientov s molekulárnou diagnózou za tretinu celkových nákladov⁽²¹⁾. WES však nemusí zabezpečiť postačujúce pokrytie všetkých požadovaných sekvencií a interpretácia jednotlivých detegovaných variantov, najmä variantov nejistej signifikancie, je v súčasnosti stále výzvou. Interpretáciu variantov získaných pomocou NGS výrazne zjednodušuje trio sekvenovanie probanda a oboch rodičov, najčastejšie vo forme WES, ktoré umožňuje sledovať dedičnosť variantov od bezpríznakových rodičov a najmä vznik *de novo* variantov⁽¹⁵⁾. Trio sekvenovanie však značne zvyšuje cenu diagnostického procesu. Na zhodnotenie efektivity jednotlivých prístupov v molekulárnej diagnostike neutropénie v súčasnosti nie je dostatok štúdií, čo je spôsobené nízkou incidenciou ochorenia a teda malým počtom pacientov. Dôležité však je ku každému pacientovi pristupovať individuálne, a zároveň tak, aby bola zachovaná vysoká diagnostická účinnosť pri súčasne efektívne využitých zdrojoch.

Podakovanie

Práca bola finančne podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 1/0190/19) a Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky (MZSR_2018/46-SAV-5).

LITERATÚRA

1. Hartman P, Beckman K, Silverstein K, et al. Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. *Mol Genet Metab Reports*. 2019;19:100464.
2. Arceci RJ, Hann IM, Smith OP, et al. *Pediatric Hematology*. Blackwell Publishing Ltd; 2006.
3. Donadieu J, Beaupain B, Mahlaoui N, Bellanné-Chantelot C. Epidemiology of Congenital Neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(1):1-17.
4. Donadieu J, Beaupain B, Fenneteau O, Bellanné-Chantelot C. Congenital neutropenia in the era of genomics: classification, diagnosis, and natural history. *Br J Haematol*. 2017;179(4):557-574.
5. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020;40(1):24-64.
6. Mehta HM, Malandra M, Corey SJ. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J Immunol*. 2015;195(4):1341-1349.
7. Dale DC, Bolyard AA, Aprikyan A. Cyclic neutropenia. *Semin Hematol*. 2002;39(2):89-94.
8. Germeshausen M, Deerberg S, Peter Y, Reimer C, Kratz CP, Ballmaier M. The Spectrum of ELANE Mutations and their Implications in Severe Congenital and Cyclic Neutropenia. *Hum Mutat*. 2013;34(6):905-914.
9. Liu Q, Zhang L, Shu Z, et al. Two paternal mosaicism of mutation in ELANE causing severe congenital neutropenia exhibit normal neutrophil morphology and ROS production. *Clin Immunol*. 2019;203:53-58.
10. Kostmann R. Infantile Genetic Agranulocytosis (Agranulocytosis infantilis hereditaria) A New Recessive Lethal Disease in Man. *Acta Paediatr*. 1956;45(3):309-310.
11. Armistead PM, Wieder E, Akande O, et al. correspondence: Cyclic neutropenia associated with T cell immunity to granulocyte proteases and a double de novo mutation in GF11, a transcriptional regulator of ELANE. *Br J Haematol*. 2010;150(6):716-719.
12. Boxer LA, Newburger PE. A molecular classification of congenital neutropenia syndromes. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(5):609-614.
13. Skokowa J, Dale DC, Touw IP, et al. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17032.
14. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase/glucose-6-phosphate transporter complexes. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(3):511-519.
15. Furutani E, Newburger PE, Shimamura A. Neutropenia in the age of genetic testing: Advances and challenges. *Am J Hematol*. 2019;94(3):384-393.
16. Ferrua F, Marangoni F, Aiuti A, et al. Paradigms and perspectives Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: History, new vectors, future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146:262-265.
17. Bean LJH, Funke B, Carlston CM, et al. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report—a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2020;22(3):453-461.
18. Carapito R, Konantz M, Paillard C, et al. Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. *J Clin Invest*. 2017;127(11):4090-4103.
19. Al-Herz W, Chou J, Delmonte OM, et al. Comprehensive genetic results for primary immunodeficiency disorders in a highly consanguineous population. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):3146.
20. Chinn IK, Orange JS. A 2020 update on the use of genetic testing for patients with primary immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol*. 2020;16(9):897-909.
21. Stark Z, Schofield D, Alam K, et al. Prospective comparison of the cost-effectiveness of clinical whole-exome sequencing with that of usual care overwhelmingly supports early use and reimbursement. *Genet Med*. 2017;19(8):867-874.



Mgr. Veronika Medová

Ústav klinického a translačného výskumu,
Biomedicínske centrum SAV, Bratislava
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava
e-mail: veronika.medova@savba.sk

KOMPLEXNÝ SORTIMENT

PRÍSTROJOV, DIAGNOSTICKÝCH
SÚPRAV A SPOTREBNÉHO MATERIÁLU

PRE VAŠE LABORATÓRIUM



 **DYNEX**

Nové Kalište 17, 974 04 Banská Bystrica
tel.: 048 41 550 45, fax: 048 41 550 56

www.dynex.cz
email: dynex@isternet.sk

Nocardia transvalensis ako pôvodca multilokulárneho abscesu mozgu u imunokompetentného pacienta

Miriama Babelová¹, Adrián Kiss², Dávid Toma², Andrej Šteňo², Juraj Mišovič³, Miroslav Böhmer⁴, Tomáš Szemes⁵

¹Medirex, a. s., Bratislava

²Comenius University in Bratislava, Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery

³Neurochirurgická klinika FNsP Nové Zámky

⁴Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave

⁵Geneton Ltd., Vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Absces mozgu je hnisavé ložisko v mozgovom parenchýme, v ktorom došlo k centrálnej nekróze. Mozgový absces môže vzniknúť priamym prestupom infekcie pri zápale okolitých štruktúr (sínusitída, mastoiditída, tromboflebitída, osteomyelitída kostí lebky), hematogénnym rozsevom z iného primárneho ložiska (infekčná endokarditída, pneumónia), po úraze, neurochirurgickom výkone. Najčastejšie je absces mozgu spôsobený streptokokmi, anaeróbnymi baktériami, enterobaktériami a stafylokokmi. Klinický obraz je rôznorodý. Rozhodujúce pre stanovenie diagnózy sú zobrazovacie vyšetrenia ako počítačová tomografia (CT) a magnetická rezonancia (MR). Terapia spočíva v dlhodobom podávaní antibiotík, symptomatickej liečbe a neurochirurgickej intervencii. V kazuistike opisujeme prípad 73-ročného pacienta s abscesom mozgu spôsobeného raritným mikroorganizmom *Nocardia transvalensis*.

