



LABORATORIJSKA MEDICINA

STROKOVNO-ZNANSTVENO GLASILO SLOVENSKEGA ZDRUŽENJA
ZA KLINIČNO KEMIJO IN LABORATORIJSKO MEDICINO

05
SEP 2023



SZK&MLM

Laboratorijska medicina je strokovno-znanstvena revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), ki objavlja prispevke s širšega področja laboratorijske medicine. Poslanstvo revije je seznanjanje slovenske strokovne javnosti z novostmi in smernicami s tega področja. V ta namen objavljamo izvirne znanstvene, pregledne znanstvene in strokovne članke ter aktualne novice, zanimivosti in poročila s področja laboratorijske medicine.

Glavna in odgovorna urednica:

Katarina Trebušak Podkrajšek

Področni uredniki:

Evgenija Homšak
Aleš Jerin
Helena Podgornik
Pika Meško Brguljan
Katarina Trebušak Podkrajšek
Janja Marc
Alenka Repše Fokter
Viktorija Tomič
Damien Gruson
Nataša Bogavac Stanojević

Tehnični uredniki:

Janez Klavž
Rok Kogovšek
Tina Levstek

Lektoriranje:

Janja Korošec

Oblikovanje in tisk:

Publik Market

Naklada:

550 izvodov

ISSN 2670-4463

Izhaja enkrat letno

Izdajatelj:

Slovensko združenje za
klinično kemijo in laboratorijsko medicino

Naslov uredništva:

Dunajska cesta 22
1000 Ljubljana, Slovenija

T: +386 599 76089

E: laboratorijska.medicina@szkklm.si

W: www.szkklm.si

Uvodnik



Katarina Trebušak Podkrajšek
Glavna in odgovorna urednica

Spoštovane kolegice in kolegi, spoštovane bralke in bralci!

Pred vami je peta številka *Laboratorijske medicine*. Koncept revije se ne spreminja in tudi tokrat vam predstavljamo rubriko *Laboratorijska medicina skozi oči*. Pripravila jo je doktorica znanosti s področja zdravstvene nege Ana Gianini. V razmislek nam daje predvsem pomen kontinuirnega izobraževanja, ki pa seveda velja za vsa področja zdravstva. Delavci v zdravstveni negi predstavljajo pomemben steber zdravstva in pogosto ključno povezavo med zdravnikom in laboratorijem. Zato je usposabljanje delavcev na področju zdravstvene nege ključno in mora vsebovati tudi vsebine iz področja laboratorijske medicine. Seveda je pomembno, da se diplomanti zdravstvene nege vsaj z osnovnimi vsebinami laboratorijske medicine seznanijo že tekom diplomskega in magistrskega študija. Ne moremo pa pričakovati, da bo celotno breme izobraževanja iz različnih specialnih znanj prevzele fakultete. Ta znanja namreč diplomanti in magistratni na vseh področjih v veliki meri pridobijo kasneje, na delovnem mestu. Za uspešno kontinuirno usposabljanje zaposlenih na področju zdravstvene nege je ključno sodelovanje strokovnjakov s področja zdravstvene nege in strokovnjakov iz drugih področij. Sodelovanje s strokovnjaki laboratorijske medicine je v nekaterih ustanovah praksa, drugje pa še

močno v povojih. Zato, drage kolegice in kolegi, velja poziv vsem! V domačih ustanovah poskrbimo za boljše povezovanje s strokovnjaki zdravstvene nege in za izobraževanja iz nekaterih ključnih področij laboratorijske medicine. Morda pa bi bilo smotrno tudi aktivnejše povezovanje z drugimi zbornicami in društvi, ki delujejo na področju zdravstva. S tem bomo pripomogli izboljšati sodelovanje in komunikacijo na vseh nivojih zdravstva, hkrati pa poskrbeli za zmanjšanje predanalitskih napak in s tem k višji kakovosti naših storitev.

V tej številki vam ponujamo tudi kratek zgodovinski vpogled v razvoj naše stroke. Ta nas uči o pomenu sodelovanja strokovnjakov različnih specialnosti znotraj laboratorijske medicine in seveda tudi o širšem povezovanju z drugimi vejami medicine. Je opomin na to, da je laboratorijska medicina živa veda, ki se razvija z izjemno hitrostjo. Pri razvoju pa je ključno, da smo usmerjeni v prihodnost in da vsi prispevamo svoj kamenček k pestremu mozaiku področij, ki jo sestavljajo. Kajti, kot pravi George Orwell: "Iz sedanjosti ne moremo bežati v preteklost, marveč zmeraj samo v bodočnost". Laboratorijska medicina je del medicine in je zajeta tudi v monografijo *Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem*. Vseeno pa bo za širše priznanje njenega pomena v medicini potrebno še veliko truda.

Želim vam prijetno branje pete številke *Laboratorijske medicine*!

Katarina Trebušak Podkrajšek
Glavna in odgovorna urednica *Laboratorijske medicine*

Kazalo

01 Laboratorijska medicina skozi oči ...	7
<i>Ana Gianini</i> Laboratorijska medicina skozi oči diplomirane medicinske sestre na Pediatrični kliniki v Ljubljani	8
02 Pregledni strokovni in znanstveni prispevki	11
<i>Joris R. Delanghe, Marijn M. Speeckaert</i> Kako oceniti delovanje ledvic v letu 2023	12
<i>Tina Levstek, Mojca Božič Mijovski, Miran Šebeštjen, Katarina Trebušak Podkrajšek</i> Diagnostična uporabnost določanja koncentracije lipoproteina(a) in genetske variabilnosti gena <i>LPA</i>	17
<i>Bernard Gouget, Pradeep Kumar Dabla, Rosa I Sierra-Amor</i> Socialne in zdravstvene neenakosti žensk v obdobju po pandemiji	31
<i>Pika Meško Brguljan, Barbara Možina, Maksimiljan Gorenjak, Borut Božič</i> Strokovna izhodišča za oblikovanje mreže laboratorijske dejavnosti s področja medicinske biokemije – nastala leta 2017, aktualna tudi v 2023	37
<i>Tjaša Debelak, Borut Božič</i> Laboratorijska medicina skozi prizmo monografije Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem	45
<i>Uroš Prešern, Jernej Kovač, Robert Šket, Tine Tesovnik, Maruša Debeljak, Barbara Jenko Bizjan</i> Uporaba sekvenciranja naslednje generacije v klinični diagnostiki prirojenih bolezní	51



SZKILM

03 Erratum **61**

Sebastijan Božič, Milka Ogrin, Polona Likar, Minka Lužovec, Marija Prezelj
 Erratum: Ocena merilne negotovosti nekaterih hematoloških parametrov analizatorja Sysmex XN-L 550 62

04 Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina **65**

Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina 66

**Izdajo revije so podprli:**

Siemens Healthcare d.o.o., Takeda Pharmaceuticals d.o.o., Roche farmacevtska družba d.o.o, Fin-Pro d.o.o.,
 Meditrade d.o.o., Pulmodata d.o.o., Dipros d.o.o., Abbott Laboratories d.o.o.

01

Laboratorijska
medicina skozi
oči ...

Laboratorijska medicina skozi oči diplomirane medicinske sestre na Pediatrični kliniki v Ljubljani

Ana Gianini

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika

Laboratorijska medicina ima pomembno vlogo pri prepoznavanju, zdravljenju in spremljanju boleznih pri otrocih in mladostnikih. Za kakovost laboratorijskih storitev pa je ključno, da je biološki vzorec odvzet pravilno, ter da se z njim ustrezno rokuje (1). Pri teh korakih pomembno vlogo igrajo prav diplomirane medicinske sestre (DMS), ki morajo biti seznanjene s predanaliznimi zahtevami za posamezno laboratorijsko preiskavo.

Pri svojem delu se DMS vsakodnevno srečujemo z odvzemi krvi pri novorojenčku, dojenčku, otroku in mladostniku. Odvzem krvi pri novorojenčku, dojenčku in majhnem otroku je specifičen in se razlikuje od odvzema krvi pri odrasli populaciji. Izbira ustrezne tehnike odvzema krvi pri otroku je odvisna od njegove starosti ter bolezenskega stanja. Pomembno je, da izberemo pravilno tehniko, saj le na ta način zmanjšamo otrokovo nelagodje ter s tem njegov strah pri odvzemu krvi (2).

Pri odvzemu krvi otroku ali mladostniku je izredno pomembna tudi komunikacija z njim in njegovimi starši. Postopek odvzema krvi mora biti primerno pojasnjen glede na starost in stopnjo razvoja otroka. Pomembno je, da DMS pri odvzemu krvi s strokovnim znanjem ustvari pozitivno izkušnjo in zagotovi varnost. To je še posebno zahtevno, kadar imajo otroci slabo izkušnjo iz preteklosti. Dobra medsebojna komunikacija z otrokom, mladostnikom in starši pripomore, da se vzpostavi zaupanje, da otroci lažje sodelujejo, so motivirani in je odvzem krvi tako manj stresen.

Pravilen odvzem krvi pri novorojenčku, dojenčku, otroku in mladostniku je ključnega pomena iz več razlogov. Otroci imajo specifične fiziološke in anatomske razlike v primerjavi z odraslo populacijo, zato je pomembno strokovno znanje DMS, ki odvzema kri. DMS mora posebno pozornost

nameniti tudi vrstnemu redu in celotnemu načrtovanemu volumnu odvzemov krvi, saj je najvišji dovoljeni volumen odvisen od starosti in velikosti ter telesne teže otroka (3). Če DMS ugotovi, da je zdravnik naročil več različnih preiskav in je količina odvzete krvi preseгла priporočeni volumen, ga mora opozoriti in se dogovoriti, katere preiskave in s tem kateri odvzemi so prednostni. Prav tako je zelo pomembno, da odvzete vzorce pravilno shrani in pravilno transportira v laboratorij. Vedeti mora, na kakšni temperaturi je lahko vzorec shranjen in v kolikšnem času mora biti transportiran v laboratorij, da bo rezultat preiskave zanesljiv.

Zato je izjemnega pomena, da ima DMS potrebno strokovno znanje, ki je pomembno za pravilen odvzem in transport vzorcev. Pri tem je ključno redno izobraževanje, saj je poleg tehničnega znanja, ki je pomembno pri odvzemu krvi, pomembno tudi dodatno specialno znanje s področja laboratorijske medicine. Obseg znanja s področja laboratorijske medicine, ki ga DMS pridobijo med študijem, je izjemno omejen. Zato menim, da bi bilo koristno, če bi bile na zdravstvenih fakultetah v študijskem programu v večji meri vključene tudi vsebine s področja laboratorijske medicine. Menim, da bi vsem, ki se pri svojem delu srečujejo z odvzemom krvi, koristila tudi redna dodatna usmerjena izobraževanja s področja laboratorijske medicine in bi se v ta namen morali še tesneje povezovati z zaposlenimi v laboratoriju. DMS in zaposleni v laboratoriju bi v posameznih ustanovah lahko organizirali skupna izobraževanja ali delavnice. Tako bi vsi, ki sodelujemo pri postopku odvzema krvi in interpretaciji rezultatov vzorcev, imeli boljši vpogled v področje in bili seznanjeni z vsemi novostmi. Zaposleni v laboratoriju pa bi na ta način lahko dobili tudi boljši vpogled v izzive in težave, s katerimi se pri odvzemu bioloških vzorcev srečujemo DMS, in so specifični za različna področja, kot je na primer pediatrija. »

Ana Gianini

Ana Gianini je kot diplomirana medicinska sestra zaposlena na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Diplomirala je leta 2004 na Visoki šoli za zdravstvo v Ljubljani. Leta 2016 je zaključila magistrski študij na Fakulteti za zdravstvo Angele Boškin, kjer je leta 2022 tudi doktorirala.

Od leta 2006 je delovala na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Pediatrične klinike, kjer se še posebno posveča edukaciji obolelih s sladkorno boleznijo tipa 1. Strokovno in raziskovalno delo predstavlja na srečanjih v Sloveniji in tujini. Bila je članica izvršilnega odbora sekcije medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v endokrinologiji pri Zbornici zdravstvene in babiške nege v Slovenije. Od 1. 9. 2023 deluje kot koordinatorica pedagoške dejavnosti na Pediatrični kliniki v Ljubljani.

LITERATURA

1. Coffin CM, Hamilton MS, Pysker TJ, Bach P, Ashwood E, Schweiger J, et al. Pediatric laboratory medicine: current challenges and future opportunities. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(5):683–90.
2. Svetovna zdravstvena organizacija. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy [Internet]. [Dostop 31. jul 2023]. Dostopno na: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/268790/WHO-guidelines-on-drawing-blood-best-practices-in-phlebotomy-Eng.pdf?ua=1
3. Sztefko K, Beba J, Mamica K, Tomasik P. Blood loss from laboratory diagnostic tests in children. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(8):1623–6.

02

Pregledni
strokovni in
znanstveni
prispevki

Kako oceniti delovanje ledvic v letu 2023

How to estimate kidney function in 2023

Joris R. Delanghe¹, Marijn M. Speeckaert^{2,3}

¹Ghent University, Department of Diagnostic Sciences

²Ghent University, Hospital Department of Nephrology

³Research Foundation-Flanders

Corresponding author:

Prof. Dr. Joris R. Delanghe

Ghent University Hospital, Department of Diagnostic Sciences, C. Heymanslaan 10 (2P8),

B-9000 Ghent, Belgium

e-mail: joris.delanghe@ugent.be

ABSTRACT

In practice, GFR is estimated (eGFR) from endogenous marker concentrations. However, current eGFR approaches still lack accuracy. Conversely, exogenous marker clearance, i.e., measured GFR (mGFR) is the most accurate method for evaluating kidney function; however, standardized protocols are lacking. Inulin clearance has been considered the reference method for determining mGFR. Given the limitations of serum creatinine and inulin, non-radioactive and radioactive exogenous mGFR markers are the most accurate options for evaluating GFR. However, mGFR procedures are complex and have a degree of error. Limited ⁵¹Cr- ethylenediamine tetraacetic acid availability, lacking certified reference iohexol (off-label IVD) materials, and lacking uniform protocols all question the merits of mGFR methods as a golden standard for evaluating kidney function. Furthermore, regulatory issues are narrowing the clinical use of mGFR.

In children, the modified Schwartz equation can only be used in combination with enzymatic creatinine assays, and thus there is a growing tendency to apply cystatin-C-based approaches in pediatric nephrology.

Creatinine-based eGFR equations have their limitations, particularly regarding imprecision. Creatinine-based equations have lower accuracy in ethnic groups other than

white and Afro-American groups. Cystatin C is an alternative: eGFR_{creatinine-cystatin} has a higher accuracy than that of eGFR_{cystatin} and eGFR_{creatinine}. Cystatin C equations perform as well as the CKD-EPI 2012 equation. The combined equation is not independent of eGFR_{creatinine} and requires specifying ethnicity. The CKD-EPI 2012 eGFR_{cystatin} equation can be used without specifying ethnicity but is not more accurate than the CKD-EPI 2009 eGFR_{creatinine} equation. Despite newer American recommendations, the European Federation of Laboratory Medicine still adheres to this equation.

Key words: cystatin C, inulin, exogenous markers, iohexol, glomerular filtration rate

INTRODUCTION

Accurate determination of the glomerular filtration rate (GFR) is of utmost importance for the diagnosis of kidney disease. In clinical practice, GFR is typically estimated (eGFR) from blood concentrations of endogenous markers (1). However, current eGFR computational approaches are still inaccurate, particularly if GFR falls below 60 mL/min/1.73 m² (2). Measuring the clearance of exogenous GFR markers is considered the most accurate method for evaluating kidney function, referred to as measured GFR (mGFR). mGFR determination is required when accurate knowledge >>

of kidney function is essential, such as in oncology patients receiving chemotherapy or in kidney transplant candidates (3, 4). As standardized procedures are lacking, mGFR values obtained by an improperly implemented protocol may be biased. Criteria for reliable exogenous GFR markers are as follows: water-soluble, not bound to proteins, only excreted by the kidneys, 100% filtered through the glomerulus in subjects with normal kidney function, and neither secreted nor absorbed by kidney tubules. Several exogenous markers have been evaluated for this purpose, including inulin, ^{51}Cr -ethylenediamine tetraacetic acid (^{51}Cr -EDTA), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -diethylenetriamine pentaacetic acid ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA), ^{125}I -iothalamate, and non-isotopic “cold” markers (e.g., iohalamate and iohexol) (5, 6). A multimetabolite eGFR panel derived from a single blood draw may estimate GFR at least as accurately as mGFR, without the need for specifying demographic and clinical characteristics or performing laborious sampling procedures.

Conversely, the introduction of the standard reference material 967 for serum/plasma creatinine (7) has paved the way towards better eGFR estimations based on traditional markers, such as creatine. In recent years, much progress has been made on improving the accuracy of eGFR based on endogenous markers. This review paper provides an overview of the currently used endogenous and exogenous GFR markers in children and adults.

EXOGENOUS GFR MARKERS

Determining mGFR is considered the most accurate method for evaluating kidney function, and inulin clearance has long been considered the reference method for determining mGFR (8). However, measuring serum creatinine and inulin has limitations, and thus non-radioactive (iohexol and iohalamate) and radioactive exogenous mGFR markers are considered the most accurate markers for evaluating GFR (9, 10). Procedures for determining mGFR are generally technically complex and are associated with a degree of error. The off-label use of non-ionic contrast agents could lead to possible compensation claims by patients in the case of adverse events (11). Despite being an invasive procedure, GFR determination based on iohexol clearance is safe; the overall rate of adverse treatment-related events was reported to be 0.0066%, independent of disease conditions and GFR categories (12).

Limited ^{51}Cr -EDTA availability, lacking certified reference materials for iohexol, and the fact that iohexol is an off-label IVD are major drawbacks that prevent widespread clinical use of exogenous markers. Lacking uniform protocols lead to varying results and question the merits of mGFR methods as a golden standard for evaluating kidney function (13).

REGULATIONS FOR *IN VITRO* DIAGNOSTICS

Both in the United States (US) and European Union (EU), the policies issued by regulatory agencies regarding laboratory-defined tests are becoming very strict. The US Food and Drug Administration applies a definition for diagnostic tools comparable to that of the European Medicine Agency (EMA), specifying what is essential for safe and effective use (14, 15). In the EU, the EMA formulated a new set of *in vitro* diagnostic regulations that have become effective as of May 26, 2022. Diagnostic laboratories are experiencing difficulties in providing the required evidence and qualifications for their reagents, as test procedures are getting stricter. In the future, the use of radiodiagnostics (e.g., iohexol and iohalamate) will only be permitted if the manufacturer can provide evidence that the reagent is compliant with the regulations and requirements of a diagnostic companion, not only for imaging applications but also for kidney function measurements. Therefore, it can be anticipated that the clinical use of exogenous GFR markers will be limited in the years to come.

A POTENTIAL SOLUTION: A MULTIPANEL SET OF MARKERS

Given the limitations of serum creatinine and exogenous biomarkers, and the global need for precise GFR estimations, an alternative approach is to combine endogenous filtration markers in a panel from a single blood draw, downplaying the contribution of non-GFR determinants of each endogenous biomarker (due to the large number

»

of biomarkers) and reducing the error in GFR estimation (16, 17). Potential non-GFR determinants of endogenous filtration markers are the rates of their production by metabolic processes, tubular secretion and reabsorption, and extrarenal elimination (17). Short-term fluctuations in the true GFR affect serum concentrations of filtration markers more slowly than clearance values, and measuring serum concentrations is easier than determining clearance. The ideal multipanel set of biomarkers should estimate GFR at least as accurately as mGFR, without the need for specifying demographic or clinical characteristics.

In the aftermath of the George Floyd case (25 May, 2020), in particular in the US, there is a growing tendency for GFR estimations to avoid specifying race (18, 19), age, and sex due to variability across different conditions, such as illness, diet, and geography. Standardizing GFR for body surface area may also not be optimal because of variable body compositions (20).

Data integration with large-scale datasets, including DNA and RNA sequence data, metabolomics data, and proteomics data from individuals and patients along the genotype–phenotype continuum of chronic kidney disease (CKD), might be helpful to develop a multimetabolite panel for GFR determination (21). Metabolomics has revolutionary potential in the field of GFR estimation with a rapid screening of metabolites that are primarily cleared by glomerular filtration and could serve as alternative filtration markers if a strong correlation with mGFR could be demonstrated. Another major advantage of this technique might be the development of robust targeted mass spectrometry assays that are both accurate and easily included in multiplex panels (20). Recently, the potential utility of proteomics for predicting CKD incidence and prognosis has been demonstrated (22, 23). Computational approaches such as machine learning enable combining high-dimensional datasets in which the number of variables exceeds the number of clinical outcome observations (21).

Although the optimal composition of multimetabolite eGFR panels is still to be determined, low-molecular-weight serum proteins and metabolic waste products have been identified as candidate filtration markers (24).

GFR DETERMINATION IN CHILDREN

In children, the estimation of GFR is slightly complicated due to the analytical interference present in the widely used Jaffe reaction in creatinine assays (25). The classical Schwartz formula (which has been in use since 1976) (26) for estimating GFR has been the standard for many years. However, the introduction of the standard reference material (SRM) 967 for serum/plasma creatinine assays has necessitated adaptations of the coefficients for calculating GFR ($k \times \text{height/serum creatinine}$). Therefore, Schwartz et al. have proposed an adapted equation to estimate GFR in children with CKD, using serum creatinine values (27). The coefficient of the revised Schwartz equation (0.413) is only valid in combination with enzymatic creatinine assays, which are recommended by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (28). As the major analytical interference in Jaffe-based creatinine methods (alkaline picrate reaction) is the total serum protein concentration, Speeckaert et al. have proposed a compensation based on total protein values that enables Schwartz equations to be used in combination with Jaffe-based creatinine assays (29).

CYSTATIN C, AN INTERESTING ALTERNATIVE OR SUPPLEMENT

The availability of an international standard ERM-DA471/IFCC (30) and the independency from muscle mass have fostered the use of plasma/serum cystatin C as a biomarker for assessing GFR (31, 32, 33). Cystatin-C-based formulas have been developed, and cystatin-C-based GFR estimation is even possible in neonates (34).

In problem cases or in cases where accurate GFR estimation is required (e.g., when nephrotoxic drugs are administered), it might be wise to supplement creatinine-based GFR estimations with a second renal function marker (e.g., cystatin C) or a conventional creatine clearance measurement. Despite its widespread use, the best creatinine-based GFR-estimating equation for use in diverse populations >>

(the Chronic Kidney Disease Epidemiology Consortium (CKD-EPI) 2009 creatinine equation) (35) has its limitations. Creatinine standardization efforts are being made; however, mGFR estimates are still imprecise and must be improved. This imprecision is explained by variations in muscle mass and diet that are not adequately modeled by correcting for sex, age, and ethnicity in the equation.

The intra-subject biological variation for MDRD and CKD-EPI_{creatinine (cr) + cystatinC (cys)} eGFR are each significantly lower than that of mGFR (6.7% [5.6–8.2]) (36). For non-white and non-Afro-American populations, current creatinine-based equations result in lower accuracy. Therefore, serum cystatin-C-based equations have been proposed because they are less influenced by muscle mass than serum creatinine. However, it should be noted that cystatin C values are affected by adiposity, inflammation, and smoking. Furthermore, cystatin C is upregulated by certain malignant tumors and is also affected by corticosteroids and thyroid hormones. CKD-EPI 2012 cystatin C and creatinine-cystatin C equations have been developed (37). eGFR_{cys} and eGFR_{cr} have comparable accuracy, whereas eGFR_{cr-cys} has a significantly higher accuracy than either single-marker equation. Cystatin-C-based GFR equations perform as well as, but not better than, CKD-EPI 2012 equations. The CKD-EPI 2012 eGFR_{cr-cys} equation appears to be more accurate than both the CKD-EPI 2009 eGFR_{cr} and CKD-EPI 2012 eGFR_{cys} equations. The combined equation is not independent of eGFR_{cr} and requires specification of ethnicity. The CKD-EPI 2012 eGFR_{cys} equation can be used without specification of ethnicity. Recently, the EFLM has recommended not to implement the race-free (CKD-EPI) equation in European laboratories and to keep the 2009 version of the CKD-EPI equation, without applying a race correction factor (38).

CONCLUSION

GFR measuring methods are characterized by serious drawbacks. Therefore, more practical and affordable GFR estimates are to be preferred for most clinical applications in children and adults. The CKD-EPI 2009 equations largely fulfill clinical needs for most patients, and combined (creatinine–cystatin-C-based) eGFR equations provide superior accuracy.

REFERENCES

1. Levey AS, Inker LA. GFR as the “gold standard”: estimated, measured, and true. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(1):9-12.
2. Bjornstad P, Karger AB, Maahs DM. Measured GFR in routine clinical practice—the promise of dried blood spots. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25(1):76-83.
3. Stevens LA, Levey AS. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:2305-2313.
4. Pascual J, Abramowitz D, Cochat P, Claas F, Dudley C, Harden P, et al. European Renal Best Practice Transplantation Guideline Development Group. ERBP guideline on the Management and evaluation of the kidney donor and recipient. *Nephrol Dial Transpl.* 2013;28(Suppl. S2):ii1-71.
5. Agarwal R, Delanaye P. Glomerular filtration rate: When to measure and in which patients? *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34:2001-7.
6. Seegmiller JC, Eckfeldt JH, Lieske JC. Challenges in measuring glomerular filtration rate: a clinical laboratory perspective. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25:84-92.
7. Peake M, Whiting M. Measurement of serum creatinine—current status and future goals. *Clin Biochem Rev.* 2006;27(4):173-84.
8. Baldwin DS, Neugarten J. Homer Smith: his contribution to the practice of nephrology. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5:1993-9.
9. Gaspari F, Perico N, Matalone M, Signorini O, Azzollini N, Mister M, et al. Precision of plasma clearance of iothexol for estimation of GFR in patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:310-3.
10. Agarwal R, Bills JE, Yigazu PM, Abraham T, Gizaw AB, Light RP, et al. Assessment of iothalamate plasma clearance: duration of study Affects Quality of GFR. *Clin J Am. Soc Nephrol.* 2009;4:77-85.
11. Lenk C, Duttge G. Ethical and legal framework and regulation for off-label use: European perspective. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:537-46.
12. Gaspari F, Thakar S, Carrara F, Perna A, Trillini M, Aparicio MC, et al. Safety of iothexol administration to measure glomerular filtration rate in different patient populations: A 25-Year Experience. *Nephron.* 2018;140(1):1-8.
13. Speeckaert MM, Seegmiller J, Glorieux G, Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R, et al. Measured glomerular filtration rate: The query for a workable golden standard technique. *J Pers Med.* 2021;11(10):949.
14. Enzmann H, Meyer R, Broich K. The New EU Regulation on in vitro diagnostics: potential issues at the interface of medicines and companion Diagnostics. *Biomark Med.* 2016;10:1261-8.
15. In Vitro Companion Diagnostic Devices. Guidance for industry and Food and Drug Administration staff [Internet]. [Cited 2022 Jan 5] Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-companion-diagnostic-devices>.
16. Freed TA, Coresh J, Inker LA, Toal DR, Perichon R, Chen J, et al. Validation of a metabolite panel for a more accurate estimation of glomerular filtration rate using quantitative LC-MS/MS. *Clin Chem.* 2019;65:406-18.
17. Levey AS, Coresh J, Tighiouart H, Greene T, Inker LA. Measured and estimated glomerular filtration rate: current status and future directions. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16:51-64.



18. Feldman HI, Briggs JP. Race and the estimation of GFR: getting it right. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32:1269-70.
19. Levey AS, Titan SM, Powe NR, Coresh J, Inker LA. Kidney disease, race, and GFR estimation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15:1203-12.
20. Coresh J, Inker LA, Sang Y, Chen J, Shafi T, Post WS, et al. Metabolomic profiling to improve glomerular filtration rate Estimation: a proof-of-concept study. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34:825-33.
21. Eddy S, Mariani LH, Kretzler M. Integrated multi-omics approaches to improve classification of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16:657-68.
22. Tofte N, Lindhardt M, Adamova K, Bakker SJL, Beige J, Beulens JWJ, et al. Early detection of diabetic kidney disease by Urinary Proteomics and Subsequent Intervention with Spironolactone to Delay Progression (PRIORITY): A Prospective Observational Study and Embedded Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8:301-12.
23. Schanstra JP, Züribig P, Alkhalaf A, Argiles A, Bakker SJL, Beige J, et al. Diagnosis and prediction of CKD Progression by assessment of urinary peptides. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:1999-2010.
24. Inker LA, Levey AS, Coresh J. Estimated glomerular filtration rate from a panel of filtration markers-hope for increased accuracy beyond measured glomerular filtration rate? *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25:67-75.
25. Delanghe J. How to estimate GFR in children. *Nephrol Dial Transpl.* 2009;24:714-6.
26. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics.* 1976;58:259-63.
27. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:629-37.
28. Panteghini M, IFCC Scientific Division. Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46:567-72.
29. Speeckaert MM, Wuyts B, Stove V, Vande Walle J, Delanghe JR. Compensating for the influence of total serum protein in the Schwartz formula. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50:1597-600.
30. Grubb A, Blirup-Jensen S, Lindström V, Schmidt C, Althaus H, Zegers I. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:1619-21.
31. Schwartz GJ, Schneider MF, Maier PS, Moxey-Mims M, Dharnidharka VR, Warady B, et al. Improved equations estimating GFR in children with chronic kidney disease using an immunonephelometric determination of cystatin C. *Kidney Int.* 2012;82:445-53.
32. Groesbeck D, Köttgen A, Parekh R, Selvin E, Schwartz GJ, Coresh J, et al. Age, gender, and race effects on cystatin C levels in US adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1777-85.
33. Zappitelli M, Parvex P, Joseph L, Paradis G, Grey V, Lau S, et al. Derivation and validation of cystatin C-based prediction equations for GFR in children. *Am J Kidney Dis.* 2006;48:221-30.
34. Treiber M, Pečovnik Balon B, Gorenjak M. A new serum cystatin C formula for estimating glomerular filtration rate in newborns. *Pediatr Nephrol.* 2015;30:1297-305.
35. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150:604-612.
36. Rowe C, Sitch AJ, Barratt J, Brettell EA, Cockwell P, Dalton RN, et al. Biological variation of measured and estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2019;96:429-35.
37. Inker LA, Levey AS, Coresh J. Estimated glomerular filtration rate from a panel of filtration markers-hope for increased accuracy beyond measured glomerular filtration rate? *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25:67-75.
38. Delanaye P, Schaeffner E, Cozzolino M, Langlois M, Plebani M, Ozben T, et al. The new, race-free, Chronic Kidney Disease Epidemiology Consortium (CKD-EPI) equation to estimate glomerular filtration rate: is it applicable in Europe? A position statement by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clin Chem Lab Med.* 2022;61(1):44-7.

