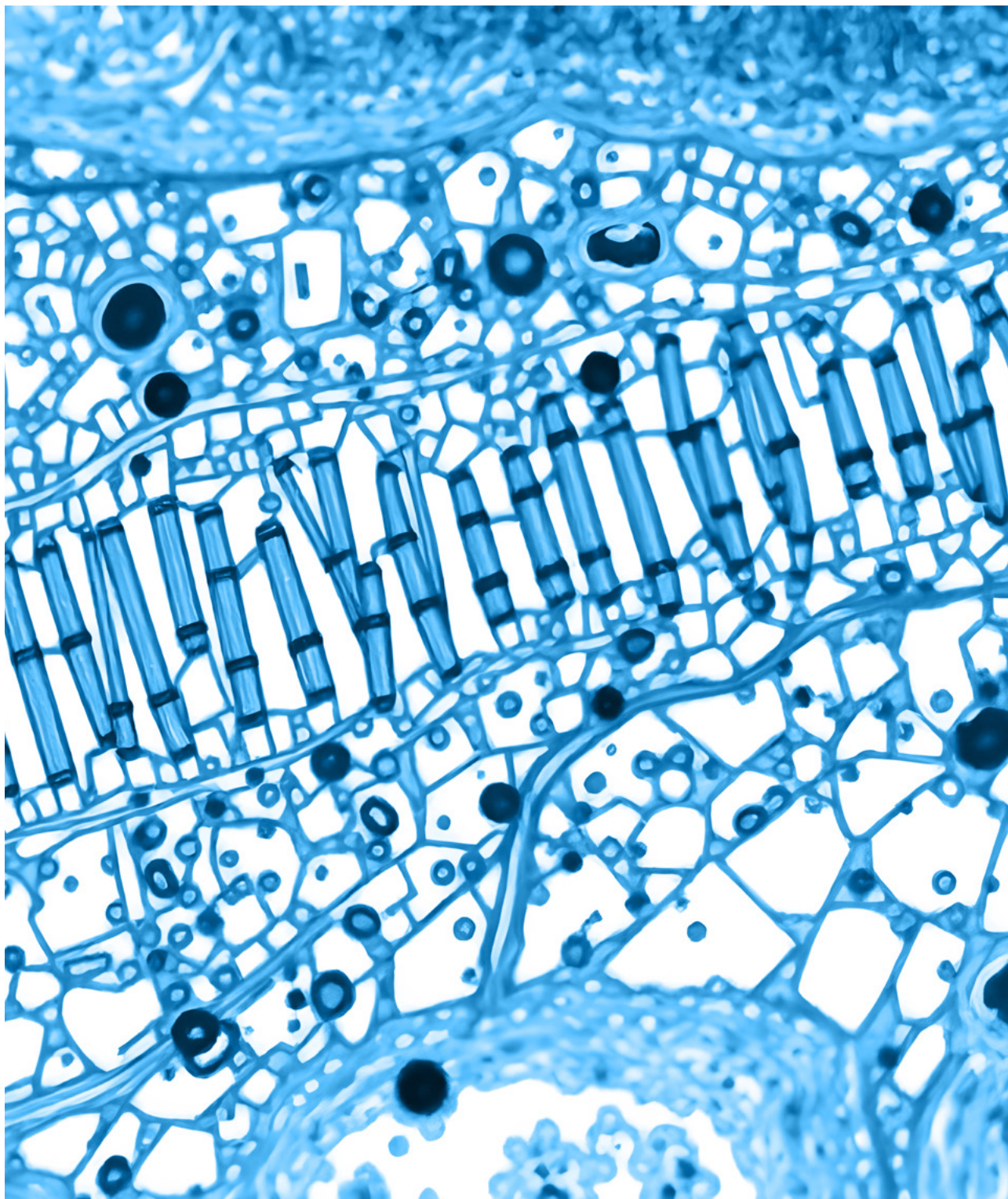




# LABORATORIJSKA MEDICINA

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

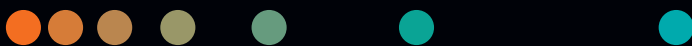
**06**  
SEP 2024



**SZK&I;LM**

# Analizator Atellica® CI

reševanje velikih izzivov-  
v kompaktnem 1.9 m<sup>2</sup>  
velikem ohišju.



## 1.9 m<sup>2</sup>



### Atellica CI analizator

Atellica CI analizator meri 1.9 m in je zasnovan za predvidljivejši in varnejši dan, z minimalnim potrebnim rokoanjem in izpostavljenostjo nevarnim snovem.



Skenirajte QR kodo, če želite izvedeti več o inovativnem analizatorju Atellica CI

Atellica je blagovna znamka Siemens Healthcare Diagnostics Inc. · CLS-23-2876-3C  
HOOD05162003368653 · 08-2023 · © Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2023

\*Dostopnost produkta se lahko razlikuje med državami in je odvisna od regulatornih zahtev.  
Prosim kontaktirajte vašega lokalnega predstavnika za informacije o dobavljivosti.

PAPP-A — Free  $\beta$ hCG  
PIGF — AFP

## First trimester trisomy and pre-eclampsia screening with assays on KRYPTOR

The best solution with reliable results for the benefit of the patient



### B·R·A·H·M·S KRYPTOR GOLD

Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ PAPP-A KRYPTOR™,  
Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ Free  $\beta$ hCG KRYPTOR™,  
Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ PIGF plus KRYPTOR™



### B·R·A·H·M·S KRYPTOR compact PLUS

and Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ AFP KRYPTOR™  
assays are used in combination with B·R·A·H·M·S™  
KRYPTOR™ analyzers

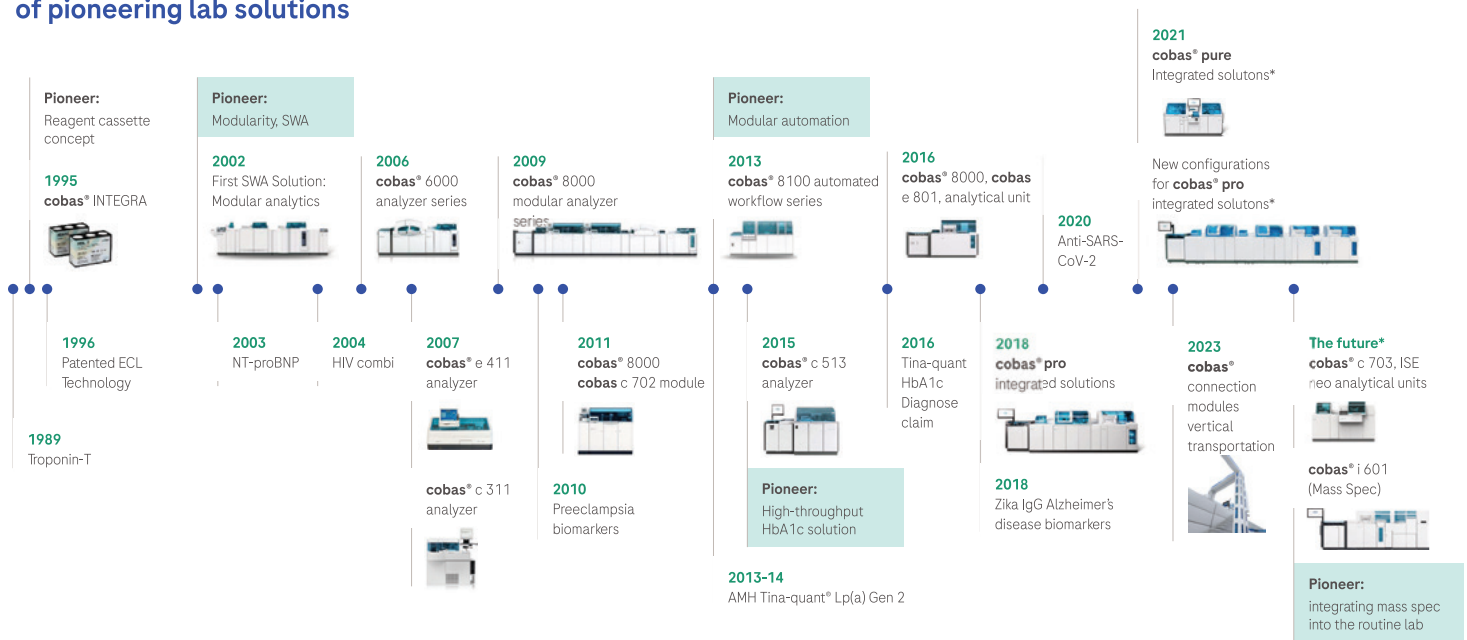
# Performing today, Transforming tomorrow

The pursuit of better patient solutions starts with and depends on diagnostics.

Roche Integrated solutions are designed to seamlessly fit your strategic goals and workflow process.

As a world leader in personalised medicine, we are uniquely placed to partner with you to develop a roadmap for the future of diagnostics and lab automation.

## Partner with a company that has a proven track record of pioneering lab solutions



# Odkrivajte svet laboratorijske medicine tudi na svojih elektronskih napravah.



Laboratorijska-medicina.si je spletna strokovna revija Slovenskega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, ki ponuja znanstvene in strokovne članke, vpogled v novosti, zanimivosti in poročila z različnih strokovnih področij laboratorijske medicine.

*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:**

Nina Krajnc

Skopos prevodi

**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](mailto:laboratorijska.medicina@szkklm.si)

**W:** [www.laboratorijska-medicina.si](http://www.laboratorijska-medicina.si)

# Uvodnik



Katarina Trebušak Podkrajšek  
Glavna in odgovorna urednica

## **Spoštovane kolegice in kolegi, spoštovane bralke in bralci!**

Šesta številka *Laboratorijske medicine*, podobno kot peta, v rubriki *Laboratorijska medicina skozi oči* poudarja pomen izobraževanja. Tokrat izobraževanja zdravnikov. Številni klinični laboratoriji po Sloveniji so bolj ali manj vpeti v izobraževanje zdravnikov, naj bo to študentov medicine ali specializantov. To je izjemno pomembno področje, ker postavlja temelje ne samo za poznavanje področja laboratorijske diagnostike med bodočimi nosilci zdravstvene dejavnosti, ampak tudi temelje za odnos, ki ga gradijo laboratorijski delavci z zdravniki. Še posebej zadnje se je izkazalo kot pomembna dodana vrednost pri ustrezni klinični obravnavi bolnikov. Rubrika *Laboratorijska medicina skozi oči* letos ločeno predstavlja pogled dekana in pogled študenta Medicinske fakultete v Ljubljani na področje izobraževanja študentov medicine s področja laboratorijske medicine. Kaže na to, da se študenti medicine sicer zavedajo pomena tega področja, ampak pogosto v napornem študiju ne najdejo časa, da bi se mu primerno posvetili. Jasno je tudi, da med učitelji in vodstvom Medicinske fakultete v Ljubljani obstaja želja po večjem poudarku tega področja tekom študija, kar se kaže tudi v uvedbi novega predmeta pri prenovi študija medicine. Vendar se je treba zavedati,

da so to samo osnove, s pomočjo katerih moramo laboratorijski delavci poskrbeti za nadaljnje širjenje znanja in utrditev zavedanja o pomenu tega področja med zdravniki. Kljub natrpanemu urniku se moramo posvetiti tudi študentom medicine. Omogočimo jim ne samo osnovno predpisano izobraževanje, ampak tudi možnost bolj podrobne seznanitve s področjem preko študentskega, projektne in raziskovalnega dela. Študenti to izredno cenijo, za področje laboratorijske medicine pa je to naložba v prihodnost. Če bomo približali področje zdravnikom, bo tudi obravnavo bolnikov kakovostnejša, kar je naš primarni namen. Dodatno bi to lahko pomembno vplivalo tudi na razvoj in raziskave na našem področju. Te namreč že dolgo niso osredotočene samo na ozko področje laboratorijske medicine, ampak so vse bolj multidisciplinarne.

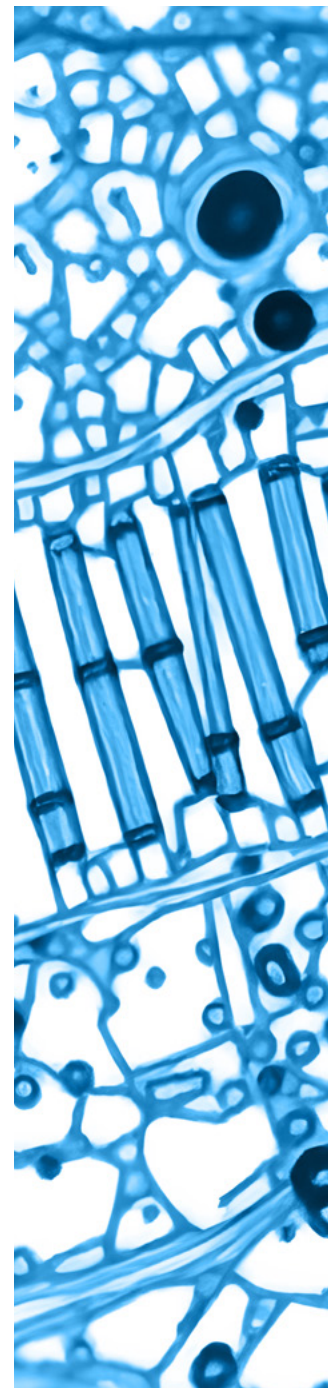
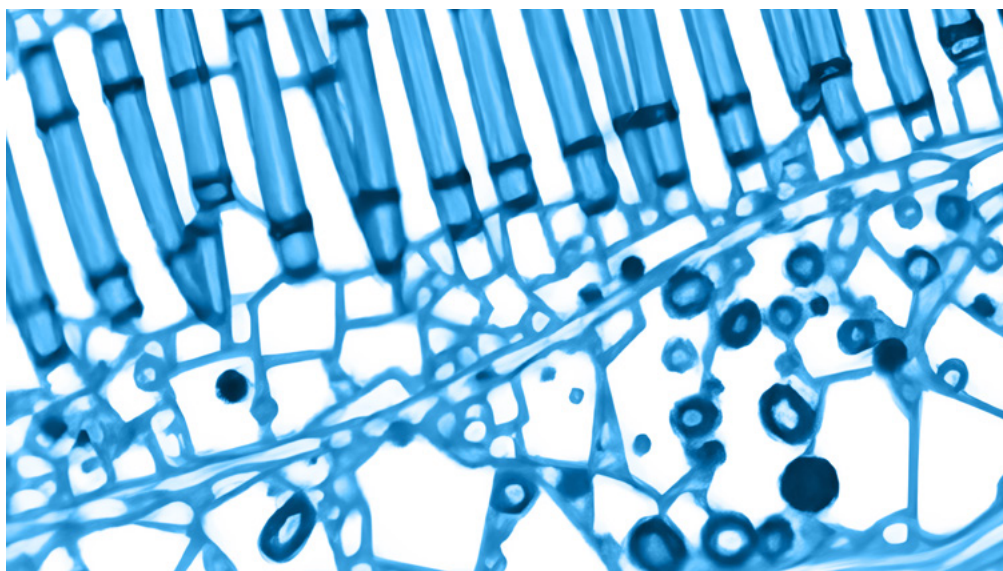
V tej številki vam ponujamo tudi prispevke, ki nakazujejo pomen sodobnih genetskih tehnologij v rutinski diagnostiki. Genetska diagnostika je pomemben del laboratorijske medicine in osnova bolniku prilagojene medicine. V rutinskih kliničnih laboratorijih se nikakor ne smemo ograževati od tega področja, ampak ga moramo sprejeti kot področje laboratorijske medicine, ki veliko obeta. Številni laboratoriji že intenzivno povezujejo diagnostiko na biokemičnem nivoju z diagnostiko na genetskem nivoju. Primer je najnovejša širitev presejalnega testiranja novorojenčkov, kjer je na primer pri presejanju za spinalno mišično atrofijo in težke prirojene okvare imunosti prav genetska analiza metoda prvega nivoja testiranja. Tako genetsko testiranje ni več namenjeno le posameznim bolnikom z redkimi boleznimi, ampak postaja vse bolj široko uporabno.