Kľúčové slová: absces mozgu, *Nocardia transvalensis*

Nocardia transvalensis as an agent causing multifocal cerebral abscess in an immunocompromised patient

The cerebral abscess is a purulent pocket of infection in the cerebral parenchyma, in which the central necrosis occurred. The cerebral abscess can originate through penetration of the infection at the inflammation of the surrounding structures (sinusitis, mastoiditis, thrombophlebitis, osteomyelitis of the cranial bones), hematogenic dissemination from another primary locus (infectious endocarditis, pneumonia), after injury, neurosurgical performance. Most frequently the cerebral abscess is caused by streptococci, anaerobic bacteria, enterobacteria and staphylococci. The clinical picture is variable. For diagnosis detection the imaging examinations as computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) are decisive. The therapy consists of the long-term administration of antibiotics, symptomatic treatment, and neurosurgical intervention. Our case study describes a 73-year-old patient with a cerebral abscess caused by rare microorganism *Nocardia transvalensis*.

Keywords: Cerebral abscess, *Nocardia transvalensis*

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 38 – 42

Úvod

Absces mozgu spôsobený *Nocardia spp.* je pôvodcom približne 1-2 % zo všetkých abscesov mozgu⁽¹⁾. Častejšie sa vyskytuje u imunosuprimovaných pacientov ako oportúna infekcia. Jeho výskyt však nie je vylúčený ani u imunokompetentných osôb. U imonosuprimovaných pacientov úmrtnosť dosahuje 55 % a u imunokompetentných pacientov 20 %, z tohto dôvodu je nevyhnutná rýchla a presná diagnostika a cieleňá terapia⁽²⁾.

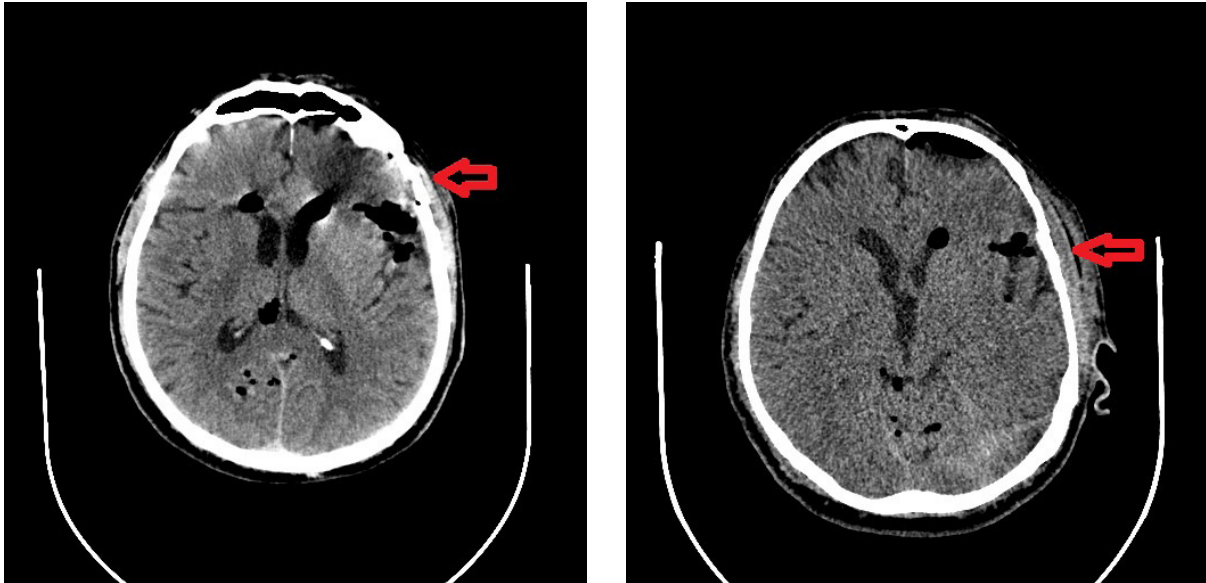
Kazuistika

73-ročný pacient s anamnézou arteriálnej hypertenzie, diabetu mellitu 2. typu liečený perorálnymi antidiabetikami, bol prijatý na Neurochirurgickú kliniku LFUK a UNB s diagnózou multilokulárneho abscesu mozgu parieto-tempo-

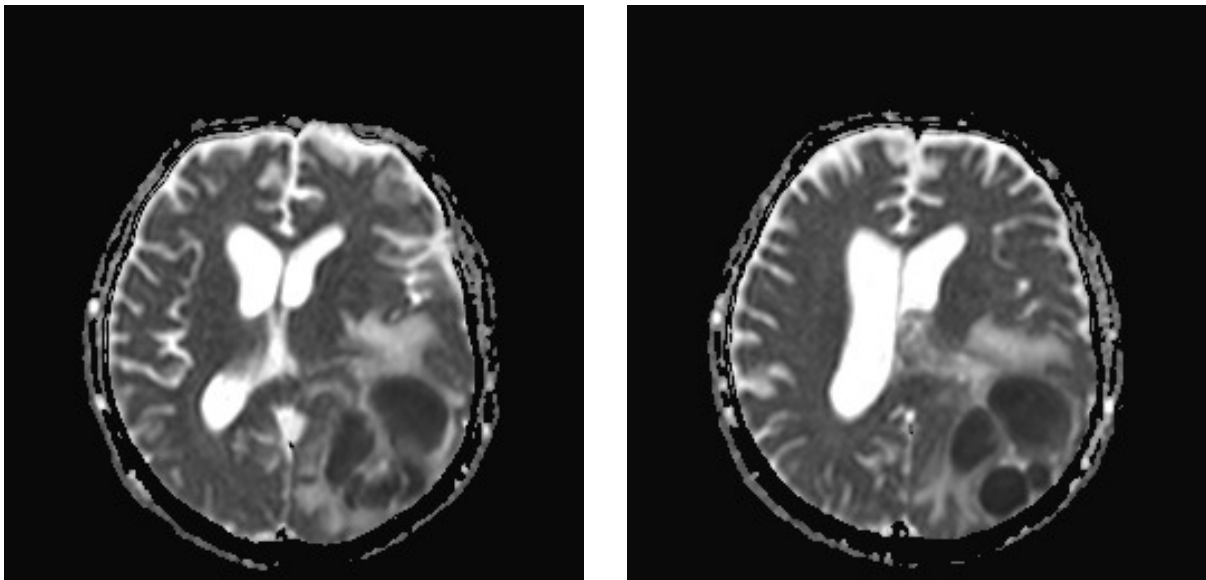
ro-okcipitálne vľavo. V predchorobí v júni 2019 absolvoval neurochirurgický výkon, ktorý bol indikovaný pre impresívnu fraktúru kalvy vľavo po páde z bicykla. Výkon prebehol bez komplikácií, fraktúra bola reponovaná a fixovaná mikrodlahami (**obrázok 1**).