Diagnostična uporabnost določanja koncentracije lipoproteina(a) in genetske variabilnosti gena *LPA*

Diagnostic utility of determination of lipoprotein(a) concentration and genetic variability of the LPA gene

Tina Levstek^{1,2}, Mojca Božič Mijovski^{3,4}, Miran Šebeštjen^{5,6,7}, Katarina Trebušak Podkrajšek^{1,2}

¹Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

²Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

³Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterosklerozo

⁴Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično kemijo

⁵Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni

⁶Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za kardiologijo

⁷Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino

Avtor za korespondenco:

Asist. Tina Levstek, mag. lab. biomed.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana
e-pošta: tina.levstek@mf.uni-lj.si

Tina Levstek je štipendistka Univerzitetne ustanove ing. Lenarčič Milana.

POVZETEK

Koncentracija lipoproteina(a) (Lp(a)) je določena genetsko in je neodvisni dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni. Lp(a) je s holesterolom bogat lipoproteinski delec, ki nastaja v jetrih. Sestavljen je iz apolipoproteina B100 in apolipoproteina(a) (apo(a)), ki sta povezana z disulfidno vezjo. Apo(a) kodira *LPA*, ki je eden najbolj polimorfnih genov pri človeku, saj je bilo identificiranih že več kot 40 genetskih variant. Koncentracija Lp(a) je v 90 % genetsko določena preko variant v genu *LPA* in je v aterogenem območju (> 300 mg/L) prisotna pri 20 do 30 % populacije. V zadnjem desetletju je prišlo do velikega napredka pri razumevanju mehanizmov, ki so vpleteni v sintezo in presnovo Lp(a), kar je izboljšalo tudi ra-

zumevanje patofiziologije Lp(a) in dejavnikov, ki vplivajo na njegovo koncentracijo. Kljub temu da določanje Lp(a) še ni standardizirano, s kliničnega vidika zadostuje za prepoznavanje posameznikov s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Pri teh posameznikih je ključno zmanjšanje tveganja, zato so v postopku razvoja nove, obetavne terapevtske možnosti za zniževanje koncentracije Lp(a), ki so usmerjene proti mRNA gena *LPA*. Namen prispevka je predstavitev najnovejših ugotovitev o strukturi, sintezi, presnovi, patofizioloških mehanizmih in terapevtskih možnostih za zniževanje koncentracije Lp(a) ter izpostaviti izzive pri njegovem določanju v kliničnih laboratorijih.

Ključne besede: lipoprotein(a), dislipidemija, srčno-žilna bolezen, ateroskleroza

»

ABSTRACT

Lipoprotein(a) (Lp(a)) is an inherited and independent risk factor for cardiovascular diseases. Lp(a) is a cholesterol-rich lipoprotein synthesized in the liver. It consists of apolipoprotein B100 and apolipoprotein(a) (apo(a)) linked by a disulfide bond. Apo(a) is encoded by *LPA* gene, one of the most polymorphic genes in humans, as more than 40 gene variants have been discovered. Lp(a) levels are 90% genetically determined by variants in the *LPA* gene and are in the atherogenic range (> 300 mg/L) in 20 to 30% of the population. In the last decade, immense progress has been made in understanding the mechanisms involved in the synthesis and metabolism of Lp(a). This has also improved the understanding of the pathophysiology of Lp(a) and the factors affecting Lp(a) concentration. Although the determination of Lp(a) is not yet standardized, from a clinical point of view it allows the identification of individuals at increased risk for cardiovascular diseases. To reduce risk, promising new therapeutic options are currently being developed to directly lower Lp(a) concentrations by targeting *LPA* mRNA. The aim of this article is to present the latest knowledge on the structure, synthesis, metabolism, pathophysiological mechanisms, and therapeutic options for lowering Lp(a) and to address challenges in determining Lp(a) concentration in clinical laboratories.

Key words: lipoprotein(a), dyslipidemia, cardiovascular disease, atherosclerosis

UVOD

Srčno-žilne bolezni še vedno predstavljajo glavni vzrok smrti v razvitih državah in to kljub temu da je v zadnjem desetletju prišlo do velikega napredka pri postavitvi diagnoze, zdravljenju in ozaveščanju o preventivnih ukrepih (1). Ateroskleroza je kronična, progresivna vnetna bolezen, ki se začne v mladosti ali v drugem desetletju življenja, klinično pa se izrazi v zrelih oz. poznih letih (2). Glavne dejavnike tveganja delimo na modificirajoče (hiperholesterolemija, sladkorna bolezen, hipertenzija) in nemodificirajoče (starost, spol, genetska predispozicija). Pomembno vlogo pri razvoju ima tudi življenjski slog (kajenje, debelost, telesna nedejavnost). Ker je ateroskleroza počasi napredujoča bolezen, je prepoznavanje oseb s povečanim tveganjem za srčno-žilne dogodke zelo pomembno, saj omogoča pra-

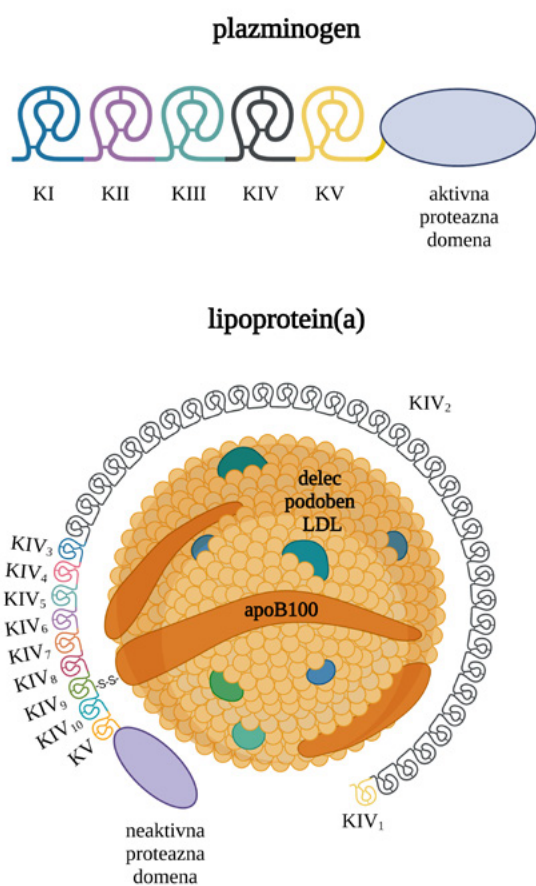
vočasno uvedbo preventivnih ukrepov in s tem nižjo stopnjo obolevnosti in umrljivosti (2).

Lipoprotein(a) (Lp(a), lipoprotein mali(a)) je leta 1963 prvič opisal norveški zdravnik Kåre Berg, ko je izvajal poskus hiperimunizacije zajcev z lipoproteini nizke gostote (LDL), izoliranimi iz krvi 20 zdravih posameznikov. Pri tem je odkril protitelo, ki je prepoznalo »antigen Lp«, imenovan Lpa. Ta antigen je bil prisoten pri 34 % od 314 testiranih serumov zdravih odraslih oseb, ki so jih poimenovali Lpa⁺ (3). Nadaljnje raziskave so pokazale, da je zvišana koncentracija Lp(a) neodvisni dejavnik tveganja za srčno-žilne dogodke ne glede na koncentracijo holesterola LDL (4). Določanje koncentracije Lp(a) zaenkrat ne poteka rutinsko. Ker ima povišano koncentracijo Lp(a) kar 20 do 30 % populacije, pomanjkljivo prepoznavanje oseb z zvišanimi koncentracijami Lp(a) prispeva k obolevnosti in umrljivosti zaradi srčno-žilnih bolezni (5). Zato bi koncentracijo Lp(a) v serumu ali plazmi morali določati pri vseh posameznikih s hiperholesterolemijo ter pri bolnikih z znano srčno-žilno boleznijo ali družinsko obremenjenostjo z namenom dodatne opredelitve tveganja. Zmanjšanje tveganja za srčno-žilne dogodke je izrednega pomena, zato so v razvoju nove, obetavne terapevtske možnosti za zniževanje koncentracije Lp(a), ki so usmerjene proti mRNA gena *LPA*. Pričakujemo, da bo določanje koncentracije Lp(a) v laboratorijski diagnostiki v prihodnosti bolj pogosto, še posebej pa smiselno pri osebah s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Namen prispevka je predstavitev najnovejših ugotovitev o strukturi, sintezi, presnovi, patofizioloških mehanizmih in terapevtskih možnostih za zniževanje koncentracije Lp(a) ter izpostaviti nekatere izzive pri njegovem določanju v kliničnih laboratorijih.

ZGRADBA LIPOPROTEINA(a)

Lp(a) je lipoprotein, ki vsebuje holesterol, sestavljen iz apolipoproteina B100 (apoB100). ApoB100 je preko disulfidne vezi vezan na apolipoprotein(a) (apo(a)), patognomonično komponento Lp(a). ApoB100 je delec, podoben holesterolu LDL, apo(a) pa je glikoprotein, ki ga kodira gen *LPA*. Gen *LPA* se nahaja na dolgi ročici kromosoma 6 (6q26-27) in spada med najbolj polimorfne gene pri človeku, saj je bilo odkritih že več kot 40 njegovih variant (5). Gen *LPA* je nastal s podvojitvijo gena za plazminogen (*PLG*), zato je struktura apo(a) homologna strukturi plazminogena. Plaz- »

minogen vsebuje pet različnih zavrtih odsekov, t. i. domen v obliki lasnice (angl. *kringle*) (KI do KV), in aktivno proteazno domeno, medtem ko apo(a) ne vsebuje kringl domen KI, KII in KIII, prisotne pa so KV, inaktivna proteazna domena ter deset različnih podtipov KIV (KIV₁₋₁₀), in sicer po ena ponovitev KIV₁ in KIV₃₋₁₀, število ponovitev KIV₂ pa variira od ene do več kot 40 (Slika 1). Molekulska masa Lp(a) je zato zelo različna in se giblje med 250 in 800 kDa (6).



Slika 1: Primerjava zgradbe plazminogena in lipoproteina(a) (Lp(a)). Plazminogen sestavlja pet domen v obliki lasnice (KI–KV) in aktivna proteazna domena. Lp(a) pa sestavlja deset različnih podtipov KIV (KIV₁–KIV₁₀), KV in neaktivna proteazna domena. Število KIV₂ variira od ene do več kot 40 ponovitev. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 1: Comparison of plasminogen and lipoprotein(a) (Lp(a)) structure. Plasminogen consists of five kringle domains (KI–KV) and active protease domain. Lp(a) consists of ten different types of KIV (KIV₁–KIV₁₀), KV, and non-active protease domain. The number of KIV₂ varies from one to more than 40. Created with BioRender.com.

SINTEZA IN RAZGRADNJA LIPOPROTEINA(a)

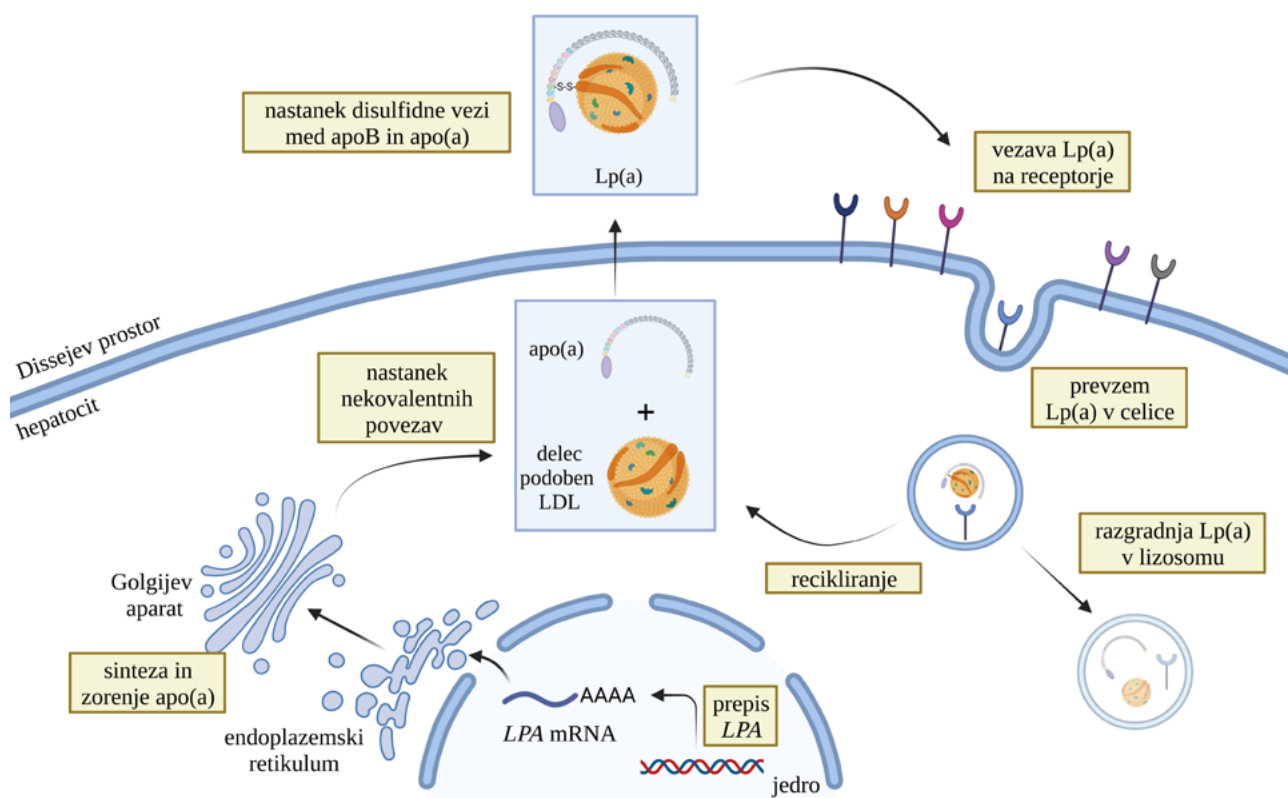
Tako apoB100 kot tudi apo(a) se sintetizirata izključno v hepatocitih (7). Sintezi apo(a) sledijo posttranslacijske modifikacije v endoplazemskem retikulumu (ER), vključno z nastankom treh disulfidnih vezi znotraj vsake kringl domene in *N*-glikozilacijo, ki omogoči povezave s kalneksinom in kalretikulinom. Le-te so potrebne za pravilno strukturno konformacijo apo(a) ter njegovo izločanje iz ER (8). Koliko časa apo(a) ostane v ER, je odvisno od števila ponovitev KIV₂. Čas je sorazmeren številu ponovitev, zato so večje izooblike bolj podvržene razgradnji v proteasomih. To morda lahko delno pojasni dejstvo, da je koncentracija Lp(a) praviloma višja pri posameznikih, ki nosijo zapis za krajše izooblike apo(a) (9, 10). Iz ER se apo(a) premakne v Golgijev aparat, kjer potече še nadaljnja *N*- in *O*-glikozilacija. Pri *O*-glikozilaciji se oligosaharid veže na apo(a) preko hidroksilne skupine serina oz. treonina, pri *N*-glikozilaciji pa preko aminske skupine asparagina.

Nastanek Lp(a) je dvostopenjski proces, v katerem se apo(a) poveže z apoB100. V prvem koraku znotraj hepatocitov nastanejo nekovalentne povezave med lizinskimi ostanki na apoB100 in kringl domenami KIV₇ in KIV₈ apo(a) (11). Nato v zunajceličnem prostoru sledi encimsko kataliziran nastanek disulfidne vezi med cisteinom na aminokislinskem mestu 4326 na C koncu delca in cisteinom na mestu 4057 na KIV₉ (12). Encim, ki katalizira to reakcijo, še ni znan, prav tako tudi ni pojasnjeno, ali reakcija potече neposredno na celični membrani ali v Dissejevem prostoru.

Prav tako tudi mehanizem katabolizma in odstranjevanja Lp(a) iz plazme še ni popolnoma razjasnjen. Znano je, da ta korak ni najpomembnejši pri uravnavanju koncentracije Lp(a) v krvnem obtoku. Glavno mesto odstranjevanja Lp(a) so jetra, v precej manjši meri pa sodelujejo pri odstranjevanju tudi ledvice in arterijska žilna stena (13). Tudi receptorji, ki sodelujejo pri privzemu Lp(a) v hepatocite, še niso popolnoma znani. Na vezavo na receptor in privzem Lp(a) najverjetneje vplivajo koncentracija Lp(a), velikost molekule apo(a), proteini, vezani na Lp(a), in vsebnost lipidov v Lp(a). Pri vezavi Lp(a) sodelujejo številni receptorji, med drugim receptor LDL (LDLR), plazminogeni receptorji, TLR2 (okr. angl. *toll like receptor 2*), SRB1 (okr. angl. *scavenger receptor class B type 1*), ASGPR (okr. angl. *asialoglycoprotein receptor*), LRP1, LRP2 in LRP8 (okr. angl. »

low-density lipoprotein receptor-related protein-1, -2 in -8), vendar njihov prispevek pri katabolizmu Lp(a) ostaja zanemarljivo neznan. Predvidoma se Lp(a) po endocitozi razgra-

di v lizosomih (14, 15, 16). Shematski potek sinteze in presnove Lp(a) je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Sinteza in presnova lipoproteina(a) (Lp(a)). ApolipoproteinB100 (apoB100) in apolipoprotein(a) (apo(a)) se sintetizirata v jetrih. Nastanek Lp(a) poteka v dveh korakih. Najprej znotrajcelično nastanejo nekovalentne povezave med apo(a) in apoB100 na delcu, podobnemu holesterolu LDL, čemur zunaj celice sledi nastanek disulfidne vezi. Lp(a) se iz krvnega obtoka odstranjuje v največji meri preko privzema v jetra, pri čemer sodelujejo različni receptorji. Po endocitozi se Lp(a) razgradi v lizosomu ali pa se reciklira. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 2: Synthesis and metabolism of lipoprotein(a) (Lp(a)). ApolipoproteinB100 (apoB100) and apolipoprotein(a) (apo(a)) are synthesized in the liver. The formation of Lp(a) occurs in two steps. First, non-covalent bonds between apo(a) and apoB100 are formed intracellularly on the LDL-like particle, followed by extracellular formation of a disulfide bond. Lp(a) is largely removed from the circulation by uptake into the liver, involving various receptors. After endocytosis, Lp(a) is degraded in the lysosome or recycled to serve as precursors for new Lp(a) particles. Created with BioRender.com. >>

FIZIOLOŠKA VLOGA LIPOPROTEINA(a)

Fiziološka vloga Lp(a) še ni popolnoma razjasnjena. Lp(a) naj bi spodbujal celjenje ran in popraviljanje tkiv, saj se akumulira v poškodovanem endoteliju, veže na številne komponente žilne stene in subendotelijskega matriksa, stimulira aktivacijo kemotakse monocitov in makrofagov ter uravnava angiogenezo (17, 18). Skrajno nizka koncentracija Lp(a) sicer ni povezana z nobeno boleznijo ali simptomi (3, 17).

PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI LIPOPROTEINA(a)

Zvišana koncentracija Lp(a) je povezana z večjim tveganjem za aterosklerotične srčno-žilne bolezni (19). Lp(a) prispeva k tveganju za srčno-žilne bolezni preko številnih mehanizmov, ki jih delimo na proaterogene, provnetne in protrombotične. Lp(a) ima vse aterogene lastnosti delcev LDL, poleg tega molekula apo(a) aterogeno delovanje še poveča. Podobno kot holesterol LDL se tudi Lp(a) kopiči v steni arterij, kjer se lahko oksidira, kar vodi v nastanek penastih celic (20). Na lipidni ovojnici Lp(a) je prisoten tudi monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1), ki olajša njegov vstop v arterijsko steno (21). Poleg tega Lp(a) zveča izražanje adhezijskih molekul in stimulira migracijo ter razrast žilnih gladkih mišičnih celic (22, 23). Provnetno delovanje Lp(a) je povezano predvsem s prisotnostjo oksidiranih fosfolipidov, še posebej oksidiranega fosfatidilholina na domeni KIV₁₀ apo(a) (24). Lp(a) lahko sproži izločanje vnetnih citokinov in migracijo monocitov preko endotelija, kar prispeva k nastanku in napredovanju ateroskleroze. Oksidirani fosfolipidi na Lp(a) pa prispevajo tudi k disfunkciji endotelijskih celic (25). Ker je struktura Lp(a) podobna plazminogenu, lahko Lp(a) tudi zavira fibrinolizo, saj tekmuje za vezavna mesta na plazminu in tako poruši ravnovesje med koagulacijo in fibrinolizo. Po drugi strani pa Lp(a) poveča izražanje tkivnega faktorja predvsem v aterosklerotičnih lezah in tako poveča možnost arterijske tromboze in s tem akutnega srčno-žilnega dogodka (26).

Poleg zvečanega tveganja za aterosklerotične srčno-žilne bolezni je zvišana koncentracija Lp(a) povezana tudi s tveganjem za nastanek in napredovanje stenozne aortne zaklopke (27, 28). Ko je poškodovan endotelij v aortni zaklopki, pride do vdora Lp(a), holesterola LDL in vnetnih celic, kot so makrofagi in limfociti T (29). Oksidirani fosfolipidi na apo(a) stimulirajo intersticijske celice zaklopke, da inducirajo osteoplastno diferenciacijo ali apoptozo (30). Oksidirani fosfolipidi so substrat za z lipoproteini povezano fosfolipazo A2 (Lp-PLA2), ki iz njih sintetizira lizofosfatidilholin. Lp-PLA2 se izraža prav v intersticijskih celicah zaklopk. Avtotaksin, ki se prav tako transportira v aortno zaklopko, vezan na Lp(a), lahko pretvori lizofosfatidilholin v lizofosfatidno kislino in tako neposredno sodeluje pri kalcifikaciji zaklopke (31).

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA KONCENTRACIJO LIPOPROTEINA(a)

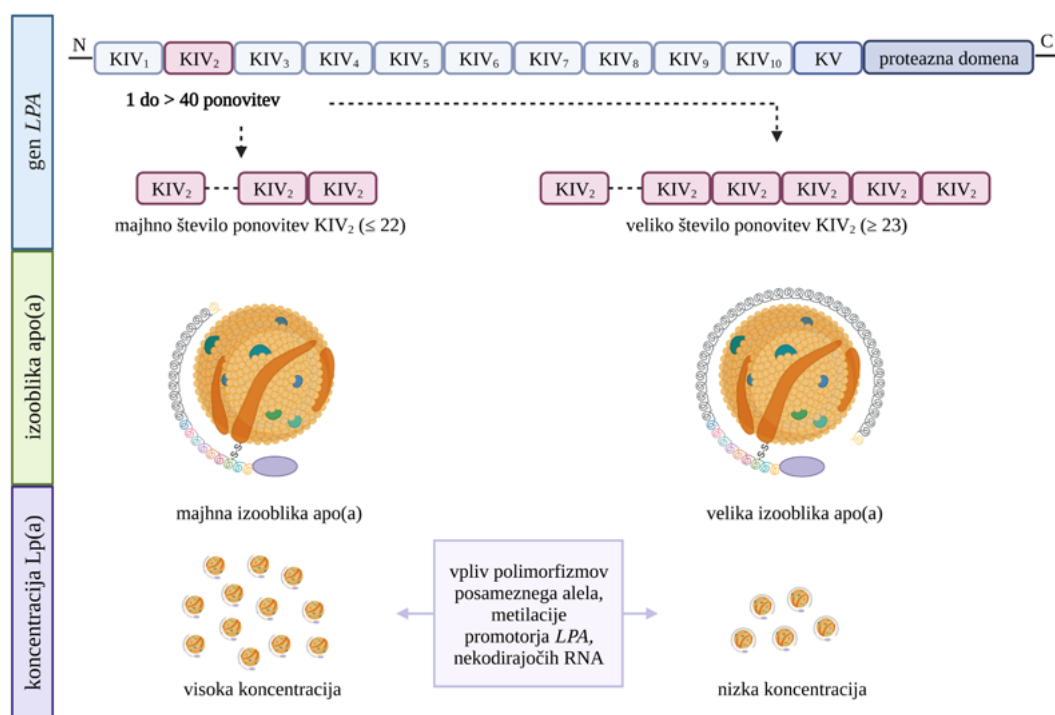
Variabilnost gena *LPA*

Koncentracija Lp(a) je v 90 % genetsko določena preko variant gena *LPA* in se deduje avtosomno kodominantno. Več kot 95 % posameznikov nosi zapis za dve varianti gena *LPA*, vsako podedovano od enega starša (32). Zaradi genetske variabilnosti je razlika v koncentraciji Lp(a) med posamezniki lahko tudi več kot 1000-kratna (5). Velikost izooblike apo(a), ki je premo sorazmerna številu ponovitev KIV₂, pojasni okoli 40–70 % variabilnosti v koncentraciji Lp(a) (5, 10). Izooblike z nizko molekulsko maso (10–22 KIV₂) so povezane s približno štiri- do petkrat višjo mediano koncentracije Lp(a) v primerjavi z izooblikami z visoko molekulsko maso (> 22 KIV₂). Povezava med zgradbo *LPA*, izoobliko apo(a) in koncentracijo Lp(a) je prikazana na Sliki 3. Na koncentracijo poleg števila ponovitev KIV₂ vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so polimorfizmi posameznega alela (okr. angl. *single nucleotid polymorphism*, SNP) in metilacija promotorja *LPA* (33). Povezava med izoobliko apo(a) in SNP-ji v *LPA* je izjemno heterogena, saj lahko prisotna izooblika zakrije vpliv SNP-ja in obratno. Večina SNP-jev zniža koncentracijo Lp(a), medtem ko so SNP-ji, ki zvišajo koncentracijo Lp(a), zelo redki. »

V raziskavi na slovenskih bolnikih s stabilno koronarno arterijsko boleznijo in povišanimi vrednostmi Lp(a) je bilo na primer ugotovljeno, da sta polimorfizma posameznega alela rs10455872 in rs3798220, ki se nahajata v *LPA*, in prisotni haplotipi povezani s koncentracijo Lp(a) (34). Frekvenca SNP-jev je zelo različna in se giblje med manj kot 0,1 in več kot 20 %. Zanimivo je, da se nekateri SNP-ji pojavljajo samo pri določenih izooblikah apo(a). Poleg tega pogostost SNP-jev variira tudi med različnimi rasami. Zadnje ugotovitve kažejo, da so funkcionalni SNP-ji prisotni tudi znotraj ponovitev KIV₂ (33). Zaradi velike homolognosti med ponovitvami KIV₂ in dejstva, da SNP-ji niso prisotni v vseh ponovitvah, sekvenciranje po Sangerju in genotipizacijske metode ne omogočajo določanja genetske variabilnosti v ponovitvah KIV₂. Z razvojem nove generacije sekvenciranja pa se je občutljivost sekvenciranja zelo povečala in tako lahko določimo SNP, ki je prisot-

ten le v eni izmed več kot 40 ponovitev KIV₂ (35). Razumevanje vpliva genetske variabilnosti je pomembno za razvoj novih terapevtskih pristopov, predvsem genetske terapije, in je cilj številnih raziskav. V diagnostične namene pa se trenutno še ne uporablja.

Omeniti velja še vpliv nekodirajočih RNA, med katere sodijo tudi mikroRNA (miRNA). To so kratke, 18–26 nukleotidov dolge, enoverižne RNA molekule, ki vplivajo na izražanje genov na posttranskripcijski ravni, in sicer preko razgradnje tarčne informacijske RNA (mRNA) ali zaviranja prevajanja mRNA (36). Znano je, da miRNA vplivajo na sintezo in presnovo lipidov ter so vpletene v nastanek in napredovanje srčno-žilnih bolezni (37, 38). Vpliv miRNA na koncentracijo Lp(a) je do sedaj malo raziskan, znano pa je, da v *in vitro* pogojih miR-23b-3p in miR-125b-5p zavirata sintezo apo(a) in tako znižujeta koncentracijo Lp(a) (39).



Slika 3: Povezava med zgradbo gena *LPA*, izoobliko apolipoproteina(a) (apo(a)) in koncentracijo lipoproteina(a) (Lp(a)).

Variabilno število ponovitev KIV₂ v genu *LPA* vpliva na velikost izooblike apo(a) in s tem na koncentracijo Lp(a) v krvnem obtoku. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 3: Association between *LPA* gene structure, apolipoprotein(a) (apo(a)) isoform and lipoprotein(a) concentration (Lp(a)).

The variable number of KIV₂ repeats in the *LPA* gene affects the size of the apo(a) isoform and thus the concentration of Lp(a) in the circulation. Created with BioRender.com.

»

Vpliv drugih dejavnikov na koncentracijo lipoproteina(a)

Koncentracija večine lipoproteinov je odvisna od življenjskega sloga in fizioloških dejavnikov, ki se skozi življenje močno spreminjajo. Koncentracija Lp(a) pa je pretežno genetsko določena, zato imajo negenetski dejavniki manjši vpliv. Kljub temu so znani nekateri dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo Lp(a) v krvnem obtoku, vendar se je treba zavedati, da je vpliv dejavnika pri posamezniku odvisen tudi od prisotne izooblike Lp(a) in začetne koncentracije Lp(a). Teščost ne vpliva na koncentracijo Lp(a) (40).