Pred kratkim je zaživel tudi portal <https://www.laboratorijska-medicina.si/si>, in sicer v slovenskem in angleškem jeziku. Ponuja aktualne in pretekle prispevke, objavljene v *Laboratorijski medicini*. Prijazno vabljeni, da ga obiščete! Prav tako, prosim, ne pozabite – vabilo k sodelovanju pri ustvarjanju revije še vedno velja. Želim vam prijetno branje šeste številke *Laboratorijske medicine*!

Katarina Trebušak Podkrajšek  
Glavna in odgovorna urednica *Laboratorijske medicine*

# Kazalo

<b>01</b>	<b>Laboratorijska medicina skozi oči ...</b>	<b>10</b>
	Igor Švab Laboratorijska medicina skozi oči dekana Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani	11
	Erazem Bahčič Laboratorijska medicina skozi oči študenta Medicinske fakultete	13
<b>02</b>	<b>Pregledni strokovni in znanstveni prispevki</b>	<b>16</b>
	Andrej Čör Histološka analiza obpreznega tkiva pri okužbi ortopedskega vsadka	17
	Katarina Klinar, Helena Podgornik Biološki označevalci akutne oblike bolezni presadka proti gostitelju	22
	Barbara Slapnik, Jernej Kovač Tehnologije sekvenciranja pri diagnostiki mitohondrijskih bolezni	32
	Nika Breznik, Klementina Črepinšek, Maruša Debeljak Sekvenciranje RNA in primer uporabe v diagnostiki	41
	Barbara Ježek, Kristina Drole, Aleš Jerin Metode za določanje različnih oblik testosterona v medicinskih laboratorijih	51
	Neža Gregorčič, Shruti Jain, Kamlesh Gidwani Aberrant glycosylation as a biomarker in oncology	61





## SZKILM

---

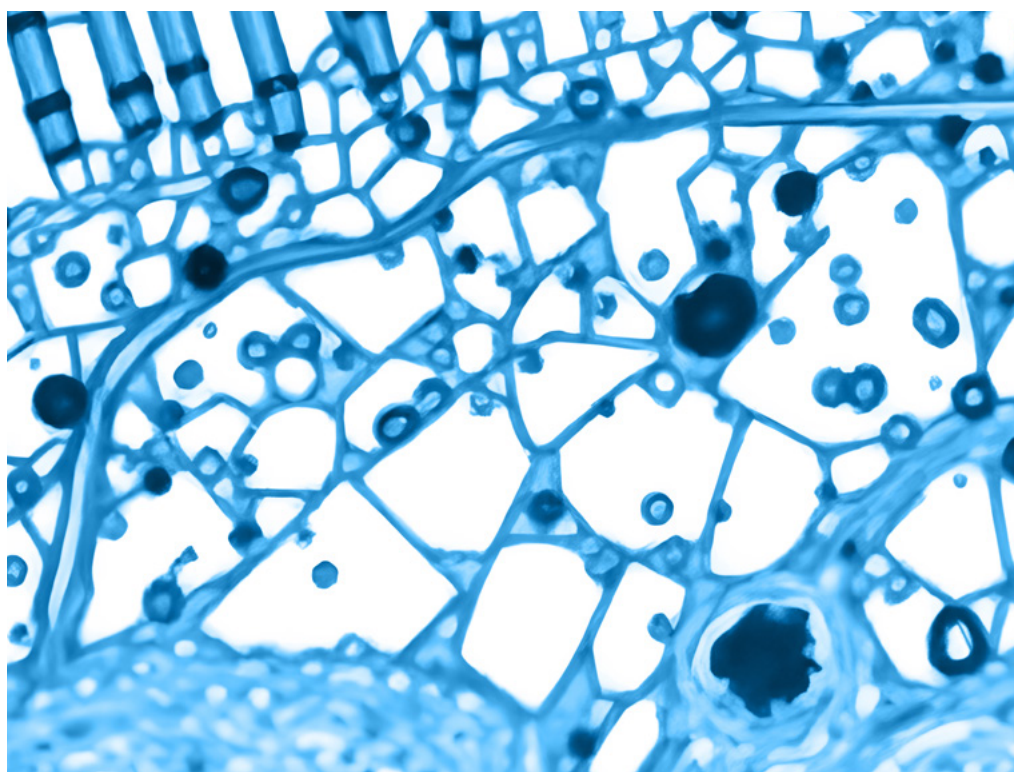
**03 Kratki prispevki s strokovnih srečanj** ..... **76**

Vesna Levašič  
 Pregled ortopedskih vsadkov s podatki Registra arthroplastike Valdoltra - Povezava s podatki o kostnih okužbah ..... 77

---

**04 Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina** ..... **84**

Navodila avtorjem prispevkov za revijo Laboratorijska medicina ..... 85

**Izdajo revije so podprli:**

Thermo Fisher Scientific, Siemens Healthcare, Takeda Pharmaceuticals, Sanolabor, Pulmodata, Roche farmacevtska družba, Axon Lab, Abbott Laboratories



**01**

Laboratorijska  
medicina skozi  
oči ...

# Laboratorijska medicina skozi oči dekana Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

**Prof. dr. Igor Švab, dr. med.**

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

## UVOD

Z razvojem medicinske stroke se povečuje število preiskav, potrebnih za strokovno odločitev. Pri teh odločitvah ima laboratorijska medicina vse pomembnejšo vlogo. V moderni medicini si ne moremo več zamisliti diagnostičnega odločanja in spremljanja uspešnosti zdravljenja brez podpore laboratorijske medicine.

S strani medicinske stroke gre pri laboratorijski medicini za specifična strokovna področja, na katerih delujejo specialisti različnih strok: patologije, mikrobiologije, sodne medicine, laboratorijske medicinske genetike, transfuzijske medicine in medicinske biokemije, sodelujejo pa tudi druge stroke.

To področje se hitro razvija, tako kot se razvija medicinska znanost, kjer smo priča izjemno hitremu razvoju, ki ga prinašajo moderna tehnologija in z njo povezana znanstvena spoznanja.

## VLOGA MEDICINSKE FAKULTETE UNIVERZE V LJUBLJANI

S tega vidika je pomembno, da se laboratorijska medicina ustrezno umesti v akademsko okolje in najde mesto tudi na Medicinski fakulteti tako pri pouku kot pri raziskavah na tem področju. Vlogo Medicinske fakultete vidim predvsem v tem, da tem področju omogočimo nadaljnji strokovni razvoj in prenos znanja na generacije bodočih zdravnikov.

Tradicija laboratorijske medicine je na naši fakulteti zelo dolga. Vloga mikrobiologije, patologije, sodne medicine, biokemije in laboratorijske medicinske genetike je že dolgo trdno zasidrana znotraj naše ustanove. Inštituti, na katerih se ta stroka razvija, predstavljajo pomemben del naše fakultete, ne samo z znanstvenega in pedagoškega, ampak tudi s strokovnega vidika. Naša fakulteta ima namreč pomembno vlogo pri zagotavljanju zdravstvenih storitev na tem področju, zato je vloga laboratorijske medicine pri nas še toliko bolj pomembna.

Morda v strokovni in laični javnosti obstaja premalo zavedanja, da ob osnovnem poslanstvu poučevanja in raziskovanja obstaja še laboratorijski del, ki je zelo močno vezan na vsakodnevno delovanje zdravstvenega sistema in za organizacijske enote pomeni sedemdnevno prisotnost vse dni v letu. Ob tem fakulteta v sodelovanju s civilno zaščito zagotavlja celo 24-urno pripravljenost za ukrepanje ob množičnih nesrečah in ogrožanju z biološkimi agensi.

Ker smo se zavedali pomena teh strok za prihodnje generacije zdravnikov, smo jih tudi ustrezno umestili v prenovljeni kurikulum. V njem smo uvedli nov predmet, ki smo ga poimenovali Klinična biokemija in laboratorijska diagnostika. Ta je umeščen v tretji letnik študija in prinaša 3 ECTS kredite. Predmet je obvezen, izvaja pa se pod vodstvom Inštituta za biokemijo in medicinsko genetiko. Prve izkušnje z novim predmetom so dobre.

## POGLED V PRIHODNOST

Za vodstvo fakultete je pomembno, da še naprej zagotovi pogoje za delovanje vseh inštitutov, ki se ukvarjajo z laboratorijsko medicino in da se jim omogoči razvoj na tem področju. »

To pomeni, da je temu področju treba zagotoviti ustrezno mesto v razvojnih načrtih fakultete. Sem sodi tudi vlaganje v prostorske kapacitete, ki smo jih zasnovali s projektom izgradnje na treh lokacijah. Ta projekt naj bi omogočil nadaljnji razvoj in zagotovil, da oprema in prostor ne bosta omejitvena dejavnika. Ključno je, da zagotavljamo razvoj vseh treh stebrov vsakega strokovnega področja – pedagoškega, raziskovalnega in strokovnega (diagnostičnega), saj se vsi trije med seboj dopolnjujejo. Le na ta način lahko zagotovimo diagnostiko na najvišji ravni tudi na najzahtevnejših področjih posamezne stroke ter poskrbimo za strokovno podkovan pedagoški kader za izvajanje pouka.

Ob tem pa je pomembneje od zagotovitve finančnih in prostorskih pogojev to, da na tem področju sodelujejo ustrezno izobraženi in motivirani strokovnjaki, ki med seboj sodelujejo. Ker prihaja do nekaterih prekrivanj med različnimi vejami laboratorijske medicine, je tako sodelovanje za kakovostno diagnostiko še toliko bolj pomembno. Samo v medpoklicnem sodelovanju in podpori na fakulteti vidim prihodnost na tem področju.

## ZAHVALA

Pri oblikovanju tega besedila sta mi s pripombami pomagala prof. dr. Miroslav Petrovec in prof. dr. Jože Pižem, za kar se jima iskreno zahvaljujem.

### Igor Švab

*Igor Švab je redni profesor družinske medicine. Rojen je v Ljubljani, kjer je diplomiral na Medicinski fakulteti leta 1981 in doktoriral leta 1991. Najprej je bil zaposlen v Zdravstvenem domu Ribnica, kasneje pa na sedanjem Nacionalnem inštitutu za javno zdravje in na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani. Bil je prvi predstojnik Katedre za družinsko medicino na tej fakulteti.*

*Je vodja znanstvenih domačih in mednarodnih projektov s področja družinske medicine, zlasti na področju poučevanja te stroke. Bil je mentor 19 uspešnim doktorskim študentom. V Medline-u je objavil več kot 120 znanstvenih in strokovnih prispevkov.*

*Je glavni in odgovorni urednik revije Zdravstveno varstvo, urednik European Journal of General Practice in urednik mednarodno uveljavljenega učbenika družinske medicine.*

*V obdobju 2004–2010 je bil predsednik Evropskega združenja zdravnikov družinske medicine Wonca Europe. Je član evropske akademije znanosti in umetnosti EASA, ustanovni član slovenske medicinske akademije in izredni član hrvaške medicinske akademije. Je častni član Royal College of general practitioners iz Velike Britanije in več drugih združenj družinske medicine. Je dobitnik priznanja Wonca fellow za prispevek razvoju družinske medicine v svetu, dobitnik Lavričevega priznanja, Hipokratovega priznanja ter dobitnik univerzitetnega priznanja Pro universitate Labacensi.*

*Od leta 2017 je dekan Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.*

# Laboratorijska medicina skozi oči študenta Medicinske fakultete

**Erazem Bahčič**

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

»Zakaj nam je pa tega treba« je stavek, ki ga med dolgim, 6-letnim študijem medicine zagotovo izreče vsak študent medicine, tudi na Medicinski fakulteti v Ljubljani (MF UL).

Pogosto se je to zgodilo, ko smo se učili izpitne vsebine manjših predmetov, ki vsaj na videz niso bile neposredno povezane s klinično medicino ali delom z bolniki. Spominjam se, da je do podobnih komentarjev prišlo tudi v drugem semestru 3. letnika, ko smo se prvič srečali z laboratorijsko medicino. Do takrat smo namreč poznali le nekaj osnov laboratorijskega dela, ki smo jih osvojili v sklopu predmetov Temelji biokemije in Medicinska biokemija in molekularna genetika.

Naj poudarim, da so bile to zelo kakovostne osnove, za kar gre zahvala predvsem predanim asistentom na Inštitutu za biokemijo in medicinsko genetiko.

Naša generacija je bila del starega programa študija medicine, kjer so bile vsebine laboratorijske medicine vključene v predmet Preiskovalne metode s tremi moduli; modul Slikovna diagnostika je izvajala Katedra za radiologijo, modula Klinična biokemija ter Molekularno-genetska diagnostika pa Inštitut za biokemijo in medicinsko genetiko. Osebno mi je bila biokemija vedno pri srcu in posledično tudi velik del laboratorijske medicine. Vsekakor pa razumem pomisleke svojih kolegov, ki so se ob vseh ostalih študijskih obveznostih s težavo lotili učenja tega predmeta in vseskozi poudarjali, da ob učenju patologije in patofiziologije, ki sta objektivno najobsežnejša in najzahtevnejša predmeta 3. letnika, zares nimajo časa še za to. Prav slednje mi je takrat dalo misliti, da težava ne tiči toliko v nezanimanju študentov za laboratorijsko medicino ali v neustreznosti vsebin, temveč predvsem v neposrečeni in slabi umeščenosti laboratorijske medicine v predmetnik 3. letnika študija medicine. Predvsem poletni semester 3. letnika je za študente medicine izredno naporen, saj se letnik poleg številnih manjših izpitov zaključuje z izpitoma dveh ce-

loletnih predmetov, patologije in patofiziologije, ki zahtevata ogromno vložene časa in truda.