Pooperačný priebeh a opakované kontroly neurológom boli vyhovujúce. Pacient bol orientovaný, reč bola zreteľne artikulovaná, bola zistená len lézia nervus abducens a porucha konjugovaného pohľadu. V októbri 2019 bol pacient hospitalizovaný na gerontopsychiatrickom oddelení pre pokus o suicídium. Podľa údajov bol pacient posledný mesiac dezorientovaný, depresívne ladený s poruchou pamäti. Počas hospitalizácie boli u pacienta zaznamenané febrility, zvýšené zápalové parametre (leukocytóza, C-reaktívny proteín). Pre zmenený neurologický status prebehla konzultácia s ne-

Obrázok 1. Vľavo impresívna fraktúra kalvy vľavo. Vpravo reponovaná fraktúra kalvy vľavo



Obrázok 2. Nález laločnatej multicystoidnej formácie parieto-temporo-okcipitálne vľavo na magnetickej rezonancii

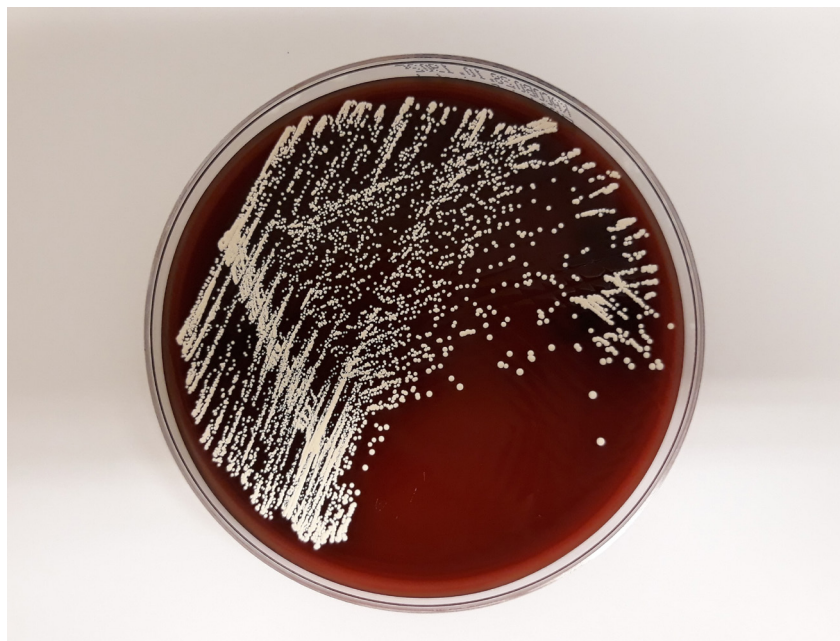
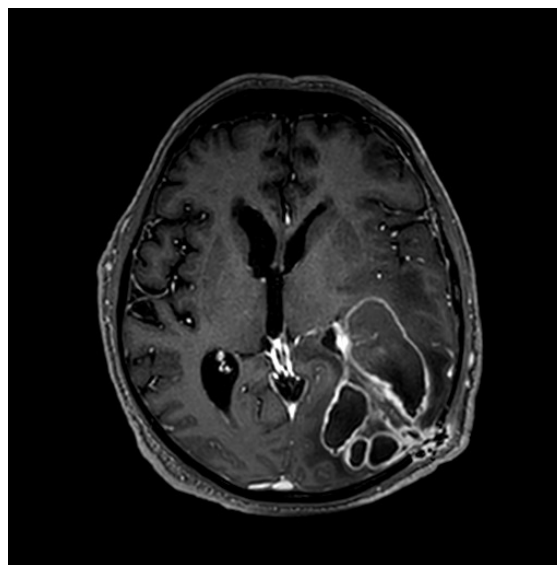
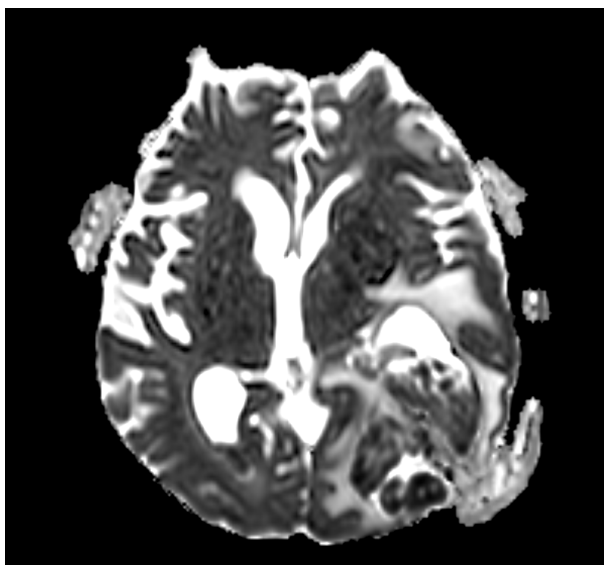


urológom, ktorý indikoval CT mozgu, na ktorom sa zobrazilo ložisko parieto-okcipitálne vľavo s perifokálnym edémom, možný glioblastóm. V rámci diferenciálnej diagnostiky bola doplnená MR mozgu, na ktorej sa zobrazila laločnatá multicystoidná formácia parieto-temporo-okcipitálne vľavo veľkosti 57 x 46 x 51 milimetrov s diskretnými hemorágiami na periférii, okolitou meningitídou, ventrikulitídou a s purulentným obsahom v oboch bočných komorách. Zároveň bol prítomný útlak komorového systému s presunom stredočiarových štruktúr doprava o 6 milimetrov (**obrázok 2**).

S týmto nálezom bol pacient v novembri 2019 preložený na Neurochirurgickú kliniku LFUK a UNB. Pri prijatí bol pacient pri vedomí, ale imobilný, nekomunikujúci, plne odkázaný na pomoc druhej osoby, objektívne boli prítomné meningeálne príznaky. Zo vstupných laboratórnych parametrov bola zaznamenaná iba leukocytóza ($19,41 \times 10^9$), ostatné parametre aj CRP boli v norme. Snímka pľúc bola bez patologického nálezu. Pacient absolvoval opakovanú trepanáciu

a evakuáciu abscesových dutín, z ktorých sa aspiráciou podarilo evakuovať približne 37,5 mililitra žltozeleného hnisavého obsahu. Bola začatá empirická kombinovaná antibiotická terapia (vankomycín + ceftriaxon) a symptomatická liečba. Zo vzoriek hnisu, ktoré boli zaslané na kultivačné vyšetrenie do nášho mikrobiologického laboratória, sme na 3. deň izolovali drobné biele kolónie, rastúce ako poprašok na krvnom agare (**obrázok 3**).