Koncentracija Lp(a) je takoj po rojstvu nizka in se v času prvega leta podvoji. Izražanje gena *LPA* se dokončno vzpostavi do prvega oz. drugega leta starosti (41, 42). Tako pri otrocih kot tudi pri odraslih so raziskave, ki bi longitudinalno preučevale spreminjanje koncentracije Lp(a), precej redke, njihovi rezultati pa so si nasprotujoči. Splošno veljavna predpostavka je, da se koncentracija Lp(a) s starostjo ne spreminja. Nasprotno je nedavno objavljena nizozemska longitudinalna raziskava na veliki kohorti otrok pokazala, da se je koncentracija Lp(a) od osmega do 20. leta povprečno zvišala za 22 % pri tistih otrocih, ki niso jemali zdravil za zniževanje koncentracije lipidov, medtem ko se je koncentracija Lp(a) pri tistih otrocih, ki so jemali statine, zvišala za 43 %. Poleg tega je bila intravariabilnost kar 70 % (43). Pri odraslih nekatere raziskave kažejo, da se s staranjem koncentracija Lp(a) zvišuje, druge pa to povezavo zavračajo (44, 45).

Tudi vpliv spola na koncentracijo Lp(a) še ni popolnoma razjasnjen. Nekatere raziskave kažejo, da imajo ženske višjo koncentracijo Lp(a) v primerjavi z moškimi, vendar so potrebne nadaljnje raziskave za osvetlitev razlik v koncentraciji in njihov prispevek k tveganju za srčno-žilne bolezni (46). Odprto ostaja tudi vprašanje o vplivu menopavze na koncentracijo Lp(a). Nekatere raziskave namreč kažejo, da je koncentracija Lp(a) pri ženskah v postmenopavzi višja, vendar zaenkrat še ni mogoče izključiti vpliva staranja na zvišano koncentracijo v tem obdobju (47). Hormonsko nadomestno zdravljenje znižuje Lp(a) za približno 20 % (48). Oblika hormonskega nadomestnega zdravljenja vpliva tudi na spremembo koncentracije Lp(a). Izkazalo se je, da oralno nadomestno hormonsko zdravljenje v nasprotju s transdermalnim statistično pomembno zniža koncentracijo Lp(a) (49). Na koncentracijo Lp(a) vpliva tudi nosečnost. Koncentracija se tekom prvega trimestra

zviša in doseže najvišjo vrednost na sredini drugega trimestra, ko so vrednosti približno trikrat višje kot pri osmih tednih nosečnosti. Po porodu se koncentracija Lp(a) vrne na osnovno raven (50).

Razlike v koncentraciji in porazdelitvi koncentracije Lp(a) v populaciji sta bili opaženi tudi med različnimi rasami. Črnci imajo najvišjo koncentracijo Lp(a), sledijo jim južni Azijci, Kavkazijci, Hispanci in zahodni Azijci. Kljub temu je bila pri vseh rasah povišana koncentracija povezana s tveganjem za srčno-žilne bolezni, mejne vrednosti za povišano tveganje za posamezno rasno oz. etično skupino pa še vedno niso opredeljene. Pri črncih koncentracija Lp(a) v populaciji sledi normalni porazdelitvi, pri Kavkazijcih pa porazdelitvi s pozitivno asimetrijo. Razlike v koncentraciji in razporeditvi Lp(a) med rasami deloma razložijo razlike v velikosti gena *LPA* ter različni prisotnosti polimorfizmov posameznega alela znotraj ali v bližini gena *LPA* (51).

Vpliv diete na koncentracijo Lp(a) je še vedno predmet raziskav. Rezultati randomiziranih kliničnih raziskav kažejo, da zmanjšanje vnosa nasičenih maščob in njihova nadomestitev s proteini, ogljikovimi hidrati in nenasičenimi maščobami zviša raven Lp(a) za 10–15 %, medtem ko se koncentracija holesterola LDL zniža (46). Fizična aktivnost za razliko od ostalih lipidov in lipoproteinov nima oz. ima samo majhen vpliv na koncentracijo Lp(a). Nekatere raziskave so sicer pokazale srednji vpliv visoko intenzivne vadbe, aerobne vadbe in nizko intenzivne vzdržljivostne vadbe pri mlajših preiskovancih, vendar pri teh ni bil upoštevan vpliv izooblike apo(a), prav tako v nekaterih raziskavah ni bila vključena kontrolna skupina (46).

Na koncentracijo Lp(a) vplivajo tudi patofiziološka stanja, kot so ledvična in jetrna okvara ter vnetje. Zvišana koncentracija Lp(a) je bila namreč ugotovljena pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo, proteinurijo in nefrotskim sindromom, najverjetneje zaradi vloge ledvic v katabolizmu in odstranitvi Lp(a) (52). Tudi bolniki na nadomestnem dializnem zdravljenju imajo višjo raven Lp(a), medtem ko imajo bolniki po presaditvi ledvic nižjo v primerjavi s kontrolnimi preiskovanci (53). Se pa je izkazalo, da se koncentracija Lp(a) po presaditvi ledvic pomembno zniža skupaj z ostalimi dejavniki tveganja, ki so odvisni od ledvične insuficience (54). Apo(a) se sintetizira v jetrih, zato jetrna funkcija vpliva na koncentracijo Lp(a). S presnovno motnjo povezana maščobna jetrna bolezen je povezana z nižjo koncentracijo Lp(a) v primerjavi s kontrolnimi preiskovanci, prav tako je koncentracija Lp(a) nižja tudi pri »

bolnikih s kroničnimi jetrnimi boleznimi, kot so ciroza, hepatitis C in hepatocelularni karcinom (55, 56). Na koncentracijo Lp(a) vpliva tudi sistemsko vnetje, ki je prisotno pri vseh fazah aterosklerotičnega procesa. Kronično sistemsko vnetje povzroči dvig koncentracije Lp(a), ki korelira s koncentracijo C-reaktivnega proteina (CRP) in interleukina 6 (IL6). V genu *LPA* se namreč nahajajo odzivni elementi na IL6 (angl. *IL6 response elements*), poleg tega pa Lp(a) tudi pospeši sproščanje pro-vnetnih citokinov iz žilnih endotelnih ter gladkih mišičnih celic, kot tudi iz monocitov in makrofagov (57, 58).

DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPOPROTEINA(a)

Določanje koncentracije Lp(a) v serumu še vedno ostaja izziv zaradi velike heterogenosti v strukturi Lp(a), saj je njegova molekulska masa odvisna od izooblike apo(a). Po drugi strani pa so eksoni, ki kodirajo domene v obliki lasnice, izredno homologni. Med različnimi domenami KIV je več kot 70-odstotna homolognost, med KIV₂ pa 98- do 100-odstotna (35, 59). Pri nekaterih izooblikah apo(a) kar 70 % celotnega proteina predstavljajo zelo homologne ponovitve KIV₂ (60).

V kliničnih laboratorijih se za določanje Lp(a) pretežno uporabljajo imunske metode s protitelesi, specifičnimi za apo(a). Večina metod je občutljivih na velikost apo(a), saj ponavljajoče strukture in visoka homolognost vplivajo na meritve (Slika 4). Protitelesa, ki so usmerjena proti ponavljajočim zaporedjem, se lahko namreč na posamezen protein vežejo na več kot enem mestu. Tudi pri uporabi protiteles, ki so usmerjena proti unikatni domeni KV, lahko zaradi homolognih struktur med KV in ponovitvami KIV pride do vezave več kot enega protitelesa na posamezno molekulo apo(a). Pridobivanje protiteles, ki prepoznajo unikatni motiv na apo(a), je zelo zahtevno, zato je takih protiteles na voljo zelo malo in so običajno monoklonska. Večina protiteles proti apo(a) se pridobiva v živalskih modelih in so poliklonska, kar pomeni, da različni subkloni prepoznajo različne epitope na apo(a). Zaradi tega je zelo velika verjetnost, da so protitelesa usmerjena proti ponavljajočim strukturam molekule apo(a) (60). V takem primeru so serumske koncentracije majhnih izooblik, ki so običajno povezane z višjo koncentracijo Lp(a),

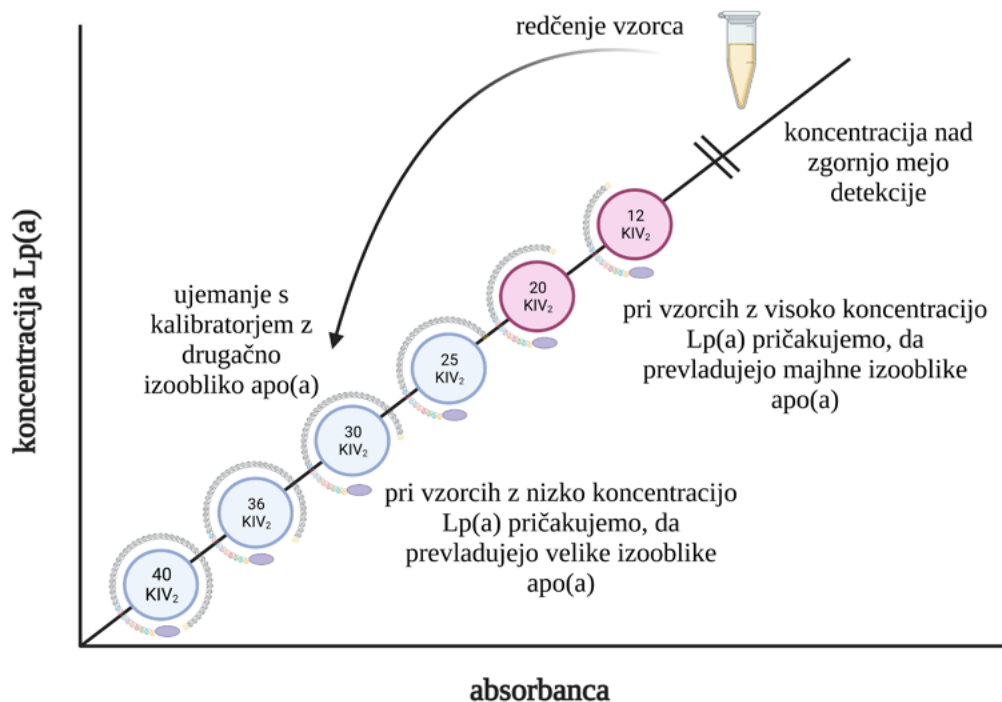
podcenjene, koncentracije velikih izooblik, ki so običajno povezane z nižjimi koncentracijami Lp(a), pa precenjene (61).

Naslednji izziv predstavljajo tudi kalibratorji, saj naj bi se z vzorcem ujemali ne samo po koncentraciji, ampak tudi po izoobliki. Pri vzorcih z visoko koncentracijo Lp(a) namreč pričakujemo majhno število ponovitev KIV₂, zato bi se morali ujemati s kalibratorjem z majhnim številom ponovitev KIV₂. Pri vzorcih z nizko koncentracijo Lp(a) pa pričakujemo veliko število ponovitev KIV₂ in bi se morali ujemati s kalibratorji z velikim številom ponovitev KIV₂ (Slika 4). Nekateri kalibratorji tako že vsebujejo različne izooblike apo(a), saj se je pri večini vzorcev na ta način možno izogniti občutljivosti zaradi različnih izooblik apo(a) (60). Zavedati pa se je treba, da je variabilnost koncentracije Lp(a) znotraj vsake skupine izooblike apo(a) tudi do 200-kratna (33). Pri analizi 5953 vzorcev so ugotovili, da je imelo 30 % vzorcev z majhnimi izooblikami apo(a) koncentracijo pod 300 mg/L, čeprav bi glede na velikost pričakovali višje koncentracije. Nasprotno pa je 11 % vzorcev z velikimi izooblikami apo(a) imelo koncentracijo višjo kot 300 mg/L in se je zato ujemalo z napačnim kalibratorjem. Podobna težava obstaja tudi pri vzorcih, ki so nad zgornjo mejo zaznane, saj bi se po redčenju tak vzorec ujemal s kalibratorjem z večjo izoobliko apo(a) (Slika 4). Takšnih vzorcev zato običajno ne redčimo, ampak podajamo rezultat kot nad zgornjo mejo zaznane. Pri izbiri kalibratorja je zato pomemben podatek o velikosti izooblik apo(a), ki so prisotne, pri veččkovnih kalibratorjih pa tudi, ali so pridobljeni z redčenjem enega samega kalibratorja ali pa so sestavljeni iz različnih kalibratorjev z različnimi izooblikami apo(a) (60).

Referenčna metoda za določanje koncentracije Lp(a) je še v razvoju. Kot referenčna metoda za standardizacijo določanja Lp(a) je bila predlagana tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) (62). Določanje v molskih enotah omogoča tudi uporaba specifičnega protitelesa, ki je usmerjeno proti unikatnemu epitopu na KIV₉. Vsak delec Lp(a) je tako prepoznan samo enkrat (61). Možna je tudi uporaba protiteles, ki so usmerjena proti apoB, saj vsak Lp(a) delec vsebuje le eno apoB molekulo, se pa ta princip uporablja bolj redko (61). Eden od razlogov bi lahko bil, da ta pristop zanemari prosti apo(a), ki ni vezan na holesterol LDL, in predstavlja približno 5 % celotne koncentracije apo(a). Ni sicer še znano, ali tako majhne koncentracije apo(a), pri čemer je apo(a) tudi delno fragmentiran, sploh prispevajo k aterogenosti apo(a) (63). >>

Zaradi omejitev in specifičnosti posameznih metod ter heterogenosti apo(a) ni mogoče neposredno pretvoriti vrednosti, izmerjenih v masnih enotah (mg/L), v molske enote (nmol/L). Kljub vsemu pa je priporočljivo določanje Lp(a) v molskih enotah. Žal so metode za sedaj slabo standardizirane, kar lahko prispeva k variaciji rezultatov, pridobljenih z različnimi metodami. Zato se je treba zavedati ome-

jitev posamezne metode, saj pri uporabi protiteles, ki so občutljiva na izoobliko apo(a), meritev v molarnih koncentracijah ni primerna, ker se lahko na posamezno molekulo apo(a) veže več protiteles. Prav tako tudi pretvorba iz masnih v molarne enote s splošnim faktorjem ni priporočljiva, saj na pretvorbeni faktor vplivajo izooblika apo(a), postavljena mejna vrednost in uporabljena metoda za merjenje (60).



Slika 4: Določanje koncentracije lipoproteina(a) (Lp(a)) z imunskimi testi. Koncentracija Lp(a) je obratno sorazmerna velikosti izooblike apolipoproteina(a) (apo(a)). Uporaba kalibratorjev z različnimi velikostmi izooblike apo(a) omogoči ujemanje kliničnega vzorca z visoko koncentracijo Lp(a) s kalibratorjem z majhno izoobliko apo(a) in obratno. Prirejeno po (60). Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 4: Assessment of lipoprotein(a) (Lp(a)) concentration using immunoassays. The concentration of Lp(a) is inversely proportional to the size of the apolipoprotein(a) (apo(a)) isoform. The use of calibrators with different sizes of apo(a) isoform allows a clinical sample with a high concentration of Lp(a) to be matched with a calibrator with a small apo(a) isoform and vice versa. Adapted from (60). Created with BioRender.com.

SMERNICE ZA DOLOČANJE LIPOPROTEINA(a)

Glede na našete omejitve, ki ostajajo pri določanju koncentracije Lp(a), tudi mejna vrednost za povečano tveganje za srčno-žilne bolezni še ni dokončno določena. V zač-

tnih raziskavah je bila mejna vrednost postavljena na 300 mg/L (64). To vrednost so uporabljale tudi številne druge raziskave, predlagana pa je bila tudi višja mejna vrednost, in sicer 500 mg/L (65). Podajanje v molskih enotah je sicer bolj pravilno, vendar se zaradi številnih raziskav, ki so uporabljale masne enote, in odsotnosti enostavne pretvorbe, še vedno pogosto navajajo masne enote. Najnovejše mednarodne smernice glede določanja Lp(a) so povze- >>

te v Tabeli 1. Smernice različnih združenj se razlikujejo v različnih mejnih vrednostih, pa tudi v prognostični in diagnostični uporabnosti določanja Lp(a). Nekatere predlagajo določanje Lp(a) samo pri posameznikih s povečanim

tveganjem za srčno-žilne bolezni, druge, med njimi tudi evropska, predlagajo določanje Lp(a) vsaj enkrat v življenju vsakega posameznika.

Tabela 1: Najnovejša mednarodna priporočila za merjenje lipoproteina(a) in mejne vrednosti za povečano tveganje za srčno-žilne bolezni.

Table 1: The latest international recommendations for lipoprotein(a) measurement and cut-off values for increased risk for cardiovascular diseases.

Smernice	Tarčna populacija	Mejna vrednost
European Society of Cardiology and European Atherosclerosis Society EAS/ESC 2019 (66)	1.) Splošno presejanje: vsaj enkrat v življenju za prepoznavanje posameznikov, ki so podedovali ekstremno povišane vrednosti Lp(a). 2.) Tarčno presejanje: pri posameznikih s povečanim tveganjem za ASŽB oz. zgodovina prezgodnje ASŽB v družini oz. ocenjeno tveganje za ASŽB v desetletnem obdobju.	zelo visoko tveganje: Lp(a) \geq 1800 mg/L ali \geq 430 nmol/L
American Heart Association and American College of Cardiology AHA/ACC 2018 (67)	1.) Zgodovina prezgodnje ASŽB v družini. 2.) Zgodovina prezgodnje ASŽB pri posamezniku, ki je ni mogoče pojasniti z ostalimi glavnimi dejavniki tveganja.	Lp(a) \geq 500 mg/L ali \geq 125 nmol/L
HEART-UK 2019 (68)	1.) Zgodovina prezgodnje ASŽB v družini. 2.) Sorodnik v prvem kolenu z Lp(a) > 200 nmol/L. 3.) Pacienti z družinsko hiperholesterolemijo, stenozo zaklopk ali visokim tveganjem za kardiovaskularni dogodek v desetletnem obdobju.	majhno tveganje: 32–90 nmol/L srednje: 90–200 nmol/L visoko: 200–400 nmol/L zelo visoko: > 400 nmol/L
National Lipid Association NLA 2019 (69)	1.) Tarčno presejanje družinskih članov pacienta s hudo hiperholesterolemijo (LDL \geq 190 mg/dL) ali zgodovina prezgodnje ASŽB pri posamezniku. 2.) Pri mladih (< 20 let) s kliničnim sumom ali genetsko potrjeno družinsko hiperholesterolemijo oz. sorodnik v prvem kolenu z zgodovino prezgodnje ASŽB oz. starš ali sorojenec z Lp(a) \geq 50 mg/dL ali \geq 100 nmol/L.	Lp(a) \geq 500 mg/L ali \geq 100 nmol/L
Canadian Cardiovascular Society CCS 2021 (70)	Enkrat v življenju posameznika kot del začetnega lipidnega presejanja.	Lp(a) > 500 mg/L ali > 100 nmol/L

ASŽB, aterosklerotična srčno-žilna bolezen; Lp(a), lipoprotein(a).



TERAPEVTSKE MOŽNOSTI ZA ZNIŽEVANJE KONCENTRACIJE LIPOPROTEINA(a)

Povišana koncentracija Lp(a) je že dolgo znana kot neodvisni dejavnik tveganja ne glede na vrednost holesterola LDL, vendar zdravil, ki bi specifično zniževala Lp(a), trenutno še ni v klinični uporabi. Za zniževanje holesterola LDL se najpogosteje uporabljajo statini, ki koncentracije Lp(a) ne znižajo. Nasprotno, nekatere raziskave so celo pokazale, da se koncentracija Lp(a) nekoliko zviša (0–10 %), kar naj bi bilo odvisno od izooblike apo(a) (71), vendar neodvisno od vrste ali odmerka statinov (72).

V zadnjih nekaj letih so na voljo zdravila, ki vplivajo na zmanjšanje koncentracije proste proteina konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9, okr. angl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). PCSK9 je sicer odgovoren za razgradnjo LDLR, in s tem vpliva na zmanjšanje privzema holesterola LDL iz krvi v celice. Na še ne povsem pojasnjen način pa znižujejo tudi koncentracijo Lp(a). Zaviralci PCSK9 so monoklonska protitelesa, ki zmanjšujejo koncentracijo PCSK9 v krvi. Hepatociti niso edini izvor PCSK9, saj ta nastaja tudi v tankem črevesu, ledvicah, endotelijskih celicah, gladkomišičnih celicah krvnih žil ter v monocitih in makrofagih v aterosklerotični lehi. Na drugi strani je inclisiran zdravilo, ki zavira nastanek PCSK9 samo znotraj jetrnih celic (73). Zdravila iz obeh skupin učinkovito znižujejo holesterol LDL za 40 do 60 % in tudi Lp(a) od 15 do 35 %. Vendar pa imamo le za zdravila iz skupine zaviralcev PCSK9 dokaze, da poleg znižanja koncentracije holesterola LDL in Lp(a) zmanjšajo tudi pojavnost srčno-žilne obolenosti in umrljivosti (74, 75). Podobna raziskava z inclisiranom še poteka in rezultate pričakujemo v letu 2025 (76).

Pri zniževanju koncentracije lipoproteinov, ki vsebujejo apoB, je zelo učinkovita afereza, saj je takoj po koncu koncentracija Lp(a) znižana za do 70 % (77). Afereza tudi zmanjša tveganje za srčno-žilne dogodke (78), vendar je to precej drag in časovno zamuden postopek, saj morajo bolniki dobivati terapijo na vsaka dva tedna. Med terapijama je znižanje koncentracije Lp(a) sicer bolj v območju 35 %. Afereza lipoproteinov povzroča veliko nihanje koncentracije Lp(a), kar je tudi

eden od potencialnih dejavnikov tveganja za srčno-žilne bolezni (77). Koncentracijo Lp(a) znižujejo tudi niacin (20 %) (79) in zaviralci holesterilester prenašalnega proteina (CETP, okr. angl. *cholesteryl ester transfer protein*) (do 25 %) (80, 81), vendar znižanje ne vpliva na zmanjšanje tveganja za srčno-žilne bolezni.

Trenutne raziskave se osredotočajo na učinkovine proti mRNA gena *LPA*, kot so protismiselni oligonukleotidi (ASO, okr. angl. *antisense oligonucleotides*) in male interferirajoče RNA (siRNA, okr. angl. *small interfering RNAs*). ASO in siRNA se v jetrih specifično vežejo na mRNA gena *LPA* in tako zavirajo sintezo apo(a) ter s tem Lp(a). Trenutno potekajo klinične raziskave za tri take terapevtske učinkovine: Pelacarsen, Olpasiran in SLN360. Pelacarsen deluje kot ASO. V fazi 2 kliničnih raziskav se je koncentracija Lp(a) znižala za 35 do 80 %, trenutno poteka faza 3 kliničnih raziskav (82). Olpasiran in SLN360 pa sta siRNA, ki sta trenutno v fazi 2 kliničnih raziskav. V fazi 1 je Olpasiran znižal koncentracijo Lp(a) za 70 do 95 % (83), SLN360 pa za 46 do 98 % (84). Rezultati kažejo, da je gensko zdravljenje tako precej bolj učinkovito v primerjavi s trenutnimi zdravilnimi učinkovinami in predstavlja obetajoč pristop za zniževanje koncentracije Lp(a). Seveda pa je treba še zaključiti vse faze kliničnih raziskav in potrditi varno uporabo in komplianco teh zdravil ter dejanski prispevek k zmanjšanju tveganja za srčno-žilne bolezni.

ZAKLJUČEK

Koncentracija Lp(a) je ena najbolj podedovanih kvantitativnih lastnosti pri človeku, saj genetske spremembe v genu *LPA* razložijo 90 % variabilnosti v koncentraciji Lp(a) med posamezniki. Lp(a) deluje proaterogeno, provnetno in protrombotično ter prispeva k začetku številnih patofizioloških procesov in tudi napredovanju bolezni. Povišane vrednosti Lp(a) so neodvisni in vzročni dejavnik za aterosklerotične srčno-žilne bolezni in stenozo aortne zaklopke. Večina oseb s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni (70–80 %) ima sicer holesterol LDL v precej višjih koncentracijah kot Lp(a), zato k tveganju v največji meri prispeva holesterol LDL. Vendar, ko koncentracija Lp(a) preseže 300 mg/L, kar je pri 20 do 30 % populacije, tveganje zaradi Lp(a) narašča linearno glede na absolutno maso Lp(a) v krvnem obtoku (85). Merjenje Lp(a) še vedno ni povsem standardizirano, vseeno pa so trenutno do- »

segeljive laboratorijske metode, opisane v tem prispevku, klinično uporabne za določanje povečanega tveganja za srčno-žilne bolezni. Ko bodo na voljo učinkovite in varne terapevtske možnosti, bo določanje Lp(a) predvidoma bolj pogosto tudi v kliničnih laboratorijih na sekundarni in terciarni ravni.

LITERATURA

- Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe —epidemiological update 2015. *Eur Heart J*. 2015;36(40):2696-705.
- Iannuzzo G, Tripaldella M, Mallardo V, Morgillo M, Vitelli N, Iannuzzi A, et al. Lipoprotein(a) where do we stand? From the physiopathology to innovative therapy. *Biomedicines*. 2021;9(7):838.
- Berg K. A new serum type system in man - the LP system. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1963;59:369-82.
- Sofi F, Marcucci R, Abbate R, Gensini GF, Prisco D. Lipoprotein (a) and venous thromboembolism in adults: a meta-analysis. *Am J Med*. 2007;120(8):728-33.
- Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med*. 2013;273(1):6-30.
- Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum Mol Genet*. 1993;2(7):933-40.
- Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G. Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J Clin Invest*. 1989;83(1):137-42.
- Wang J, White AL. Role of N-linked glycans, chaperone interactions and proteasomes in the intracellular targeting of apolipoprotein(a). *Biochem Soc Trans*. 1999;27(4):453-8.
- Brunner C, Lobentanz EM, Pethö-Schramm A, Ernst A, Kang C, Dieplinger H, et al. The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1996;271(50):32403-10.
- Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C. Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest*. 1987;80(2):458-65.
- Youssef A, Clark JR, Marcovina SM, Boffa MB, Koschinsky ML. Apo(a) and ApoB interact noncovalently within hepatocytes: Implications for regulation of Lp(a) levels by modulation of ApoB secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42:289-304.
- Frank S, Durovic S, Kostner GM. Structural requirements of apo-a for the lipoprotein-a assembly. *Biochem J*. 1994;304(Pt 1):27-30.
- Hoover-Plow J, Huang M. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. *Metabolism*. 2013;62(4):479-91.
- McCormick SPA, Schneider WJ. Lipoprotein(a) catabolism: a case of multiple receptors. *Pathology*. 2019;51(2):155-64.
- Vuorio A, Watts GF, Schneider WJ, Tsimikas S, Kovanen PT. Familial hypercholesterolemia and elevated lipoprotein(a): double heritable risk and new therapeutic opportunities. *J Intern Med*. 2020;287(1):2-18.
- Sharma M, Redpath GM, Williams MJ, McCormick SP. Recycling of apolipoprotein(a) after PlgRKT-mediated endocytosis of lipoprotein(a). *Circ Res*. 2017;120(7):1091-102.
- Rubin J, Kim HJ, Pearson TA, Holleran S, Berglund L, Ramakrishnan R. The apolipoprotein(a) gene: linkage disequilibria at three loci differs in African Americans and Caucasians. *Atherosclerosis*. 2008;201(1):138-47.
- Leischik R, Dworrak B. Lipoprotein(a): importance for the fibrinolytic system and thromboembolic complications. *Herz*. 2006;31(2):144-52.
- Forbes CA, Quek RG, Deshpande S, Worthy G, Wolff R, Stirk L, et al. The relationship between Lp(a) and CVD outcomes: a systematic review. *Lipids Health Dis*. 2016;15:95.
- Umahara T, Uchihara T, Yamada S, Hashimoto T, Akimoto J, Haraoka J, et al. Differential expression of oxidized/native lipoprotein(a) and plasminogen in human carotid and cerebral artery plaques. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):392-8.
- Wiesner P, Tafelmeier M, Chittka D, Choi SH, Zhang L, Byun YS, et al. MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *J Lipid Res*. 2013;54(7):1877-83.
- Allen S, Khan S, Tam S, Koschinsky M, Taylor P, Yacoub M. Expression of adhesion molecules by Lp(a): a potential novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J*. 1998;12(15):1765-76.
- O'Neil CH, Boffa MB, Hancock MA, Pickering JG, Koschinsky ML. Stimulation of vascular smooth muscle cell proliferation and migration by apolipoprotein(a) is dependent on inhibition of transforming growth factor-beta activation and on the presence of kringle IV type 9. *J Biol Chem*. 2004;279(53):55187-95.
- Leibundgut G, Scipione C, Yin H, Schneider M, Boffa MB, Green S, et al. Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *J Lipid Res*. 2013;54(10):2815-30.
- Cho T, Jung Y, Koschinsky ML. Apolipoprotein(a), through its strong lysine-binding site in KIV(10'), mediates increased endothelial cell contraction and permeability via a Rho/Rho kinase/MYPT1-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30503-12.
- Boffa MB, Koschinsky ML. Lipoprotein (a): truly a direct prothrombotic factor in cardiovascular disease? *J Lipid Res*. 2016;57(5):745-57.
- Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(5):470-7.
- Capoulade R, Yeang C, Chan KL, Pibarot P, Tsimikas S. Association of mild to moderate aortic valve stenosis progression with higher lipoprotein(a) and oxidized phospholipid levels: Secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Cardiol*. 2018;3(12):1212-7.
- Pawade TA, Newby DE, Dweck MR. Calcification in aortic stenosis: The skeleton key. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(5):561-77.
- Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, Kroon J, Jenkins WSA, Doris MK, et al. Lipoprotein(a) and oxidized phospholipids promote valve calcification in patients with aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(17):2150-62.
- Bourgeois R, Devillers R, Perrot N, Després AA, Boulanger MC, Mitchell PL, et al. Interaction of autotaxin with lipoprotein(a) in patients with calcific aortic valve stenosis. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(9):888-97.
- Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahmig T, Hobbs HH. Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest*. 1991;87(6):2153-61. >>