V zadnjem času poteka na MF UL obsežna prenova študijskega programa, ki je osvežila tudi predmetnik 3. letnika. Mlajši kolegi tako obiskujejo nov samostojen predmet Klinična biokemija in laboratorijska diagnostika, ki poskuša študentom medicine približati laboratorijsko medicino. Poteka v zimskem semestru, kar vsaj deloma razbremeni študijsko »norijo« v poletnem semestru. Sam tega predmeta ne poznam podrobno, saj ga nisem obiskoval. Kot študent starega programa bi si želel, da bi se nosilci predmeta potrudili izpostaviti tiste najpomembnejše dele omenjenega področja, s poudarkom na uporabnosti za študenta medicine, ki se že v sklopu pripravištva prvič sooči s samostojnim kliničnim delom. Čeprav je razumevanje mehanizmov in postopkov določenih laboratorijskih preiskav pogosto koristno, lahko to pomeni nepotreben balast in obremenitev za študenta ter hkrati zasenči pomembne dele snovi, ki so klinično bolj aplikativni. Na primer, dobro je, da študenti razumejo osnovni metodološki princip plinske analize arterijske krvi. Enako ali še pomembnejše pa se mi zdi, da poznajo postopek pravilnega odvzema vzorca arterijske krvi, kako se meritev na analizatorju izvede in da razumejo pomen rezultatov v kontekstu kliničnega stanja specifičnega bolnika. V praksi je klinično delo na številnih klinikah povezano s tesnim sodelovanjem med zdravnikom in ostalimi strokovnjaki v timu, tudi laboratorijskimi delavci. Mislim, da bi večina študentov medicine pozdravila več praktičnega pristopa in stika z delavci iz laboratorijev, bodisi med vajami bodisi v sklopu obvezne klinične prakse. Takšne izkušnje se mladim študentom medicine običajno bolj vtisnejo v spomin kot poslušanje seminarjev ali predavanj z obilo teoretičnih osnov. Predvsem pa so tovrstne izkušnje izrednega pomena za mlade zdravnike, od katerih se v času pripravištva pričakujeta že velika mera samostojnosti in obvladanje veččin, ki tekom študija včasih niso primerno usvojene. >>

Zakaj nam je torej tega treba? Zakaj je smiselno, da ima študent medicine nekaj znanja tudi o laboratorijski medicini? Svojim kolegom bi odgovoril, da zato, da se bodo lažje znašli v kliničnem okolju. Zato, ker bo marsikateri predklinični ali klinični predmet bolj razumljiv in jasen ob poznavanju temeljnih načel laboratorijske medicine. Zato, ker bodo laboratorijski delavci pomembni sodelavci pri kliničnem delu, na katere se bomo lahko obrnili v primeru težav. Prav tako se veliko študentov med študijem vključi v raziskovalno delo in napiše raziskovalno nalogo, ki lahko vključuje manj ali več laboratorijskega dela. Predhodne izkušnje s tega področja, pravila laboratorijskega dela ter teoretične in praktične osnove, pridobljene v sklopu obveznega predmeta, so lahko v veliko pomoč pri uspešni izdelavi raziskovalne naloge. Veliko je torej razlogov, zakaj študentu medicine koristi znanje laboratorijske medicine. Velik izziv za profesorje in strokovnjake s tega področja pa je, kako te teme približati študentu medicine, ki jih morda dojema kot manj pomemben del študijskih obveznosti. Vsi poznamo občutek, ko je treba naštudirati »eno tono« snovi in se obveznosti le nalagajo ena na drugo. Ravno zato apeliram na mlajše kolege, da profesorjem in nosilcem predmeta redno podajajo povratne informacije in možnosti za izboljšavo, predlagajo vsebine, o katerih želijo slišati več, in opozorijo, če se jim zdi katera od tem preveč obširno zastavljena.

Morda se ravno v bolj praktično načrtanem pouku skriva eden izmed ključev do uspeha. Obisk in predstavitev določenih laboratorijev, ki delujejo v sklopu inštitutov na Medicinski fakulteti ali na Univerzitetnem kliničnem

centru, je le ena izmed možnosti, za katero sem prepričan, da bi naletela na pozitiven odziv študentov. Laboratorijska medicina študente medicine in kasneje zdravnike spremlja na skoraj vsakem koraku, naj bo to ob obravnavi akutnega miokardnega infarkta ali pa določanju bioloških označevalcev neke redkejšje bolezni. Zato bi jo bilo napačno dojemati kot črno skrinjico, v katero vstavimo vzorec in dobimo ven rezultat. Pouk laboratorijske medicine na UL MF se zagotovo razvija v pravo smer, za dokončni uspeh pa bosta potrebna vzajemno sodelovanje in trud tako s strani študentov kot tudi profesorjev in asistentov, ki pouk organizirajo.

#### **Erazem Bahčič**

*je študent 6. letnika medicine na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani. Je aktiven član Društva študentov medicine Slovenije (DŠMS), v študijskem letu 2020/21 je deloval kot vodja projekta Misli na srce, med 2020 in 2023 pa je opravljal delo lokalnega koordinatorja (LEO-in) International Federation of Medical Students Associations (IFMSA) mednarodnih izmenjav v Ljubljani. Svoje znanje je izpopolnjeval na večih izmenjavah; v Libanonu, Bolgariji in na Poljskem. Piše Prešernovo raziskovalno nalogo na temo biokemičnih označevalcev pri Fabryjevi nefropatiji in se vključuje v raziskovalno dejavnost na UKCL. Je prejemnik priznanja Dušana Stucina za najboljši študijski uspeh pri predmetih s področja biokemije na UL MF in Diplome prof. Janeza Plečnika ter je v študijskem letu 2023/2024 štipendist Univerzitetne ustanove ing. Milana Lenarčiča.*





**02**

Pregledni  
strokovni in  
znanstveni  
prispevki

# Histološka analiza obproteznega tkiva pri okužbi ortopedskega vsadka

## *Histological analysis of periprosthetic tissue in prosthetic joint infection*

**Andrej Cör**

Ortopedska bolnišnica Valdoltra

Avtor za korespondenco:

**Prof. dr. Andrej Cör, dr. med.**

Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Jadranska 31, 6280 Ankaran

e-pošta: andrej.coer@ob-valdoltra.si

### POVZETEK

Pri diagnostiki okužb sklepnih protez (OSP) ima histološka analiza pomembno vlogo. Prisotnost nevtrofilnih granulocitov v obproteznem tkivu je povezana z diagnozo OSP. Histološki kriterij, ki se uporablja v številnih centrih, je ugotavljanje več kot pet nevtrofilnih granulocitov v petih mikroskopskih vidnih poljih 400-kratne povečave. Uporabnost histološke diagnostike okužb sklepnih protez je z vidika specifičnosti, senzitivnosti ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti odvisna od histološke tehnike in analiziranega vzorca, od praznih vrednosti, ki si jih postavimo, in seveda od pacienta. Zavedati se moramo tudi pomanjkljivosti histološke analize; zlasti okužbe z nizko virulentnimi bakterijami lahko dajejo lažno negativen rezultat, medtem ko je rezultat pri pacientih s periprotetičnim zlomom ali revmatoidnim artritisom lahko lažno pozitiven. Ključna je dobra komunikacija med patologom in ortopedom, ki bistveno zmanjša pomanjkljivosti histološke diagnostike OSP.

**Ključne besede:** okužba sklepnih protez, histologija, nevtrofilni granulocit

### ABSTRACT

Histological analysis plays an important role in the diagnosis of prosthetic joint infections (PJI). The presence of neutrophilic granulocytes in the periprosthetic tissue is highly correlated with the diagnosis of PJI. The histological criteria used in many centres is the detection of more than 5 neutrophil granulocytes in five microscopic fields of 400x magnification. The usefulness of the histological diagnosis of PJI, in terms of specificity, sensitivity and positive and negative predictive value, depends on the histological technique, type of sample, on the threshold values and, on the patient himself. However, we must also be aware of the shortcomings of histological analysis, especially infections with low-virulence bacteria, in which the result can be false negative, and, on the other hand, periprosthetic fracture or rheumatoid arthritis, in which the result of histological analysis can be false positive. The key is good communication between the pathologist and the orthopaedic surgeon, which significantly reduces the shortcomings of the histological diagnosis of PJI.

**Key words:** prosthetic joint infection, histology, neutrophil granulocyte

»

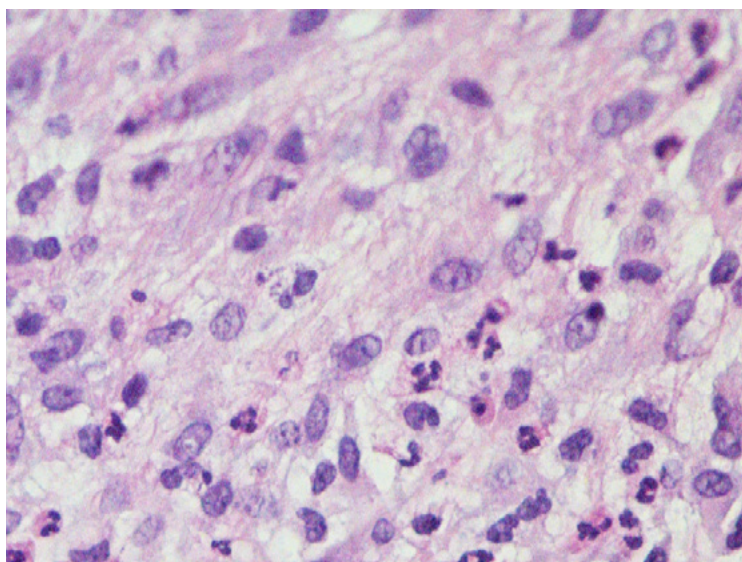
## UVOD

Okužba sklepnih protez (OSP) je sicer redek, a zelo resen zaplet in velik problem moderne artroplastike. OSP predstavlja veliko zdravstveno tveganje za pacienta, obenem pa veliko obremenitev za zdravstveno blagajno. Incidenca okužb kolenskih protez je med 0,8 % in 1,9 %, pri kolčnih protezah pa med 0,3 % in 1,7 % (1) but diagnosis in these patients can be challenging because active inflammatory arthritis produces elevated inflammatory markers that may mimic those seen in PJI. Purpose: In this pilot study, we sought to identify the clinical, microbiologic, and histopathologic features of culture-positive and culture-negative PJI in patients with inflammatory arthritis who underwent total hip arthroplasty (THA, vendar so razlike med centri velike. Mnogi menijo, da je ta incidenca podcenjena in da je OSP-jev bistveno več (2). Kljub številnim ukrepom, da bi zmanjšali pojavnost OSP-jev, kot so izboljšana kirurška tehnika in izboljšave sklepnih protez, mednarodni registri ne poročajo o bistveno zmanjšani pojavnosti OSP-jev. Še več, zaradi povečanega števila vstavljenih sklepnih protez se bo v prihodnjih letih močno povečalo tudi število OSP-jev.

Diagnostika okužb sklepnih protez je še vedno izziv, saj nimamo univerzalnih enotnih kriterijev za postavitev diagnoze, zanesljiva diagnoza pa je ključna za ustrezno zdravljenje. Za postavitev diagnoze OSP-jev je potrebno upoštevati različne diagnostične metode, in sicer od kliničnih, mikrobio-

loških in radioloških do histoloških (3). Različna akademska združenja so predlagala kriterije za definicijo OSP-jev. Pri vseh teh kriterijih igra histološka diagnostika pomembno vlogo. Če je bila histološka diagnostika v kriterijih MSIS-a (*Musculoskeletal Infection Society*) uvrščena med pomožne kriterije (4), igra po kriterijih EBJIS-a (*European Bone and Joint Infection Society*) pomembnejšo vlogo pri diagnostiki OSP-jev (5). Kljub temu se histološka analiza obproteznih tkiv ne izvaja sistematično v vseh bolnišnicah, kjer se vršijo revizijske operacije sklepnih protez.

Ključna v histološki diagnostiki OSP-jev je prisotnost akutnega vnetoceličnega infiltrata z nevtrofilnimi granulociti v obproteznem tkivu, zato osnovo histološke analize predstavlja štetje nevtrofilnih granulocitov. Število nevtrofilnih granulocitov v vidnem polju 400-kratne povečave (HPF) korelira z okužbo, vendar je veliko nasprotujočih si mnenj, kako obsežen mora biti infiltrat z nevtrofilnimi granulociti, da lahko postavimo diagnozo OSP-jev (6). Histološki kriterij, ki je diagnostičen in ga upoštevajo tako kriteriji MSIS-a kot tudi EBJIS-a, je več kot pet nevtrofilnih granulocitov na vidno polje v petih mikroskopskih vidnih poljih 400-kratne povečave (7) (Slika 1). Za mnoge je ta definicija preenostavna (8), za druge je ta kriterij preohlapen (9). Uporabnost histološke diagnostike OSP-jev je z vidika specifičnosti, senzitivnosti ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti odvisna od histološke tehnike in analiziranega vzorca, od praznih vrednosti, ki si jih postavimo, ter od pacienta (10).



**Slika 1:** Obsežen vnetocelični infiltrat v obproteznem tkivu s številnimi nevtrofilnimi granulociti (> 5/vidno polje) (hematoksilin in eozin; 400-kratna povečava).

**Figure 1:** Heavily inflammatory cell infiltration of periprosthetic tissue in which there are numerous neutrophil granulocytes (> 5/high power field) (haematoxylin and eosin; 400x magnification).

»

## VRSTA HISTOLOŠKE TEHNIKE

Na voljo sta dve histološki tehniki: zaledenele rezine in parafinske rezine. Obe tehniki uporabljata klasično barvanje s hematoksilinom in eozinom, vendar je bistvena razlika v tem, da je prva intraoperativna tehnika, ki operaterja med operacijo informira o tem, ali je proteza okužena ali ne, s tem pa daje operaterju usmeritev za enostopenjsko ali dvostopenjsko menjavo sklepne proteze (11). Na drugi strani pa definitivna histološka tehnika s parafinskimi rezinami daje informacijo o tem, ali je bila proteza okužena, in je tako potrditveni test po tem, ko je že vstavljena nova proteza oz. vstavljen distančnik (5).

Čeprav obe tehniki temeljita na ugotavljanju gostote nevtrofilnih granulocitov v preparatu periprotetičnega tkiva, je pomembna razlika v kakovosti samega preparata in s tem v uspešnosti razlikovanja nevtrofilnih granulocitov od ostalih vnetnih celic v obproteznem tkivu. Težava s kakovostjo preparata je še zlasti pomembna zato, ker so v obproteznem tkivu lahko tudi različno veliki obrabni delci (kovinski, keramični, polietilenski), ki močno poškodujejo histološki preparat. Stroh in sodelavci so ugotovili ujemanje med obema tehnikami v kar 97,7 % (analizirali so 304 primere) (12), medtem ko so drugi avtorji poročali o bistvenih razlikah med obema tehnikami. Tohtz in sodelavci so poročali o ujemanju le v 78,2 % pri analiziranih 64 primerih (13). Pri 12 primerih je bila zaledenela rezina dvoumna ali ne dovolj kakovostna in je šele parafinska rezina dala točno diagnozo.