Kmeň bol identifikovaný metódou hmotnostnej spektrometrie ako *Nocardia spp.* (MALDI – TOF, Bruker, Nemecko) a následne bližšie identifikovaný molekulárnogenetickými metódami, a to sekvenáciou génu kódujúceho 16S rRNA použitím primerov 27F a 1492R ako *Nocardia transvalensis*. Citlivosť na vybrané antibiotiká podľa literatúry bola stanovená diskovou difúznou metódou. Keďže neexistujú interpretačné kritériá na hodnotenie citlivosti na antibiotiká podľa normy EUCAST (European committee on antimicrobial susceptibility testing), citlivosť bola stanovená orientačne na základe

Obrázok 3. Rast *Nocardia transvalensis* na Columbia krvnom agare (foto autor)**Obrázok 4.** Nález po opakovaných evakuáciách abscesu parieto-temporo-okcipitálne vľavo na magnetickej rezonancii

veľkosti inhibičných zón. Testovaný kmeň bol orientačne citlivý na cefotaxím, ceftriaxon, meropeném, ciprofloxacín a linezolid. Ale proti trimetoprim-sulfametoxazolu, ktorý je v literatúre uvádzaný ako liek voľby abscesov mozgu spôsobených *Nocardia spp.*⁽⁷⁾, bol vykultivovaný kmeň rezistentný. Antibiotická liečba bola upravená podľa orientačnej citlivosti na meropeném a linezolid. Na kontrolnej MR mozgu bol nález len miernej regresie abscesových ložísk so zakrvácaním subakútneho charakteru, pretrvávalo rezíduum cystoidnej laločnatej formácie s perifokálnym edémom a miernou regresiou expanzívnych prejavov (**obrázok 4**).

U pacienta nastalo prechodné celkové zlepšenie stavu vedomia, snažil sa komunikovať, vyhovel požiadavkám, bol orientovaný osobou. Ďalšia neurochirurgická intervencia nebola indikovaná. Pacient bol preložený na interné oddelenie, na ktorom sa pokračovalo v podávaní intravenózneho antibio-

tickej liečby. Napriek komplexnej liečbe stav pacienta postupne progredoval a približne mesiac od izolácie *Nocardia transvalensis* z abscesu mozgu pacient zomrel. Ako príčina smrti bolo uvedené kardiorespiračné zlyhanie.

Diskusia

Nocardia spp. sú striktne aeróbne, grampozitívne až gramlabilné vetviace sa paličky. V minulosti boli nokardie pre tvorbu hýf považované za huby⁽³⁾. Morfologicky sa podobajú anaeróbnemu rodu *Actinomyces*, a preto sú označované ako aeróbne aktinomycéty⁽⁴⁾. Na rozdiel od aktinomycét sú čiastočne acidorezistentné. Pri farbení metódou podľa Grama sa nokardie javia ako gramnegatívne s grampozitívnymi granulami (**obrázok 5**)⁽⁵⁾.

Nocardia spp. rastú na bežných kultivačných pôdach po troch až piatich dňoch. Na krvnom agare tvoria kolónie v po-

Obrázok 5. Preparát *Nocardia transvalensis* farbený metódou podľa Grama (foto autor)

dobe bieleho alebo zamatového poprašku, pevne lipnúceho na agar. Pre tento rod je jedinečná prítomnosť aerálnych hýf a už spomínaná acidorezistencia⁽³⁾. Nokardie patria medzi oportúnne patogénne baktérie. Zdrojom infekcie je pôda alebo voda⁽⁵⁾. Ochorenie sa šíri respiračnou cestou, cez poranenia alebo sekundárne hematogénnym rozsevom. Nebol dokázaný medzilidský prenos ani prenos zo zvierat na človeka. Pravdepodobný zdroj infekcie u prezentovaného pacienta bol predchádzajúci úraz hlavy a kontaminácia rany pôdou. Infekcie spôsobujú najčastejšie tri druhy nokardií: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides complex* a *Nocardia caviae*. Infekcie sa vo viac ako 90 % vyskytujú u imunosuprimovaných pacientov (onkologickí, HIV pozitívni, pacienti po transplantácii) alebo u pacientov liečených imunosupresívami⁽⁶⁾.

Nokardióza je exogénna, akútna, subakútna alebo chronická infekcia s tendenciou k remisiám a exacerbáciám. Klinické prejavy sú nešpecifické a zahŕňajú horúčku a orgánové príznaky podľa toho, kde je infekcia lokalizovaná. Najčastejšie dochádza k pľúcnemu poškodeniu, môže však postihnúť ktorýkoľvek orgán, v ktorom *Nocardia spp.* vyvoláva tvorbu abscesov⁽⁷⁾.

Pri systémovej infekcii spôsobenej *Nocardia spp.* dochádza až v 45 % k tvorbe abscesov v mozgu. V 40 % je prítomný len absces mozgu, bez postihnutia iných orgánov. Pri infekciách centrálného nervového systému bola opísaná aj meningitída a postihnutie miechy⁽⁸⁾. Klinický obraz abscesu mozgu sa prejavuje ložiskovými neurologickými príznakmi v závislosti od lokalizácie, menej často febrilitami, bolesťami hlavy, vracaním, poruchou vedomia. Základom laboratórnej mikrobiologickej diagnostiky je mikroskopia a kultivácia hnisu z abscesových ložísk, zo vzoriek tkaniva, prípadne histologické vyšetrenie bioptického materiálu. Prítomnosť nokardií vo vyšetrovaných vzorkách môžu potvrdiť aj genetické metódy (PCR)⁽⁷⁾. Lumbálna punkcia je u pacientov s abscesom mozgu kontraindikovaná, pretože ako komplikácia môže vzniknúť herniácia mozgu. Zobrazovacími vyšetreniami môže absces mozgu imitovať nádorový proces, cievnu mozgovú príhodu,

vaskulitídu⁽⁸⁾. V 38 % sa môže vyskytovať aj viacpočetný absces mozgu, pri ktorom úmrtnosť dosahuje až 66 %⁽⁹⁾. Najčastejšie absces mozgu spôsobuje *N. farcinica*, ktorá patrí medzi virulentnejšie druhy, častejšie spôsobuje disemináciu a relaps ochorenia, je rezistentnejšia proti antibiotikám v porovnaní s ostatnými druhmi^(6,10). Vo všeobecnosti liekom voľby nokardiózy je trimetoprim-sulfametoxazol, ku ktorému sa pridávajú cefalosporíny 3. generácie alebo imipiném. Podľa literatúry možno použiť aj iné antibiotiká, a to linezolid, tobramycín, amikacín, tetracyklín, amoxicilín klavulanátu⁽⁸⁾. Pri abscesoch väčších ako 2,5 cm sa odporúča aspirácia a drenáž. Ako účinnejší postup sa uplatňuje kraniotómia a excízia celého abscesu, a to hlavne v prípade, ak zlyháva antibiotická liečba⁽²⁾. Keďže ide o pomaly rastúce mikroorganizmy, odporúča sa dlhodobá antibiotická liečba, ktorá trvá od 6 do 12 mesiacov⁽⁵⁾.