33. Coassin S, Kronenberg F. Lipoprotein(a) beyond the kringle IV repeat polymorphism: The complexity of genetic variation in the *LPA* gene. *Atherosclerosis*. 2022;349:17-35.
34. Rehberger Likozar A, Blinc A, Trebušak Podkrajšek K, Šebešljen M. *LPA* genotypes and haplotypes are associated with lipoprotein(a) levels but not arterial wall properties in stable post-coronary event patients with very high lipoprotein(a) levels. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(12):181.
35. Coassin S, Schönherr S, Weissensteiner H, Erhart G, Forer L, Losso JL, et al. A comprehensive map of single-base polymorphisms in the hypervariable *LPA* kringle IV type 2 copy number variation region. *J Lipid Res*. 2019;60(1):186-99.
36. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
37. Fernández-Tussy P, Ruz-Maldonado I, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and circular RNAs in lipoprotein metabolism. *Curr Atheroscler Rep*. 2021;23(7).
38. Zhu L, Li N, Sun L, Zheng D, Shao G. Non-coding RNAs: The key detectors and regulators in cardiovascular disease. *Genomics*. 2021;113(1):1233-46.
39. Zeng JF, Zeng ZL, Zhang K, Zhao Y, Liu YM, Chen JJ, et al. miR-23b-3p and miR-125b-5p downregulate apo(a) expression by targeting Ets1 in HepG2 cells. *Cell Biol Int*. 2018;42(3):313-23.
40. Langsted A, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Lipoprotein(a): fasting and nonfasting levels, inflammation, and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2014;234(1):95-101.
41. Wang XL, Wilcken DEL, Dudman NPB. Early expression of the apolipoprotein (a) gene: Relationships between infants' and their parents' serum apolipoprotein (a) levels. *Pediatrics*. 1992;89(3):401-6.
42. Rifai N, Heiss G, Doetsch K. Lipoprotein(a) at birth, in blacks and whites. *Atherosclerosis*. 1992;92(2-3):123-9.
43. de Boer LM, Hof MH, Wiegman A, Stroobants AK, Kastelein JJP, Hutten BA. Lipoprotein(a) levels from childhood to adulthood: Data in nearly 3,000 children who visited a pediatric lipid clinic. *Atherosclerosis*. 2022;349:227-32.
44. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2009;301(22):2331-9.
45. Jenner JL, Ordovas JM, Lamon-Fava S, Schaefer MM, Wilson PW, Castelli WP, et al. Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham Offspring Study. *Circulation*. 1993;87(4):1135-41.
46. Enkhmaa B, Berglund L. Non-genetic influences on lipoprotein(a) concentrations. *Atherosclerosis*. 2022;349:53-62.
47. Anagnostis P, Antza C, Trakatelli C, Lambrinoukaki I, Goulis DG, Kotsis V. The effect of menopause on lipoprotein (a) concentrations: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2022;167:39-45.
48. Anagnostis P, Galanis P, Chatzistergiou V, Stevenson JC, Godsland IF, Lambrinoukaki I, et al. The effect of hormone replacement therapy and tibolone on lipoprotein (a) concentrations in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2017;99:27-36.
49. Zegura B, Guzic-Salobir B, Sebestjen M, Keber I. The effect of various menopausal hormone therapies on markers of inflammation, coagulation, fibrinolysis, lipids, and lipoproteins in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 2006;13(4):643-50.
50. Zechner R, Desoye G, Schweditsch MOP, Karl P, Kostner GM. Fluctuations of plasma lipoprotein-A concentrations during pregnancy and post partum. *Metabolism*. 1986;35(4):333-6.
51. Mehta A, Jain V, Saeed A, Saseen JJ, Gulati M, Ballantyne CM, et al. Lipoprotein(a) and ethnicities. *Atherosclerosis*. 2022;349:42-52.
52. Kronenberg F. Causes and consequences of lipoprotein(a) abnormalities in kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(2):234-7.
53. Kronenberg F, Utermann G, Dieplinger H. Lipoprotein(a) in renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1996;27(1):1-25.
54. Kimak E, Solski J. Serum lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) phenotypes in hemodialysis, chronic ambulatory peritoneal dialysis and post-transplant patients. *Ren Fail*. 2002;24(2):187-95.
55. Choe YG, Jin W, Cho YK, Chung WG, Kim HJ, Jeon WK, et al. Apolipoprotein B/AI ratio is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease in nondiabetic subjects. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(4):678-83.
56. Jiang J, Zhang X, Wu C, Qin X, Luo G, Deng H, et al. Increased plasma apoM levels in the patients suffered from hepatocellular carcinoma and other chronic liver diseases. *Lipids Health Dis*. 2008;7:25.
57. Klezovitch O, Edelstein C, Scanu AM. Stimulation of interleukin-8 production in human THP-1 macrophages by apolipoprotein(a). Evidence for a critical involvement of elements in its C-terminal domain. *J Biol Chem*. 2001;276(50):46864-9.
58. Ramharack R, Barkalov D, Spahr MA. Dominant negative effect of TGF-beta1 and TNF-alpha on basal and IL-6-induced lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(6):984-90.
59. Schmidt K, Noureen A, Kronenberg F, Utermann G. Structure, function, and genetics of lipoprotein (a). *J Lipid Res*. 2016;57(8):1339-59.
60. Kronenberg F. Lipoprotein(a) measurement issues: Are we making a mountain out of a molehill? *Atherosclerosis*. 2022;349:123-35.
61. Marcovina SM, Albers JJ, Gabel B, Koschinsky ML, Gaur VP. Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). *Clin Chem*. 1995;41(2):246-55.
62. Marcovina SM, Clouet-Foraison N, Koschinsky ML, Lowenthal MS, Orquillas A, Boffa MB, et al. Development of an LC-MS/MS proposed candidate reference method for the standardization of analytical methods to measure lipoprotein(a). *Clin Chem*. 2021;67(3):490-9.
63. Mooser V, Marcovina SM, White AL, Hobbs HH. Kringle-containing fragments of apolipoprotein(a) circulate in human plasma and are excreted into the urine. *J Clin Invest*. 1996;98(10):2414-24.
64. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Quinici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 1981;38(1-2):51-61.
65. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010;31(23):2844-53.
66. Authors/Task Force Members, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), ESC National Cardiac Societies. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2019;290:140-205.
67. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention >>

- of cardiovascular disease: Executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(10):1376-414.
68. Cegla J, Neely RDG, France M, Ferns G, Byrne CD, Halcox J, et al. HEART UK consensus statement on Lipoprotein(a): A call to action. *Atherosclerosis*. 2019;291:62-70.
69. Wilson DP, Jacobson TA, Jones PH, Koschinsky ML, McNeal CJ, Nordestgaard BG, et al. Use of Lipoprotein(a) in clinical practice: A biomarker whose time has come. A scientific statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2019;13(3):374-92.
70. Pearson GJ, Thanassoulis G, Anderson TJ, Barry AR, Couture P, Dayan N, et al. 2021 Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in adults. *Can J Cardiol*. 2021;37(8):1129-50.
71. Yahya R, Berk K, Verhoeven A, Bos S, van der Zee L, Touw J, et al. Statin treatment increases lipoprotein(a) levels in subjects with low molecular weight apolipoprotein(a) phenotype. *Atherosclerosis*. 2019;289:201-5.
72. Zhu L, Fang Y, Gao B, Jin X, Zheng J, He Y, et al. Effect of an increase in Lp(a) following statin therapy on cardiovascular prognosis in secondary prevention population of coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):474.
73. Nishikido T, Ray KK. Inclisiran for the treatment of dyslipidemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(3):287-94.
74. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-22.
75. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16):1489-99.
76. Stoekenbroek RM, Kallend D, Wijngaard PL, Kastelein JJ. Inclisiran for the treatment of cardiovascular disease: the ORION clinical development program. *Futur Cardiol*. 2018;14(6):433-42.
77. Langsted A, Nordestgaard BG. Genetics of lipoprotein(a): Cardiovascular disease and future therapy. *Curr Atheroscler Rep*. 2021;23(8):46.
78. Roeseler E, Julius U, Heigl F, Spitthoever R, Heutling D, Breitenberger P, et al. Lipoprotein apheresis for lipoprotein(a)-associated cardiovascular disease: Prospective 5 years of follow-up and apolipoprotein(a) characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(9):2019-27.
79. Sahebkar A, Reiner Z, Simental-Mendía LE, Ferretti G, Cicero AF. Effect of extended-release niacin on plasma lipoprotein(a) levels: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Metabolism*. 2016;65(11):1664-78.
80. Group HTRC, Bowman L, Hopewell JC, Chen F, Wallendszus K, Stevens W, et al. Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377(13):1217-27.
81. Bittner VA, Szarek M, Aylward PE, Bhatt DL, Diaz R, Edelberg JM, et al. Effect of alirocumab on lipoprotein(a) and cardiovascular risk after acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(2):133-44.
82. Tsimikas S, Karwatowska-Prokopczuk E, Gouni-Berthold I, Tardif JC, Baum SJ, Steinhagen-Thiessen E, et al. Lipoprotein(a) reduction in persons with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2020;382(3):244-55.
83. Koren MJ, Moriarty PM, Neutel J, Baum SJ, Hernandez-Illas M, Weintraub HS, et al. Safety, tolerability and efficacy of single-dose Amg 890, a novel siRNA targeting Lp(a), in healthy subjects and subjects with elevated Lp(a). *Circulation*. 2020;142:A13951.
84. Nissen SE, Wolski K, Balog C, Swerdlow DI, Scrimgeour AC, Rambaran C, et al. Single ascending dose study of a short interfering RNA targeting lipoprotein(a) production in individuals with elevated plasma lipoprotein(a) levels. *JAMA*. 2022;327(17):1679-87.
85. Tsimikas S. A test in context: Lipoprotein(a): Diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(6):692-711.

Socialne in zdravstvene neenakosti žensk v obdobju po pandemiji

Women social and health inequalities in the post-pandemic era

Bernard Gouget^{1,2,3,4}, Pradeep Kumar Dabla^{3,5}, Rosa I Sierra-Amor^{6,7,8}

¹Ministry of Health France, National Committee for the Selection of Reference Laboratories

²Comité Français d'accréditation (Cofrac), Healthcare Division Executive Committee

³International Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Committee on Mobile Health and Bioengineering in Laboratory Medicine

⁴International Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Task Force on History

⁵Govind Ballabh Pant Institute of Postgraduate Medical Education and Research (GIPMER), Department of Biochemistry

⁶International Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Nominations Committee

⁷Consejo Mexicano de Certificación de Profesionales de las Ciencias Químico Farmacéuticas (COMECEP)

⁸Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI), Working group on Accreditation Management

Corresponding authors:

Dr. Bernard Gouget

International Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Committee on Mobile Health and Bioengineering in Laboratory Medicine, Via Carlo Farini 81, 20159 Milano, Italy

e-mail: b.gouget@icloud.com

Dr. Pradeep Kumar Dabla

Govind Ballabh Pant Institute of Postgraduate Medical Education and Research (GIPMER), Department of Biochemistry, 110002 Delhi, India

e-mail: pradeep_dabla@yahoo.com

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has strongly affected all walks of life and has devastated lives globally. The pandemic has further increased economic and social inequality in a vulnerable society. As per The World Economic Forum's Global Gender Report 2021, it is estimated that the global economy has been set back by up to 39 years during the pandemic era. Furthermore, healthcare access has been disrupted for women and girls, a subject which has been

ignored for a long time. Precipitating factors further led to a rise in gender-based violence and sex-based marginalization. Health inequalities related to economic status and social and cultural environments are increasing. These differences are attributable to social disparities between men and women, which often assume different functions and tasks and are therefore exposed to different morbidity factors. Others are innate to biological, genetic, hormonal, and metabolic dissimilarities or acquired (environmental) dissimilarities. It appears that both social and biological differences play a role; however, the border between the »

two is difficult to delimit. Thus, long-term measures are needed to balance between professional and personal life for the economic independence of women.

Key words: female gender, sex, global health emergency, COVID-19, inequality

INTRODUCTION

It is of pertinent importance to attain health equality even beyond the existing differences in health, biology, or social status with the motto of health for all. (1). The gender influence, which refers to the social identities and relations between sexes, constitutes a risk factor for discrimination in medical care. The gender based social code is linked to the feminine and masculine genders, influencing the expression of symptoms, the relationship to one's body, and the care required during sickness period. (2). Among physicians and caregivers, gender-related prejudices are likely to impact the interpretation of clinical signs and the management of pathologies (3). According to the joint report of the International Labour Organization and World Health Organization, in the health and social care sector, women face a larger gender pay gap than in other economic sectors, making 24% less than men (4). According to a global review carried out during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, there were only slight advances in pay equity in 2019 and 2020, despite the essential role performed by health and care workers during the pandemic (5). In almost every nation, the relationship between social inequality and health is experimentally well verified (6). As a result, social disadvantages (or inequalities), particularly in areas such as education, occupation, and income, have a detrimental effect on both health status (morbidity and mortality) and health behavior (7). However, other aspects of socioeconomic inequality, such as gender and migration history, have also been connected to several health indices (8). According to one study, due to gender stereotyping, men typically receive less support from their families, which makes them more resistant to show illness. Conversely, women are less likely to receive support, which leads to less successful coping. In addition, women are more likely than men to accept their sickness as a natural aspect of who they are, rather than perceiving their sickness as a challenge to conquer (9).

WOMEN ARE UNDER-REPRESENTED IN CLINICAL TRIALS

Clinical and biomedical researchers are also steeped in gender stereotypes, which can lead to bias in research and medical applications. For example, women are still under-represented in clinical trials, particularly for cardiovascular pathologies. A major cause of death in women is due to lifestyle changes in the past several decades, such as tobacco, stress, and other lifestyle factors. These pathologies have become more deadly than breast cancer showing how other areas of concern regarding women health are often neglected or compromised. (10, 11).

WOMEN AND INFECTIOUS DISEASES

In infectious diseases, gender theory plays a role in data interpretation as well as in cancer and practically all human- and animal-related diseases. This is also observed by the men-to-women ratio in scientific studies (12). In infectious diseases, some differences are directly related to anatomy. Infections of the genital tract and lower urinary tract are exclusively or mainly observed in women (13), whereas prostatitis infection is the main infection in men (14).

The second factor is related to the hormonal context. The immune response to infections is often different between genders due to the secretion of estrogen and progesterone. Furthermore, pregnant women exhibit different hormones, partly linked to massive hormonal secretion. Although the roles male and female hormones play are still incompletely understood, they have a clearly established role in the response to viruses and bacteria (15). Finally, the third factor is the environment, which causes behavioral changes due to the different habits and routines between women and men. Nevertheless, there are irreducible differences in medicine that will withstand social and educational upheavals and all ideologies (16). >>

COVID-19, GENDER/SEX, AND LIFE EXPECTANCY

Increasing evidence suggests that COVID-19 produces more severe symptoms and higher mortality among men than women, which has been observed in many countries with different cultures and economic levels. However, whether immune responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) differ between sexes, and whether such differences correlate with gender differences during the course of COVID-19, is currently unknown (17, 18).

The French High Council for Equality between Women and Men published an interesting study in November 2020—Taking sex and gender into account for better care: a public health issue (19). It emphasized that the COVID-19 pandemic acted as a powerful indicator of the actual inequalities in society and, in particular, between women and men. It revealed, as rarely before, the more precarious social and economic situation of women in the world.

At the end of 2020, in the United States (US), 54% of SARS-CoV-2-caused deaths were among men (20, 21), causing another change in demographic history. According to a study carried out by British, German, and Danish researchers in 29 developed countries, including 27 in Europe, the pandemic caused life expectancy to plunge in 2020 with rare brutality. In most Western European countries, the fall has reached a level not seen since the end of the Second World War (22). The US is paying the heaviest price, with a drop in life expectancy at birth of 2.2 and 1.6 years for boys and girls, respectively. Such decreases of more than a year have been recorded in eleven and eight countries for men and women, respectively. It takes an average of 5.6 years for countries to gain a year of life expectancy, and this was erased in one stroke in 2020 by COVID-19. The countries who were hit hardest in Europe are Lithuania, Bulgaria, Poland, Spain, Italy, and Belgium. In 22 countries (including France), the life expectancy has fallen by more than half a year, with a decline estimated at 8 and 7.2 months for men and women, respectively. Finally, countries from Northern Europe and Greece appear to have been more spared. Researchers give special mention to Norway and Denmark, the only two countries with an increase in life expectancy between 2019 and 2020 (23).

The question arises as to whether women are protected due to their biological characteristics, genes, hormones, etc. (24). Such hypotheses have been regularly repeated in the media and social networks. On April 27, 2020, The New York Times headlined: “Can estrogens and other sex hormones help men survive Covid?”. The article refers to a couple of ongoing clinical trials in the US that are testing the effects of estrogen and progesterone administration in patients with mild COVID-19 symptoms (25, 26, 27). Another clinical trial study showed the effect of reducing testosterone levels on the course of the disease (28). However, although the elderly are the most vulnerable population, and postmenopausal women have very low gonadal hormone levels, thus, postmenopausal women are more resistant to COVID-19 than men. Another study followed the trail of genetic factors linked to sex and involved in immune defense and the mechanisms of viral entry into cells (29).

To date, the results are far too preliminary to consider different therapeutic strategies according to sex or gender. Furthermore, the greater vulnerability of men is not an absolute rule. This new perspective was recently published by the “Gender Sci Lab” research group directed by professor Sarah Richardson at Harvard University (30). Gender differences in prevalence and mortality vary widely from state to state in the US. The states of Dakota, Kentucky, Massachusetts, and Rhode Island have higher mortality rates among women: 53–56% (31). Conversely, the states of New York, Oregon, California, and Nevada have higher mortality rates among men: 56–58%. When the age factor is taken into account, the percentage of COVID-19-related deaths in relation to the of age in each state, it shows that the women live longer on average than men. Additional mortality risk in men is more frequent but with strong variations and factors associated. In the states of New York, Texas, and New Jersey, twice as many men as women died due to COVID-19. By contrast, in the states of Kentucky, Maine, New Hampshire, Utah, and Vermont, COVID-19-related deaths were equally distributed between men and women as per available literature (32).

Such variability is found on a global scale. Men represent more than 70% of COVID-19-related deaths in Thailand, Bangladesh, Haiti, and Costa Rica, but less than 50% in Canada, Finland, Ireland, Estonia, and Slovenia. These differences in raw statistics regarding mortality between the sexes are meaningless in the absence of additional data related to the context of the prevalence of the pandemic (18). »

CO-MORBIDITIES IN SOCIAL AND CULTURAL CONTEXTS

Co-morbidities for a given age group can affect women and men differently (33). Heart, lung, kidney and liver diseases including diabetes and asthma are proven risk factors. The prevalence of these diseases varies according to the social, cultural, and economic environment. For example, diabetes is more common in men in the US and in women in South Africa. Asthma affects women more frequently in the US, and cardiac pathologies are more frequent in men than in women in the African-American population (34, 35).

Other gender-related risk factors must also be considered regarding vulnerability to infection, including alcohol consumption, smoking, professional activities, social codes, place of residence, access to care, and adherence to preventive measures. Both regarding COVID-19 and previous epidemics, the social and cultural contexts are key in understanding the gender disparity in susceptibility to infection (36). For example, the Spanish flu pandemic in 1918, which mainly affected men, in particular military and factory workers, i.e., fragile populations very exposed to close contact and often suffering from tuberculosis. Conversely, the mortality of upper-class men was the same as that of women. For SARS-CoV-2, the mortality of men was higher than that of women by 10%. After taking into account other factors, such as age, comorbidity, professional activity, and lifestyle, the death rates of SARS-CoV-2 were similar for both sexes. In the case of Middle East Respiratory Syndrome (MERS), transmitted mainly by camels, the majority of the victims were elderly men. Before interpreting vulnerability to COVID-19, which should not simply be linked to biological sex, it is essential to carry out rigorous analyses that take into account such risk factors linked to disease susceptibility and infection severity (37).

COVID-19 AND LOCKDOWN

The restraint measures have affected women and men differently, highlighting gender inequality during this crisis. There are strong gender disparities in living conditions at

work and at home, significantly more so in the poorest social groups. Women more often work in professions where conditions are more deteriorated, including physical and mental health. Workers and employees, many of whom are women, have been on leave of absence for almost half a year. In contrast, the staff such as healthcare workers and essential services that remained working on site were at a high risk of exposure to infection. Women are over-represented in care professions (nurses and nursing assistants), education, and services (cashiers, cleaners). Another subject is the recognition of COVID-19 as an occupational disease for all healthcare personnel and other workers during the confinement period. Women massively ensured essential activities (e.g., food, public transport, security, and cleaning) (38), and the “mental burden” of women has greatly increased due to their larger involvement in the education of children and domestic tasks. With schools closed, some single mothers had to stop working, which led to loss of income. Family confinement has exacerbated domestic violence for women and children. Generally, access to care was more complicated, particularly threatening the sexual and reproductive rights of women (e.g., contraception and abortion). Finally, the media have also been revealing the invisibility of expert women in biology, medicine, epidemiology, sociology, and economics (39).

CONCLUSION

The COVID-19 pandemic has increased public awareness of the consequences of lacking resilience and preparedness to deal with such situations. Both biological and social factors, and interactions between the two, may play a role in shaping the observed patterns of COVID-19 outcomes between women and men. There are many socially relevant variables that may be influencing this, such as sex distribution for COVID-19 outcomes, age, disability, race/ethnicity, migration status, geographic location, occupation, and personal history. The anticipated vulnerability of women during the COVID-19 crisis was likely exacerbated in developing countries. Assuming that only sex-related biological factors contribute to COVID-19 sex disparities would be unfavorable to public health. Given their front-line interaction with communities, it is worrying that women have not been fully incorporated into global health security surveillance, detection, and pre- »

vention mechanisms. Socioeconomic variables influence disease risk and outcomes, and comprehensive and transparent demographic data is needed to explore how structural inequities affect COVID-19 disparities. The SARS-CoV-2 pandemic has led states to urgently make several critical choices affecting social inequalities and the social determinants of population health. Attention needs to be paid to the possible longer-term effects of the pandemic on the balance between professional and personal life and the economic independence of women.

The reduction of social vulnerabilities and the promotion of women constitute an opportunity to be seized for the realization of an ambitious vision in society. As Jean Ferrat sang: “The poet is always right, who sees higher than the horizon – And the future is his kingdom – Facing our generation, I declare with Aragon (French Poet) – Woman is the future of man.” Well said.

REFERENCES

- Arcaya MC, Arcaya AL, Subramanian SV. Inequalities in health: definitions, concepts, and theories. *Glob Health Action*. 2015;24(8):27106.
- Vlassoff C. Gender differences in determinants and consequences of health and illness. *J Health Popul Nutr*. 2007;25(1):47-61.
- Gebhard C, Regitz-Zagrosek V, Neuhauser HK, Morgan R, Klein SL. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol Sex Differ*. 2022;11(1):29.
- Women in the health and care sector earn 24 percent less than men [Internet]. World Health Organization; 2022 [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://www.who.int/news/item/13-07-2022-women-in-the-health-and-care-sector-earn-24-percent-less-than-men>.
- Shadmi E, Chen Y, Dourado I, Faran-Perach I, Furler J, Hangoma P, et al. Health equity and COVID-19: global perspectives. *Int J Equity Health*. 2020;19(1):104.
- CSDH. Closing the gap in a generation: Health equity through action on the social determinants of health. Final report of the commission on social determinants of health. [Internet] World Health Organization. 2008. [cited 2023 Jan 10]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-IER-CSDH-08.1>.
- Lago S, Cantarero D, Rivera B, Pascual M, Blázquez-Fernández C, Casal B, et al. Socioeconomic status, health inequalities and non-communicable diseases: a systematic review. *Z Gesundh Wiss*. 2018;26(1):1-14.
- Singh GK, Hiatt RA. Trends and disparities in socioeconomic and behavioral characteristics, life expectancy, and cause-specific mortality of native-born and foreign-born populations in the United States, 1979–2003. *Int J of Epidemiol*. 2006;35(4):903-919.
- Vlassoff C. Gender differences in determinants and consequences of health and illness. *J Health Popul Nutr*. 2007;25(1):47-61.
- Pauker, S. From protection to access: Women’s participation in clinical trials—conflict, controversy and change [Internet]. Harvard University’s DASH repository. 2002. [cited 2023 Feb 2] Available from: <http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:8889449>.
- Bierer BE, Meloney LG, Ahmed HR, White SA. Advancing the inclusion of underrepresented women in clinical research. *Cell Rep Med*. 2022;3(4):100553.
- Gay L, Melenotte C, Lakbar I, Mezouar S, Devaux C, Raoult D, et al. Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2021;12:698121.
- Minardi D, d’Anzeo G, Cantoro D, Conti A, Muzzonigro G. Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *Int J Gen Med*. 2011;4: 333-43.
- Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liang ML, Riley DE. Epidemiology of prostatitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(Suppl 1):85-90.
- Taneja V. Sex Hormones Determine Immune Response. *Front Immunol*. 2018;27(9):1931.
- Leone M, Honstetter A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, et al. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. *J Infect Dis*. 2004;189(2):339-45.
- Abate BB, Kassie AM, Kassaw MW, Aragie TG, Masresha SA. Sex difference in coronavirus disease (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2020;10(10):e040129.
- Gresy B, Piet E, Vidal C, Salle M, Niosi M, Gardais N. Prendre en compte le sexe et le genre pour mieux soigner/ un enjeu de santé publique Rapport n°2020-11-04; voté le 04.11.2020.
- Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, et al; Yale IMPACT Research Team, Shaw A, Fournier JB, Odio CD, Farhadian S, Dela Cruz C, Grubaugh ND, Schulz WL, Ring AM, Ko AI, Omer SB, Iwasaki A. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*. 2020;588(7837):315-320.
- Jacobs J, Johnson AK, Boshara A, Hunt B, Khouri C, Cruz J, et al. COVID-19 health inequities and association with mechanical ventilation and prolonged length of stay at an urban safety-net health system in Chicago. *PLoS One*. 2021;16(10):e0258243.
- COVID Data Tracker. Centers for Disease Control and Prevention. [Internet] [cited 2023 March 15]. Available from: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#demographics>.
- Woolf SH, Masters RK, Aron LY. Effect of the covid-19 pandemic in 2020 on life expectancy across populations in the USA and other high income countries: simulations of provisional mortality data. *BMJ*. 2021;373: n1343.
- Aburto JM, Schöley J, Kashnitsky I, Zhang L, Rahal C, Missov TI, et al. Quantifying impacts of the COVID-19 pandemic through life-expectancy losses: a population-level study of 29 countries. *Int J Epidemiol*. 2022;51(1):63-74.
- Vidal C. Vulnérabilité à la Covid-19: que sait-on des différences entre hommes et femmes? *The Conversation*. Published October 28, 2020. [cited 2023 Jan 15].
- Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Faidah H, Al-Maiah TJ, Cruz-Martins N, Batiha GE. The Looming Effects of Estrogen in Covid-19: A Rocky Rollout. *Front Nutr*. 2021;8: 649128.
- Clinical Trials, Identifier: NCT04853069 [Internet]. [cited 2023 Feb 1] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04853069>. >>

27. Rubin R. How Sex Hormones May Be Linked to COVID-19 Susceptibility [Internet]. *The New York Times*. 2020 Apr 27 [cited 2023 Jan 4]. Available from: <https://www.nytimes.com/2020/04/27/health/coronavirus-estrogen-men.html>.
28. Nickols NG, Mi Z, DeMatt E, Biswas K, Clise CE, Huggins JT, et al. Effect of Androgen Suppression on Clinical Outcomes in Hospitalized Men With COVID-19: The HITCH Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2022;5(4):e227852.
29. Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):737-44.
30. US Gender/Sex COVID-19 Data Tracker [Internet]. Harvard GenderSci Lab.; 2020 [cited 2023 Jan 7]. Available from: <https://www.genderscilab.org/gender-and-sex-in-covid19>.
31. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Morbidity and Mortality Weekly Report [Internet]. [cited 2023 Jan 10] Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5807.pdf>.
32. Krieger N, Chen JT, Waterman PD. Excess mortality in men and women in Massachusetts during the COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2020;395(10240):1829.
33. Danielsen C, Tarant M. COVID-19 sex disparities differ dramatically across U.S. states and over time, pointing to social factors [Internet]. Harvard GenderSci Lab. [cited 2023 Jan 12]. Available from: <https://www.genderscilab.org/blog/covid-19-sex-disparities-differ-dramatically-across-us-states>.
34. Bonita, R, Beaglehole, R. Women and NCDs: Overcoming the neglect. *Global Health Action* [Internet]. 2014;7. [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://doi.org/10.3402/gha.v7.23742>.
35. Der Ham MV, Bolijn R, Vries AD, Ponce MC, M van Valkengoed IG. Original research: Gender inequality and the double burden of disease in low-income and middle-income countries: an ecological study. *BMJ Open* [Internet]. 2021;11(4). [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-047388>.
36. Danielsen AC, Lee KM, Boulicault M, Rushovich T, Gompers A, Tarrant A, et al. Sex disparities in COVID-19 outcomes in the United States: Quantifying and contextualizing variation. *Soc Sci Med*. 2022;294:114716.
37. Danielsen C, Tarant M. COVID-19 sex disparities differ dramatically across U.S. states and over time, pointing to social factors [Internet]. Harvard GenderSci Lab. [cited 2023 Jan 16]. Available from: <https://www.genderscilab.org/blog/covid-19-sex-disparities-differ-dramatically-across-us-states>.
38. Lambert A, Cayouette-Remblière J, Guéraud E, Le Roux G, Bonvalet C, Girard V, et al. Le travail et ses aménagements: ce que la pandémie de covid-19 a changé pour les Français. *Popul Soc*. 2020;579:1- 4.
39. Wenham C, Smith J, Morgan R; Gender and COVID-19 Working Group. COVID-19: the gendered impacts of the outbreak. *Lancet*. 2020;395(10227):846-848.