## VRSTA TKIVNEGA VZORCA ZA HISTOLOŠKO ANALIZO

Med revizijsko operacijo lahko kirurg odvzame različne vzorce obproteznega tkiva za histološko analizo. Tako je lahko tkivo iz pseudokapsule, periprotetične membrane ali iz drugih obproteznih tkiv. Mesto, kjer so bili vzorci odvzeti, je lahko različno, kar lahko vpliva na rezultate histološke analize. Bori in sod. so objavili študijo, kjer so ugotovili, da imajo vzorci iz interface membrane (membrane med protezo in kostjo) značilno boljše specifičnost in napovedno vrednost pri analizi gostote nevtrofilnih granulocitov od vzorcev iz pseudokapsule (14). Specifičnost vzorcev iz in-

terface membrane je bila 84 % v primerjavi s specifičnostjo vzorcev iz pseudokapsule, ki je bila 42 %. Možen vzrok za razlike bi bil, da je v pseudokapsuli veliko vezivnega tkiva, ki zamaskira nevtrofilne granulocite; ali pa, da je bakterijski biofilm tik ob protezi, torej ob interface membrani (12).

## PRAŽNE (CUT-OFF) VREDNOSTI ZA DIAGNOZO OKUŽB SKLEPNIH PROTEZ

Ključna pri histološki diagnostiki sklepnih protez je prisotnost oz. odsotnost nevtrofilnih granulocitov v preparatih obproteznega tkiva (10). Nekateri avtorji pri tem ugotavljajo tudi prisotnost drugih celic, kot so plazmatke in limfociti. Teoretično prisotnost nevtrofilnih granulocitov v tkivu pomeni okužbo, njihova odsotnost pa aseptično omajanje. V večini raziskav je postavljena pražna vrednost več kot pet nevtrofilnih granulocitov na mikroskopsko vidno polje v petih vidnih poljih 400-kratne povečave (7). Če bi pražne vrednosti dvignili na deset nevtrofilnih granulocitov/HPF, bi se povečala specifičnost, vendar zmanjšala senzitivnost; če bi nasprotno pražno vrednost zmanjšali na 1 nevtrofilni granulocit/HPF, kar priporočajo nekateri, bi bilo obratno. Poleg tega se je treba zavedati, da nekateri mikroorganizmi, zlasti koagulaza negativni *Stafilokoki* in *Cutibacterium acnae*, povzročajo okužbe, kjer je gostota nevtrofilnih granulocitov v periprotetičnem tkivu pod 5/HPF (15).

## SKUPINE BOLNIKOV

Včasih je diagnoza odvisna tudi od vrste pacientov. Večina raziskav je narejenih na histoloških vzorcih pri revizijah kolčnih in kolenskih protez. Grosso in sodelavci, ki so analizirali periprotetično tkivo ramenskih protez (16) in Ahmadi in sodelavci (17), ki so analizirali obprotežno tkivo komolčnih protez, so ugotovili, da je senzitivnost histološke analize v teh primerih zelo nizka. To verjetno ni odvisno od vrste proteze, temveč od tega, da večino okužb ramenskih protez povzročajo *Cutibacterium acnae* in da večino okužb komolčnih protez povzročajo koagulaza negativni stafilokoki (15).



Poleg tega obstajata dve skupini bolnikov, kjer je pri histološki analizi rezultat pogosto lažno pozitiven. Prva so bolniki, pri katerih je bil razlog za primarno vstavev sklepne proteze ravmatoidni artritis. Ti imajo vztrajajočo infiltracijo z nevtrofilnimi granulociti v obproteznem tkivu zaradi aktivne primarne bolezni in ne zaradi okužbe (18). Druga skupina so bolniki s periprotetičnim zlomom. Munoz-Mahamud in sodelavci so ugotovili lažno pozitivnih kar 66 % histoloških analiz, kjer je bil periprotetični zlom (19). Vzrok je vnetni odgovor na zlom in na poškodbo krvnih žil ob zlomu. Da bi se izognili tovrstnim lažno pozitivnim rezultatom, je potrebna predvsem dobra komunikacija med ortopedom in patologom.

## TEHNIKA ŠTETJA NEVTROFILNIH GRANULOCITOV

V večini primerov je določanje števila nevtrofilnih granulocitov v obproteznem tkivu za izkušenega patologa enostavno, vendar je v nekaterih primerih lahko identifikacija zelo zahtevna. Obstaja nekaj pravil, ki se jih moramo držati (20) the International Consensus Meeting (ICM). Upoštevajo se samo nevtrofilni granulociti, ki se nahajajo v tkivu, in ne tisti v lumnih krvnih žil. Včasih so vidni številni nevtrofilni granulociti v lumnih krvnih žil, v tkivu pa infiltracije ni. Možna razlaga bi bila, da je vnetno žarišče nekje drugje ali da je odvzet vzorec nereprezentativen. Nekateri avtorji zato priporočajo odvzem večjega števila vzorcev za histološko analizo, in sicer iz različnih mest okoli proteze (8, 21). Tako Feldman in sodelavci priporočajo vsaj dva vzorca (21), Fourchade in sodelavci pa vsaj štiri (3). Pri analizi štejemo nevtrofilne granulocite v vidnih poljih z največ celicami. Nevtrofilni granulociti morajo imeti tudi jasno citoplazmo, saj nas včasih celični in jedrni drobci zaradi jedrne fragmentacije lahko zavedeta. Prepoznavanje nevtrofilnih granulocitov znatno olajšajo različna dodatna barvanja, npr. imunohistokemično barvanje na CD15 na membrani nevtrofilnih granulocitov ali pa histokemično označevanje kloroacetatne esterase v citoplazmi nevtrofilnih granulocitov (22, 23). Obe metodi olajšata prepoznavanje nevtrofilnih granulocitov, vendar podaljšata čas, ki je potreben za diagnozo, in bistveno povečata ceno izdelave preparatov. Imunohistokemično označevanje nevtrofilnih granulocitov s CD15 omogoča tudi objektivno analizo

preparatov s pomočjo avtomatskega sistema za analizo slike, ki pa zahteva sofisticirano in drago opremo.

S pomočjo imunohistokemičnega barvanja CD15 in avtomatske analize slike so Morawietz in sodelavci leta 2015 predlagali nov, objektivnejši kriterij, ki se vse bolj uveljavlja (23). Menili so namreč, da je kriterij več kot 5 na HPF previsok. Ugotovili so, da je 23 nevtrofilnih granulocitov v 10 vidnih poljih 400-kratne povečave tista prazna vrednost, ki najučinkoviteje razlikuje OSP-je od aseptičnega omajanja. Več kot 23/10 HPF pomeni okužbo, upoštevati pa je treba, da v vsakem vidnem polju štejemo največ 10 nevtrofilnih granulocitov; tako je najvišje možno število 100 nevtrofilnih granulocitov v 10 vidnih poljih.

Danes obstaja cela vrsta poskusov, da bi odkrili biomarkerje v sklepni tekočini, kot so humani alfa defenzin 1-3, nevtrofilna elastaza 2, lactoferin in nekateri drugi, vendar se nobeden od teh ni izkazal z dovolj veliko zanesljivostjo, da bi nadomestil histološko analizo obproteznega tkiva.

## ZAKLJUČKI

1. Kljub številnim študijam o kriterijih za histološko diagnozo OSP-jev v zadnjih letih še vedno ostaja in veljavi kriterij več kot pet nevtrofilnih granulocitov na mikroskopsko vidno polje v petih vidnih poljih 400-kratne povečave.
2. Histološka analiza je pomembna v diagnostiki OSP-jev, vendar se moramo zavedati njenih pomanjkljivosti, kot so primeri okužb z nizko virulentnimi bakterijami ali pri pacientih s periprotetičnim zlomom ali revmatoidnim artritisom.
3. Histološka analiza OSP-jev je hitra in poceni metoda, zato bi bilo treba tkivne vzorce obproteznega tkiva analizirati pri vseh revizijskih operacijah sklepnih protez.
4. Histokemična (CAE) in imunohistokemična barvana (CD15) omogočajo lažje prepoznavanje nevtrofilnih granulocitov, vendar se pri tem podaljša čas in poveča cena.
5. Ključna je dobra komunikacija med patologom in ortopedom, ki bistveno zmanjša pomanjkljivosti histološke diagnostike OSP-jev.

»

## LITERATURA

1. Sculco P, Kapadia M, Moezinia CJ, Mannstadt I, Miller AO, Donlin L, et al. Clinical and histological features of prosthetic joint infections may differ in patients with inflammatory arthritis and osteoarthritis. *HSS J*. 2023; 19(2): 146–53.
2. Zeng ZJ, Yao FM, He W, Wei QS, He MC. Incidence of periprosthetic joint infection after primary total hip arthroplasty is underestimated: a synthesis of meta-analysis and bibliometric analysis. *J Orthop Surg*. 2023; 18(1): 610.
3. Fourcade C, Gomez-Brouchet A, Bouige A, Krin G, Bicart-See A, Marlin P, et al. Can we rely on histopathological results for the diagnosis of prosthetic joint infection? *Infect Dis Now*. 2023; 53(5):104706.
4. Koh IJ, Cho WS, Choi NY, Parvizi J, Kim TK. How accurate are orthopedic surgeons in diagnosing periprosthetic joint infection after total knee arthroplasty?: A multicenter study. *Knee*. 2015; 22(3):180–5.
5. McNally M, Sousa R, Wouthuyzen-Bakker M, Chen AF, Soriano A, Vogely HC, et al. The EBJIS definition of periprosthetic joint infection: a practical guide for clinicians. *Bone Joint J*. 2021; 103-B(1):18–25.
6. Bémer P, Léger J, Milin S, Plouzeau C, Valentin AS, Stock N, et al. Histopathological diagnosis of prosthetic joint infection: does a threshold of 23 neutrophils do better than classification of the periprosthetic membrane in a prospective multicenter study? *J Clin Microbiol*. 2018; 56(9): e00536-18.
7. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop*. 2011; 469(11): 2992–4.
8. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract*. 2014; 210(12): 779–86.
9. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol*. 1999; 52(2): 118–23.
10. Bori G, McNally MA, Athanasou N. Histopathology in periprosthetic joint infection: when will the morphomolecular diagnosis be a reality? *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 1412701.
11. Kelly ME, Bahethi SR, King ME, Elstner BC, Turcotte JJ, King PJ. The utility of frozen section histology in diagnosing periprosthetic joint infection in revision total joint arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2021; 36(6): 2137–43.
12. Stroh DA, Johnson AJ, Naziri Q, Mont MA. Discrepancies between frozen and paraffin tissue sections have little effect on outcome of staged total knee arthroplasty revision for infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2012; 94(18): 1662–7.
13. Tohtz SW, Müller M, Morawietz L, Winkler T, Perka C. Validity of frozen sections for analysis of periprosthetic loosening membranes. *Clin Orthop Relat Res*. 2010; 468(3): 762–8.
14. Bori G, Muñoz-Mahamud E, García S, Mallofre C, Gallart X, Bosch J, et al. Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Mod Pathol*. 2011; 24(4): 579–84.
15. Bori G, Soriano A, García S, Gallart X, Mallofre C, Mensa J. Neutrophils in frozen section and type of microorganism isolated at the time of resection arthroplasty for the treatment of infection. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009; 129(5): 591–5.
16. Grosso MJ, Frangiamore SJ, Ricchetti ET, Bauer TW, Iannotti JP. Sensitivity of frozen section histology for identifying propionibacterium acnes infections in revision shoulder arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2014; 96(6): 442–7.
17. Ahmadi S, Lawrence TM, Morrey BF, Sanchez-Sotelo J. The value of intraoperative histology in predicting infection in patients undergoing revision elbow arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2013; 95(21): 1976–9.
18. Kataoka M, Torisu T, Tsumura H, Yoshida S, Takashita M. An assessment of histopathological criteria for infection in joint arthroplasty in rheumatoid synovium. *Clin Rheumatol*. 2002; 21(2): 159–63.
19. Muñoz-Mahamud E, Bori G, García S, Ramírez J, Riba J, Soriano A. Usefulness of histology for predicting infection at the time of hip revision for the treatment of Vancouver B2 periprosthetic fractures. *J Arthroplasty*. 2013; 28(8): 1247–50.
20. Sigmund IK, Luger M, Windhager R, McNally MA. Diagnosing periprosthetic joint infections: a comparison of infection definitions: EBJIS 2021, ICM 2018, and IDSA 2013. *Bone Joint Res*. 2022; 11(9): 608–18.
21. Feldman DS, Lonner JH, Desai P, Zuckerman JD. The role of intraoperative frozen sections in revision total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg*. 1995; 77(12): 1807–13.
22. Kashima TG, Inagaki Y, Grammatopoulos G, Athanasou NA. Use of chloroacetate esterase staining for the histological diagnosis of prosthetic joint infection. *Virchows Arch*. 2015; 466(5): 595–601.
23. Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*. 2009; 54(7): 847–53.

# Biološki označevalci akutne oblike bolezni presadka proti gostitelju

## *Acute graft versus host disease biomarkers*

Katarina Klinar<sup>1,2</sup>, Helena Podgornik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Avtor za korespondenco:

**Izr. prof. dr. Helena Podgornik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: [helena.podgornik@kclj.si](mailto:helena.podgornik@kclj.si)

### POVZETEK

Presaditev krvotvornih matičnih celic se uporablja pri zdravljenju hematoloških (malignih) boleznih z najbolj neugodno prognozo, pri čemer glavni razlog umrljivosti bolnikov po presaditvi predstavlja bolezen presadka proti gostitelju (GVHD), še posebej na zdravljenje neodzivna oblika bolezni. Ker trenutno postavitev diagnoze temelji predvsem na kliničnih znakih bolezni in histološki analizi prizadetega tkiva, je veliko študij usmerjenih v iskanje bioloških označevalcev, ki bi jih lahko določali na neinvaziven način in bi omogočali čim bolj zgodnjo postavitev diagnoze in prognoze ter spremljanje zdravljenja. Najbolj proučevani so zaenkrat topni serumski in plazemski označevalci. Ker pa v zadnjem času vedno več dokazov kaže na povezanost med GVHD in endotelijsko poškodbo, predstavlja obojaven označevalec tudi cirkulirajoče endotelijske celice ter zunajcelični vezikli in mikro RNA.

**Ključne besede:** bolezen presadka proti gostitelju, biološki označevalci

### ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation is a treatment modality for hematologic (malignant) diseases with the worst prognosis, in which graft versus host disease (GVHD), especially the steroid-resistant form of the disease, is the main cause of mortality. Currently, diagnosis is mainly based on the clinical presentation of the disease and histologic findings. Therefore, many researchers are looking for non-invasive diagnostic, predictive, responsive or prognostic biomarkers for this disease. The most commonly studied biomarkers are serum and plasma biomarkers. As many studies have shown a connection between GVHD and endothelial damage, circulating endothelial cells are a promising marker. In addition, extracellular vesicles and micro-RNA also have great potential.

**Key words:** graft versus host disease, biomarkers

»

## UVOD

Eden izmed možnih načinov zdravljenja hematoloških (malignih) bolezni je alogenska presaditev krvotvornih matičnih celic (aloPKMC), ki predstavlja možnost ozdravitve bolnikov z najbolj neugodno prognozo. Pri omenjenem načinu zdravljenja bolnika ogrožajo predvsem okužbe in bolezen presadka proti gostitelju (GVHD, angl. *Graft versus Host Disease*), ki predstavlja glavni razlog umrljivosti bolnikov po aloPKMC (1,2).