N. transvalensis je raritný pôvodca ochorení. Podieľa sa na infekciách pľúc u pacientov s cystickou fibrózou, spôsobuje keratitídu, absces mozgu. *N. transvalensis* sa odlišuje prirodzenou rezistenciou proti aminoglykozidom a variabilnou citlivosťou na cefalosporíny 3. generácie, imipeném, trimetoprim-sulfametoxazol a linezolid⁽¹¹⁾. Stanovenie citlivosti na antibiotiká kmeňa vykultivovaného v našom laboratóriu pomocou diskovej difúznej metódy bolo iba orientačné. Vhodnejšie a presnejšie metódy na stanovenie citlivosti na antibiotiká sú pomocou E-testov alebo dilučnou metódou. V našom laboratóriu však citlivosť dilučnými metódami pre náročnosť nevykonávame. V literatúre je uvedené hodnotenie citlivosti *Nocardia spp.* na antibiotiká, ktorú vypracovala americká norma CLSI (Clinical & Laboratory standards institute) pomocou E-testov⁽¹²⁾. Nie všetky E-testy máme v našom laboratóriu dostupné, preto sme sa rozhodli stanoviť aspoň orientačnú citlivosť na antibiotiká pomocou difúznej diskovej citlivosti.

Záver

Absces mozgu spôsobený *Nocardia spp.* je vzácne a závažné ochorenie. Rozvíja sa pomaly, niekedy niekoľko mesiacov až rokov, čo sťažuje včasnú diagnostiku⁽¹³⁾. Incidencia výskytu infekcií spôsobených *Nocardia spp.* sa podľa literatúry zvyšuje aj v dôsledku nárastu pacientov po transplantácii solídnych orgánov a pacientov užívajúcich dlhodobu imunosupresívnu liečbu⁽⁸⁾.

Cieľom článku bolo poukázať na možnosť výskytu raritného patogénu, ktorého diagnostika sa pomocou moderných techník neustále zlepšuje. Zároveň poukazujeme na nutnosť

diferenciálnej diagnostiky. Na CT mozgu bol prvotne nález postkontrastne sa vysycujúceho multilokulárneho ložiska, sýtiaceho sa na periférii a centrálnne hypodenzného pripomínajúceho tumor. Doplnená MR mozgu odhalila, že išlo o patologickú laločnatú multicystoidnú formáciu, v MR obraze atribútov abscesovej kolekcie. Empirickú antibiotickú liečbu je vhodné upraviť podľa výsledkov citlivosti na antibiotiká. Kmeň *Nocardia transvalensis* v uvádzanej kazuistike bol rezistentný proti lieku voľby trimetoprimu-sulfametoxazolu. Vzhľadom na možnosť relapsov sa odporúča pokračovať v dlhodobom podávaní antibiotík.

LITERATÚRA

1. Kim S, Lee KL, Lee DM, et al. Nocardia brain abscess in an immunocompetent patient. *Infect Chemother* 2014; 46:45–49.
2. Mamelak AN, Obana WG, Flaherty JF, et al. Nocardial brain abscess: treatment strategies and factors influencing outcome. *Neurosurgery* 1994; 35:622–631.
3. Murray, Rosenthal, Pfaller *Medical Microbiology*, Elsevier, 2016, 229-232 p.
4. Votava M. *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, 2006, 143-144p.
5. Liptáková A. a kol. *Lekárska mikrobiológia*, Herba, 2019, 329-331p.
6. Hamel Patel, Bijal Patel, Sonal Jadeja, Carmen Isache. Central nervous system nocardiosis masquerading as metastatic brain lesions. *ID-Cases* Volume 18, 2019, e00652
7. Beneš J. *Infekční lékařství*, Galén, 2010, 286p., 522-523p.
8. Martin Tamarit, Pedro Poveda, Manuel Barón, Jose Manuel Del Pozo. Four cases of nocardial brain abscess. *Surg Neurol Int.* 2012; 3: 88
9. Uneda A, Suzuki K, Okubo S, Hirashita K, Yunoki M, Yoshino K. Brain abscess caused by *Nocardia asiatica*. *Surg Neurol Int* 18-Jul-2016;7:74
10. Vinciguerra et al. *Nocardia farcinica* Multiple Brain Abscesses in an Immunocompetent Patient. *J Neuroinfect Dis* 2014, 6;3
11. Jorge García-Méndez, Erika M. Carrillo-Casas, et al. *Nocardia transvalensis* Disseminated infection in an immunocompromised patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Case Rep Infect Dis.* 2016; 2016: 3818969
12. Pan Zhao, Xiujuan Zhang, Pengcheng Du, et al. Susceptibility profiles of *Nocardia spp.* to antimicrobial and antituberculous agents detected by a microplate Alamar Blue assay. *Sci Rep.* 2017; 7: 43660
13. Lerner PI. Nocardiosis. *Clin Infect Dis.* 1996. 22: 891-903

MUDr. Miriama Babel'ová

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 821 06 Bratislava

e-mail: miriama.babelova@medirex.sk

Prostatický karcinóm s aberantnou expresiou p63. Kazuistika

Michal Zámečník^{1,2}, Matúš Chocholatý^{3,4}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava, Slovenská republika

²Agel, a. s., bioptické laboratórium, Nový Jičín, Česká republika

³Urologické oddelenie, Fakultná nemocnica, Trenčín, Slovenská republika

⁴Urologická ambulancia, Urowell, s. r. o., Trenčín, Slovenská republika

Prezentujeme prípad prostatického adenokarcinómu s aberantnou expresiou p63 (PKAE). Išlo o tumor prostaty u 79-ročného muža, ktorý bol pre zvýšené PSA indikovaný na biopsiu prostaty. Histologický nález v punkciách pravej strany prostaty ukázal PKAE, dobre diferencovaný, s Gleasonovým skóre 3 + 3. Tumor bol tvorený dobre definovanými acínmi, s ojedinelou „Paneth cell-like“ zmenou cytoplazmy. Imunohistochemicky vykazoval silnú difúznú expresiu p63 a MIB1-index 3 %. Veľmi ojedinelé bunky boli pozitívne na HMW-CK. CK5/6 bola kompletne negatívna. Expresia alpha-methylacyl-CoA racemázy (AMACR) bola pozorovaná v tretine buniek nádoru. Kontralaterálne bolo v jednom punktáte ložisko high-grade PIN, imunohistochemicky bez expresie p63 v luminálnych bunkách. Po histologickej diagnóze bol pacient sledovaný, pre eleváciu PSA na 13,54 bol podaný leuprorelín a je plánovaná rádioterapia. V kazuistike prezentujeme klinickopatologické znaky PKAE, ktorý predstavuje nový typ karcinómu, biologickými vlastnosťami odlišný od konvenčných karcinómov, a diskutujeme o nich.

Kľúčové slová: prostatický karcinóm s aberantnou expresiou p63, prostata, imunohistochemia, p63

Prostatic carcinoma with aberrant expression of p63. A case report

We report an unusual case of prostatic adenocarcinoma with aberrant expression of p63. In a 79-year-old man, a prostate needle biopsy was performed for elevated PSA (9.2 ng/mL). In four of five cores of the right side, a well-differentiated small acinar carcinoma with Gleason score 3+3 was found. The tumour contained well-formed acini with rare Paneth cell-like cytoplasm and a surprising strong diffuse expression of p63. It was positive for AMACR and its sporadic cells expressed HMW-CK. CK5/6 was negative. MIB1-index of the tumour was 3%. One needle sample from the contralateral side contained a small focus of high-grade PIN without p63 positivity in the luminal cells. Twelve months after the diagnosis, the patient is under active surveillance, and he is treated with leuprolide acetate. His PSA was elevated to 13.54 ng/mL, and currently, radiotherapy is planned. We discuss clinicopathologic features of this newly described carcinoma type which differs from common prostatic carcinomas.