Strokovna izhodišča za oblikovanje mreže laboratorijske dejavnosti s področja medicinske biokemije – nastala leta 2017, aktualna tudi v 2023

Professional starting points for the creation of a network of laboratory activities in the field of medical biochemistry - created 2017, also current 2023

Pika Meško Brguljan^{1,2}, Barbara Možina^{2,3}, Maksimiljan Gorenjak^{2,4}, Borut Božič^{2,5,6}

¹Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo

²Zbornica laboratorijske medicine Slovenije

³Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za laboratorijske dejavnosti

⁴Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko

⁵Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

⁶Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za revmatologijo, Laboratorij za imunologijo revmatizma

Avtor za korespondenco:

Prof. dr. Borut Božič, mag. farm, spec. med. biokem.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: borut.bozic@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Ministrstvo za zdravje je leta 2017 imenovalo delovno skupino za pripravo mreže laboratorijske dejavnosti s področja medicinske biokemije v skladu z Resolucijo Nacionalnega programa zdravstvenega varstva do leta 2025. Znotraj te skupine je bila imenovana podskupina za pripravo strokovnih izhodišč. Gradivo je pripravila na osnovi strokovnih virov, smernic, resolucij, nacionalnih programov, preteklih analiz in lastnih izkušenj na področju zagotavljanja kakovosti laboratorijskega dela.

Medicinska biokemija se izvaja na vseh treh ravneh zdravstvene dejavnosti in predstavlja največji del laboratorijske medicine. Obsega tudi laboratorijsko genetiko, laboratorijsko hematologijo, imunologijo in druga področja. Skozi pooblastila Zbornice laboratorijske medicine ima delno samoregulacijo. Za kakovost storitev in varnost pacientov sta pomembni dve aktivnosti: dovoljenja za delo po Pravilniku o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji na področju laboratorijske medicine in pridobljeni Standard ekvivalentnosti izobraževanja in specialističnega usposabljanja z evropskim učnim načrtom (*Syllabus for post-graduate training in clinical chemistry and laboratory medicine*). »

Podskupina je v izhodiščih za pripravo mreže prepoznala šest pomanjkljivosti in predlagala ukrepe, kot je npr. uredevev šifrantov in evidenc, saj so pomanjkljive, neustrezne in celo napačne glede zaposlenih v laboratorijih.

Po predaji dokumenta Ministrstvu so se aktivnosti delovne skupine ustavile, v ukrepih zdravstvene politike ni bilo zaznati uporabe pripravljene gradiva, ki je pet let kasneje še vedno aktualno v okviru razprav o zdravstveni reformi.

Ključne besede: nacionalna laboratorijska mreža, medicinska biokemija, analiza stanja, predlagani ukrepi, regulativa

ABSTRACT

In 2017, the Ministry of Health established a working group to prepare a network of laboratory activities in the field of medical biochemistry in accordance with the Resolution of the National Health Program until 2025. Within this group, a subgroup was tasked with preparing technical starting points. It prepared the material based on professional sources, guidelines, resolutions, national programs, previous analyses, and its own experience in the field of quality assurance of laboratory work.

Medical biochemistry is performed at all three levels of health care and constitutes the largest part of laboratory medicine. It also includes genetics, laboratory haematology, immunology, and other areas. It is subject to partial self-regulation by the authority of the Chamber of Laboratory Medicine. Two activities are important for the quality of services and patient safety: the work permit according to the By-law on the conditions that laboratories in the field of laboratory medicine must meet, and the acquired Standard of equivalence of education and specialist training with the European curriculum (Syllabus for post-graduate training in clinical chemistry and laboratory medicine).

The subgroup identified 6 deficiencies in the starting points for the preparation of the network and proposed measures, such as the arrangement of code books and records, as they

are deficient, inadequate and even incorrect as far as the personnel in the laboratories are concerned.

After the document was handed over to the Ministry, the activities of the working group were discontinued, and the use of the elaborated material, which is still relevant five years later in the health reform discussions, did not find its way into the health policy measures.

Key words: national laboratory network, clinical biochemistry, situational analysis, proposed measure, regulation

UVODNO POJASNILO

Leta 2017 je Ministrstvo za zdravje imenovalo osemčlansko delovno skupino za pripravo mreže laboratorijske dejavnosti s področja medicinske biokemije v skladu z Resolucijo NPZV do leta 2025 (1). Znotraj te skupine so bili avtorji prispevka zadolženi za pripravo strokovnih izhodišč za kolegij ministrice. Gradivo smo pripravili na osnovi strokovnih virov, različnih priporočil ali smernic (2–4), resolucij in nacionalnih programov (1, 5), preteklih analiz v slovenskem in širšem prostoru (6–9) ter osebnih in skupinskih izkušenj iz dela na področju organizacije in zagotavljanja kakovosti laboratorijskega dela v nacionalnem in mednarodnem okolju (10–17). Sestavni del dokumenta so bili tudi uporabljeni viri – v seznamu je bilo skoraj 400 bibliografskih enot, razvrščenih po letnicah objave, od prvih iz obdobja 1977–1982 (18–21), do aktualnih informacij iz leta 2017 na spletnih straneh Ministrstva za zdravje, Ministrstva za javno upravo, Nacionalnega inštituta za javno zdravje in Javne agencije za zdravila in medicinske pripomočke (22–23).

Po predaji dokumenta ministrstvu so se aktivnosti delovne skupine ustavile, o uporabi predanega dokumenta od takrat dalje nismo dobili nobene informacije, prav tako nismo zasledili njegove uporabe v ukrepih zdravstvene politike. Ocenjujemo, da so pet let kasneje in ob četrti vladi od takrat izhodišča še vedno aktualna, in da lahko bolje služijo svojemu namenu, če so javno dostopna. Dokument je v nadaljevanju tak, kakršnega smo oblikovali v letu 2017, deloma so prilagojeni samo podnaslovi. »

PREGLED RAZVOJA MEDICINSKE BIOKEMIJE V SLOVENIJI Z ANALIZO STANJA

Medicinska biokemija je del laboratorijske medicine, ki je po veljavni zakonodaji pomemben del zdravstvene dejavnosti. Vsebinsko je vezana na uspešno obravnavo pacientov, ki v mnogih primerih brez laboratorijskih izvidov ni možna, saj kar 70 % zdravniških odločitev sloni na laboratorijskih izvidih.

Razumevanje pojmov klinična kemija, klinična biokemija, medicinska biokemija se je spreminjalo skozi desetletja. Če je šlo v začetnih obdobjih res predvsem za »kemijske« preiskave in analize vzorcev, se je v zadnji tretjini 20. stoletja pojem klinična kemija uporabljal precej širše.

Analiza obstoječega stanja na področju laboratorijske medicine – medicinske biokemije in pregleda razvoja dejavnosti medicinske biokemije v Sloveniji kaže, da ima to področje (medicinska biokemija, klinična biokemija ali klinična kemija (angl. *clinical/medical (bio)chemistry*)), ki je po obsegu preiskav največji del laboratorijske medicine, na Slovenskem dolgo tradicijo.

Prvi zametki segajo v čas po prvi svetovni vojni, ko so se začeli pojavljati prvi priročni laboratoriji za preiskave telesnih tekočin. Del Higienskega zavoda, ustanovljenega leta **1923**, je bil tudi biokemični laboratorij. Pravi razvoj je sledil po zaključku druge svetovne vojne, še posebej v začetku petdesetih let, ko je nastala večina največjih biokemičnih laboratorijev. Prvi opravljeni specialistični izpit te stroke v Sloveniji je bil registriran leta **1970**. Leta **1977** je bil sprejet Zakon o standardizaciji, ki je vplival tudi na delo laboratorijev klinične biokemije. Istega leta je bil oblikovan prvi Strokovni kolegij kliničnih in biokemičnih laboratorijev republike Slovenije, ki je v naslednjih letih postavil merila glede prostorov, zaposlitvene strukture, postopkov in opreme, izpeljal kategorizacijo izvajalcev laboratorijskih storitev na področju medicinske biokemije, v praksi organiziral zunanjo kontrolo kakovosti rezultatov in izvedel obvezno vključitev vanjo. Leta **1985** je delovalo 238 laboratorijev klinične biokemije, od tega 104 tipa I, 33 tipa II, 15 tipa III, 2 tipa IV, 1 tipa V, 7 laboratorijev tipa VI in ob ambulantah še 76 laboratorijev tipa 0.

Analiza rezultatov strokovnih nadzorov iz obdobja **1985–1987** je pokazala, da so še vedno velike razlike pri organizaciji dela in prostorih, da pa je večina spoštovala dogovorjeno tipizacijo in standardizacijo postopkov. Notranjo kontrolo kakovosti rezultatov je že osvojil del laboratorijev, vsi pa so bili vključeni v sistem zunanje ocene kakovosti rezultatov.

Po osamosvojitvi, leta **1992**, je Ministrstvo za zdravje (MZ) imenovalo Razširjeni strokovni kolegij za laboratorijsko diagnostiko (RSK), s čimer se je nadaljevalo strokovno delo, vendar zakonodaja ni sledila strokovnim zahtevam področja. Klinična biokemija je bila v zakonu o zdravstveni dejavnosti iz leta **1992** le omenjena in še to nedosledno in razdrobljeno. Prav tako novi zakonodaji niso sledili sistemski pravilniki za to področje. Pregleda nad izvajalci ni imel nihče (ne Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS), ne MZ), kakovost storitev in varnost pacientov pa v državi nista bili zagotovljeni na isti ravni. Področni dogovori z ZZZS-jem so v tem obdobju kot kadrovski normativ navajali kar laboratorij. Šele na posredovanje predstavnikov Zbornice laboratorijske medicine Slovenije (ZLMS) so koncem devetdesetih zajeli strokovnjake po poklicnih skupinah (skladno s sklepom RSK-ja osnovna ekipa na primarni ravni: en specialist medicinske biokemije, dva inženirja laboratorijske biomedicine, dva laboratorijska tehnika).

Drobljenje zdravstvenih domov je stanje še poslabšalo, tako da tudi strokovne smernice in intenzivno delo Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani na področju nacionalne sheme zagotavljanja kakovosti (SNEQAS) niso zadoščale. Plan zdravstvenega varstva Slovenije iz leta **2000** je imel v prilogi predvideno mrežo laboratorijske dejavnosti na primarni ravni po regijah, vendar priloga ni bila sprejeta kot del Plana zdravstvenega varstva. V sprejetem besedilu se je pojem laboratorij pojavil petkrat: dvakrat glede stroškov kot del cene programa, enkrat v opisu dejavnosti zdravstvenega doma in enkrat v opisu koncesijskih možnosti zdravilišča, enkrat pa kot galenski laboratorij v lekarništvu. Ob pripravi plana se je izkazalo, da so potrebe na primarni ravni (zdravstveni domovi) po specialistih medicinske biokemije večje, kot pa je bilo vseh aktivnih specialistov medicinske biokemije v državi. Večina specialistov medicinske biokemije je bila zaposlena v kliničnem centru in bolnišnicah. Ciljno število specialistov medicinske biokemije po Planu zdravstvenega varstva do leta 2004 še deset let kasneje ni bilo doseženo. »

Financiranje laboratorijske dejavnosti je vezano na ločene zakonske pristojnosti občin in države. V praksi je več kot tri desetletja uveljavljena nivojska ureditev laboratorijske dejavnosti (primarni ter sekundarni in terciarni nivo), vezana na dva različna vira financiranja (občine, država), ki predstavljata glavni izvor ekonomske neučinkovitosti laboratorijske dejavnosti.

Nivojska ureditev financiranja laboratorijske dejavnosti ima številne slabosti: zavira povezovanje primarne in sekundarne ravni ob prehajanju pacientov med njima, stimulira podvojevanje laboratorijskih naročil zaradi zaprtosti obeh ravni obravnave, omogoča lokalno, neracionalno koncentracijo laboratorijske avtomatizacije (ki je nezadostno izkoriščena) ter neustrezno kadrovske in prostorske strukturo majhnih laboratorijev, omogoča realizacijo individualnih interesov in lokalne politike, kar je na ravni celotnega zdravstvenega sistema neracionalno in nepregledno z vidika financiranja.

Pomembna strokovna prelomnica pri organizaciji in delovanju medicinskih laboratorijev je bilo leta **2003** sprejetje mednarodnega standarda ISO 15189: Medicinski laboratoriji – Posebne zahteve za kakovost in usposobljenost (sedaj ISO 15189: Medicinski laboratoriji – Zahteve za kakovost in kompetentnost), ki ga je Republika Slovenija sprejela kot slovenski standard SIST EN ISO 15189. Ta mednarodni standard opredeljuje enotne zahteve za kakovost in kompetentnost medicinskih laboratorijev.

Strokovno in organizacijsko področje laboratorijske medicine – medicinske biokemije urejajo tri ključne strokovne organizacije: Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), ZLMS in RSK za laboratorijsko medicino – medicinsko biokemijo, v skladu s svojimi pristojnostmi in pooblastili. Ključne naloge SZKKLM so kontinuirano usposabljanje laboratorijskih delavcev, prenos znanj in vpetost v mednarodne kroge (EFLM – »*European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*«, IFCC – »*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*«,...). ZLMS skrbi za povezovanje strokovnjakov z različnih področij laboratorijske medicine ter za priznavanje stroke in njenih predstavnikov. Strokovne smernice na nacionalni in mednarodni ravni sooblikujemo v delovanju v mednarodnih in nacionalnih strokovnih združenjih ter njihovih delovnih skupinah, komisijah, kot npr. IFCC,

EFLM, SZKKLM in ZLMS. RSK za laboratorijsko medicino-medicinsko biokemijo je posvetovalni organ MZ, ki predstavlja avtonomno strokovno telo z nalogo implementacije strokovnih novosti v delovno prakso.

Leta **2004** je MZ podelilo javno pooblastilo ZLMS za podeljevanje licenc, izvajanje strokovnih nadzorov s svetovanjem, vodenje registra, nadzor nad izvajanjem specializacije medicinske biokemije in izdajanje regulatornih aktov področja. Hkrati so bili potrjeni pripadajoči pravilniki, vključno s pravilnikom o specializaciji iz medicinske biokemije, ki je nadgradil prvotni pravilnik iz leta 1982. Program specializacije je bil ob sodelovanju RSK-ja za laboratorijsko diagnostiko, SZKKLM in Katedre za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani usklajen s programom za evropskega kliničnega kemika oz. za evropskega specialista laboratorijske medicine.

Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji na področju laboratorijske medicine (v nadaljevanju Pravilnik), sprejet leta **2004** (Ur. l. RS 64/04, spremembe Ur. l. RS 1/16), je pomembno vplival na področje laboratorijske medicine v Sloveniji. Vsebinsko gradi na izhodiščih strokovnih smernic *European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (EC4), ki so tudi osnova standardu ISO 15189 za področje medicinskih laboratorijev.

Leta **2005** se je na poziv MZ k oddaji vloge za dovoljenje za delo po navedenem Pravilniku prijavilo preko 300 izvajalcev laboratorijskih diagnostičnih preiskav s področja medicinske biokemije, pri čemer izvajalci testiranj ob pacientu (POCT) niso bili vštet. Zaradi tolikšnega števila izvajalcev in pomanjkanja specialistov medicinske biokemije je potekala implementacija pravilnika na področju medicinske biokemije počasi, kljub temu pa uspešno. Pregledi laboratorijev v postopku pridobivanja (v letih **2009–2015**) ali podaljševanja (od leta **2016** dalje) dovoljenja za delo so bistveno izboljšali kakovost, primerljivost delovanja laboratorijev in s tem varnost pacientov. V letu **2017** je imelo 110 laboratorijev dovoljenje za delo s področja medicinske biokemije in 75 izvajalcev dovoljenje za omejeni obseg v okviru POCT. Od tega je 76 izvajalcev že podaljšalo dovoljenje za delo po petletnem obdobju od prvega pregleda.

Leta 2017 je število aktivnih nosilcev področja 96 specialistov medicinske biokemije in 30 specializantov. To pred- >>

stavlja 4,75 specialista medicinske biokemije na 100.000 prebivalcev. V državah Evropske unije je to razmerje med 1 (Romunija) in 34,6 (Grčija), pri čemer je treba upoštevati, da področje medicinske biokemije v Sloveniji obsega tudi genetiko, laboratorijsko hematologijo, imunologijo in druga področja, kjer lahko obstaja tudi samostojna specializacija. Izobraževalni proces in program slovenske specializacije iz medicinske biokemije sta usklajena in se že vrsto let izvajata v skladu s specializacijami v evropskem prostoru po »*European Syllabus for Post-Graduate Training in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, version 4 – 2012*«. Že leta 2006 je naš izobraževalni sistem dosegel ekvivalent standarda s pogoji izobrazbenih zahtev in priznavanje kompetenc v okviru Evropske unije. S strani EC4 (*European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) nam je bil na osnovi primerljivosti in usklajenosti programov specializacije, vpisa v nacionalni register in veljavne nacionalne licence, ki zagotavlja in potrjuje ustrezno sprotne izobraževanje in izpopolnjevanje nosilcev stroke, priznan in podeljen naziv **evropski specialist laboratorijske medicine** (EuSpLM). Standard ekvivalentnosti izobrazbe, ki smo ga pridobili, predpisuje najmanj 10 let dodiplomskega in podiplomskega izobraževanja po programu, ki je usklajen z evropskim programom specializacije. Vstop v specializacijo je omogočen po zaključenem ustreznem izobraževalnem programu v skladu s Pravilnikom o specializaciji medicinske biokemije (Ur. l. RS 15 /2017).

V laboratoriju so poleg specialistov medicinske biokemije zaposleni tudi drugi zdravstveni delavci in zdravstveni sodelavci, predvsem laboratorijski tehniki in diplomirani inženirji laboratorijske biomedicine. Sistemizacija po Kolektivni pogodbi za javni sektor tipičnih oziroma prevladujočih delovnih mest za področje medicinske biokemije je laboratorijski tehnik (zahtevnost del V, izhodiščni plačni razred 19), inženir laboratorijske biomedicine (zahtevnost del VII/1, izhodiščni plačni razred 29), analitik v laboratorijski biomedicini (zahtevnost del VII/2, izhodiščni plačni razred 31), specializant s področja laboratorijske medicine (zahtevnost del VII/2, izhodiščni plačni razred 35) in medicinski biokemik specialist (zahtevnost del VIII, izhodiščni plačni razred 39, oziroma zahtevnost del IX, izhodiščni plačni razred 44).

Iz dostopnih evidenc zaposlenih v zdravstvu, za katere je pristojen Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ), je razvidno neustrezno šifriranje poklicev v laboratorijski medicini, prav tako neenotna sistemizacija delovnih mest v zdravstvenih zavodih. Obstoječe uradne evidence so po-

manjkljive, neuporabne in ne odražajo dejanskega stanja.

V obdobju od objave (2004) Pravilnika je v Sloveniji opazen velik napredek v kakovosti medicinskih laboratorijev in s tem varnosti pacientov. Izboljšuje se tudi kakovost na področju izvajanja POCT kot integralnega dela medicinske biokemije – laboratorijske medicine. Dolgotrajne aktivnosti in zavedanje pomembnosti zagotavljanja kakovosti v medicinskih laboratorijih so prepoznane tudi pri zunanjih presojah zdravstvenih ustanov, pri katerih so laboratoriji deležni številnih pohval. Pregled stanja dovoljenj za delo pri MZ pokaže veliko razdrobljenost laboratorijev medicinske biokemije ter izvajalcev POCT. Izrazita je tudi neenakomerna demografska pokritost. Mreža laboratorijev (znotraj ZD, splošnih bolnišnic (SB), terciarnih ustanov in samostojnih) ne ustreza potrebam po zadostni koncentraciji preiskav in ustrezni kadrovske zasedbi.

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) in Združenja proizvajalcev *in vitro* diagnostike (IVD) (EDMA, sedaj MedTech) (l. 2015) je delež stroškov IVD brez stroškov dela v Sloveniji 1,2 % vseh stroškov v zdravstvu, kar predstavlja 23 EUR/preb. Opazne so velike razlike v porabi, od 2,3 EUR/preb. na Cipru, do 57,4 EUR/preb. v Švici. Laboratorijska diagnostika predstavlja do 5 % sredstev za zdravstvo. Z razvojem novih preiskav in metodologij, ki lahko bistveno prispevajo k boljši, hitrejši, učinkovitejši obravnavi pacientov, je bistvena njihova kakovostna, učinkovita in racionalna uvedba ter uporaba.

Sodobna organiziranost medicinskih laboratorijev pomeni integracijo in povezovanje izvajalcev laboratorijske dejavnosti. Modeli povezovanja v svetu so različni, kot npr.:

- centralni laboratorij s satelitskimi laboratoriji, odvzemnimi mesti in izvajalci POCT,
- partnersko povezovanje laboratorijev (vključujoč odvzemna mesta, izvajalci POCT).

Pri tem je treba upoštevati kadrovske normative za minimalno laboratorijsko ekipo, ki lahko učinkovito podpira obravnavo pacientov (24/7 oziroma 12/5). Upoštevati je treba kakovost obstoječih izvajalcev, prav tako demografsko pokritost. Povezovanje laboratorijev (problematika kadrovske zasedbe primarnega nivoja) in minimalne kadrovske zahteve so bile predvidene tudi že ob uveljavitvi Pravilnika (sklep RSK, 25. seja RSK – 14. aprila 2005 – »Ekipa 1 spe- >>

cialist + 2 inženirja + 2 tehnika je najmanjša ekipa, ki lahko ustrezno opravlja preiskave s področja medicinske biokemije na primarnem nivoju. Ustanove, ki tega ne dosežajo, naj se poslovno povezujejo med seboj«. Pri tem mora biti varnost pacienta na prvem mestu. Leta 2008 je MZ objavilo Prostorsko tehnične smernice (Ur. l. RS 83/2008), v katerih je za laboratorijsko diagnostiko na primarnem nivoju glede na predvideno število zdravnikov potrebna naslednja ekipa v laboratoriju: 2,5 specialistov medicinske biokemije, 5 inženirjev in 5 tehnikov).

Primerjava rezultatov prvih in drugih pregledov (2009–2017) laboratorijev za dovoljenje za delo MZ, kaže pomembno izboljšanje stanja pri večini izvajalcev, hkrati so ugotovljene tudi ključne sistemske pomanjkljivosti:

- zmanjšanje učinkovitosti strokovnega nadzora zaradi preklica licenc za področje medicinske biokemije,
- upočasnjena kadrovska rast in varčevanje na račun kakovosti ter varnosti zaradi finančne krize,
- drobljenje laboratorijske dejavnosti,
- demografsko neenakomerna porazdelitev laboratorijev medicinske biokemije.

Ključni pri sodobni organiziranosti so informacijska podpora, enotni sistem vodenja (»*quality management*«) in racionalna izraba virov.

Resolucija o Nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025 v RS postavlja v ospredje tudi strateško nadgradnjo izvajanja Pravilnika, ki bo opredelila tudi mednarodno usklajene, priznane in standardizirane postopke ugotavljanja usposobljenosti laboratorijev.

IZHODIŠČA ZA PRIPRAVO MREŽE

1. Neustrezna in pomanjkljiva umeščenenost področja v zdravstveni sistem: tako v sistemsko zakonodajo kakor tudi v podzakonske in izvedbene akte:

- Področje ni urejeno v Zakonu o zdravstveni dejavnosti (ZZDej), odgovorni nosilec področja

laboratorijske medicine – medicinske biokemije ni opredeljen, kar pomeni izpad ali pomanjkljivo obravnavo področja tudi v podzakonskih aktih.

Ukrep: dopolnitev ZZDej.

2. Neustrezen nadzor nad stroko zaradi ukinitve licenc za področje medicinske biokemije:

- MZ je v Odredbi o seznamu izvajalcev zdravstvenih poklicev, ki morajo biti vpisani v register in imeti veljavno licenco (Ur. l. RS 16/2013), med izvajalci zdravstvenih poklicev izpustilo specialista medicinske biokemije. S tem je MZ na nacionalni ravni ukinilo licence nosilec področja medicinske biokemije, ki so bile pridobljene v prostoru Evropske unije že leta 2006.

Ukrep: vrnitev licenc specialistom medicinske biokemije kot nosilec dejavnosti.

3. Pomanjkljive, neustrezne in celo napačne evidence zaposlenih v laboratorijih javnih zavodov s področja laboratorijske medicine – medicinske biokemije:

- iz dostopnih evidenc zaposlenih v zdravstvu, za katere je pristojen NIJZ, je razvidno neustrezno šifriranje dejavnosti in poklicev v laboratorijski medicini.

Ukrep: takojšnja ureditev šifrantov in evidenc.

4. Neopredeljenost glede mreže javnih zdravstvenih zavodov in s tem vpetosti laboratorijev.

Ukrep: strateška odločitev o mreži laboratorijev, ki upošteva dobre mednarodne prakse. Sodobna organiziranost pomeni integracijo in povezovanje izvajalcev laboratorijske dejavnosti. Modeli povezovanja v svetu so različni, kot npr.:

- centralni laboratorij s satelitskimi laboratoriji, odvzemnimi mesti in izvajalci POCT,
- partnersko povezovanje laboratorijev (vključujoč odvzemna mesta, izvajalci POCT).

Upoštevati je treba kakovost obstoječih izvajalcev, prav tako demografsko pokritost, pri čemer mora biti varnost pacienta na prvem mestu. »»

5. Nepovezljivost različnih informacijskih sistemov /evidenc:

- nerealiziran sklep MZ o uporabi enotnega mednarodnega šifranta laboratorijskih preiskav – LOINC na področju celotne laboratorijske medicine, vključno z medicinsko biokemijo.

Ukrep: uvedba povezljive informacijske tehnologije v zdravstvene zavode in laboratorije ter uvedba uporabe mednarodnega šifranta laboratorijskih preiskav.

6. Neurejenost financiranja laboratorijskih preiskav:

- organizacijsko in finančno ločevanje med ravnmi zdravstvene dejavnosti ni utemeljeno s smiselno strokovno povezljivostjo laboratorijske dejavnosti. Financiranje laboratorijske dejavnosti, ki je vezano na dva različna vira financiranja (občine, država), predstavlja glavni izvor ekonomske neučinkovitosti in nepreglednosti laboratorijske dejavnosti.

Ukrep: implementacija transparentnega modela financiranja laboratorijskih preiskav. Na ravni finančne vzdržnosti zdravstvenega sistema so potrebne strateške in organizacijske spremembe, pri čemer mora biti javni interes usmerjen v zagotavljanje primerljivih in kakovostnih laboratorijskih storitev celotni populaciji.

Za kakovostno, varno obravnavo pacientov, ki vključuje kakovostne laboratorijske preiskave, je nujna sodobna organiziranost laboratorijske dejavnosti, temelječa na kompetencah nosilcev dejavnosti (specialisti medicinske biokemije) in ostalih izvajalcev. Izrednega pomena je obvladovanje stroškov za laboratorijske preiskave, pri čemer je eden od vidikov racionalna in učinkovita uporaba avtomatizirane laboratorijske opreme.

SKLEP

Seveda so se nekatere zadeve in situacije v letih 2018–2023 spremenile. Od predlaganih ukrepov je bila v letu 2022 realizirana vrnitev licenc specialistom medicinske biokemije kot nosilcem dejavnosti. Še vedno pa je dokument lahko pomembno strokovno gradivo za področje laboratorijske medicine v okviru razprav o reformi zdravstva (24).

LITERATURA

1. Pravno-informacijski sistem. Resolucija o Nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025. [Internet]. 2016 [Dostop 10. avg 2023]. Dostopno na: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=RESO102#>

Opomba: delovna skupina je uporabila tudi gradivo za parlamentarno razpravo, ki je bilo izdano v tiskani obliki in ni (več) dosegljivo na spletnih straneh: Resolucija o Nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025 – Predlog za obravnavo, novo gradivo št. 3, EVA 2014-2711-0003, številka 0070-46/2015-219.

2. Dybkaer R. Clinical laboratory work - concepts and terms. *Eur Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35(7):495-9.
3. Slovenski standard. SIST EN ISO 15189, Medicinski laboratoriji - Zahteve za kakovost in kompetentnost (ISO 15189:2012). [Ljubljana]: Slovenski inštitut za standardizacijo, 2013.

4. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, Oosterhuis W, Plebani M, Sandberg et al. Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(12):1849-56.

5. Pravno-informacijski sistem. Nacionalni program zdravstvenega varstva Republike Slovenije - zdravje za vse do leta 2004 (Uradni list RS, št. 49/00). [Internet]. 2000 [Dostop 10. avg 2023]. Dostopno na: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=NACP3>

Opomba: delovna skupina je uporabila tudi gradivo za parlamentarno razpravo, ki je bilo izdano v tiskani obliki in ni (več) dosegljivo na spletnih straneh. Obsegalo je tudi predlog mreže laboratorijske dejavnosti na primarni ravni: Nacionalni program zdravstvenega varstva Republike Slovenije - zdravje za vse do leta 2004 – gradivo za parlamentarno razpravo (osebni arhiv BB).

6. Libeer JC, Osredkar J, Kovacs G, Bratož S, Skitek M, Bonvicini P. Vloga zunanjih ocen kakovosti v laboratorijski medicini. V: Tivadar A, urednica. Slovenski kongres klinične kemije z mednarodno udeležbo: Zbornik razširjenih povzetkov. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2004. str. 296.

7. Možina B. Predlogi organizacijskih in strateških sprememb na področju laboratorijske dejavnosti v Sloveniji: vabljeno predavanje na 5. mednarodni konferenci o kakovosti laboratorijev. Ljubljana, 2013.