GVHD je sistemska bolezen. Do akutnega GVHD (aGVHD) praviloma pride v prvih 100 dneh po aloPKMC, pojavi se pri približno 40 % bolnikov s sorodnim darovalcem krvotvornih matičnih celic (KMC) in pri 50–60 % bolnikov, ki so prejeli KMC nesorodnega darovalca (3). Kronična oblika GVHD (cGVHD) se praviloma pojavi več kot 100 dni po PKMC ter tudi pomembno vpliva na umrljivost in kakovost življenja bolnikov po presaditvi. Nastane zaradi tkivne poškodbe timusa, kar vodi v motnje v toleranci limfocitov B in T in pripelje v nastanek aloreaktivnih protiteles ter posledično v nastanek kroničnega vnetja in tkivne fibroze (3).

Pri aGVHD v prvi stopnji pride do poškodbe gostiteljevega tkiva, ki jo povzročita kemoterapija in/ali obsevanje v sklopu kondicioniranja. To povzroči izpostavitve z nevarnostjo in z mikrobi povezanih molekularskih vzorcev (DAMP, angl. *Danger-Associated Molecular Pattern* in PAMP, angl. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), kar aktivira prejemnikove (in/ali darovalčeve) antigen predstavitvene celice (APC) in posledično pride do sproščanja vnetnih citokinov (npr. tumor nekrotizirajoči faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1). Poleg tega kondicioniranje in uporaba profilaktičnega antibiotičnega zdravljenja povzročita tudi izgubo raznovrstnosti črevesne mikrobiote. Bakterijski produkti, ki prehajajo preko poškodovane črevesne sluznice, še dodatno spodbudijo aktivacijo APC. V drugi stopnji APC darovalčevim limfocitom T predstavijo antigene prejemnika, kar povzroči aktivacijo in ekspanzijo celic T pomagalk in zaviralk. Le-ti nato potujejo v tarčne organe in v zadnji stopnji povzročijo poškodbo tkiva, pri čemer pride tudi do okrepljenega sproščanja različnih vnetnih in citotoksičnih dejavnikov, kar še okrepi imunski odziv proti prejemniku in vodi v apoptozo in nekrozo prejemnikovih celic ter tako poveča poškodbo tkiva (3).

Bolezen se lahko izrazi v različnih oblikah – od blage, ki ne potrebuje zdravljenja, do hude, ki ogroža življenje in se pojavi v 10–15 %. Najpogosteje so prizadeti koža, jetra in prebavila, poznamo pa tudi atipično obliko aGVHD, ki prizadene žleze, kostni mozeg in centralni živčni sistem (1,4). Diagnostika aGVHD trenutno temelji predvsem na dokaj nespecifičnih kliničnih znakih bolezni in histološki analizi prizadetega tkiva, zato bi bili označevalci, ki bi jih lahko doleteli iz vzorcev, odvzetih na čim manj invaziven način, zelo dobrodošli. Njihova potencialna vloga pa ni vezana le na postavitve diagnoze, prognoze ali napoved poteka aGVHD, ampak tudi na spremljanje učinkovitosti zdravljenja tega zapleta (5). Hkrati pa njihovo odkrivanje pripomore tudi k razumevanju patofiziologije bolezni in iskanju novih tarč pri načrtovanju zdravljenja (3).

Preživetje bolnikov je sorazmerno klinični resnosti bolezni, vendar šele takrat, ko so simptomi najbolj izraženi, česar pa ne moremo oceniti na začetku, ob pojavu prvih simptomov bolezni. Pri bolnikih, pri katerih pride do odpornosti na zdravljenje s steroidi (SR-GVHD, angl. *Steroid-Refractory GVHD*), ki se uporabljajo kot prva linija zdravljenja, je smrtnost visoka (70–90 %). Ob poznavanju ustreznih označevalcev bi le-ti pomagali pri zgodnji izbiri ustreznega zdravljenja. Pretirano zdravljenje namreč lahko povzroči preveliko imunosupresijo, kar poveča verjetnost nastanka okužb, hkrati pa se zaradi zmanjšanja učinka presadka proti levkemiji (GVL, angl. *Graft versus Leukemia*) poveča možnost ponovitve bolezni. Po drugi strani se pogosto izkaže, da je potrebno močnejše zdravljenje, šele ko prvo zdravljenje ni zadostno (6). Na steroide neodzivna je pogosto črevesna oblika GVHD (GI-GVHD). Ta se kaže z znaki, kot so bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje in (krvava) driska. Taki simptomi se lahko pojavijo tudi pri drugih zapletih po aloPKMC, kot so okužbe gastrointestinalnega trakta, kolitis kot posledica zdravljenja ali s transplantacijo povezana trombotična mikroangiopatija (TA-TMA, angl. *Transplantat-Associated Thrombotic Microangiopathy*), za katero je prav tako značilno slabo preživetje (7). TA-TMA označuje endotelijska disfunkcija in aktivacija komplementa, kar vodi v nastanek mikrotrombov in posledično v trombocitopenijo, mikroangiopatično hemolitično anemijo in prizadetosti različnih organov. Največkrat so prizadeta ledvica, gastrointestinalni trakt, centralni živčni sistem in pljuča, lahko pride tudi do odpovedi večorganskih sistemov (8).





Čeprav je aGVHD povezan z epitelijsko poškodbo, pa vedno več dokazov kaže na povezanost med SR-GVHD in poškodbo endotelija (9). K aktivaciji in poškodbi endotelija pri aloPKMC prispevajo različni dejavniki, kot so obsevanje in kemoterapija v sklopu kondicioniranja, različni vnetni dejavniki, ki se sproščajo iz tkiva ob njegovi poškodbi, endotoksini, ki prehajajo skozi poškodovano črevesno sluznico, in profilaktično imunosupresivno zdravljenje za preprečevanje aGVHD. Poškodbo endotelija povzročajo tudi aloreaktivni limfociti T, ki prepoznajo neujemajoče se humane levkocitne antigene (HLA) na površini endotelij-skih celic. Prav podaljšana aktivacija in poškodba endotelija imata pomembno vlogo tudi pri pojavu nekaterih drugih zapletov po PKMC, kot je npr. TA-TMA (10). Teorija, ki TA-TMA opisuje kot tristopenjski proces (angl. *Three-Hit-Hypothesis*), predpostavlja, da je v njen nastanek vpletena endotelij-ska aktivacija, ki povzroči izgubo zaščitnih mehanizmov endotelija, kar skupaj z dodatnimi dejavniki, kot so npr. okužbe, aloreaktivni limfociti T in profilaktično zdravljenje, vodi v poškodbo endotelija, aktiva-

cijo komplementa, nastanek mikrotrombov in posledične tkivne ishemije. Hkrati so ugotovili, da je pomemben dejavnik pri razvoju TA-TMA tudi genetska predispozicija za aktivacijo komplementa in endotelij-sko poškodbo, kar v omenjeni teoriji predstavlja prvi zadetek (7,8).

V prispevku so predstavljeni biološki označevalci aGVHD s poudarkom na tistih, ki bi lahko služili pri zgodnji prepoznavi bolnikov s težko obliko aGVHD. To so namreč bolniki, pri katerih je potrebno čimprej intenziviranje imunosupresije za preprečitev poslabšanja aGVHD in zmanjšanje verjetnosti za nastanek nekaterih drugih zapletov, kot je tudi TA-TMA. Glede na prekrivanje entitet med (SR)-GVHD in TA-TMA smo v pregled vključili označevalce, povezane z obema zapletoma. Povzetek glavnih skupin označevalcev in njihove vloge je prikazan tudi v Tabeli 1.

»

**Tabela 1:** Označevalci aGVHD: njihov pomen v razvoju in spremljanju bolezni ter način določanja.**Table 1:** Markers of aGVHD: their importance in the development and monitoring of the disease and the method of their determination.

OZNAČEVALEC		PATOLOŠKI PROCES SPROŠČANJA	POMEN OZNAČEVALCA	POVEZAVA Z GVHD	NAČIN DOLOČANJA	VIR
Serumski / plazemski	REG3 $\alpha$	Poškodba črevesja Poškodba tkiva/ endotelija	Diagnostični, napovedni, prognostični	Koncentracija pri GI-GVHD trikrat višja kot pri enteritisu Koncentracija narašča z resnostjo GI-GVHD	ELISA	(11-13)
	sST2		Napovedni, prognostični	Visoka koncentracija povezana s SR-GVHD Visoka koncentracija pred PKMC povezana z večjim tveganjem za TA-TMA	ELISA	(16)
	Algoritem MAGIC (REG3 $\alpha$ in sST2)		Napovedni, prognostični	Napoveduje dolgoročne izide zdravljenja pred, ob ali po pojavu simptomov in začetku zdravljenja	/	(11,12,17)
Celični	CEC	Poškodba endotelija	Napovedni, diagnostični	Pomoč pri razlikovanju od drugih zapletov, ki niso povezani s poškodbo endotelija	Pretočna citometrija	(26)
EV	Eritrocitni EV	Celična komunikacija, poškodba tkiva, aktivacija celic	Diagnostični in napovedni	Največje povišanje ob hkratni prisotnosti mikroangiopatije	Pretočna citometrija	(34,38,39)
	Endotelijski EV		Diagnostični	Kaže na poškodbo endotelija		(36,37)
miRNA	miR-146a	Celična komunikacija, poškodba tkiva, aktivacija celic	Prognostični	Obratno sorazmerna s težo aGVHD	RT-qPCR, NGS	(48)
	miR-155		Prognostični	Sorazmerna s težo aGVHD		(47)
	miR-181a		Prognostični, diagnostični, spremljanje zdravljenja	Sorazmerna s težo aGVHD Znižanje kaže na odgovor na zdravljenje		(49)

aGVHD – akutna oblika bolezni presadka proti gostitelju; CEC – cirkulirajoče endotelijske celice; ELISA – encimsko imunska metoda na trdi podlagi; EV – zunajcelični vezikli; GI-GVHD – črevesna oblika bolezni presadka proti gostitelju; MAGIC – angl. *Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*; miRNA – mikro RNA; NGS – sekvenciranje naslednje generacije; REG3 $\alpha$  – angl. *regeneration islet-derived protein 3 $\alpha$* ; RT-qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo; SR – GVHD-na steroide neodzivna oblika bolezni presadka proti gostitelju; ST2 – angl. *suppressor of tumorigenicity 2*

aGVHD – acute form of graft-versus-host disease; CEC – circulating endothelial cells; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; EV – extracellular vesicles; GI – GVHD – intestinal form of graft-versus-host disease; MAGIC – Mount Sinai Acute GVHD International Consortium; miRNA – micro RNA; NGS – next-generation sequencing; REG3 $\alpha$  – regeneration islet-derived protein 3 $\alpha$ ; RT-qPCR – quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription; SR – GVHD – steroid-refractory form of graft-versus-host disease; ST2 – suppressor of tumorigenicity 2

»

## SERUMSKI IN PLAZEMSKI OZNAČEVALCI

Nobeden izmed številnih v literaturi opisanih označevalcev ni popolnoma specifičen za aGVHD oziroma TA-TMA. Najbolj proučevani so topni serumski oziroma plazemski označevalci, ki se sproščajo iz poškodovanega tkiva in (imunskih) celic, vključenih v patofiziologijo omenjenih stanj (3). Označevalce aGVHD lahko razdelimo na splošne (npr. različni citokini in receptorji zanje) in organsko specifične (npr. hepatocitni rastni dejavnik za jetrno obliko, elafin za kožno obliko). Označevalec, specifičen za GI-GVHD, ki je povezana z največjo smrtnostjo, je REG3 $\alpha$  (angl. *regeneration islet-derived protein 3 $\alpha$* ), ki se v kri sprosti iz poškodovanih Panethovih celic, ki se nahajajo v črevesnih kriptah. REG3 $\alpha$  je lektin, pomemben pri zaščiti črevesne sluznice, saj pokriva luminalno stran enterocitov in tako predstavlja »pregrado« med enterociti in črevesno mikrobioto. Količina REG3 $\alpha$  v krvi je sorazmerna s količino poškodovanih Panethovih celic. Tako ta preiskava služi kot »tekočinska biopsija« tankega črevesa, ki lahko pokaže poškodbo črevesja še pred pojavom simptomov GI-GVHD (7 dni po PKMC). Količina REG3 $\alpha$  narašča z resnostjo GI-GVHD, poleg tega je koncentracija tega proteina pri tistih, ki imajo GI-GVHD, trikrat višja kot pri bolnikih z enteritisom oz. pri tistih, ki GI-GVHD nimajo (11–13). Višje vrednosti REG3 $\alpha$  tik pred aloPKMC in po začetku zdravljenja so bile dokazane pri bolnikih, ki niso odgovorili na zdravljenje z ruksolitinitom – zaviralcem Janus kinaze 2 (JAK2), za katerega je bila dokazana učinkovitost pri zdravljenju SR-GVHD (14,15).

Iz poškodovanih celic prizadetega tkiva se sprošča tudi alarmin IL-33, kar v tarčnih celicah vodi do večjega proizvodnje vnetnih dejavnikov. IL-33 se veže na membransko vezani receptor ST2 (angl. *suppressor of tumorigenicity 2*), katerega izražanje se poveča na aktiviranih limfocitih T. Topni ST2 (sST2) tudi veže IL-33 in s tem prepreči njegovo vnetno delovanje (11). Ob aGVHD se izločanje sST2 iz poškodovanih (predvsem endotelijskih) celic poveča. Prepoznani je bil tudi kot plazemski označevalec, ki kaže na SR-GVHD. Visoka koncentracija sST2 pred PKMC je povezana tudi z večjim tveganjem za nastanek TA-TMA (16).

Tako sST2 kot tudi REG3 $\alpha$  sicer neodvisno napovedujeta umrljivost bolnikov z aGVHD, vključena pa sta tudi v algoritem MAGIC (*Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*), ki ima prognostični pomen in napoveduje dolgoročne izide zdravljenja pred (7. dan po PKMC), ob

ali po pojavu simptomov in začetku zdravljenja aGVHD bolje, kot če le-te napovemo samo na podlagi kliničnih simptomov (11,12,17).

Plazemski koncentraciji sST2 in REG3 $\alpha$  sta skupaj z receptorjem tumor nekrotizirajočega faktorja 1 (TNFR1), ki je nadomestni označevalec TNF- $\alpha$ , ki ga proizvajajo limfociti T in povečuje poškodbo tkiva, vključena v algoritem Ann Arbor. Ta algoritem na podlagi določitve koncentracije omenjenih označevalcev ob pojavu aGVHD napove verjetnost odziva na terapijo s steroidi, razvoja GI-GVHD in umrljivost, ki ni povezana s ponovitvijo bolezni (NRM, angl. *non relapse mortality*) v 6 mesecih neodvisno od ostalih kliničnih dejavnikov tveganja (npr. neujemanje HLA, starost, vrsta kondicioniranja ...) in bi bil potencialno lahko uporabljen kot pomoč pri izbiri ustreznega zdravljenja (6).