Keywords: prostatic carcinoma with aberrant expression of p63, prostate, immunohistochemistry, p63

NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 43 – 46

Úvod

Tzv. karcinóm s aberantnou expresiou p63 (PKAE) je novodefinovaný typ adenokarcinómu prostaty⁽¹⁻⁶⁾. Kvôli expresii bazálneho markeru p63 a často aj blandnej morfológii predstavuje v prostatickej biopsii jeden z diagnostických pitfallov. Tumor sa líši od konvenčných adenokarcinómov aj biologickým správaním a jeho vydelenie ako osobitného typu je podľa nových poznatkov oprávnené^(2,7). V tejto kazuistike by sme radi prezentovali prípad PKAE z našej klinickej a biopatickej praxe.

Klinický popis

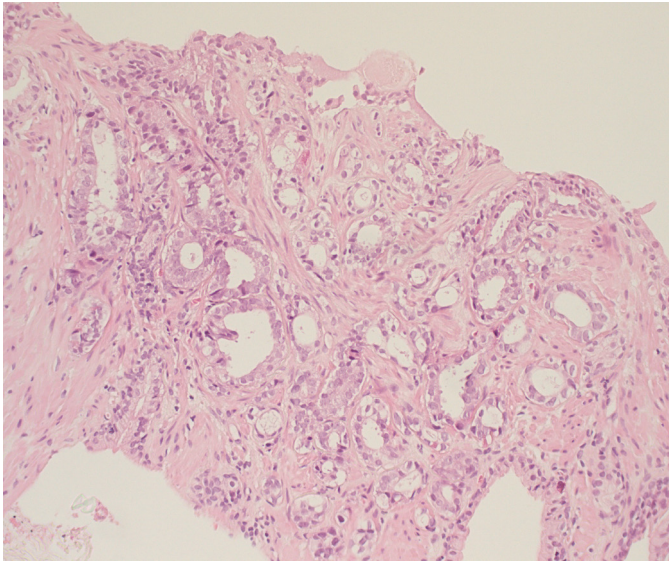
Išlo o 79-ročného muža, ktorý bol vyšetrený pre slabý prúd moču, prerušované močenie a nyktúrie. V osobnej anamnéze bola resekcia žalúdka pre adenokarcinóm difúzneho typu, stage II. Fyzikálny nález bol v norme, okrem zväčšenej

prostaty, ktorá však bola bez podozrenia na malignitu. Sonograficky bola prostata homogénna a mala 55 g. PSA bolo 9,2. Z toho dôvodu bola vykonaná punkčná biopsia prostaty. Po histologickej dg. PKAE sa pacient rozhodol pre aktívne sledovanie. V súčasnosti, rok po diagnóze, je pacient liečený leuprolidacetátom (Eligard) pre eleváciu PSA na 13,54 a je naplánovaná rádioterapia prostaty 6 mesiacov od začatia hormonálnej liečby.

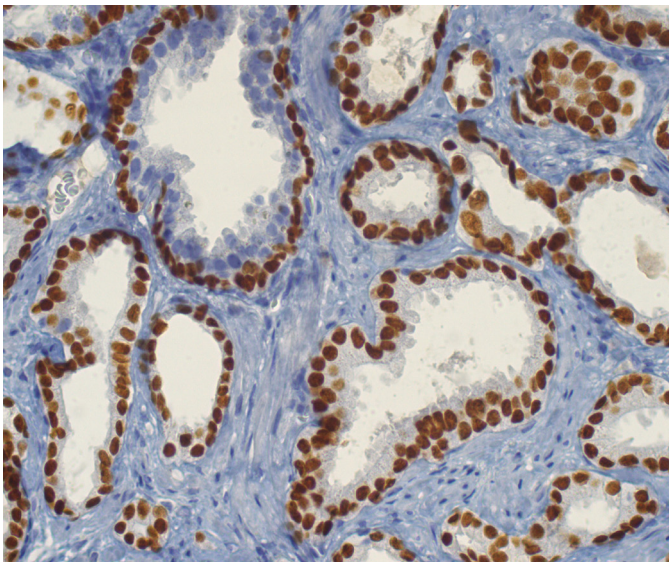
Histologický nález

Vyšetrili sme 10 punktátov prostaty (5 z pravej a 5 z ľavej strany). V štyroch punktátoch pravej strany bola prítomná maloacinarná infiltrácia tkaniva (**obrázok 1 a 2**). Acíny boli dobre definované, zväčša blandného alebo nízko atypického vzhľadu, s fokálne zreteľnými nukleolmi. Cytoplazma bola stredného až malého (pseudoatrofického) objemu. Vo veľmi

Obrázok 1. Infiltrácia dobre diferencovaným adenokarcinómom štruktúry Gleason 3.



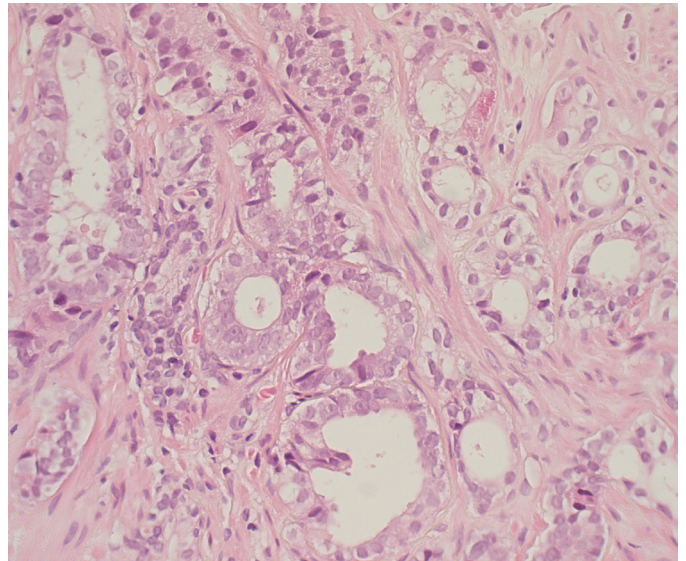
Obrázok 3. Silná expresia p63 v bunkách nádoru. Zachytená je aj jedna benígna žľazka s typickou p63 pozitívitou bazálnej vrstvy a negatívnou luminálnych buniek.