8. Ministrstvo za zdravje, Svetovna zdravstvena organizacija, EuObservatory. Analiza zdravstvenega sistema v Sloveniji: Povzetek in ključne ugotovitve. [Internet]. 2016 [Dostop 10. avg 2023] Dostopno na: https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/Organizacija-zdravstvenega-varstva/Analiza-zdravstvenega-sistema-v-Sloveniji/SLO_-analiza_ZS_povzetek_in_kljucne_ugotovitve_lektorirana_verzija.pdf

9. Kakovost in akreditacija medicinskih laboratorijev v Sloveniji in Evropski uniji: priročnik. [Ljubljana]: Slovensko združenje za klinično kemijo, 2002.

10. Božič B. Standardi za delo v medicinskih laboratorijih. V: Inštitut za varovanje zdravja, urednik. Prvi dnevi javnega zdravja [strokovno srečanje]: vloga laboratorijev v javnem zdravju. Ljubljana: [s.n.]; 2005.

11. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine: priročnik. [Ljubljana]: Slovensko združenje za klinično kemijo in Zbornica laboratorijske medicine, 2005.



12. Gorenjak M. Does the laboratory consolidation improve the quality of laboratory results?. V: Krhin B, urednik. Mednarodna konferenca o kakovosti in akreditaciji medicinskih laboratorijev: Konferenčni zbornik. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo; 2009. str. 91-4.
13. Možina B. Izkušnje pri nadzorih izvajalcev POCT: vabljeno predavanje na strokovnem srečanju Vloga laboratorija in specialista medicinske biokemije pri organizaciji in implementaciji testov ob pacientu – POCT. Ljubljana, 2015.
14. Gorenjak M. Informacijski sistemi v laboratorijih. V: Osredkar J, urednik. 1. slovenski kongres klinične kemije z mednarodno udeležbo: zbornik razširjenih povzetkov. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2000. str. 371-2.
15. Meško-Brguljan P. From laboratory working licenses to accreditation of medical laboratories. V: Bratož S, Meško-Brguljan P, Homšak E, urednice. International Conference on Quality of Medical Laboratories: Proceedings of the Conference. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino; 2015. str. 7-9.
16. Božič B. Možnost izvajanja laboratorijskih preiskav v Sloveniji: danes in jutri. V: Skitek M, urednik. Dodana vrednost in spreminjajoča se vloga laboratorijske medicine: Zbornik predavanj. Ljubljana: Klinični center, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo; 2007. str. 37-9.
17. Gorenjak M. Nujne laboratorijske preiskave. V: Grmec Š, Kupnik D, urednika. Akutna stanja: znamenja, simptomi, sindromi, diferencialna diagnoza in ukrepanje: 3. strokovni seminar z mednarodno udeležbo: zbornik predavanj. Maribor: Zdravstveni dom dr. Adolfa Drolca, Center za nujno medicinsko pomoč in reševalne prevoza; 2007. str. 229-32.
18. Majhen J. Strokovne naloge zdravstvenih organizacij. *Novis*. 1977;IV(2):9-11.
19. Kralj A. JUS standardi za elektromedicinske naprave in njihov pomen za uporabnike in proizvajalce. *Novis*. 1981;VIII(9):5-7.
20. Flisar-Joković Ž, Prezelj M. Klinični in biokemični laboratoriji v SR Sloveniji: priprava kontrolnih sistemov. *Novis*. 1982;9(4):26-30.
21. Jesenovc N. Klinični in biokemični laboratoriji v SR Sloveniji. Drugi posvet medicinskih biokemikov Jugoslavije v Banja Luki. *Novis*. 1982;IX(10):20-2.
22. Ministrstvo za javno upravo. Katalog delovnih mest in nazivov. [Internet]. [Dostop 10. avg 2023]. Dosegljivo na: <http://www.pportal.gov.si/FDMN/index.html>
Opomba: delovna skupina je uporabljala katalog, ki je bil veljaven leta 2017 in dostopen na takratni spletni strani Javne uprave na: http://www.mju.gov.si/fileadmin/mju.gov.si/pageuploads/JAVNA_UPRAVA/DPJS/Katalog/Katalog_FDMN_9.11.2017.pdf
23. Ministrstvo za zdravje. Strokovni izpiti za zdravstvene delavce in sodelavce. [Internet]. [Dostop 10. avg 2023]. Dostopno na: <https://www.gov.si/zbirke/storitve/strokovni-izpit-za-zdravstvene-delavce-in-sodelavce/>
24. Ministrstvo za zdravje. Pregled stanja na področju zdravstva v Sloveniji - januar 2023. [Internet]. 2023 [Dostop 14. apr 2023]. Dostopno na: <https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/NOVICE/Zdravstveni-sistem-v-Sloveniji-januar-2023.pdf>

Laboratorijska medicina skozi prizmo monografije Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem

Laboratory medicine through the prism of the monograph The history of healthcare and medicine in the Slovene lands

Tjaša Debelak¹, Borut Božič^{2,3}

¹Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

³Univerzitetni klinični center, Klinični oddelek za revmatologijo

Avtor za korespondenco:

Prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: borut.bozic@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Danes si kakovostno in učinkovito oskrbo bolnika večinoma težko predstavljamo brez laboratorijske diagnostike. Tesen preplet laboratorijske medicine, ki je neposredno vključena v zdravstveni sistem z laboratorijskimi rezultati in sorodnimi informacijami ter nasveti, povezanimi s kliničnim stanjem in obravnavo prejemnika storitev zdravstvenega sistema, z drugimi zdravstvenimi in nezdravstvenimi strokami, je skozi zgodovino pripomogel k razvoju sodobnega zdravstvenega sistema. Povezava laboratorijskega in kliničnega pristopa v medicini in zdravstvu je opisana v obsežni monografiji »Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem«.

Ključne besede: zgodovina, zdravstvo, laboratorijska medicina, monografija, specialistične stroke

ABSTRACT

Nowadays, quality and efficient patient care is mostly unimaginable without laboratory diagnostics. The close interplay of laboratory medicine, which supports the health care system with laboratory results and related information and advice related to the clinical condition and treatment of the recipient of the health care services, with other medical and nonmedical professions has contributed to the development of the modern health care system throughout history. The intertwining of laboratory and clinical approach in medicine and health care is described in the extensive monograph »The history of health care and medicine in the Slovene lands«.

Key words: history, healthcare, laboratory medicine, monography, specialist professions

»

UVOD

Laboratorijska medicina je kljub »mlademu« imenu stara veda, v sodobnosti pa povzemamo njene opredelitve iz standarda ISO 15.189 Medicinski laboratoriji – zahteve za kompetentnost in odličnost (1). Kljub veliki raznolikosti posameznih vej laboratorijske medicine ima kot stroka skupne značilnosti: preiskovanje bioloških vzorcev praviloma človeškega izvora z namenom ugotavljanja zdravstvenega stanja preiskovanca. Obsega izvajanje preiskav in interpretacijo rezultatov, zagotavljanje kakovosti, svetovanje, raziskovalno in izobraževalno delo. Laboratorijska medicina kot veja medicine, ki podpira zdravstveni sistem z laboratorijskimi rezultati in sorodnimi informacijami ter nasveti, povezanimi s kliničnim stanjem in obravnavo prejemnika storitev zdravstvenega sistema, predstavlja pomemben del zdravstvenega sistema. Vključena je v več kot 70 % medicinskih odločitev, pri čemer obsega le 3–4 % vseh stroškov zdravstvenih storitev (2).

Strokovnjaki laboratorijske medicine se dobro zavedamo pomena laboratorijske diagnostike v kakovostni in učinkoviti oskrbi bolnika (2). Z znanstvenimi, strokovnimi in poljudnimi prispevki to mesto tudi utemeljujemo in potrjujemo. Ker je osrednji subjekt bolnik, se okoli njega povezujejo in dopolnjujejo različne stroke. Nobena sama po sebi, ne glede na njen pomen, ni zadostna za dobro zdravstveno oskrbo. Slednja je možna šele ob povezanosti različnih zdravstvenih in tudi nezdravstvenih strok.

Povezanost različnih strok v celovitem sistemu zdravstva na Slovenskem s poudarkom na 20. in prehodu v 21. stoletje, z utemeljitvijo razvoja strok iz obdobja pred tem, prikazuje monografija »Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem«. Monografija, ki jo je avtorica, prof. dr. Zvonka Zupanič Slavec, dr. med., zgodovinarica medicine, predstojnica Inštituta za zgodovino medicine Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, z ekipo recenzentov pripravila po objektivnih merilih zgodovinopisja, je ogledalo strokovni in socialni zrelosti naše družbe prejšnjega stoletja. In tega tudi v 21. stoletju ne bi smeli pozabiti, temveč bi morali nadgrajevati dobre prakse, ki jih – skozi zgodovinsko prizmo gledano – ni malo. Kot pravi avtorica v zahvali: »Skupaj smo ustvarili delo, ki bo ohranjalo svetlobo velikega dela medicinskega in zdravstvenega osebja s podpornimi službami za dobro zdravje domačega človeka.«

LABORATORIJSKA MEDICINA V MONOGRAFIJI

Laboratorijski diagnostiki je v celoti posvečeno samostojno poglavje Razvoj laboratorijske dejavnosti v sklopu Razvoja strokovnih ved v tretji knjigi. Predstavljen je razvoj laboratorijske dejavnosti v svetu, od pisnih virov v 4. stoletju pr. n. št. pa do konca 20. stoletja, ko se je pojem laboratorijska medicina uveljavil v svetu in Sloveniji. Podrobneje je opisan razvoj klinične kemije na Slovenskem od začetkov organiziranih laboratorijev po prvi svetovni vojni preko Centralnega laboratorija in Higienkega zavoda do prikaza delovanja Univerzitetnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana, Oddelka za laboratorijsko diagnostiko UKC Maribor in številnih laboratorijev/oddelkov po slovenskih bolnišnicah. Že v tem delu je čutiti preplet posameznih področij, saj so drug ob drugem opisani npr. laboratorij za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil, laboratorij za hormone in tumorske označevalce, laboratorij za oploditev z biomedicinsko pomočjo (4). Nosilci laboratorijske medicine so specialisti posameznih strok in za področje klinične kemije kot najboljše delo laboratorijske medicine je pomemben dosežek priznavanje usklajenosti programa specializacije iz medicinske biokemije z učnim načrtom Evropske federacije za laboratorijsko medicino (EFLM) na podlagi skupnega okvira usposabljanja (EFLM Common Training Framework) (5). Na tej osnovi sta omogočena vpis posameznika v evropski register specialistov in uporaba naziva evropski specialist laboratorijske medicine (EuSpLM).

Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana (KIKKB) ima svoje začetke v Biokemičnem laboratoriju, ki je bil ustanovljen na Interni kliniki. Razvoj in potrebe bolnišničnih oddelkov ter razne mednarodne pomoči so botrovali odpiranju novih specifičnih laboratorijev v Kliničnih bolnicah v Ljubljani na kirurški, pediatrični, ginekološki in dermatološki kliniki ter na Onkološkem inštitutu. Z ustanavljanjem in konsolidacijo novih laboratorijev se je oblikoval sodobni Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, ki je največji slovenski laboratorij in eden najpomembnejših učnih centrov za specialistično usposabljanje na področju laboratorijske medicine. Laboratoriji skupaj opravijo okoli 770 različnih preiskav in združujejo 24-urno delo in skrb za paciente, terciarno in raziskovalno-razvojno ter izobraževalno de- »

javnost. KIKKB je tudi organizator in izvajalec republiške kontrole kakovosti dela SNEQAS v slovenskih biomedicinskih laboratorijih (4).

Drugi največji laboratorij deluje v UKC Maribor. Oddelek za laboratorijsko diagnostiko sestavlja 11 medicinsko-biokemijskih laboratorijev: urgentni, centralni, hematološki, urinski, proteinski, biokemijski, imunološki, hormonski, toksikološki laboratorij, laboratorij za pretočno citometrijo in laboratorij za analizo kovin. V Mariboru je prvi laboratorij v okviru internega oddelka mariborske bolnišnice deloval v dvajsetih letih 20. stoletja (4).

Opisana je laboratorijska diagnostika tudi v drugih dveh terciarnih ustanovah, to je Univerzitetna klinika Golnik in Onkološki inštitut, ter v splošnih in specialnih bolnišnicah po Sloveniji (4). Laboratorijska medicina je na področju medicinske/klinične biokemije najboljše na primarni ravni zdravstvene dejavnosti. Razvoj laboratorijev v zdravstvenih domovih nam prikaže poglavje o razvoju javnega zdravstva v prvem delu monografije Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem (6).

SPECIALIZIRANA ZNANJA IN VSE OPAZNEJŠI PREPLET RAZLIČNIH STROK

V začetku 21. stoletja smo po eni strani soočeni s tako specializiranimi znanji, da to pomeni samostojen razvoj (pod področij, po drugi strani pa vse manjšemu razmejevanju, vse večjemu prekrivanju in sodelovanju strokovnjakov različnih strok. V medicini, v okviru zdravniških specializacij, se je laboratorijska dejavnost zelo razvila predvsem na področju mikrobiologije, patologije, sodne medicine ter transfuzijske medicine s transplantacijo, ki imajo v monografiji svoja poglavja (4, 7). Razvoj je potekal in še poteka v povezavi laboratorijskega in kliničnega pristopa, zato je težko ali včasih celo nemogoče ločiti laboratorijski in klinični del.

Mikrobiologijo omenja že poglavje o razvoju javnega zdravstva do druge svetovne vojne v podobi stalne bakteriološke postaje Higienskega zavoda in Odseka za serološko diagnostiko sifilisa v prvi knjigi monografije. Tudi po

drugi svetovni vojni je mikrobiologija prednjačila z bakteriološko-epidemiološkim inštitutom, predhodnikom Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (UL) (6). Njen razvoj podrobno opisuje poglavje Mikrobiologija, bakteriologija, virologija, parazitologija, imunologija, alergologija v tretji knjigi monografije (4). Na področju infektologije se je uveljavila elektronska mikroskopija skupaj s serološkim testiranjem v diagnostiki viroz (4).

Patologija ima danes bistveno drugačno vlogo, kot jo je imela do 19. stoletja, ko je pomenila zgolj avtopsijsko, ne pa tudi diagnostične dejavnosti za življenja bolnika. Na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete UL opravljajo dejavnosti na področjih imunopatologije, nefropatologije (zlasti z elektronsko mikroskopijo), revmatopatologije, dermatopatologije, uropatologije (z imunohistokemijskimi metodami), gastroenteropatološke biopsijske diagnostike, nevroopatologije in drugo. Lepo je opisan preplet različnih strok in dejavnosti, na primer v molekularni patologiji so pri reševanju zapletenih primerov kliničnih sindromov vključene tudi sodobne metode molekularne genetike (4).

Sodna medicina združuje medicino in pravo. Pomemben del Inštituta za sodno medicino so njegovi laboratoriji, najdete jih v tretji knjigi monografije. Toksikološki in alkoholometrični laboratorij se ukvarjata s forenzično in klinično toksikologijo, določevanjem psihoaktivnih snovi pri udeležencih v prometu in spremljanjem terapevtskih ravni manj pogostih in za analizo zahtevnejših zdravil ter zagotavljata podporo Centru za zastrupitve UKC Ljubljana in drugim zdravstvenim ustanovam po Sloveniji. Laboratorij za molekularno genetiko med drugim omogoča določanje genetskih profilov oseb in bioloških sledi ter preiskavo starodavne DNA iz arheoloških vzorcev. V okviru obdukcijske dejavnosti deluje histološki laboratorij z imunohistokemijo (4).

V transfuzijski medicini je pomembno preprečevanje prenosa bolezni s krvjo, v monografiji na primer izvemo, da so s časom pri nas uvedli radioimunske, encimskoimunske in molekularno testiranje prisotnosti različnih virusov. V okviru laboratorijske dejavnosti Zavoda za transfuzijsko medicino z različnimi metodami zagotavljajo skladnost med dajalcem in prejemnikom transfuzije in opravljajo diagnostično testiranje. Aktivnosti v Centru za tipizacijo tkiv so pomembne pri transplantacijski medicini (7). »

POVEZANOST LABORATORIJSKE MEDICINE S PREDKLINIČNIMI VEDAMI IN Z DRUGIMI MEDICINSKIMI SPECIALNOSTMI

Vse manjše razmejevanje med laboratorijskim in kliničnim delom se kaže tudi v opisu nekaterih predkliničnih ved, vključenih v tretjo knjigo monografije: histologije, embriologije, biokemije v medicini. Prehod od bazičnih raziskav v laboratorijsko diagnostiko skoraj ni opazen (4). Povezanost laboratorijske diagnostike se kaže tudi pri drugih medicinskih specialnostih. V monografiji se področje laboratorijske medicine prepleta z drugimi strokami skozi različna poglavja.

Onkologija je izrazito interdisciplinarna veda, ki sega na različna polja bioloških in medicinskih ved. Laboratorijska dejavnost je nepogrešljivi del v onkologiji in je na Onkološkem inštitutu (OI) prisotna od njegove ustanovitve leta 1937, ko so imeli histološki, klinični in eksperimentalni laboratorij. Kasneje se je kot samostojna enota OI oblikoval Oddelek za laboratorijske dejavnosti. Izvajajo tudi preiskave tumorskih označevalcev in so vpeti v raziskovalno in pedagoško delo, saj na OI skoraj ni raziskave, ki ne bi potrebovala storitev laboratorija (4).

Od konca 19. stoletja je znanje o etiologiji kožnih bolezni napredovalo na podlagi histopatologije in bakteriologije. Prvi laboratorij za serologijo sifilisa v Sloveniji je bil ustanovljen v 20. letih 20. stoletja. Na ljubljanski dermatovenerološki kliniki so se oblikovali specialni laboratoriji: imunobiokemični za specialne biokemične preiskave in imunološke preiskave, alergološki za epikutano testiranje bolnikov s sumom na kontaktni ekcem, kar je pomembno tudi za diferencialno diagnozo nekaterih poklicnih dermatoz, histološki, mikološki in bakteriološki laboratorij (4).

Nevrologija med diagnostične metode poleg elektrofizioloških in radioloških metod vključuje tudi laboratorijske preiskave telesnih tekočin. Na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja UKC Ljubljana deluje šest laboratorijev: za testiranje avtonomnega živčevja, za elektroencefalografijo (EEG), za motnje gibanja in hojo, za nevrourodinamiko, za kognitivno nevroznanost in za likvorsko diagnostiko (4).

V poglavju o razvoju ginekologije in porodništva najdemo diagnostične in presejalne teste za odkrivanje kromosomskih napak, razvoj obravnave neplodnosti v obliki citogenetskih preiskav in amniocenteze. Spoznamo razvoj zunanostne oploditve, oploditve z biomedicinsko pomočjo in druge pomembne mejnike, pri katerih so pogosto sodelovali in sodelujejo strokovnjaki različnih specialnosti (7).

Humana citogenetika se je v medicini uveljavila po odkritju trisomije 21. kromosoma kot vzroka za nastanek Downovega sindroma. Tedaj so se znanstveniki zavedeli, da so kromosomske anomalije spolnih kromosomov tudi vzrok številnih drugih bolezni. Pri razvoju medicinske genetike je v monografiji opisan hiter napredek, ki je opazen zlasti na področju genetskega diagnostičnega testiranja. Genetski testi so uporabni kot podpora medicinski diagnostiki, v predrojni diagnostiki v smislu primarnega preprečevanja bolezni in v predsimpltomatski diagnostiki v smislu sekundarnega preprečevanja bolezni. Poleg specialistov klinične genetike, ki se ukvarjajo z genetskim svetovanjem, v Sloveniji delujejo tudi specialisti laboratorijske medicinske genetike, ki se ukvarjajo z laboratorijskim genetskim testiranjem (8).

Pri nuklearni medicini se slikovna in laboratorijska diagnostika prepletata z zdravljenjem. Nuklearnomedicinske enote so opremljene in usposobljene za slikovno, funkcijsko in laboratorijsko diagnostiko v klinični medicini, usmerjene so tudi v diagnostiko in zdravljenje ščitničnih in rakavih bolezni. Laboratorijska dejavnost poteka na oddelkih za radiofarmacijo in za klinično radiokemijo, od priprave radiofarmakov za diagnostiko ali zdravljenje do različnih analiznih metod, ki pripomorejo k diagnostiki obravnavanih stanj (7).

Revmatologija se kot izrazito interdisciplinarna veda prepleta z drugimi internističnimi vejami, s fizioterijo, rehabilitacijo in ortopedijo. Povezana je tudi z imunologijo in genetiko. Že v začetku razvoja sodobne revmatologije na Slovenskem je na Revmatološki kliniki deloval Laboratorij za imunologijo revmatizma, ki je kmalu postal eden redkih referenčnih laboratorijev z območja vzhodnoevropskih držav. V sodobnem času laboratorij deluje tudi na področju bazičnih raziskav. Specialni laboratorijski testi, ki jih izvaja, so nepogrešljivi pri rutinskem kliničnem delu in pri zapletenih diagnostičnih postopkih pri bolnikih z vnetnimi revmatskimi in s sistemskimi vezivnotkivnimi boleznimi (9). Specialne teste s področja revmatologije v večjem obsegu izvaja tudi v UKC Maribor. »

Razvoj hematologije, vede, ki preučuje kri in se ukvarja s krvnimi boleznimi, je postal mogoč šele z razvojem biokemije, imunologije in nuklearne medicine. Hematološka laboratorijska diagnostika se je v Ljubljani začela razvijati kmalu po drugi svetovni vojni. Sodobni Specializirani hematološki laboratorij tudi danes ostaja tesno povezan s Kliničnim oddelkom za hematologijo Interne klinike v UKC Ljubljana. Deli se na laboratorije za citologijo, pretočno citometrijo, citogenetiko, molekularno genetiko in hemostazo (8).

Laboratorijska dejavnost je vpeta tudi v geriatrico. V raziskovalni dejavnosti zavzema predvsem področja hemostaze in tromboze, koagulacije, ateroskleroze, lipidov, zdravljenje hiperholesterolemij in rehabilitacijo po miokardnem infarktu (8).

Toksikologija se je s časom vse bolj razvijala v subspecialne veje in postajala podporna veja medicine, ki v sodobnem času postaja še pomembnejša. Učinkovitost centrov za zastrupitve je največja, kadar združujejo klinično in informativno-svetovalno dejavnost, še zlasti, če imajo v svoji sestavi tudi ustrezen toksikološki laboratorij. V Centru za klinično toksikologijo in farmakologijo potekajo tudi raziskave s področja klinične farmakologije, predvsem o neželenih učinkih in medsebojnem delovanju zdravil, da bi izboljšali varnost pri njihovem predpisovanju (8).

Na ljubljanski Pediatrični kliniki se je laboratorijska diagnostika od prvih hematoloških in urinskih preiskav v 50. letih 20. stoletja razvila v obsežen program, ki poteka v več enotah laboratorija: splošni biokemični, hematološko-citološki, alergološki, laboratorij za preiskavo koagulacijskih motenj, laboratorij za preiskavo presnovnih bolezni in laboratorij za urinske preiskave. Med preiskavami so najpomembnejše diagnostika aminoacidopatij, presnove ogljikovih hidratov, celiakije, galaktozemije, anemij, tumorjev, levkemij, hemofilij, alergološke in druge preiskave. Pomemben je tudi presejalni program za prirojene bolezni pri novorojenčkih (8).

Urgentna medicina izvaja preventivo, diagnostiko in zdravljenje pacientov, ki so zaradi nenadno nastale bolezni, poškodbe ali zastrupitve življenjsko ogroženi. Pomembna je stalna laboratorijska podpora, saj nujna medicinska pomoč deluje neprekinjeno 24 ur dnevno vse dni v letu. Nekatere preiskave izvajajo s pomočjo obpostelnega analizatorja krvi, nekatere, kot so kompletna krvna slika, elektroliti, retenti, tropoin T, laktat in plinska analiza krvi, je mogoče opraviti tudi na terenu (8). Testiranje ob pacientu (angl. *point-of-care te-*

sting, POCT) se v zadnjem obdobju intenzivno razvija. Analizo biološkega materiala na terenu praviloma izvaja nelaboratorijsko (klinično) osebje, kljub temu pa za POCT veljajo iste zahteve kakovosti kot za medicinski laboratorij in morajo biti uvedene ter nadzirane s strani laboratorijskega osebja.

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE NA PODROČJU LABORATORIJSKE MEDICINE

Izobraževalni programi so pomembna osnova zdravstva, pa čeprav se tega marsikdo zave šele v krizi pomanjkanja kadrov, ko je že zamujenih 5–10 let ali več. Tretja knjiga v poglavju o razvoju zdravstvenega šolstva opisuje tudi izobraževanje in usposabljanje zdravstvenih strokovnjakov, ki delajo na področju laboratorijske diagnostike (4). Izobraževanje strokovnjakov na področjih laboratorijske medicine izhaja iz medicinske, farmacevtske, biomedicinske ali druge naravoslovne usmeritve. Za laboratorijsko diagnostiko so na prvi, drugi ali enoviti magistrski stopnji, neposredno ali posredno, ključnega pomena obe medicinski fakulteti (UL in UM) in Fakulteta za farmacijo UL, za vrhunske strokovnjake pa doktorski študij Biomedicina UL. Na srednješolski ravni je to Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo s programom laboratorijski tehnik (4).

Za izobraževanje laboratorijskih strokovnjakov je ključno tudi usposabljanje v realnih kliničnih okoljih, pri čemer so predhodno omenjeni laboratoriji pomembne učne baze za strokovnjake različnih področij in specialnosti. Slednjim stanovske organizacije, predvsem Zbornica laboratorijske medicine, Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, Zdravniška zbornica Slovenije in Zdravniško društvo nudijo stalno poklicno usposabljanje na vseh ravneh od tehnikov do specialistov. Ker so nosilci dejavnosti specialisti posameznih strok (patologije, klinične mikrobiologije, medicinske biokemije, transfuzijske medicine, laboratorijske medicinske genetike in sodne medicine), je usklajenost med dodiplomskim in podiplomskim izobraževanjem, specialističnem usposabljanjem in stalnim poklicnim usposabljanjem nujna. »

ZAKLJUČEK

V monografiji »Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem« ima laboratorijska medicina v vsej raznolikosti svojih pojavnih oblik mesto, ki ji gre: pomembna zdravstvena dejavnost preiskovanja bioloških vzorcev pacientov z namenom ugotavljanja njihovega zdravstvenega stanja v procesu številnih medicinskih odločitev. In čeprav jo je možno spremljati v posameznih delih monografije, sta prava podoba in velikanski pomen laboratorijske medicine vidna ob listanju vseh delov tega izjemnega enciklopedičnega dela.

Monografijo Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem sestavljajo štiri knjige. Prva dva dela sta izšla pri Slovenski matici in Znanstvenem društvu za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije leta 2017 in 2018, tretji 2022 pri Celjski Mohorjevi družbi in Znanstvenem društvu za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije, izid četrtega pričakujemo letos pri istih založnikih.

Skupno bo monografija obsegala okoli 2500 knjižnih strani formata A4, več tisoč referenc in okoli 6000 slikovnih prilog.

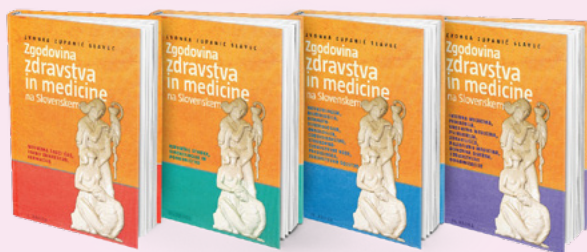
Knjige lahko prelistate na spletni povezavi <https://www.mf.uni-lj.si/izm/raziskovanje>.

Naročiti jih je možno (1. in 2. del po 49,0 €, 3. po 89,9 €) na naslovu:

Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije, Zaloška 7a, 1000 Ljubljana

e-naslov: zgodovina.medicine@gmail.com

telefon: 030 700 617



LITERATURA

1. International Organization for Standardization. ISO 15.189: 2022 Medical laboratories - requirements for quality and competence.
2. Kurec AS, Lifshitz MS. General concept and administrative issues. V: McPherson RA, Pincus MR, urednika. Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Philadelphia: Elsevier; 2007. str 3–11.
3. Božič B. Laboratorijska medicina skozi oči strokovnjaka in univerzitetnega profesorja za področje klinične biokemije in laboratorijske biomedicine. Laboratorijska medicina 2021;3:8–10.
4. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Infektologija, nevrologija, onkologija, dermatovenerologija, zobozdravstvo, strokovno-zdravstvene vede, predklinika, zdravstveno šolstvo. Celje, Ljubljana: Celjska Mohorjeva družba, Društvo Mohorjeva družba, Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2022.
5. Wieringa G, Querlto J, Homšak E, Jassam N, Cavalier E, Svinarov D, et. al. A proposed Common Training Framework for Specialists in Laboratory Medicine under EU Directive 2013/55/EC (The Recognition of Professional Qualifications). Clin Chem Lab Med 2020;59(3):505–12.
6. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Medicina skozi čas, javno zdravstvo, farmacija. Ljubljana: Slovenska matica, Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2017.
7. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Kirurške stroke, ginekologija in porodništvo. Ljubljana: Slovenska matica, Znanstveno društvo za zgodovino zdravstvene kulture Slovenije; 2018.
8. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na Slovenskem, Interna medicina, pediatrija, urgentna medicina, psihiatrija, zdraviliška medicina, paliativna medicina, duhovna oskrba bolnikov, zdravstvene organizacije [v pripravi].