Iskanje novih potencialnih označevalcev GVHD so v zadnjem času olajšala različna informacijska orodja in razvoj masne spektrometrije, s katero so dokazali spektralne vzorce značilne za aGVHD, vendar ta tehnika ne omogoča prepoznave posameznih proteinov. Poleg tega je delovno zahtevna in dolgotrajna, vendar pri njej nismo omejeni z dostopnostjo protiteles. Hkratno določitev različnih označevalcev omogočajo tudi proteinske mikromreže, pri katerih problem predstavljata predvsem visok signal ozadja in nespecifična vezava, kar lahko izboljšamo z uporabo drugih imunokemijskih metod za kvantifikacijo posameznega proteina. Najpogosteje se uporablja sendvič encimsko imunska metoda na trdi podlagi (ELISA, angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Vendar na rezultat lahko vplivajo uporabljena protitelesa in kalibratorji, kar lahko vodi do razlik med rezultati testov različnih proizvajalcev (3,18,19).

## CIRKULIRAJOČE ENDOTELIJSKE CELICE

Obetaven označevalec endotelijske poškodbe predstavljajo cirkulirajoče endotelijske celice (CEC), to so namreč zrele celice, ki se ob žilni poškodbi izplavijo v kri (20). Povišano število omenjenih celic je bilo dokazano pri mnogih stanjih, povezanih z žilno poškodbo, npr. miokardni infarkt in sladkorna bolezen (21,22). V primerjavi z zdravimi osebami je bila povišana koncentracija CEC dokazana tudi pri bolnikih s (hematološkimi) malignimi boleznimi (23). >>

Kondicioniranje pred aloPKMC oziroma njegova vrsta (mieloablativno/nemieloablativno) prispeva k endotelijski poškodbi, kar posledično vodi v višje število CEC (24). Pri interpretaciji rezultatov pa moramo upoštevati še možen vpliv drugih dejavnikov, ki povzročijo poškodbo endotelijske celice, kot so npr. okužbe, zdravila (3). Koncentracija CEC ob vgnezditvi (angl. *engraftment*) je nižja pri tistih, pri katerih se kasneje razvije aGVHD, v primerjavi s tistimi, pri katerih do aGVHD ne pride (25). Poleg tega je bil dokazan statistično značilen porast CEC ob pojavu simptomov aGVHD (26). V drugi študiji so pri bolnikih z aGVHD ugotovili nižje število CEC kot pri tistih, ki aGVHD niso razvili, vendar so CEC določali ob vnaprej določenih časovnih točkah in torej ne nujno ob pojavu simptomov aGVHD (24). Zaradi hitrega spreminjanja števila CEC bi njihovo določanje ob pojavu simptomov aGVHD lahko služilo kot pomoč pri razlikovanju aGVHD od drugih zapletov, pri katerih endotelij ni vpleten (26).

Raziskav, ki bi ugotovljale povezavo med CEC in TA-TMA, je malo. V eni izmed študij je bilo sicer dokazano, da imajo bolniki z žilnimi zapleti po aloPKMC višje vrednosti CEC, pri čemer je glavna pomanjkljivost omenjene študije majhno število vključenih bolnikov (27).

Poleg CEC pa se v krvi nahajajo tudi endotelijske prekursorske celice (EPC). To so celice, ki sodelujejo pri nastanku novih žil ter regeneraciji poškodbe obstoječih žil in tako kažejo na regeneracijsko sposobnost žilja (28). Vloga EPC pri aGVHD in TA-TMA za zdaj še ni popolnoma pojasnjena. Dokazano je bilo, da je pri bolnikih z aGVHD koncentracija EPC ob diagnozi bolezni narasla, medtem ko je pri tistih, ki aGVHD niso razvili, ostala nizka. Prav tako pa je pri tistih s SR-GVHD koncentracija EPC ostala visoka, medtem ko je pri bolnikih, ki so se na zdravljenje odzvali, padla na začetno vrednost (29). Hkrati histološki dokazi kažejo, da se ob aGVHD v koži in gastrointestinalnem traktu poveča vaskularizacija. Ena izmed možnih razlag teh rezultatov predvideva, da endotelijska poškodba vodi v višje število EPC, kar privede do povečane vaskularizacije in nazadnje pride do poškodbe endotelijskih celic s strani aloreaktivnih limfocitov, kar povzroči porast CEC (30). Nasprotno pa je bil v drugi študiji porast EPC v periferni krvi 14. dan po aloPKMC v skupini bolnikov z aGVHD omejen (25). Na živalskem modelu pa je bilo dokazano, da injiciranje EPC po aloPKMC ublaži aGVHD (31).

CEC in EPC so v krvi zelo redke. Posledično je potrebna analiza velikega števila celic, za njihovo določanje pa se

lahko uporabljajo različne metode, ki sicer niso standardizirane. Pogosto uporabljena metoda za določanje CEC in EPC je pretočna citometrija, kjer prav tako različne raziskovalne skupine, poleg različnih načinov izolacije celic, za njihovo prepoznavo uporabljajo različne imunofenotipe (32). Nimamo namreč celičnega označevalca, ki bi bil popolnoma specifičen za omenjene celice, zato njihova prepoznava temelji na kombinaciji različnih označevalcev. Pogosto uporabljeni označevalci za prepoznavo CEC so CD31, CD34 in CD146, za prepoznavo EPC pa CD34, CD133 in CD309. Za izključitev nespecifičnih dogodkov je priporočljivo dodati še negativne označevalce, npr. CD45, in označevalce nukleinskih kislin ter označevalce živosti celic. Poleg tega pa je priporočljiva uporaba izotipske kontrole (28,33). Prav uporaba različnih metod in imunofenotipov v različnih študijah je lahko vzrok za različne rezultate dosedanjih študij, ki so proučevale CEC kot možen označevalec aGVHD. Kljub razlikam CEC ostajajo obetaven označevalec za prepoznavo aGVHD, bi pa bilo potrebno pred uporabo metode v vsakdanji klinični praksi standardizirati protokole za prepoznavo in kvantifikacijo teh celic. Prednost uporabe pretočne citometrije pri prepoznavi CEC in EPC predstavlja dejstvo, da lahko omenjene celice določamo hkrati (33).

## ZUNAJCELIČNI VEZIKLI

Zunajcelični vezikli (EV, angl. *extracellular vesicle*) so sferične membranske strukture, ki lahko kažejo na celično poškodbo oziroma aktivacijo, pomembni pa so tudi pri medcelični komunikaciji (34). Glede na njihovo velikost EV delimo na eksosome (30–100 nm), mikrovezikle (100–1000 nm) in apoptotska telesca (1000–5000 nm). Sestavljajo jih različne biološke molekule, njihova sestava pa je odvisna od tega, iz katere celice so nastali in od (pato)fizioloških procesov v teh celicah. Ker se nahajajo v mnogih bioloških vzorcih, imajo kot nein vazivni označevalci z diagnostično in prognostično vlogo velik potencial pri različnih boleznih (35), med drugim tudi pri aGVHD, kjer je bilo dokazano povišano število endotelijskih EV (EEV), kar kaže na prisotnost endotelijske poškodbe (36,37). Poleg tega je bilo pri bolnikih z aGVHD dokazano povišano število eritrocitnih EV (Eri-EV), medtem ko pri bolnikih z okužbami do povišanja ni prišlo (38). Višja koncentracija celokupnega števila EV (TEV) in Eri-EV ob vgnezdenju je povezana z večjim tveganjem za razvoj aGVHD. Dokazan je bil tudi vpliv kondicioniranja na število EV, saj »

je bila koncentracija EV pri mieloablativnem kondicioniranju v primerjavi z nemieloablativnim višja, pri čemer je bila pri nemieloablativnem kondicioniranju povezava med Eri-EV in aGVHD še močnejša (34). Pri bolnikih, pri katerih je bila poleg aGVHD prisotna tudi mikroangiopatija, je bilo povišanje Eri-EV največje. Prav tako je bila pri tistih, ki so preživeli TA-TMA, opažena dolgotrajno povišana koncentracija Eri-EV, vendar je bilo število sodelujočih, pri katerih je prišlo do mikroangiopatije, majhno (38,39).

Poleg določanja Eri-EV, EEV in TEV je bilo proučevano tudi izražanje posameznih antigenov na površini EV. Večje izražanje CD146 je povezano z večjim tveganjem, večje izražanje CD31 in CD140 $\alpha$  pa z manjšim tveganjem za razvoj aGVHD. CD146 je sicer označevalec endotelijskih celic, ki ga najdemo tudi na subpopulaciji limfocitov T (Th17). Čeprav je delež teh limfocitov pri aGVHD povišan, pa je za omenjeno stanje značilna tudi endotelijska poškodba. Ker je intenziteta fluorescence CD146 sorazmerna z intenziteto fluorescence nekaterih drugih endotelijskih označevalcev, avtorji predpostavljajo, da CD146 pozitivni EV izvirajo prav iz endotelijskih celic. CD31 je prav tako membranski antigen, ki se ne nahaja le na endotelijskih celicah, ampak tudi na trombocitih in na nekaterih drugih celicah (npr. limfocitih T ter APC). Med drugim preprečuje povečano aktivacijo limfocitov T, saj zviša aktivacijski prag T celičnega receptorja. CD140 $\alpha$ , znan tudi kot PDGFR $\alpha$  (angl. *platelet-derived growth factor receptor-alpha*), ima pomembno vlogo pri migraciji fibroblastov in celjenju ran oziroma obnovi poškodovanega tkiva (40).

Pomembno vlogo pri razvoju aGVHD imajo tudi limfociti T, ki se nahajajo v tarčnem organu. Antigena za prepoznavo teh tako imenovanih tkivnih spominskih limfocitov T (TRM, angl. *tissue resident memory*) sta CD69 in CD103, ki imata pomembno vlogo pri »zadrževanju« teh celic v tkivu, zato so omenjene celice v krvi zelo redke. Lahko pa v krvi določamo EV; njihova sestava je namreč odvisna od vrste in stanja celic, iz katerih izvirajo (41,42). Ugotovljeno je bilo, da aktivirane endotelijske celice lahko spodbudijo izražanje CD69 na limfocitih (41). Visoka serumska koncentracija CD69 pozitivnih EV pred aloPKMC je povezana z večjim tveganjem za razvoj aGVHD, pri čemer CD69 pozitivni EV soizražajo CD45, kar kaže na levkocitni izvor (42).

Metode za določanje EV za zdaj še niso standardizirane, na rezultate analize pa lahko vplivajo mnogi dejavniki. Še posebej pomemben je način izolacije EV, ki se priporoča za zmanjšanje vpliva motečih snovi na analizo (34,43). Prav

tako so za analizo EV možne različne metode. Metoda, ki omogoča tako prepoznavo različnih EV kot tudi njihovo kvantifikacijo, je pretočna citometrija (44). Določanje EV otežujeta predvsem njihova majhnost in dejstvo, da imajo na svoji površini manjšo količino proteinov, torej je izražanje označevalcev na njihovi površini šibko, zato za njihovo analizo potrebujemo občutljive pretočne citometre, njihova prepoznavna pa bolj kot na podlagi sipanja svetlobe temelji na uporabi fluorescenčnih označevalcev (45).

## MIKRO RNA

Poleg membranskih struktur so za opravljanje (pato)fiziološke vloge EV zelo pomembne tudi snovi, ki se nahajajo znotraj EV. Med drugim se v notranjosti EV nahajajo tudi različne kodirajoče in nekodirajoče RNA. Pogosto proučevane so prav mikro RNA (miRNA), ki z vezavo na komplementarno informacijsko RNA (mRNA) preprečijo njeno izražanje. Proučevanje različnih miRNA, ki se nahajajo znotraj EV ali pa prosto v krvi, je predmet različnih študij, povezanih z aGVHD, tako v smislu iskanja označevalcev te bolezni kot tudi ugotavljanja patofizioloških mehanizmov bolezni (46).

Lia s sodelavci je dokazal, da kombinacija izražanja CD146 na EV, plazemska koncentracija sTNFR1 in izražanje miR-100 ter miR-194 v EV najboljše ločuje med bolniki z in brez aGVHD ob pojavu bolezni. miR-100 ima pomembno vlogo pri uravnavanju neovaskularizacije pri aGVHD in postopno narašča od PKMC do pojava aGVHD. Pri tistih, ki so kasneje razvili aGVHD, sta bili pred kliničnim pojavom bolezni v EV povišani tudi količina miR-194 in miR-155; slednja ima pomembno vlogo pri uravnavanju T celičnega odziva (43). Za serumsko vrednost miR-155 je bilo dokazano, da je sorazmerna s težo aGVHD (47).

Pogosto proučevana miRNA v povezavi z aGVHD je miR-146a, ki je pomembna pri uravnavanju izražanja TNF- $\alpha$ , zmanjšano izražanje te miRNA pa je povezano z resnostjo aGVHD (48). S slabšim preživetjem in z resnostjo bolezni je povezano tudi povišanje miR-181a v serumu ob pojavu simptomov aGVHD, medtem ko zmanjševanje miR-181a kaže na odgovor na zdravljenje. Poleg tega je bila dokazana značilna razlika med ravno izražanja miR-181 pri bolnikih z aGVHD in tistih z akutno zavrtnitvijo presajene ledvice, zdravih osebah in bolnikih s sepsa, kar kaže na specifičnost tega označevalca (49). »

V različnih študijah je bilo sicer dokazanih še veliko drugih miRNA, ki predstavljajo možno tarčo za zdravljenje ali pa imajo potencialno napovedno, diagnostično ali prognozično vrednost za aGVHD in so večinoma vpletene v regulacijo imunskega odziva (3).

Tako kot EV lahko tudi miRNA določamo v različnih bioloških vzorcih, odvzetih na neinvaziven način. Pogosto uporabljena metoda za njihovo določitev je kvantitativna verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-qPCR). Njeni prednosti sta dobra občutljivost in specifičnost, poleg tega se omenjena metoda tudi sicer uporablja v diagnostiki in spremljanju hematoloških bolezni in je tako na voljo v vseh transplantacijskih centrih (50). Po drugi strani pa analizo miRNA omejuje predvsem dejstvo, da na rezultat lahko vplivajo različni predanalitični in analitični dejavniki, kot so izbor ustreznega matriksa, čas do analize, shranjevanje vzorca, način izolacije miRNA in izbor najustrežnejšega načina za normalizacijo rezultatov. Zato je tudi pri analizi miRNA pred uvedbo v vsakdanjo klinično prakso potrebno overjanje metode za njihovo določanje (51).