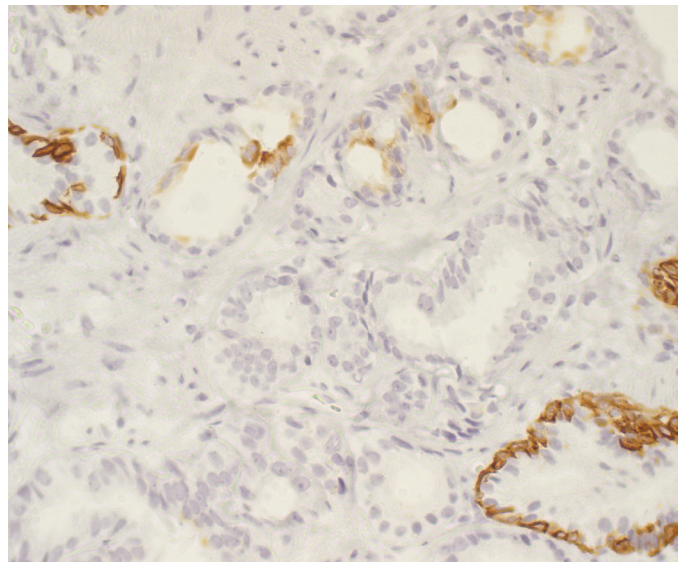
ojedinelých acínoch bola eozinofilná „Paneth cell-like“ zmena cytoplazmy. Mitotická aktivita bola minimálna. Inváziu perineuria a ciev sme nenašli. Presvedčivé štruktúry high-grade PIN na danej strane neboli prítomné. V jednom punktáte kontralaterálne bolo drobné ložisko high-grade PIN. V konvenčných hematoxylnovo-eozínových rezoch sme zvažovali najmä adenokarcinóm podobný atrofii, adenózu a mezenefrickú léziu.

Imunohistochemicky bol tumor prekvapivo veľmi silne pozitívny na marker bazálnych buniek p63 (DAK-p63, DAKO) (**obrázok 3**), pričom expresia sa viazala na všetky bunky acínov, t. j. nešlo o pozitívitu limitovanú len na bazálne uložené bunky. CK5/6 a HMW-CK (cytokeratín s vysokou molekulárnou hmotnosťou) boli bez expresie bazálnej vrstvy. HMW-CK označoval len veľmi ojedinelé luminálne bunky acínov (**obrázok 4**). Polovica buniek acínov bola pozitívna na alpha-methylacyl-CoA-racemázu (AMACR) (**obrázok 5**). Acíny boli silne pozitívne na PSA a NKX3. 1. Negatívne boli GATA3

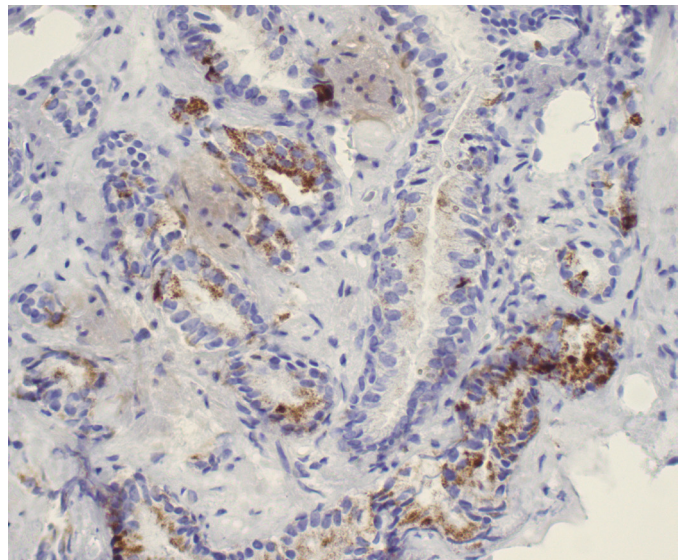
Obrázok 2. Pri väčšom zväčšení vidno cytologické známky karcinómu. Ide o časť punktátu s maximom atypie a nukleolárnej prominencie. Vpravo hore je bunka s eozinofilnou „Paneth cell-like“ cytoplazmou.



Obrázok 4. Ojedinelé bunky nádoru exprimujú HMW-CK. Pozitívnosť bazálnych buniek benígnych žliaz predstavuje internú kontrolu.



Obrázok 5. Expresia AMACR v cytoplazme nádorových buniek.



a p53. MIB1-index bol 3 %. Kontralaterálna high-grade PIN bola konvenčná, bez expresie p63 v luminálnych bunkách. Na základe morfológie a imunohistochemických nálezov bola stanovená diagnóza PKAE.

Diskusia

Prostatický karcinóm s aberantnou expresiou p63 (PKAE) opísal v r. 2008 Osunkoya a spol.⁽¹⁾ a následne pribudli ďalšie pozorovania tohto nádoru⁽²⁻⁶⁾. Tumor sa vyznačuje často veľmi blandnou maloacinárnou morfológiou, ktorá napodobňuje benígne maloacinárne lézie. Typická je preň silná expresia markera bazálnych buniek p63, čo môže sťažiť bioptickú diagnózu. Ide o zriedkavý typ karcinómu. V prvej publikovanej štúdií šlo o 21 prípadov, ktoré boli identifikované v súbore 8 251 konzultačných biopsií prof. Epsteina (0,25 % konzultácií)⁽¹⁾. Keďže na konzultáciu prichádzajú zväčša biopsie s problematickou morfológiou, predpokladá sa, že skutočný výskyt môže byť ešte nižší. Na druhej strane treba vziať do úvahy, že s častejším používaním p63 v diagnostike by, naopak, mohlo percento výskytu stúpnúť. Domnievame sa, že hlavne vyšetrenia p63 v skupine „atrophy-like“ karcinómov⁽⁸⁾ by mohli odhaliť viac prípadov.

Histologický obraz PKAE v punkčnej biopsii tvoria acíny, solídne skupiny alebo trámce buniek. Charakteristický je pseudoatrofický pomer medzi jadrami a cytoplazmou. Jadrá obsahujú aspoň fokálne dobre zreteľné nukleoly. Opisované Gleasonove štruktúry boli od Gleason 3 po Gleason 5^(1,2). V našom prípade sa morfológia podobala na dobre diferencovaný acinárny karcinóm Gleason 3 + 3, pseudoatrofickej morfológie, s ojedinelou „Paneth cell-like“ zmenou cytoplazmy. Imunohistochemicky je PKAE difúzne pozitívny na p63 (definujúci znak jednotky) a vykazuje pre karcinóm typické absencie iných markerov bazálnej vrstvy, ako je HMW-CK a CK5/6. V niektorých prípadoch môže byť HMW-CK pozitívny v časti buniek tumoru, čo sme pozorovali aj v našej biopsii. Táto expresia v našom prípade by mohla byť vysvetlená „basal cell“ diferenciáciou nádorovej bunky. Zaujímavé však je, že expresia ďalšieho bazálneho markeru CK5/6 nebola v opísaných prípadoch PKAE zistená, ako to bolo aj v našej biopsii. PLAE býva podobne ako iné prostatické karcinómy pozitívny na AMACR. V imunohistochemii PKAE je dôležitý nález nízkeho proliferatívneho indexu Ki-67 (MIB1-index), ktorý bol vo väčšine prípadov nižší ako 5 % a je v súlade s nižšou bio-

logickou agresivitou tumoru. V našom prípade bol MIB1-index len 3 %.