Uporaba sekvenciranja naslednje generacije v klinični diagnostiki prirojenih bolezni

Next-generation sequencing in the clinical diagnosis of congenital diseases

Uroš Prešern¹, Jernej Kovač^{1,2}, Robert Šket^{1,2}, Tine Tesovnik^{1,2}, Maruša Debeljak^{1,2}, Barbara Jenko Bizjan^{1,2}

¹Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

²Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

Asist. dr. Barbara Jenko Bizjan

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana

e-pošta: barbara.jenko.bizjan@kclj.si

POVZETEK

Sekvenciranje naslednje generacije (NGS) je v zadnjem desetletju postalo osrednja metoda v klinični diagnostiki prirojenih bolezni. Njegova visoka zmogljivost omogoča iskanje vzročnih patogenih sprememb skozi celoten genom, pri čemer pa sam postopek zaradi velike količine generiranih podatkov zahteva uporabo posebnih bioinformatičnih orodij. Eden ključnih korakov v analizi je pravilna poravnava pridobljenih zaporedij na zaporedje referenčnega genoma, čemur sledi določitev prisotnih genetskih sprememb. Ozko grlo v analiznem postopku trenutno predstavlja anotacija sprememb, kjer je za odkrite spremembe v genomu treba določiti, če so patogene ali benigne, ter če lahko njihova prisotnost v genomu pojasni klinično sliko preiskovanca. Svojevrstno etično dilemo predstavlja tudi način ravnanja ob odkritju sprememb, ki so sicer patogene, vendar niso neposredno povezane s klinično sliko. V tem preglednem članku je opisan potek uporabe NGS v klinični diagnostiki prirojenih bolezni, ki je dodatno predstavljen na primeru bolnika s prirojeno katarakto.

Ključne besede: sekvenciranje naslednje generacije, diagnostika prirojenih bolezni

ABSTRACT

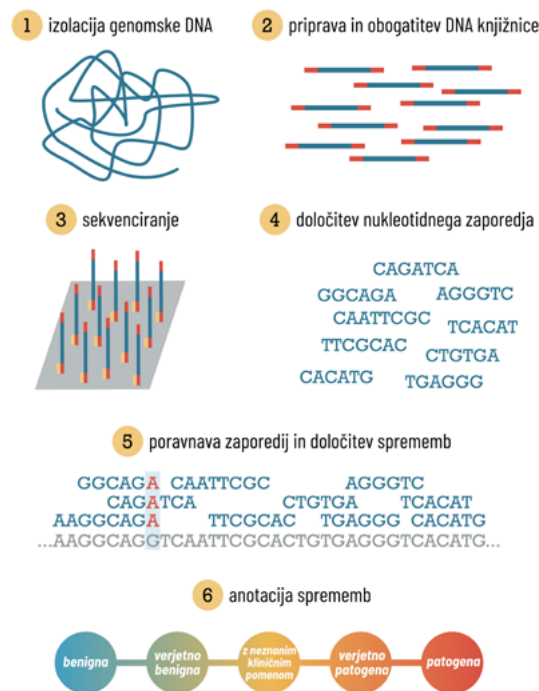
Over the past decade, next-generation sequencing (NGS) has become the method of choice in the clinical diagnosis of congenital diseases. Its high throughput enables the identification of causal pathogenic variants throughout the entire genome; however, the process requires specialized bioinformatics tools due to the large amount of generated data. One of the key steps in the analysis is a correct alignment of acquired sequences to the reference genome, followed by variant calling. Currently, the bottleneck in the process is variant annotation, where discovered variants in the genome need to be classified as pathogenic or benign. The causation between detected variants and observed phenotype is also determined. A unique ethical dilemma is encountered when a pathogenic variant not directly linked to an observed phenotype is discovered. This review describes the individual steps of NGS in the clinical diagnosis of congenital diseases. The use of NGS in the case of a patient with a congenital cataract is presented as an example.

Key words: next generation sequencing, diagnosis of congenital diseases »

UVOD

Razvoj sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next generation sequencing*, NGS) je povzročil revolucijo na področju določanja nukleotidnih zaporedij, saj je le-to postalo dosti hitrejše in cenejše. Zaradi zmožnosti sočasne analize celotnega genoma se je NGS hitro uveljavil v klinični diagnostiki, ki je bila pred tem omejena na določanje za-

poredja posameznih genov. V genetski diagnostiki se NGS najbolj pogosto uporablja v diagnostiki prirojenih bolezni in onkologiji. V zadnjem času pa prodira tudi na druga področja, kot sta mikrobna diagnostika (1) in določanje tkivne skladnosti (2). V nadaljevanju se bomo osredotočili na diagnostiko prirojenih bolezni, kjer bodo predstavljeni potek analize ter zmogljivosti in omejitve NGS (Slika 1).



Slika 1: Shema poteka uporabe NGS v klinični diagnostiki. Posamezni koraki, ki so prikazani na shemi, so podrobneje razloženi v nadaljevanju besedila.

Figure 1: A general outline of the use of NGS in clinical diagnostics. The individual steps mentioned in the figure are explained in more detail in the following parts of the review.

Pojem NGS označuje različne tehnologije sekvenciranja, za katere je značilno, da omogočajo analizo ogromnega števila zaporedij hkrati. Izmed prvotnih tehnologij NGS je danes v širši rabi tehnologija sekvenciranja s sintezo podjetja Illumina (3), zaradi česar izraz NGS pogosto kar enačimo z njo (to velja tudi za nadaljevanje članka, razen če ni navedeno drugače). NGS temelji na sekvenciranju kratkih fragmentov DNA (300 baznih parov), ki so pripeti na prečno celico, kar omogoča njihovo prostorsko ločbo in so-

časno analizo. Sekvenciranje poteka preko sinteze komplementarne verige DNA, kjer se nanjo postopoma dodajajo nukleotidi s fluorescenčno oznako. Zajemanje svetlobnega signala na koncu vsakega dodanega nukleotida omogoča določitev nukleotida, ki se je v tistem krogu vgradil v verigo. V kategorijo NGS uvrščamo tudi novejšo, tretjo generacijo sekvenciranja, katere pomemben predstavnik je sekvenciranje z nanoporami, ki prav tako počasi postaja sestavni del klinične diagnostike. Tretja generacija sekven- >>

ciranja omogoča veliko daljša branja (> 10 kb) kot druga (kamor spada Illumina) in služi kot komplementarna metoda v primerih, pri katerih je zmogljivost sekvenciranja s sekvenciranjem Illumina slabša, npr. ponavljajoča zaporedja in psevdogeni (4).

Cilj uporabe NGS v diagnostiki prirojenih bolezni je odkritje ene ali več genetskih sprememb, ki bi nam pojasnile klinično sliko preiskovanca. Pod pojmom genetska sprememba razumemo kakršnokoli odstopanje od nukleotidnega zaporedja referenčnega človeškega genoma. Pri tem gre lahko za manjše genetske spremembe, kot v primeru sprememb posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide variant*, SNV) in kratkih insercij/delecij, ali večje strukturne spremembe, kot so duplikacije, translokacije, inverzije ter večje insercije/delecije. Večina genetskih sprememb je benigne narave, nekatere pa lahko vodijo do nastanka patoloških stanj. Pri iskanju vzročnih patogenih genetskih sprememb ločimo tri različne pristope glede na območje, ki ga v genomu analiziramo: analiza panela genov, sekvenciranje celotnega eksoma (angl. *whole exome sequencing*, WES) in sekvenciranje celotnega genoma (angl. *whole genome sequencing*, WGS). Vsak izmed pristopov ima svoje prednosti in slabosti, v praksi se trenutno najpogosteje uporablja sekvenciranje celotnega eksoma (5).

Analiza panela genov

Pri analizi panela genov pripravimo NGS knjižnico za zgolj vnaprej izbrane gene, ki so povezani z opazovanimi kliničnimi znaki (npr. prirojena izguba sluha) (6). Z omejitvijo na manjše število preiskovanih genov se zmanjšajo stroški sekvenciranja, prav tako je enostavnejša tudi nadaljnja bioinformatična analiza rezultatov. Slabost tega pristopa je možnost, da se vzročni gen ne nahaja v izbranem panelu in ga tako v analizi ne bomo zajeli. Prav tako lahko težavo povzročajo neklasične kombinacije kliničnih znakov, kjer se pojavi dilema, panel katerih genov je smiselno analizirati.

Sekvenciranje celotnega eksoma

Eksom obsega vse nukleotidne regije na DNA, ki kodirajo proteine v genomu, in predstavlja med 1 in 2 % celotnega genoma. Pri WES se priprava NGS knjižnice iz panela izbranih genov razširi na vse eksonske regije v genomu. S tem povečamo verjetnost, da bomo v analizo zajeli patogeno genetsko spremembo, hkrati pa je zaradi večje velikosti preiskovanega območja analiza dražja in zahtevnejša (7).

Sekvenciranje celotnega genoma

WGS dodatno poveča možnost za najdbo vzročne patogene genetske spremembe, hkrati pa se pri WGS izognemo stopnji obogatitve DNA knjižnice, zaradi česar je globina branja skozi celoten genom enakomernejša (8). WGS omogoča tudi lažjo določitev strukturnih genomskih sprememb, opredelitev mitohondrijskega genotipa na mitohondrijskem genomu, opredelitev večjih sprememb v številu kopij odseka genoma in njihovih lomov. Njegova ključna slaba lastnost je dražja in časovno zamudnejša analiza.

POTEK SEKVENCIRANJA S TEHNOLOGIJO NGS

Izolacija DNA in priprava DNA knjižnice

Priprava DNA knjižnice se nanaša na postopek priprave vzorca DNA za izvedbo sekvenciranja. Začetni material je izolirana DNA, pri čemer se za izolacijo najpogosteje uporablja periferna kri in slina. Ker tehnologija NGS temelji na sekvenciranju kratkih fragmentov DNA, je treba narediti fragmentacijo izolirane DNA, in sicer s fizikalnimi (npr. sonicanje) ali encimskimi metodami, medtem ko se kemične metode pogosteje uporabljajo za fragmentacijo RNA (9). Po fragmentaciji naredimo selekcijo fragmentov dolžine 300–500 bp z metodo čiščenja na paramagnetnih kroglicah. Paramagnetne kroglice glede na ionsko moč selektivno vežejo nukleinske kisline po velikosti ter se tako uporabljajo za visoko učinkovite protokole izolacije in čiščenja fragmentov DNA. Po selekciji velikosti fragmentov se z ligacijo ali verižno reakcijo s polimerazo (PCR) na obeh koncih posameznega fragmenta DNA pritrdita adapterska oligonukleotida s tako imenovano »molekularno črtno kodo«. Ta je sestavljena iz unikatnega nukleotidnega zaporedja, ki v primeru vzporednega sekvenciranja več vzorcev hkrati služi kot identifikacijska regija za določitev, kateremu vzorcu pripadajo prebrana zaporedja DNA. Poleg molekularne črtno kode vsebuje adapter tudi regijo, ki omogoča pritrditev fragmenta DNA na pretočno celico. Pojem DNA knjižnica se nanaša na skupek vseh fragmentov DNA posameznega vzorca s pripetimi adapterji. Po pripravi DNA knjižnice za posameznega preiskovanca je treba ovrednotiti količino, kakovost in dolžino pripravljenih fragmentov DNA. To običajno storimo z avtomatsko elektroforezo. »

Obogatitev DNA knjižnice

Pri analizi izbranega panela genov in WES naredimo tudi obogatitev DNA knjižnice, s katero v njej povečamo delež fragmentov, ki pripadajo preučevanim regijam v genomu. To dosežemo bodisi s pomnoževanjem izbranih fragmentov DNA s PCR ali z njihovo izolacijo preko hibridizacije s komplementarnim zaporedjem (10). V primeru izvedbe WES je priporočljivo, da obogatena DNA knjižnica poleg eksonskih regij vsebuje tudi začetni del nukleotidnega zaporedja sosednjih intronov, saj se tu pogosto nahajajo genetske spremembe, ki spremenijo proces izrezovanja (11). Pomanjkljivost obogatitve DNA knjižnice je neenakomerna pomnožitev oziroma izolacija posameznih fragmentov DNA, zaradi česar tudi globina branja na različnih mestih ni enakomerna. Obogatitev pri WGS ni potrebna, saj določamo zaporedje celotnega genoma.

Sekvenciranje s tehnologijo Illumina

Fragmenti DNA ene ali več pripravljenih DNA knjižnic se s pomnoževanjem preko mostov pritrdijo na pretočno celico, kjer nato poteka sekvenciranje. Ker je dobljena dolžina zaporedja (100–300 bp) običajno krajša od dolžine fragmenta, določimo zgolj zaporedje njegovega 5' končnega dela. Sekvenciranje lahko nato ponovimo tudi na drugem koncu komplementarne verige fragmenta DNA, s čimer dobimo zaporedji parnih koncev (angl. *paired-end read*), ki sta ločeni z vmesnim delom, kjer zaporedje ni določeno (3).

BIOINFORMATSKA ANALIZA

Surovi podatki sekvenciranja zahtevajo nadaljnjo analizo z različnimi bioinformatскими orodji. Proces lahko razdelimo v štiri stopnje: določitev baz, poravnava zaporedij, določitev genetskih sprememb in njihova anotacija.

Določitev baz

Določitev baz zaobjema pretvorbo signalov (npr. svetlobnih ali električnih), zajetih med sekvenciranjem v nukleotidno zaporedje. V primeru sočasne analize več vzorcev je hkrati potrebno tudi razvrstiti, katera zaporedja pripadajo kateremu vzorcu. Pri tem so v pomoč »molekularne črtne kode,« ki se nahajajo na začetku vsakega za-

poredja (12). Razvrščena zaporedja so shranjena v obliki datoteke formata *FASTQ*, ki poleg nukleotidnih zaporedij vsebuje tudi podatke o zanesljivosti določitve posameznih nukleotidov.

Poravnava zaporedij

Zaporedja posameznih fragmentov DNA služijo kot osnova za pridobitev celotnega zaporedja eksoma, genoma ali panela genov. Sestavljanje zaporedja genoma *de novo* (tj. brez uporabe referenčnega genoma) je računsko zahtevno in zahteva večjo količino generiranih podatkov (13), zaradi česar se običajno za sestavo genomskega zaporedja uporablja prileganje fragmentov DNA na referenčni genom. V ta namen so bila razvita različna orodja za prileganje, ki vključujejo kombinacijo globalne in lokalne poravnave (14). Rezultati poravnave so shranjeni v datoteki formata *BAM* (angl. *binary alignment map*), ki za vsak posamezen fragment DNA vsebuje podatke o mestu poravnave in morebitnih neujemanjih (15).

Določitev genetskih sprememb

Na podlagi poravnanih zaporedij in neujemanj z referenčnim genomom določimo prisotnost genetskih sprememb. Te so zbrane v datoteki formata *VCF* (angl. *variant call format*). V njej sta med drugim za vsako genetsko spremembo določena njeno nahajališče v genomu ter podatek, za kakšno spremembo v zaporedju gre. Podan je tudi podatek o vertikalni pokritosti oziroma globini branja, ki je opredeljena kot število unikatnih fragmentov DNA, ki vsebujejo dani nukleotid na nekem mestu v genomu (16). Večja kot je vertikalna pokritost genetske spremembe, večja je verjetnost, da je ta v genomu dejansko prisotna in ni zgolj artefakt. Za določitev prisotnosti heterozigotnih genetskih sprememb je okvirno potrebna vsaj desetkratna vertikalna pokritost posameznega nukleotida (17). V praksi se izkaže, da je vertikalna pokritost nukleotidov skozi celoten genom oziroma eksom neenakomerna, zaradi tega mora biti povprečna pokritost genoma oziroma eksoma (tj. povprečna vrednost vertikalnih pokritosti posameznih nukleotidov v celotnem genomu oziroma eksomu) višja. S tem dosežemo zadostno globino branj tudi v regijah z nižjo vertikalno pokritostjo nukleotidov. Pri WGS, kjer je vertikalna pokritost razmeroma enakomerna, je priporočljivo, da je povprečna pokritost genoma vsaj 30-kratna, pri WES, kjer pokritost močneje variira, pa vsaj 75–100kratna (11). »»

Če želimo zaznati nizke stopnje mozaicizma ali heteroplazmije, mora biti povprečna pokritost genoma ustrezno višja. Poleg podatka o vertikalni pokritosti je informativen tudi podatek o alelnem deležu genetske spremembe, ki je opredeljen kot razmerje med vertikalno pokritostjo določene genetske spremembe in celokupno vertikalno pokritostjo mesta, kjer se ta nahaja. Iz alelnega deleža je možno sklepati, ali je neka sprememba homozigotna, heterozigotna ali je prisoten mozaicizem (18).

Anotacija genetskih sprememb

Postopek anotacije omogoča povezavo genetske spremembe z informacijami o njenem vplivu na delovanje organizma. Ameriško združenje medicinskih genetikov (angl. *American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG) je izdalo smernice, v katerih priporočajo petstopenjsko razvrščanje sprememb glede na njihov klinični pomen: patogena, verjetno patogena, sprememba z neznanim kliničnim pomenom, verjetno benigna in benigna (19). V kategoriji patogenih (povzročajo nastanek določene bolezni) in benignih (ne povzročajo nastanka bolezni) spadajo tiste genetske spremembe, za katere obstaja trdna znanstvena podlaga o njihovem kliničnem pomenu, medtem ko v kategoriji verjetno patogenih oziroma verjetno benignih spadajo tiste genetske spremembe, pri katerih lahko z vsaj 90odstotno gotovostjo trdimo o njihovem kliničnem pomenu. Če ni jasnih povezav s klinično sliko, se genetska sprememba razvršča kot sprememba z neznanim kliničnim pomenom. Ker je gotovost o povezavi težko kvantitativno oceniti, med posameznimi kategorijami ni ostre meje. Prav tako lahko nova spoznanja privedejo do ponovne razvrstitve posameznih genetskih sprememb. Najpogosteje uporabljeni podatki za določitev kategorije vključujejo pojavnost genetske spremembe v splošni populaciji in populaciji obolelih, funkcionalne študije, vrsto genetske spremembe in predviden vpliv, primerjavo z že znanimi genetskimi spremembami in rezultate računalniških modelov (20). Ti podatki se črpajo iz objavljene znanstvene literature, podatkovnih baz ter rezultatov napovednih algoritmov. Populacijske podatkovne baze (npr. dbSNP, dbVAR in gnomAD) vsebujejo podatke o prisotnosti in frekvenci genetskih sprememb v neki populaciji, vendar ni nujno, da vsebujejo podatke o njihovem kliničnem pomenu (21–24). Kljub temu lahko na podlagi podatka o frekvenci genetske spremembe o njeni funkciji deloma sklepamo, saj običajno velja, da splošno prisotne genetske spremembe niso patogene. Drugi tip podatkovnih baz obsega baze patogenih genetskih sprememb (ClinVar, OMIM, HGMD itd.) in tako vsebuje tudi podatke o njihovo-

vem kliničnem pomenu (25–27). Pri interpretaciji podatkov iz podatkovnih baz je potrebna pozornost, v kakšni meri so informacije posodobljene in podprte z zanesljivimi viri. Rezultate podatkovnih baz lahko kombiniramo z algoritmi, ki skušajo napovedati vpliv neke genetske spremembe na izražanje genov ter na funkcijo in strukturo izraženih proteinov. Najpogosteje so uporabljeni algoritmi za napoved posledic na aminokislinski ravni (npr. PolyPhen-2, SIFT in CADD), kjer algoritem preveri, če se prisotnost genetske spremembe izrazi kot nesmiselna oziroma drugače smiselna aminokislinska sprememba ali če pride do spremembe bralnega okvirja (28,29). Algoritem oceni vpliv aminokislinske spremembe na podlagi njenega mesta znotraj proteina ter biokemijskih lastnosti in evolucijske ohranjenosti mutiranega aminokislinskega ostanka. Prav tako se uporabljajo algoritmi za napovedovanje mest izrezovanja intronov (npr. GeneSplicer), ki lahko napovejo pojav ali izgubo mest v prisotnosti neke genetske spremembe (30). Novejša orodja poskušajo napovedati tudi vpliv genetskih sprememb v nekdirajočih regijah (31). Občutljivost in specifičnost napovednih algoritmov se razlikujeta od primera do primera, v splošnem pa ti algoritmi še niso dovolj zanesljivi, da bi jih lahko uporabili samostojno kot edini vir informacije za napoved vpliva genetskih sprememb. Glede na velik napredek napovednih algoritmov na sorodnih področjih, kot je AlphaFold za napovedovanje tridimenzionalnih struktur proteinov (32), lahko pričakujemo, da bo v bližnji prihodnosti uporaba strojnega učenja in nevronske mreže tudi na področju napovedovanja vpliva genetskih sprememb privedla do znatnih izboljšav napovedne moči (33).

Filtriranje genetskih sprememb

Za opredelitev vzročne genetske spremembe oziroma genetskih sprememb, ki vplivajo na klinično sliko preiskovanca, izberemo panel genov, ki so povezani s kliničnimi znaki. Pri osnovanju panela si pomagamo z bazo podatkov Human Phenotype Ontology (<https://hpo.jax.org/app/>) in Genomics England PanelApp (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>). Obe bazi podatkov sta razviti na podlagi medicinske literature ter sorodnih portalov, kot so Orphanet, DECIPHER in OMIM. Izbrani panel genov uporabimo za filtriranje anotiranih genetskih sprememb. V naslednjem koraku genetske spremembe filtriramo še glede na prisotnost v populaciji ter njihov položaj v intronski, eksonski, promotorski ali regulatorni regiji. Osredotočimo se na redke genetske spremembe, ki so prisotne v eksonski, promotorski ali regulatorni regiji, saj je vpliv intronskih sprememb običajno težje razložljiv. Izjema so že znane opredeljene vzročne »

intronske spremembe. Pri genih, ki se dedujejo avtosomno dominantno, klinično sliko pojasnimo z opredelitvijo ene heterozigotne patološke ali verjetno patološke spremembe. Medtem ko v genih, ki se dedujejo recisivno, za pojasnitev kliničnega fenotipa opredelimo eno patološko ali verjetno patološko spremembo v homozigotni obliki oziroma dve heterozigotni spremembi, ki se nahajata na različnih alelih.

Poročanje naključnih najdb

Pri iskanju vzročnih patogenih sprememb, ki bi pojasnile klinično sliko, lahko bodisi po naključju ali načrtno odkrijemo tudi druge patogene spremembe, ki pa niso povezane z napotno diagnozo. Takim najdbam pravimo naključne oziroma sekundarne (v primeru načrtnega iskanja) in lahko razkrijejo že obstoječo nediagnosticirano bolezen ali pa povečano verjetnost za njen pojav v prihodnosti. Pri tem se pojavlja dvom, kako v takih primerih ravnati ter kdaj o najdbah preiskovanca obvestiti in kdaj ne. V ta namen je združenje ACMG sestavilo seznam genov, za katere je priporočljivo poročanje patogenih sprememb (34). Seznam ne vsebuje vseh sprememb genov, pri katerih so patogene spremembe povezane z razvojem različnih bolezni, temveč se pri uvrščanju genov na seznam ravnajo po več merilih. Glavno izmed njih je, da mora poročanje o najdbi omogočiti ukrepe, ki bi znatno zmanjšali obolevnost ali smrtnost brez prekomerne obremenitve preiskovanca in zdravstvenega sistema. Trenutni seznam vsebuje 81 genov, od katerih je največ povezanih z razvojem rakavih in kardiovaskularnih obolenj.

POMANJKLJIVOSTI NGS

Kljub temu da se je NGS uveljavila kot glavna metoda v klinični genetski diagnostiki, ima nekatere pomanjkljivosti, ki zahtevajo uporabo dodatnih metod ter pozornost pri interpretaciji rezultatov.

Določanje zaporedja problematičnih regij

Problematično je predvsem določanje prisotnosti genetskih sprememb v homolognih, repetitivnih ali z gvaninom in citozinom bogatih območjih. Homologne regije zaradi svoje medsebojne podobnosti predstavljajo oviro pri poravnavi zaporedij, saj je včasih nemogoče nedvoumno določiti, kateri regiji pripada neko zaporedje. Tako lahko v primeru napačnega prileganja pride do pojava lažno po-

zitivnih ali lažno negativnih rezultatov (35). Podobna težava nastopi pri repetitivnih regijah, kjer je težko določiti pravo mesto poravnave, če zaporedje fragmenta DNA vsebuje zgolj repetitivni element (36). Hkrati so repetitivne in homopolimerne regije močnejše izpostavljene napakam pri sekvenciranju in pomnoževanju s PCR, saj lahko pride do zdrsa polimeraze (37). Slabša kakovost rezultatov je tudi v regijah, bogatih z gvaninom in citozinom, kjer pogosteje pride do napačne določitve baz (38).

Določanje strukturnih sprememb in sprememb v številu kopij

Medtem ko se NGS razmeroma dobro odreže pri določanju SNV in kratkih insercij oz. delecij, je določevanje večjih kompleksnih strukturnih sprememb in sprememb v številu kopij (angl. *copy number variant*, CNV) zahtevnejše (39). Razlog je predvsem kratka dolžina prebranih fragmentov DNA, ki jih je v primeru večjih sprememb težko pravilno prilegati na genom. Opredelitev takih genetskih sprememb lahko olajšajo uporaba podatkov o globini branja prebranih zaporedij, sekvenciranje parnih koncev fragmentov DNA ali pa poravnava zaporedij *de novo* brez uporabe referenčnega genoma (40, 41).

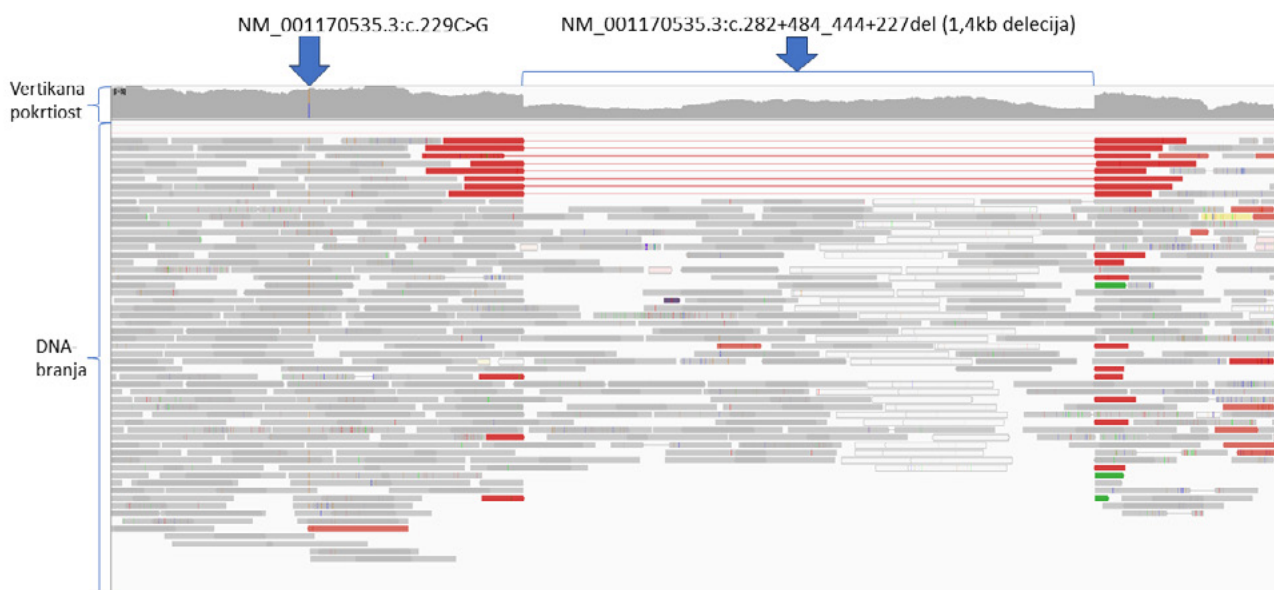
Uspešnost določanja genetskih sprememb v zahtevnejših regijah lahko izboljšamo s sočasno uporabo sorodnih metod. V nekaterih primerih lahko zaporedje problematičnih regij uspešno določimo s sekvenciranjem po Sangerju (42). Prav tako lahko posamezno regijo pred sekvenciranjem specifično pomnožimo s PCR, s čimer povečamo globino branja in se izognemo napačnemu prileganju na homologne regije (35). V zadnjem času se vse pogosteje uporabljajo tehnike tretje generacije sekvenciranja, ki s svojo dolgo dolžino branja olajšajo določanje strukturnih sprememb in zaporedij v problematičnih regijah (4).

KLINIČNI PRIMER

Kot oris uporabe NGS sekvenciranja v klinični diagnostiki prirojene bolezni je naveden primer bolnika s prirojeno katarakto. Ker je bil bolnik na intenzivni enoti, je bilo nujno genomsko sekvenciranje. Iz krvi smo izolirali DNA in pripravili DNA knjižnico celotnega genoma. DNA smo z metodo sonikacije fragmentirali ter na oba konca fragmentirane DNA ligirali adapterske oligonukleotide s tako imeno- »

vano »molekularno črtno kodo«. Po pripravi DNA knjižnice smo izvedli sekvenciranje s sekvenatorjem Illumina Nova-Seq6000. Po končanem sekvenciranju smo naredili bioinformatičko analizo, pri kateri smo s pretvorbo svetlobnih signalov v zaporedje baz določili nukleotidno zaporedje vseh fragmentov DNA ter na podlagi »molekularne črtno kode« določili branja, ki pripadajo preiskovanemu bolniku. S specifičnimi bioinformatičkimi orodji smo prilegali izbrana branja na humani referenčni genom. Sledila je določitev genetskih sprememb, ki se razlikujejo od referenčnega genoma ter anotacija le-teh. Pri analizi genetskih sprememb smo pregledali izbrani panel genov, povezanih z izraženimi kliničnimi znaki. Po izločitvi intergenskih in intronskih sprememb smo v genu *ATAD3A*, ki kodira mitohondrijsko membransko ATPazo, našli tri heterozigotne spremembe, ki jih v splošni populaciji ni ali pa so zelo redke in prisotne s frekvenco manj kot 0,1 % (gnomAD). Sprememba c.57C>G (NM_001170535) se nahaja

57 nukleotidov pred start kodonom gena *ATAD3A* in lahko potencialno vpliva na učinkovitost promotorja ter tako na izražanje gena, vendar njena biološka funkcija ni znana. Sprememba c.229C>G (rs138594222) povzroči zamenjavo levčinskega ostanka na mestu 77 z valinskim (p.Leu77Val) in je v podatkovni bazi HGMD opisana kot patološka, saj povzroči delno izgubo funkcije proteina *ATAD3A* (43). Sprememba c.282+484_444+227del predstavlja 1,4 kb veliko delecijo, ki zajema eksone 3 in 4 gena *ATAD3A* (Slika 2). Sprememba je opisana v bazi ClinVar kot patogena delecija. Z analizo sekvenciranja genoma smo opredelili dve patološki spremembi, ki predstavljata verjeten vzrok za opažene klinične znake. Za natančnejšo opredelitev povezave opisanih sprememb z izraženimi kliničnimi znaki bolnika smo opravili tudi analizo družinske segregacije opisanih genetskih sprememb in potrdili, da se patološki spremembi nahajata na različnih alelih.