## ZAKLJUČEK

Glavni razlog umrljivosti bolnikov po aloPKMC predstavlja aGVHD. Smrtnost je največja pri bolnikih, ki se ne odzovejo na zdravljenje, do česar najpogosteje pride pri GI-GVHD. Z enakimi znaki kot GI-GVHD pa se kaže tudi TA-TMA, ki je prav tako povezana s slabim preživetjem. Zaradi pomanjkanja enotnih diagnostičnih kriterijev in prekrivajočih se entitet med (SR)-GVHD in TA-TMA v različnih študijah uporabljajo različne načine prepoznavne omenjenih stanj, kar vodi v neenotno in prekrivajočo se opredelitev obeh zapletov. Pri postavitvi diagnoze nam sicer lahko pomaga histološka analiza prizadetega tkiva, pri čemer je biopsija invaziven postopek, ki je še posebej tvegan pri trombocitopeniji in zato pogosto neizvedljiv (52). Zato bi bili označevalci, ki bi jih lahko določali na neinvaziven način (npr. iz periferne krvi) in bi pomagali pri zgodnji prepoznavi (predvsem tistih bolnikov s težko obliko) aGVHD, zelo dobrodošli (3). Poleg iskanja označevalcev aGVHD pa je pomembno tudi iskanje označevalcev cGVHD. Tudi pri cGVHD so obetavni različni serumski in plazemski označevalci, miRNA, kot pomembni pa so se izkazali tudi nekateri celični označevalci, predvsem določanje različnih subpopulacij limfocitov (3).

Kljub številnim študijam bioloških označevalcev GVHD za zdaj še nobeden ni samostojno umeščen v smernice za klinično obravnavo bolnika. V posameznih transplantacijskih centrih se uporablja le določanje sST2 ter REG3 $\alpha$ . Glavni razlog je, da metode za določanje označevalcev še niso standardizirane, hkrati pa lahko na njihovo koncentracijo vplivajo različni dejavniki (npr. vrsta kondicioniranja in uporaba profilaktičnega zdravljenja). To ob pomanjkanju enotnih diagnostičnih kriterijev in razlik med vključitvenimi kriteriji v različnih študijah omejuje njihovo uporabo v vsakdanji klinični praksi. Zato je poleg odkrivanja novih označevalcev v prihodnosti nujno tudi delo na standardizaciji laboratorijskih metod za njihovo določanje in klinični validaciji odkritih označevalcev oziroma njihovih kombinacij, pri čemer je nujno sodelovanje med zdravniki in laboratorijskimi strokovnjaki (5,53). >>

## LITERATURA

1. Zver S, Škerget M. Bolezni krvi in krvotvornih organov. In: Košnik M, Štajer D, Jug B, Kocjan T, Koželj M, eds. *Interna medicina*. 6. izd. Ljubljana: Buča; 2022. p. 1224–1230.
2. Bolnik po presaditvi krvotvornih matičnih celic v ambulanti družinskega zdravnika - Združenje hematologov Slovenije [Internet]. 2022 [assessed on 15.11.2023]. Available from: <https://zhs.si/bolnik-po-presaditvi-krvotvornih-maticnih-celic-v-ambulantni-druzinskega-zdravnika/>
3. Giaccone L, Faraci DG, Butera S, Lia G, Di Vito C, Gabrielli G, et al. Biomarkers for acute and chronic graft versus host disease: state of the art. *Expert Rev Hematol*. 2021;14(1):79–96.
4. Malard F, Holler E, Sandmaier BM, Huang H, Mohty M. Acute graft-versus-host disease. *Nat Rev Dis Primer*. 2023;9(1):1–18.
5. Bidgoli A, DePriest BP, Saatloo MV, Jiang H, Fu D, Paczesny S. Current definitions and clinical implications of biomarkers in graft-versus-host disease. *Transplant Cell Ther*. 2022;28(10):657–66.
6. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, et al. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicenter study. *Lancet Haematol*. 2015;2(1):e21–9.
7. Dvorak CC, Higham C, Shimano KA. Transplant-associated thrombotic microangiopathy in pediatric hematopoietic cell transplant recipients: a practical approach to diagnosis and management. *Front Pediatr*. 2019;7:133.
8. Lazana I. Transplant-associated thrombotic microangiopathy in the context of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: where we stand. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1159.
9. Lufi T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, et al. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood*. 2011;118(6):1685–92.
10. Neidemire-Colley L, Robert J, Ackaoui A, Dorrance AM, Guimond M, Ranganathan P. Role of endothelial cells in graft-versus-host disease. *Front Immunol*. 2022;13:1033490.
11. Ferrara JLM, Chaudhry MS. GVHD: biology matters. *Blood Adv*. 2018;2(22):3411–7.
12. Srinagesh HK, Ferrara JLM. MAGIC biomarkers of acute graft-versus-host disease: biology and clinical application. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(4):101111.
13. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, et al. Regenerating islet-derived 3- $\alpha$  is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;118(25):6702–8.
14. Zeiser R, von Bubnoff N, Butler J, Mohty M, Niederwieser D, Or R, et al. Ruxolitinib for glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2020;382(19):1800–10.
15. Socie G, Niederwieser D, Von Bubnoff N, Mohty M, Szer J, Or R, et al. Prognostic value of blood biomarkers in steroid-refractory/dependent acute graft-vs-host disease: A REACH2 analysis. *Blood*. 2023;141(22):2771–2779.
16. Zeisbrich M, Becker N, Benner A, Radujkovic A, Schmitt K, Beimler J, et al. Transplant-associated thrombotic microangiopathy is an endothelial complication associated with refractoriness of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(10):1399–405.
17. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, et al. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018;131(25):2846–55.
18. Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood*. 2013;121(4):585–94.
19. Chen J, Xiao P, Song D, Song D, Chen Z, Li H. Growth stimulation expressed gene 2 (ST2): Clinical research and application in the cardiovascular related diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1007450.
20. Kraan J, Strijbos MH, Sieuwerts AM, Foekens JA, Bakker M a. D, Verhoef C, et al. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients. *J Thromb Haemost*. 2012;10(5):931–9.
21. Farinacci M, Krahn T, Dinh W, Volk HD, Düngen HD, Wagner J, et al. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(1):49–58.
22. Ahmed FW, Rider R, Glanville M, Narayanan K, Razvi S, Weaver JU. Metformin improves circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in type 1 diabetes: MERIT study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):116.
23. Zahran AM, Aly SS, Altayeb HA, Ali AM. Circulating endothelial cells and their progenitors in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*. 2016;12(3):1965–70.
24. Beije N, Versluis J, Kraan J, Gratama JW, Sleijfer S, Cornelissen JJ. Circulating endothelial cell enumeration demonstrates prolonged endothelial damage in recipients of myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2015;100(6):e246–9.
25. Takamatsu A, Nakashima Y, Haji S, Tsuda M, Masuda T, Kimura D, et al. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells as potential predictors of acute GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2022;109(2):146–53.
26. Almici C, Skert C, Bruno B, Bianchetti A, Verardi R, Di Palma A, et al. Circulating endothelial cell count: a reliable marker of endothelial damage in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(12):1637–42.
27. Touzot F, Moshous D, Cros G, Frange P, Chomton M, Frémond ML, et al. Circulating endothelial cells as markers of endothelial dysfunction during hematopoietic stem cell transplantation for pediatric primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1203–6.
28. Lanuti P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, Budillon A, Doretto P, et al. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2016;89(3):259–70.
29. Medinger M, Heim D, Gerull S, Halter J, Krenger W, Buser A, et al. Increase of endothelial progenitor cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2016;47:22–5.



30. Lia G, Giaccone L, Leone S, Bruno B. Biomarkers for early complications of endothelial origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Do they have a potential clinical role? *Front Immunol.* 2021;12:641427.
31. Wang W, Ye Y, Du Y, Xu Z, Yuan K, Wang Y, et al. EPC infusion ameliorates acute graft-versus-host disease-related endothelial injury after allogeneic bone marrow transplantation. *Front Immunol.* 2022;13:1019657.
32. Almici C, Neva A, Skert C, Bruno B, Verardi R, Di Palma A, et al. Counting circulating endothelial cells in allo-HSCT: an ad hoc designed polychromatic flowcytometry-based panel versus the CellSearch system. *Sci Rep.* 2019;9:87.
33. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):496–503.
34. Carneiro TX, Marrese DG, dos Santos MG, Gonçalves MV, Novis YAS, Rizzatti EG, et al. Circulating extracellular vesicles as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. *Exp Hematol.* 2023;117:15–23.
35. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667–88.
36. Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation.* 2006;81(10):1405–9.
37. Wu Q, Chen H, Fang J, Xie W, Hong M, Xia L. Elevated Fas/FasL system and endothelial cell microparticles are involved in endothelial damage in acute graft-versus-host disease: a clinical analysis. *Leuk Res.* 2012;36(3):275–80.
38. Rank A, Nieuwland R, Toth B, Pihusch V, Delker R, Hiller E, et al. Microparticles for diagnosis of graft-versus-host disease after allogeneic stem transplantation. *Transplantation.* 2011;92(2):244.
39. Gavriilaki E, Sakellari I, Anyfanti P, Batsis I, Vardi A, Bousiou Z, et al. Assessment of endothelial injury and pro-coagulant activity using circulating microvesicles in survivors of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9768.
40. Lia G, Brunello L, Bruno S, Carpanetto A, Omedè P, Festuccia M, et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers of acute graft-vs-host disease. *Leukemia.* 2018;32(3):765–73.
41. Wienke J, Veldkamp SR, Struijf EM, Yousef Yengej FA, van der Wal MM, van Royen-Kerkhof A, et al. T cell interaction with activated endothelial cells primes for tissue-residency. *Front Immunol.* 2022;13:827786.
42. Storci G, Barbato F, Ricci F, Tazzari PL, De Matteis S, Tomassini E, et al. Pre-transplant CD69+ extracellular vesicles are negatively correlated with active ATLG serum levels and associate with the onset of GVHD in allogeneic HSCT patients. *Front Immunol.* 2022;13:1058739.
43. Lia G, Di Vito C, Bruno S, Tapparo M, Brunello L, Santoro A, et al. Extracellular vesicles as biomarkers of acute graft-vs.-host disease after haploidentical stem cell transplantation and post-transplant cyclophosphamide. *Front Immunol.* 2022;12:816231.
44. Marchisio M, Simeone P, Bologna G, Ercolino E, Pierdomenico L, Pieragostino D, et al. Flow cytometry analysis of circulating extracellular vesicle subtypes from fresh peripheral blood samples. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):48.
45. Stoner SA, Duggan E, Condello D, Guerrero A, Turk JR, Narayanan PK, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2016;89(2):196–206.
46. Sevcikova A, Fridrichova I, Nikolaieva N, Kalinkova L, Omelka R, Martiniakova M, et al. Clinical significance of microRNAs in hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Cancers.* 2023;15(9):2658.
47. Xie LN, Zhou F, Liu XM, Fang Y, Yu Z, Song NX, et al. Serum microRNA155 is increased in patients with acute graft-versus-host disease. *Clin Transplant.* 2014;28(3):314–23.
48. Stickel N, Prinz G, Pfeifer D, Hasselblatt P, Schmitt-Graeff A, Follo M, et al. MiR-146a regulates the TRAF6/TNF-axis in donor T cells during GVHD. *Blood.* 2014;124(16):2586–95.
49. Xie L, Zhou F, Liu X, Fang Y, Yu Z, Song N, et al. Serum microRNA181a: Correlates with the intracellular cytokine levels and a potential biomarker for acute graft-versus-host disease. *Cytokine.* 2016;85:37–44.
50. Pitea M, Canale F, Porto G, Verduci C, Utano G, Policastro G, et al. The role of microRNA in graft-versus-host-disease: a review. *Genes.* 2023;14:1796.
51. Lampignano R, Klotten V, Krahn T, Schlange T. Integrating circulating miRNA analysis in the clinical management of lung cancer: Present or future? *Mol Aspects Med.* 2020;72:100844.
52. Jodele S, Sabulski A. Reeling in complement in transplant-associated thrombotic microangiopathy: You're going to need a bigger boat. *Am J Hematol.* 2023;98(4):S57–73.
53. Iacobescu M, Pop C, Uifălean A, Mogoșan C, Cenariu D, Zdrengea M, et al. Unlocking protein-based biomarker potential for graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Front Immunol.* 2024;15:1327035.



# Tehnologije sekvenciranja pri diagnostiki mitohondrijskih bolezní

## *Advanced sequencing technologies for diagnosis of mitochondrial disorders*

**Barbara Slapnik<sup>1,2</sup>, Jernej Kovač<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Avtor za korespondenco:

**Doc. dr. Jernej Kovač, univ. dipl. biokem.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

e-pošta: jernej.kovac@kclj.si

### POVZETEK

Mitohondrijske bolezni so skupina heterogenih bolezní, večinoma povezanih s pomanjkanjem celične energije zaradi slabše mitohondrijske funkcije. So posledica genetskih sprememb na mitohondrijski DNA ali mitohondrijskih genov na jedrni DNA. Patološke genetske spremembe na mitohondrijski DNA so običajno enonukleotidne, manjše insercije in delecije ali večje strukturne preureditve mitohondrijske DNA. Diagnostika mitohondrijskih bolezní je zaradi klinične in genetske heterogenosti ter omejenih povezav med genotipom in fenotipom pogosto težavna. Tehnologija sekvenciranja naslednje generacije je izboljšala diagnostiko mitohondrijskih bolezní, zlasti tistih, ki so povezane z okvarami genov na jedrni DNA. S prihodom tehnologije sekvenciranja dolgih odčitkov se je izboljšala natančnost identifikacije strukturnih sprememb. V okviru mitohondrijskih bolezní lahko s tehnologijo sekvenciranja dolgih odčitkov izboljšamo analizo heteroplazmatskih delecij, identifikacijo velikih kompleksnih preureditev in natančnejšo lokalizacijo jedrno-mitohondrijskih zaporedij v jedrnem genomu. Tehnologija sekvenciranja naslednje generacije trenutno predstavlja standard pri molekularni diagnostiki mitohondrijskih bolezní, kljub temu pa bi lahko

z izboljšanjem natančnosti tehnologije sekvenciranja dolgih odčitkov in razvojem novih bioinformatičnih orodij tehnologijo učinkoviteje uporabljali v diagnostične namene.

**Ključne besede:** mitohondrijski genom, diagnostika mitohondrijskih bolezní, heteroplazmija, sekvenciranje dolgih odčitkov

### ABSTRACT

Mitochondrial diseases are a group of heterogeneous disorders, mostly associated with cellular energy deficiency due to impaired mitochondrial function, resulting from genetic variants in mitochondrial DNA or mitochondrial genes on nuclear DNA. Pathogenic variants on mitochondrial DNA typically involve single nucleotide variants, small indels or larger structural rearrangements of mitochondrial DNA. The diagnosis of mitochondrial diseases is often challenging due to diverse clinical manifestations and genetic heterogeneity, as well as limited associations between genotype and phenotype. Next-generation sequencing technology has improved the diagnosis of mitochondrial diseases, particularly those related to defects in »

nuclear DNA genes. The advent of long-read sequencing brings heightened precision in the identification of structural variants. In the context of mitochondrial diseases, long-read sequencing can enhance the analysis of heteroplasmic deletions, identify large complex rearrangements, and provide more accurate localization of nuclear-mitochondrial sequence in the nuclear genome. Next generation sequencing technology currently represents the standard in molecular diagnostics of mitochondrial diseases; however, by improving the accuracy of long-read sequencing and developing new bioinformatics tools, we could introduce it for diagnostic purposes.