Histologická diferenciálna diagnóza PKAE zahŕňa najmä acinárne prostatické lézie, ako je adenóza, sklerotizujúca adenóza, postatrofická hyperplázia a mezonefrická hyperplázia⁽⁹⁻¹³⁾. Adenóza má menej atypie a nukleolov a vykazuje typickú distribúciu pozitívnych bazálnych markerov^(9,13). Sklerotizujúca adenóza obsahuje myoepitelovú vrstvu s expresiou S100 proteínu a aktínu^(9,12,13). V atrofii a postatrofickej hyperplázii nie je nukleárna atypia a prominencia nukleolov, pričom imunohistochemia bazálnych markerov vykáže typickú expresiu a AMACR bude negatívna^(9,13). Mezonefrické lézie sú negatívne na prostatické markery NKX3.1 a PSA⁽⁹⁻¹¹⁾.

Pre klinickú a prognostickú implikáciu nálezu PKAE je dôležitá jeho rozdielnosť od konvenčného karcinómu. Podľa doterajších výsledkov je PKAE biologicky menej agresívny ako konvenčné karcinómy. Nápadný je rozdiel medzi Gleasonovou štruktúrou a ukazovateľmi prognózy. Hoci Gleasonovo skóre bolo v publikovaných prípadoch priemerne 8 a viac, tumor bol v troch najvýznamnejších štúdiách limitovaný na prostatu v 100 %, 100 % a 76 % prípadov⁽¹⁻³⁾. Pre túto diskrepanciu medzi Gleasonovým skóre a biologickým správaním je navrhované, aby sa pri PKAE upustilo od Gleasonovho gradingu⁽²⁾. Biologická povaha tumoru zostáva priaznivejšia i v prípadoch, keď sa okrem PKAE nájde v prostate aj konvenčný adenokarcinóm (aj ten má obvykle nízky proliferatívny index, podobne ako asociovaný PKAE)⁽²⁾.

Molekulárno geneticky sa PKAE líši od konvenčného karcinómu predovšetkým absenciou TMPRSS2-ERG translokácie a expresiou GSTP1^(3,6,7). Podľa Tana a spol. fenotyp PKAE je zmiešaný luminálny a bazálny, zatiaľ čo konvenčné karcinómy sú luminálne⁽⁷⁾.

Hoci nové poznatky o PKAE sú stále limitované len na rádovo desiatky prípadov, je už teraz zrejmé, že tumor predstavuje osobitný typ prostatického adenokarcinómu. Pre klinikov i patológov je dôležitá znalosť biologických vlastností tohto novodefinovaného tumoru. V bioptrickej praxi je potrebné poznať pri PKAE úskalnia jeho morfolologickej a najmä imunohistochemickej diagnostiky.

Podakovanie

MUDr. Jozefovi Kurucovi z Medicytu Trenčín ďakujeme za fotodokumentáciu prípadu.

LITERATÚRA

- Osunkoya AO, Hansel DE, Sun X, et al. Aberrant diffuse expression of p63 in adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy and radical prostatectomy: report of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 461-467.
- Giannico GA, Ross HM, Lotan T, et al. Aberrant expression of p63 in adenocarcinoma of the prostate: a radical prostatectomy study. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:1401-1406.
- Baydar DE, Kulac I, Gurel B, et al. A case of prostatic adenocarcinoma with aberrant p63 expression: presentation with detailed immunohistochemical study and FISH analysis. *Int J Surg Pathol* 2011; 19: 131-136.
- Leung A, Ross F, Roberts M, et al. Aberrant p63 expression in prostate adenocarcinoma: a potential diagnostic pitfall. *Pathology*. 2017; 49: S77.
- Casimero FA, Andal JJ, So J. Aberrant diffuse expression of p63 in prostate adenocarcinoma. A case report. *Phillip J Pathol* 2018 (March 11), on-line only: <https://philippinejournalofpathology.org/index.php/PJP/article/view/89/117>

- Wu A, Kunju LP. Prostate cancer with aberrant diffuse p63 expression: report of a case and review of the literature and morphologic mimics. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1179-1184.
- Tan HL, Haffner MC, Esopi DM, et al. Prostate adenocarcinomas aberrantly expressing p63 are molecularly distinct from usual-type prostatic adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2015; 28: 446-456.
- Egan AJ, Lopez-Beltran A, Bostwick DG. Prostatic adenocarcinoma with atrophic features: malignancy mimicking a benign process. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 931-935.
- Paner GP, Luthringer DJ, Amin MB. Best practice in diagnostic immunohistochemistry: prostate carcinoma and its mimics in needle core biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1388-1396.
- Chen YB, Fine SW, Epstein JI. Mesonephric remnant hyperplasia involving prostate and periprostatic tissue: findings at radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1054-1061.

11. Gikas PW, Del Buono EA, Epstein JI. Florid hyperplasia of mesonephric remnants involving prostate and periprostatic tissue. Possible confusion with adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1993; 17: 454-460.

12. Jones EC, Clement PB, Young RH. Sclerosing adenosis of the prostate gland: a clinicopathological and immunohistochemical study of 11 cases. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 1171–1180.

13. Harik LR, O'Toole KM. Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 721-734.

MUDr. Michal Zámečník

Laboratórium Medicyt, s.r.o.
Legionárska 28, 911 01 Trenčín, SR
e-mail: zamecnikm@seznam.cz

Detekce SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR metody neinvazivní odběrovou sadou na kloktání/sliny GARGTEST®.



SONY

mindray
healthcare within reach

zybio

cytognos

immunostep

SouthernBiotech

HAIN
LIFESCIENCE

LITUO

sptlabtech

MOLECULAR
DEVICES

IPRASENSE

Applied
BioPhysics

CORNING

BD

strattec
biomedical

Photon
A spectrum of solutions



GARGTEST

Odběrová kloktací souprava

Unikátní sada založená na principu kloktání. Odběrová sada se používá pro získání vzorků patogenů infikujících dutinu ústní a horní cesty dýchací (SARS-CoV-2, HPV, Chřipka, RSV, atd.) Absence tyčinek v mediu umožňuje plnou automatizaci.

- Vhodné pro testování ve školách, školkách, firmách, na odběrných místech i zdravotnických a sociálních zařízeních

- Ověřeno validačními studii na více jak 100 000 testů

CE IVD certifikace

- Kloktání za použití pitné vody
- Transportní zkuševka obsahuje Lyofilizované médium
- Dlouhodobá stabilita viru v teplotách od 4-37°C po dobu nejméně 1 týdne



Pošlete k vyšetření do laboratoří

MEDIREX

I.T.A. - spol. s r.o.

Slovenská 26
040 01 Košice
Slovensko

Tel. +421 0903 611599
jozef.kmec@ita-slovakia.sk
www.ita-slovakia.sk



www.newslab.sk
www.medirexgroupacademy.sk