Slika 2: Slika spremembe c.229C>G (NM_001170535) in 1,4 kb delecije c.282+484_444+227del (NM_001170535) iz interaktivnega genomskega pregledovalnika IGV (angl. *Integrative Genomics Viewer*). Prikazan je izbrani odsek na humanem genomu, kjer se nahajata obe omenjeni genetski spremembi. Zgornje sivo področje prikazuje vertikalno pokritost, spodnje sive črte pa prikazujejo posamezne fragmente DNA. Rdeče črte predstavljajo fragmente DNA, kjer se nahaja delecija c.282+484_444+227del (NM_001170535). Rdeče-modra navpična črta na zgornjem sivem področju predstavlja nukleotidno spremembo c.229C>G (NM_001170535).

Figure 2: Figure of variant c.229C>G (NM_001170535) and 1.4 kb deletion c.282+484_444+227del (NM_001170535) from IGV (*Integrative Genomics Viewer*). A selected section of the human genome is shown, where both changes are located. The upper grey area shows vertical coverage, while the lower grey lines show individual DNA fragments. The red lines represent the fragments where the deletion c.282+484_444+227del (NM_001170535) is located. The red-blue vertical line in the upper grey area represents the nucleotide change c.229C>G (NM_001170535).

»

ZAKLJUČEK

Prihod NGS je v diagnostiki prirojenih boleznih omogočil premik od zamudnega ciljnega iskanja vzročnega gena do hitre analize celotnega genoma, zaradi česar se je uspešnost iskanja genetskega vzroka boleznih močno izboljšala. Poleg hitrejših in celovitejših analiz je NGS močno pospešil tudi pridobivanje informacij o človeškem genomu, zaradi česar poznamo čedalje več genetskih sprememb ter njihov vpliv na razvoj boleznih. Skupaj z razvojem sekvenciranja so se razvila tudi številna bioinformatična orodja, ki omogočajo obdelavo ogromne količine podatkov, ki jih pridobimo z NGS. Kljub uspešnosti sekvenciranja s tehnologijo Illumina pri določanju krajših sprememb, se ta slabše obnese pri daljših strukturnih spremembah. V teh primerih se kot rešitev kaže prihod tretje generacije sekvenciranja z dolgimi branji. V bližnji prihodnosti pa nas verjetno čaka še naslednji preboj, ki ga bo prinesla vpeljava umetne inteligence pri napovedovanju posledic genetskih sprememb na izražanje in delovanje proteinov, s čimer bo močno olajšana anotacija sprememb, ki je pogosto ozko grlo analiz.

LITERATURA

- Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 2017;243:16–24.
- Weimer ET, Montgomery M, Petraroia R, Crawford J, Schmitz JL. Performance characteristics and validation of next-generation sequencing for human leucocyte antigen typing. *J Mol Diagn.* 2016;18(5):668–75.
- Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M. The Illumina sequencing protocol and the NovaSeq 6000 system. *Methods Mol Biol.* 2021;2242:15–42.
- De Coster W, De Rijk P, De Roeck A, De Pooter T, D’Hert S, Strazisar M, et al. Structural variants identified by Oxford Nanopore PromethION sequencing of the human genome. *Genome Res.* 2019;29(7):1178–87.
- Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med.* 2015;17(6):444–51.
- Bean LJH, Funke B, Carlston CM, Gannon JL, Kantarci S, Krock BL, 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):453–61.
- Tetreault M, Bareke E, Nadaf J, Alirezaie N, Majewski J. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(6):749–60.
- Nisar H, Wajid B, Shahid S, Anwar F, Wajid I, Khattoon A, et al. Whole-genome sequencing as a first-tier diagnostic framework for rare genetic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2021;246(24):2610–7.
- Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques.* 2014;56(2):61–4.
- Samorodnitsky E, Jewell BM, Hagopian R, Miya J, Wing MR, Lyon E, et al. Evaluation of hybridization capture versus amplicon-based methods for whole-exome sequencing. *Hum Mutat.* 2015;36(9):903–14.
- Rehder C, Bean LJH, Bick D, Chao E, Chung W, Das S, et al. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2021;23(8):1399–415.
- Tu J, Ge Q, Wang S, Wang L, Sun B, Yang Q, et al. Pair-barcode high-throughput sequencing for large-scale multiplexed sample analysis. *BMC Genomics.* 2012;13:43.
- Sohn JI, Nam JW. The present and future of de novo whole-genome assembly. *Brief Bioinform.* 2018;19(1):23–40.
- Li H, Homer N. A survey of sequence alignment algorithms for next-generation sequencing. *Brief Bioinform.* 2010;11(5):473–83.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078–9.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011;27(15):2156–8.
- Mahamdallie S, Ruark E, Yost S, Münz M, Renwick A, Poyastro-Pearson E, et al. The quality sequencing minimum (QSM): providing comprehensive, consistent, transparent next generation sequencing data quality assurance. *Wellcome Open Res.* 2018;3:37.
- Wang Z, DiVincenzo C, Elzinga C, Bazinet M, Batish SD, Jaremko M, et al. Zygosity detection by next generation sequencing in a clinical laboratory (P1.329). *Neurology.* 2014;82(10 Supplement).
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24.
- Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, Alfares A, Kelly M, Pugh T, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clin Genet.* 2013;84(5):453–63.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308–11.
- Lappalainen I, Lopez J, Skipper L, Hefferon T, Spalding JD, Garner J, et al. dbVar and DGVA: public archives for genomic structural variation. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D936–41.
- Fairley S, Lowy-Gallego E, Perry E, Flicek P. The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D941–7.
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434–43.
- Stenson PD, Mort M, Ball E V, Chapman M, Evans K, Azevedo L, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet.* 2020;139(10):1197–207. >>

26. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D789–98.
27. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062–7.
28. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248–9.
29. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812–4.
30. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(5):1185–90.
31. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014;46(3):310–5.
32. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596(7873):583–9.
33. Eraslan G, Avsec Ž, Gagneur J, Theis FJ. Deep learning: new computational modelling techniques for genomics. *Nat Rev Genet.* 2019;20(7):389–403.
34. Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, Amendola LM, Brothers K, Chung WK, et al. ACMG SF v3.2 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2023;25(8):100866.
35. Mandelker D, Amr SS, Pugh T, Gowrisankar S, Shakhbatyan R, Duffy E, et al. Comprehensive diagnostic testing for stereocilin: An approach for analyzing medically important genes with high homology. *J Mol Diagn.* 2014;16(6):639–47.
36. Treangen TJ, Salzberg SL. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet.* 2011;13(1):36–46.
37. Torresen OK, Star B, Mier P, Andrade-Navarro MA, Bateman A, Jarnot P, et al. Tandem repeats lead to sequence assembly errors and impose multi-level challenges for genome and protein databases. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(21):10994–1006.
38. Shin S, Park J. Characterization of sequence-specific errors in various next-generation sequencing systems. *Mol Biosyst.* 2016;12(3):914–22.
39. Nord AS, Lee M, King MC, Walsh T. Accurate and exact CNV identification from targeted high-throughput sequence data. *BMC Genom.* 2011;12:184.
40. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: Features and perspectives. *BMC Bioinform.* 2013;14 Suppl 11(Suppl 11):S1.
41. Yang R, Nelson AC, Henzler C, Thyagarajan B, Silverstein KAT. ScanIndel: A hybrid framework for indel detection via gapped alignment, split reads and de novo assembly. *Genome Med.* 2015;7:127.
42. Li J, Dai H, Feng Y, Tang J, Chen S, Tian X, et al. A comprehensive strategy for accurate mutation detection of the highly homologous PMS2. *J Mol Diagn.* 2015;17(5):545–53.
43. Yap ZY, Park YH, Wortmann SB, Gunning AC, Ezer S, Lee S, et al. Functional interpretation of ATAD3A variants in neuro-mitochondrial phenotypes. *Genome Med.* 2021;13(1):55.

03 | Erratum

Erratum: Ocena merilne negotovosti nekaterih hematoloških parametrov analizatorja Sysmex XN-L 550

Erratum: Estimation of measurement uncertainty of some hematological parameters on Sysmex XN-L 550 analyzer

Sebastijan Božič, Milka Ogrin, Polona Likar, Minka Lužovec, Marija Prezelj
Zdravstveni dom Vrhnika

Avtor za korespondenco:

Dr. Marija Prezej, spec. med. biokem.

Zdravstveni dom Vrhnika, Cesta 6. maja 11, 1360 Vrhnika

e-pošta: doda.prezelj@gmail.com

V prispevku z naslovom *Ocena merilne negotovosti nekaterih hematoloških parametrov analizatorja Sysmex XN-L 550*, ki je bil objavljen v 4. številki Laboratorijske medicine, je prisotna napaka. Na strani 55, v Tabeli 2: *Merilna negotovost obnovljivosti znotraj laboratorija (uRw) za he-*

moglobin, eritrocite, levkocite in trombocite v primerjavi z zaželeno specifikacijo analitične učinkovitosti se je vrinila decimalna vejica pri povprečni vrednosti koncentracijskega nivoja 2 trombocitov. Pravilna vrednost je 237 ($10^9/L$) in ne 2,37 ($10^9/L$).

04

Navodila
avtorjem
prispevkov
za revijo
Laboratorijska
medicina

Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina

Laboratorijska medicina je strokovno-znanstvena revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), ki objavlja prispevke s širšega področja laboratorijske medicine (klinična biokemija, laboratorijska hematologija, kakovost in akreditacija medicinskih laboratorijev, laboratorijska medicinska genetika, pacientu prilagojena laboratorijska medicina, laboratorijska patologija s citologijo, laboratorijska mikrobiologija, laboratorijska transfuzijska medicina). Poslanstvo revije je seznanjanje slovenske strokovne javnosti z novostmi in smernicami s tega področja. V ta namen objavljamo izvirne znanstvene, pregledne znanstvene in strokovne članke ter aktual-

ne novosti, zanimivosti in poročila s področja laboratorijske medicine.

Laboratorijska medicina je revija z odprtim dostopom, vsi objavljeni prispevki so prosto in takoj po objavi dostopni na spletni strani SZKKLM za deljenje in uporabo ob ustreznem citiranju originalnih avtorjev in vira. Avtorji dovolijo reviji *Laboratorijska medicina*, da objavi članek in se predstavi kot njegov izvirni izdajatelj. Avtorji podeljujejo vsem tretjim osebam pravico do svobodne uporabe članka pod pogojem, da so navedeni njegovi izvirni avtorji in podatki o objavi.

1. SPLOŠNA NAVODILA AVTORJEM

- Uredništvo sprejema v obravnavo le dela, ki pred tem še niso bila objavljena in niso v procesu objave. Če avtor povzame del drugega dela (slike, tabele), ki je bilo že objavljeno, mora predložiti dovoljenje avtorja in založnika za reprodukcijo.
- Rokopisi morajo biti napisani v jezikovno in strokovno neoporečnem slovenskem ali angleškem jeziku. V članku so lahko uporabljene le SI enote.
- **Rokopis mora biti pripravljen v skladu z navodili avtorjem in poslan v elektronski obliki (wordov dokument) kot priloga po elektronski pošti na elektronski naslov laboratorijska.medicina@szkkkm.si.** Datoteka naj bo označena z imenom korespondenčnega avtorja in naslovom dela. Sprejem in objava prispevkov sta za avtorje brezplačna.
- Prispevki bodo recenzirani. Posamezen prispevek bosta pregledala in ocenila dva neodvisna recenzenta ter lektor za slovenski ali angleški jezik. Med uredniškim postopkom je zagotovljena tajnost vsebine prispevka.
- Vsa dela, ki obravnavajo raziskave, narejene na ljudeh, morajo imeti v besedilu navedeno, da je bila raziskava opravljena v skladu z načeli Helsinško-Tokijske deklaracije, da so se preiskovanci strinjali z vključitvijo v raziskavo in so podpisali obveščeni pisni pristanek za prostovoljno vključitev. Podrobnosti, ki bi lahko razkrile identiteto preiskovancev, morajo biti izpuščene. Navedena naj bo zaporedna številka, pod katero je Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje obravnavala vlogo raziskave.



2. VRSTE PRISPEVKOV IN NAVODILA ZA NJIHOVO PRIPRAVO

Uvodnik napiše urednik ali k pisanju povabi uglednega strokovnjaka. Je brez izvlečka, ključnih besed in označenih odstavkov.

Izvirni znanstveni članek je samo prva objava rezultatov izvirnih raziskav na področju laboratorijske medicine. Članek naj bo organiziran po naslednji shemi: povzetek, uvod, materiali in metode, rezultati, razprava, zaključek in literatura. Vsebuje naj do 3000 besed, največ 5 grafičnih elementov in do 30 referenc.

Pregledni znanstveni ali strokovni članek je pregled najnovejših del o določenem področju z namenom povzeti, analizirati, evalvirati ali sintetizirati informacije, ki so že bile objavljene. Prispevek naj vsebuje povzetek, uvod, osrednje besedilo, zaključek in literaturo. Vsebuje naj do 5000 besed, največ 7 grafičnih elementov in do 50 virov.

Kratki prispevek je pripravljen z namenom predstavitve zanimivega kliničnega primera/-ov, pomembnih poti laboratorijske obravnave ali osvetlitve aktualne teme s področja laboratorijske medicine. Pri kratkem prispevku so posamezni elementi sheme izvirnega članka lahko izpuščeni. Prispevek naj vsebuje povzetek, uvod, prikaz primera/-ov, razpravo, zaključek in literaturo. Vsebuje naj do 2000 besed, največ 3 grafične elemente in do 20 referenc.

Strokovni članek je predstavitev že znanega, s poudarkom na uporabnosti rezultatov izvirnih raziskav in širjenju znanja. Organizacija članka je prilagojena vsebini, ima povzetek, uvod, osrednje besedilo, zaključek in literaturo. Vsebuje naj do 3000 besed, največ 5 grafičnih elementov in do 30 referenc.

3. OBLIKA IN STRUKTURA PRISPEVKA

Prispevek naj bo pripravljen v formatu A4 z robovi 2,5 cm in razmakom vrstic 1,5. Velikost črk pisave *Times New Roman* naj bo 12 pt, besedilo naj ima obojestransko poravnavo.

Spremni dopis naj vsebuje:

- naslov prispevka v slovenskem in angleškem jeziku,
- telefonsko številko in elektronski naslov korespondenčnega avtorja,
- izjavo, da prispevek še ni bil objavljen ali poslan v objavo v drugo revijo,
- izjavo, da se z vsebino prispevka strinjajo vsi avtorji,
- lahko vsebuje predlog dveh neodvisnih recenzentov (ime in priimek, elektronski naslov).

Prva stran prispevka naj vsebuje:

- naslov prispevka v slovenskem in angleškem jeziku,
- celotna imena avtorjev in naslove ustanov, kjer so zaposleni.

Povzetek prispevka:

- v slovenskem in angleškem jeziku,
- naj ne presega 200 besed.

Ključne besede:

- v slovenskem in angleškem jeziku,
- največ šest.

Strukturirano besedilo:

- naslovi poglavij/podpoglavij naj bodo odebeljeni (*bold*),
- struktura naj bo skladna z vrsto prispevka.

Slike in preglednice:

- Morajo biti označene z zaporedno številko in opremljene s slovenskim in angleškim besedilom, ki naj vsebuje naslov slike oziroma preglednice in razlago vsebine. »

- Slike naj bodo originalne. Članku naj bodo priložene kot samostojna datoteka. Kakovost slike naj bo vsaj 300 dpi v formatu TIFF ali JPEG.
- Preglednice naj bodo pripravljene v programu Word. Priložene naj bodo na koncu besedila.
- V primeru ponatisa ali minimalne spremembe slik ali drugih elementov v prispevku mora avtor priložiti dovoljenje lastnika avtorskih pravic za objavo v *Laboratorijski medicini*.

4. LITERATURA

- V besedilu je treba vsako trditev podpreti z navedbo vira.
- Za navajanje virov naj bo uporabljen *Vancouver reference style*, podrobnejša navodila so v »Quick reference guide: Vancouver Citing & Referencing style« (<http://guides.lib.monash.edu/citing-referencing/vancouver>).
- Viri naj bodo označeni s številkami in v vrstnem redu, kot se pojavljajo v prispevku. V besedilu naj bodo navedeni v okroglem oklepaju. Kot primer prikazujemo navajanje članka (1), poglavja v knjigi (2) in spletne strani (3). Seznam vseh navedenih virov naj sledi na koncu besedila, označeni naj bodo z zaporednimi številkami, kot so navedeni v tekstu. Če je avtorjev dela več kot šest, navedite le prvih šest in nato dodajte *et al.*

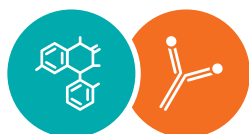
Primer navajanja znanstvenih člankov:

1. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24.
2. Lieberman M, Marks A, Peet A. Fate of Amino Acid Nitrogen: Urea Cycle. In: Lieberman M, editor. *Basic medical biochemistry*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 707–23.
3. Deafness Variation Database [Internet]. Available from: <http://deafnessvariationdatabase.org/>

Zmogljivost centralnih laboratorijev za vsako klinično okolje

Analizator Atellica CI 1900

siemens-healthineers.com/atellica-ci1900



Analizator Atellica® CI 1900 je nizko do srednje zmogljiv analizni sistem za biokemijske in imunokemijske analize. Izvede lahko do 1120 testov na uro* (do 600 fotometričnih, do 400 preiskav elektrolitov in do 120 imunokemijskih preiskav). Sistem odlikuje neodvisna integracija, saj si biokemijski in imunokemijski modul ne delita nobenih analiznih komponent.

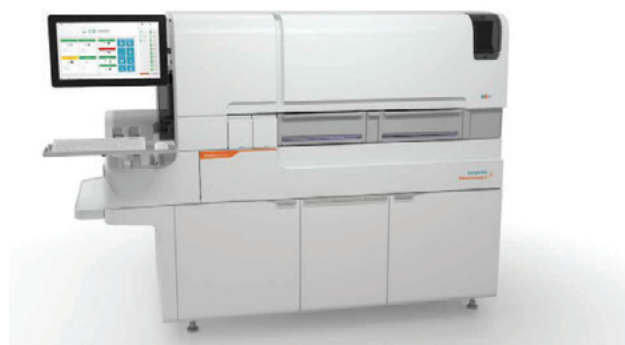
Modul za klinično kemijo je opremljen s tehnologijo mikrovolumnov. Testiranje se izvaja s fotometrijo, EMIT, PETINIA in turbidimetrično tehnologijo ter integrirano multisenzorsko tehnologijo (IMT) za testiranje elektrolitov.

Imunokemijski modul ima edinstveno zasnovo, optimizirane in robustne pralne protokole, ki omogočajo hiter čas obdelave, in visoko natančnost. Naši imunološki testi slonijo na principu kemiluminiscence in uporabljajo napredno tehnologijo akrinidijevih estrov.

Zmogljivosti si lahko prilagodite, kjer in ko je potrebno.

*Ovisno od nabora testov
Dostopnost produkta se lahko razlikuje med državami in je odvisna od regulatornih zahtev. Prosim kontaktirajte vašega lokalnega predstavnika za informacije o dobavljenosti.

Na zgolj 1,9 m² analizator Atellica CI 1900 uporablja enako tehnologijo, reagente, potrošni material in uporabniški vmesnik kot Atellica® Solution, kar omogoča standardiziranje zalog, delovnih procesov in kliničnih rezultatov skozi vašo celotno laboratorijsko mrežo.



SIEMENS
Healthineers



Boljše zdravje, svetlejša prihodnost

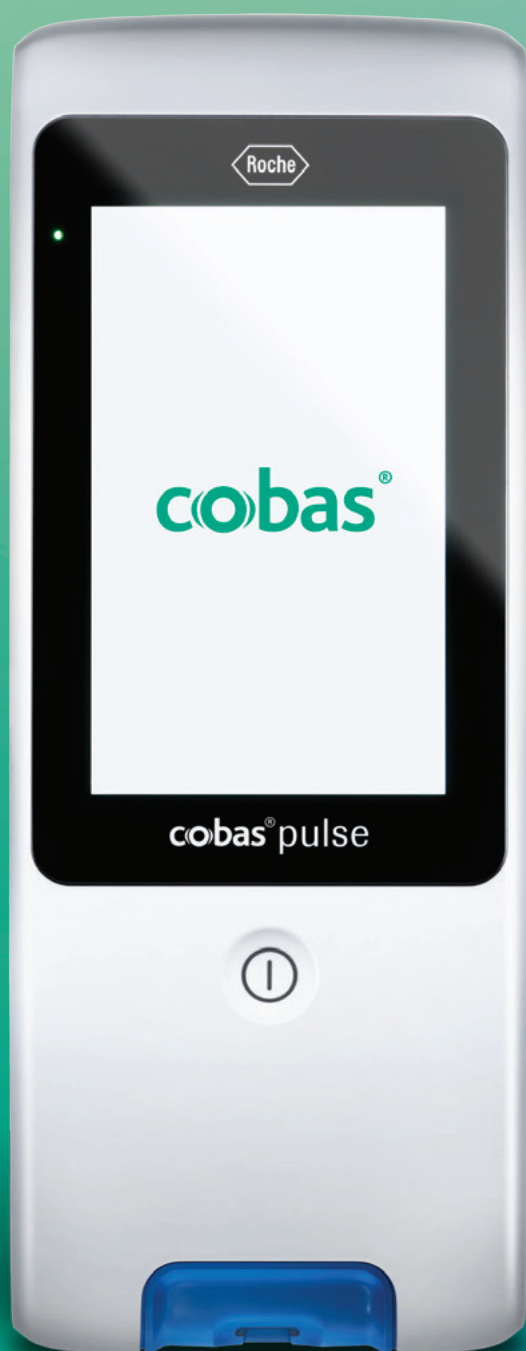
Takeda je globalno biofarmacevtsko podjetje, ki se osredotoča na raziskave in razvoj ter se zavzema za odkrivanje in zagotavljanje zdravil in cepiv, ki spreminjajo življenja in imajo trajen vpliv na družbo.

Od naše ustanovitve leta 1781 v Osaki na Japonskem vztrajamo pri naših vrednotah, tako da na prvo mesto postavljamo potrebe bolnikov, gradimo zaupanje v družbi, krepiamo svoj ugled in razvijamo poslovanje.

Takeda Pharmaceuticals d.o.o.

Bleiweisova cesta 30, 1000 Ljubljana, Slovenija
Tel.: + 386 (0) 59082480
E-pošta: info-si@takeda.com
www.takeda.com





Pridružite se nam na poti v

prihodnost zdravstvene oskrbe

cobas® pulse system

Naslednja generacija *Point of Care* diagnostike, ki zagotavlja celostno ter visokokakovostno oskrbo pacientov v današnjem hitro razvijajočem in kompleksnem okolju. cobas® pulse, profesionalni, povezljiv glukometer, hkrati služi tudi kot platforma raznovrstnih klinično uporabnih aplikacij. Zasnovan z mislijo na vašo varnost ter varnost bolnikov, prilagodljiv in enostaven za uporabo, nudi podporo, na katero se lahko zanesete – zdaj in v prihodnosti.

Izvedite več
diagnostics.roche.com/cobas-pulse



Samo za zdravstvene delavce. | MC-SH-00451



Laboratorijski informacijski sistem

VODILNI SISTEM SLOVENSКИH MEDICINSКИH LABORATORIJEV

- Čakalni sistem za laboratorije
- POCT način povezave analizatorjev
- Avtovalidacija
- Povezava dislociranih ambulant/analizatorjev z možnostjo avtomatskega potrjevanja rezultatov (NMP, MD, antikoag./diabetična amb.)
- Elektronski podpis ob potrjevanju na vodji in hramba naročil v e-arhivu
- Sprejem PDF izvidov iz zunanjih laboratorijev (izvajalcev)



Fin-Pro d.o.o.

Stegne 35
SI-1000 Ljubljana

T: +386 1 518 8080

F: +386 1 518 8090

info@labis.si

www.labis.si



ISO 9001
Q-715

Celovite laboratorijske rešitve po vaši meri



Hematologija



XN-550



XN-1000



XN-3100

Diagnostika urinov



UD-10 & UF-4000 & UC3500

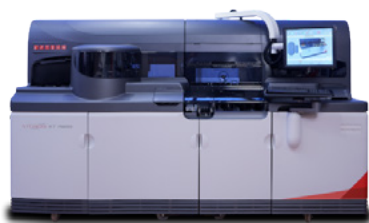
Ortho Clinical Diagnostics

Because Every Test Is A Life™

Biokemija, imunologija



Vitros XT-3400



Vitros XT-7600

TMC Techno Medica

Plinska analiza



Gastat 700



ESR – Westergren metoda



Starrsed ST



Starrsed RT



Imunologija

166 parametrov



Maglumi X3



Maglumi X8

CELLAVISION

RAL Diagnostics

Priprava krvnih razmazov



RAL Stainer



RAL Stainbox



CellaVision DI-60



CellaVision DM-1200



CellaVision DC-1

CELLAVISION

Digitalna morfologija

ABL800 FLEX GIVE YOUR BLOOD GAS TESTING A **PLUS**




THE **PLUS**
VERSION

PROVEN PERFORMANCE



IMPROVED USER INTERACTION

PULMODATA
Profesionalna medicinska oprema



- ▶ Revolutionary optical system combining bright-field and phase contrast microscopy
- ▶ Throughput: up to **150 tests/hour**
- ▶ Improved consumable traceability: RFID based cuvette and rack identification
- ▶ Fully automated sample preparation requiring only low sample volume
- ▶ The only consumable is the UriSed cuvette
- ▶ No need for liquid reagents or calibrators
- ▶ Live view mode: Real-time view of any viewfield of the cuvette to observe microorganisms in motion

LABUMAT 2

New PHASE with CONTRAST



- ▶ Throughput: up to **240 tests/hour**
- ▶ Evaluates up to 12 chemical and 3 physical parameters
- ▶ RFID based rack identification
- ▶ Cost-effective operation without any special liquid reagents
- ▶ Increased test strip capacity: up to 300 test strips
- ▶ Built-in PMC module (Physical Measurement Cell) for measuring physical parameters
- ▶ Streamlined documentation by LIS connectivity
- ▶ Automated QC analysis and self-check



Urine test strips for LabUMat 2	Chemical parameters												Calculated		Physical parameters		
	BIL	URO	KET	ASC	GLU	PRO	BLD	CREA	pH	NIT	mALB	LEU	ACR	PCR	SG	Color	TUR
LabStrip U11 GL Plus	■	■	■	■	■	■	■		■	■		■			■	■	■
LabStrip U12 mALB/CREA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

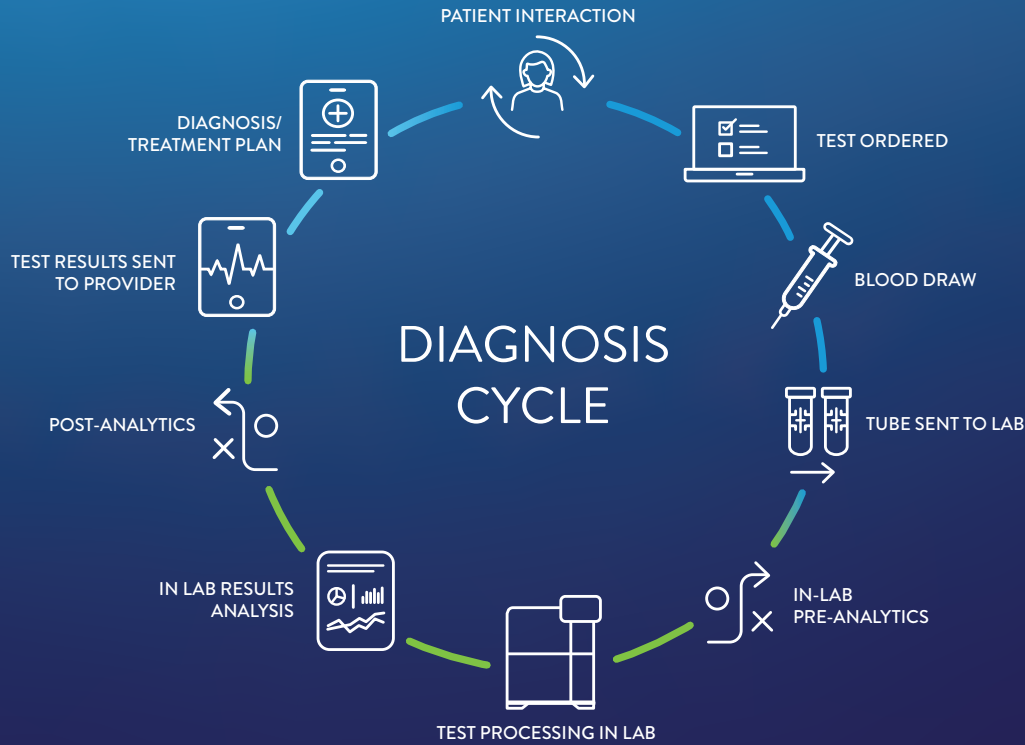
LABUMAT 2 & URISED 3 PRO

Chemistry and sediment analysis in one system



THE POWER OF DATA

Abbott provides visibility and optimizes every step of the diagnosis cycle



“If you can’t measure it, you can’t improve it.” — Peter Drucker

AlinIQ

ADD-XXXXXX-XXX-XX 10/21

AlinIQ

DIGITAL HEALTH SOLUTIONS

ISSN 2670-4463



9 772670 446006

www.szklm.si