**Key words:** mitochondrial genome, diagnostics of mitochondrial disorders, heteroplasmy, long-read sequencing

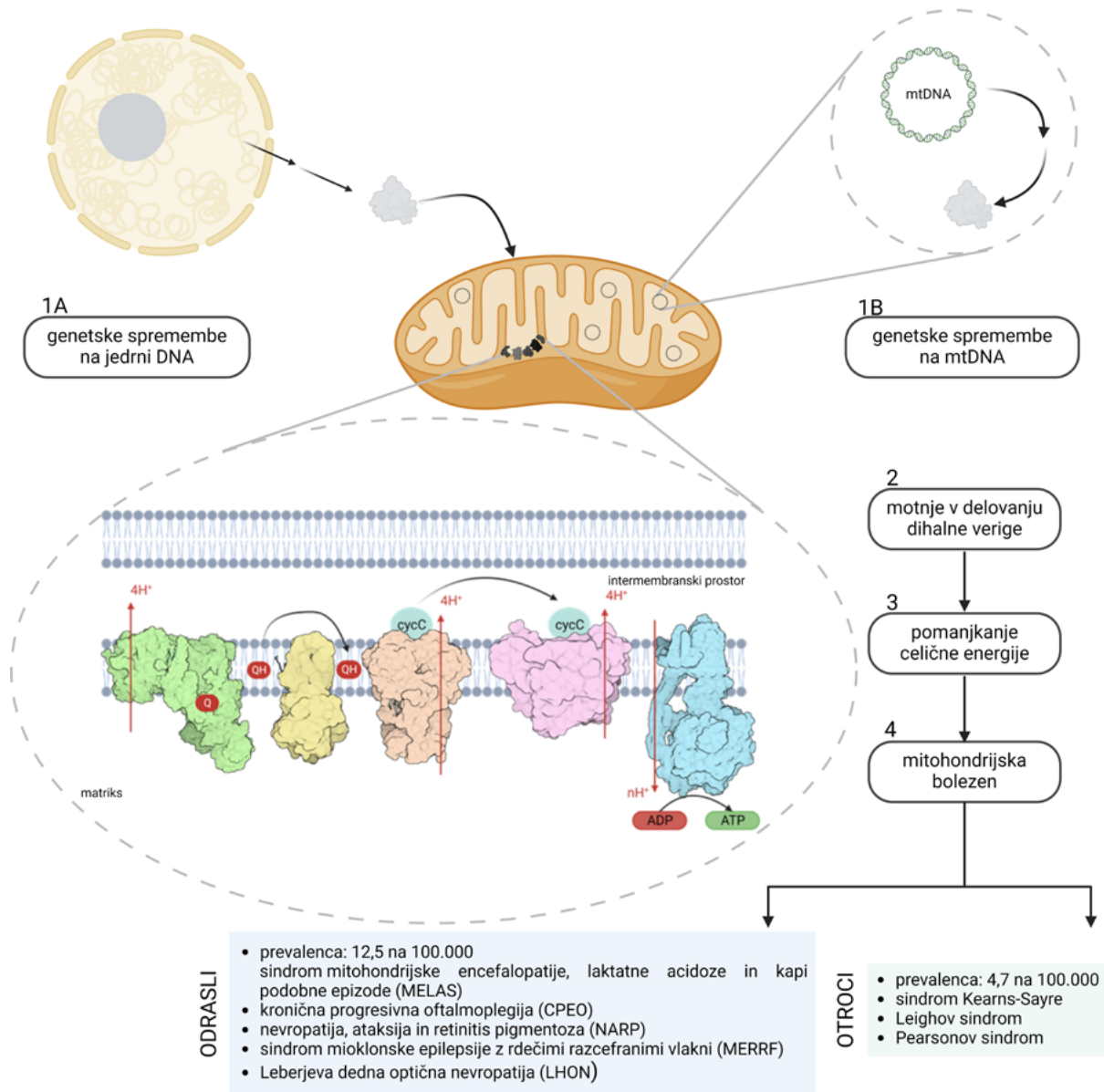
## UVOD

Mitochondriji so energijski centri evkariontskih celic, saj proizvajajo celično energijo v obliki adenozin trifosfata (ATP), ki nastaja s procesom oksidativne fosforilacije v dihalni verigi (1). Poleg tega mitochondriji sodelujejo pri presnovnih procesih in njihovi regulaciji, signaliziranju s kalcijem in programirani celični smrti (2). Za sestavljanje in delovanje mitochondrija je potrebnih približno 1200 proteinov, katerih genetski zapis se nahaja tako na jedrni kot na mitohondrijski DNA (mtDNA). Na jedrnem genomu so zapisani večina proteinov dihalne verige, proteini za replikacijo, transkripcijo in translacijo mtDNA ter proteini, ki regulirajo dinamiko mitochondrija. mtDNA je 16.569 bp dolga dvoverižna krožna molekula, ki zapisuje 13 polipeptidov dihalne verige, 22 prenašalnih RNA (tRNA) in 2 ribosomalni RNA (rRNA), ki so nujno potrebne za transkripcijo in translacijo proteinov, zapisanih na mtDNA. V matriksu mitochondrija je prisotnih več kopij mtDNA. Število kopij je odvisno od potreb po celični energiji in znaša med 100 in 1000 kopij na celico. Posameznik ima lahko identične kopije mtDNA (homoplazmija) ali več različnih kopij mtDNA (heteroplazmija) (3). Za mtDNA je značilno maternalno dedovanje, saj se mtDNA iz spermijev med spermatogenezo eliminira (4). mtDNA lahko razvrstimo v haploskupine. V posamezni haploskupini so sorodna zaporedja, ki si delijo skupne genetske spremembe in kažejo regionalno specifičnost (5). Med evolucijo evkariontske celi-

ce se lahko zaporedja mtDNA vstavljajo v jedrno DNA in nastanejo jedrno-mitohondrijska zaporedja (NUMTs) (6).

Mitohondrijske bolezni so skupina heterogenih bolezni, večinoma povezanih s pomanjkanjem celične energije zaradi slabše mitohondrijske funkcije in so posledica genetskih sprememb na mtDNA ali mitohondrijskih genov na jedrni DNA (Slika 1). Genetske spremembe na mtDNA se lahko dedujejo maternalno ali nastanejo *de novo*, medtem ko se genetske spremembe na jedrni DNA dedujejo avtosomno dominantno, avtosomno recesivno, X-vezano ali nastanejo *de novo*. Večina mitohondrijskih bolezni so multisistemski sindromi, ki vključujejo nevrološke, endokrine, kardiološke, dermatološke in gastroenterološke značilnosti. Lahko povzročajo tkivno specifična obolenja, kot so optična nevropatija, gluhost in sladkorna bolezen tipa 2. Ker je njihov klinični fenotip zelo raznolik in se lahko pojavijo pri vseh starostih ter prizadenejo različna tkiva in organe, predstavljajo precejšen klinični izziv in oteženo zdravljenje (7,8). Poleg tega je molekularna diagnostika mitohondrijskih bolezni kompleksna zaradi genetske heterogenosti, heteroplazmije in prisotnosti NUMTs. Za pojav kliničnih simptomov mora stopnja heteroplazmije presežati mejno vrednost, ki znaša med 60 % in 90 % in je odvisna od genetske spremembe ter se razlikuje med posameznimi tkivi (9,10).

Prevalenca mitohondrijskih bolezni je približno 12,5 na 100.000 odraslih (11) in 4,7 na 100.000 otrok (12). Vendar je frekvenca patoloških genetskih sprememb na mtDNA v splošni populaciji višja. Ocenjuje se, da je 1 na 250 zdravih posameznikov prenašalec nizkostonpenjske heteroplazmije s patološko genetsko spremembo na mtDNA (13). Med mitohondrijske bolezni, ki se večinoma pojavijo v zgodnjem otroštvu, uvrščamo sindrom Kearns-Sayre, Leighov sindrom in Pearsonov sindrom. Za te sindrome je značilen težji potek bolezni, klinični simptomi lahko obsegajo hipotonijo, splošno šibkost, počasen razvoj, utrujenost, bruhanje in encefalopatije. Med mitohondrijske bolezni, ki so pogostejše pri odraslih, vendar se lahko pojavljajo tudi pri otrocih, uvrščamo sindrom mitohondrijske encefalopatije, laktatne acidoze in kapi podobne epizode (MELAS), kronično progresivno oftalmoplegijo (CPEO), nevropatijo, ataksijo in retinitis pigmentozo (NARP), sindrom mioklonске epilepsije z rdečimi razcefranimi vlakni (MERRF) in Leberjevo dedno optično nevropatijo (LHON) (Slika 1) (7). >>



**Slika 1: Mitohondrijske bolezni.** Mitohondrijske bolezni so posledica genetskih sprememb na jedrni DNA, ki zapisujejo proteine, potrebne za delovanje mitohondrija (1A) ali genetskih sprememb na mtDNA (1B). Zaradi genetskih sprememb pride do motenj dihalne verige (2) in posledično do pomanjkanja celične energije (3). Prevalenca mitohondrijskih bolezni pri otrocih je 4,7 na 100.000 otrok, za njih je značilen težji potek bolezni, medtem ko je prevalenca mitohondrijskih bolezni pri odraslih 12,5 na 100.000 odraslih. Pripravljeno z BioRender.com.

**Figure 1: Mitochondrial diseases.** Mitochondrial diseases are caused by genetic variants in nuclear DNA, which encodes proteins essential for mitochondrial function (1A), or by genetic variants in mtDNA (1B). Due to these genetic variants, the respiratory chain is disrupted (2), leading to a deficiency in cellular energy (3). The prevalence of mitochondrial diseases is 4.7 per 100,000 children, who experience a more severe course of the disease, compared to a prevalence of 12.5 per 100,000 adults. Created with BioRender.com



Razvoj sekvenciranja naslednje generacije (NGS) je povzročil revolucijo na področju diagnostike genetskih bolezni, saj je genetska analiza postala hitrejša in cenejša. Za tehnologije NGS so značilni kratki odčitki, dolgi 300–500 bp (14). Kljub vsem prednostim, ki jih tehnologija NGS prinaša, se za analizo posameznih regij v diagnostiki uporablja tudi sekvenciranje po Sangerju. V zadnjem času se hitro razvija in izboljšuje sekvenciranje dolgih odčitkov, kamor uvrščamo tehnologiji proizvajalca Oxford Nanopore Technologies (ONT) in Pacific Biosciences (PacBio). Dolgi odčitki (>10 kbp) olajšajo opredelitev večjih insercij, delecij, translokacij in drugih strukturnih sprememb. Poleg tega bistveno izboljšajo kakovost *de novo* sestavljenih genomov in omogočajo detekcijo epigenetske informacije, brez posebne predpriprave vzorca (15). Namen preglednega članka je opisati tehnologijo ONT in prikazati prednosti, ki jih tehnologija ONT prinaša v diagnostiko mitohondrijskih bolezni.

## GENETSKA DIAGNOSTIKA MITOHONDRIJSKIH BOLEZNI

Diagnostika mitohondrijskih bolezni je zaradi klinične in genetske heterogenosti ter omejenih povezav med genotipom in fenotipom pogosto težavna, zato je za učinkovito genetsko diagnostiko ključen multidisciplinaren pristop. S prihodom tehnologije NGS se je spremenil način, kako pristopamo k diagnozi mitohondrijskih bolezni. Pri tradicionalnem pristopu so se najprej opravile biokemične in slikovne preiskave, nato pa mišična biopsija in histokemične preiskave, katerih rezultati so pripomogli k usmeritvi tarčnih molekularnih analiz. Z razširjeno uporabo tehnologije NGS se za diagnostiko mitohondrijskih bolezni najprej opravi genetsko testiranje DNA izolirane iz krvi (10,16).

Tehnologija NGS je izboljšala diagnostiko mitohondrijskih bolezni, zlasti tistih, ki so povezane z okvarami genov na jedrni DNA (17,18). NGS omogoča sočasno sekvenciranje in analizo mtDNA in jedrnih genov, povezanih z mitohondrijskimi boleznimi. Za sekvenciranje se uporablja oba pristopa, sekvenciranje celotnega eksoma (WES) in

sekvenciranje celotnega genoma (WGS). Pri WES so za obogatitev mtDNA potrebne dodatne sonde, ki se specifično hibridizirajo na mtDNA. Tako lahko dosežemo globoko pokritost mtDNA, kar bistveno izboljša odkrivanje nizkostonenjskih mitohondrijskih heteroplazmij. Z NGS sekvenciranjem in sistematično analizo celotnega mitohondrijskega genoma lahko dosežemo boljšo občutljivost v primerjavi z usmerjenim testiranjem patoloških genetskih sprememb posameznih genov, vendar pa obsežnejše testiranje poveča verjetnost odkritja genetskih sprememb z nejasnim kliničnim pomenom (VUS). Genetska sprememba je klasificirana kot VUS, ker v času njenega odkritja ni dovolj dokazov, ki bi jo lahko zanesljivo povezali kot vzročno za določen fenotip. Z novimi odkritji se lahko VUS spremeni v patološko, verjetno patološko, benigno ali verjetno benigno spremembo (16).

Patološke genetske spremembe na mtDNA so običajno enonukleotidne (SNV) ali manjše insercije in delecije, ki zapisujejo proteine ali mitohondrijske tRNA. Točkovne genetske spremembe v protein kodirajočih genih okvarijo funkcijo dihalne verige. Medtem ko točkovne genetske spremembe v tRNA zmanjšajo dostopnost mitohondrijskih prenašalnih RNA (mt-tRNA), kar okvari mitohondrijsko translacijo. V tRNA genih je več kot polovica vseh patoloških točkovnih genetskih sprememb na mtDNA (19). Patološke genetske spremembe so lahko tudi večje preureditve na mtDNA, kot je pogostejša 4,9 kbp mtDNA delecija (20,21). Posamezne delecije v mtDNA se običajno pojavijo v začetku razvoja zarodka in so prisotne v vseh celicah prizadetih tkiv (19). Do zdaj so znane patološke genetske spremembe v več kot 400 genih na jedrni DNA in v več kot 30 genih na mtDNA, ki so vzrok mitohondrijskih bolezni (22). Pri genetskih spremembah na mtDNA je verjetnost detekcije odvisna od same genetske spremembe, vrste vzorca in starosti bolnika.

Ker je stopnja heteroplazmije in količina mtDNA tkivno specifična, je tudi za genetsko analizo zelo pomemben izbor vzorca. Pri mitohondrijskih boleznih je mišica pogosto klinično prizadeto tkivo, zato je optimalna za analizo mtDNA in je hkrati izjemno pomembna za histološke in histokemične preiskave ter študije encimov dihalne verige. Izbira ustrezne mišice za biopsijo je ključnega pomena za natančno diagnozo, pri čemer moramo upoštevati vpletenost mišice v bolezen in njeno dostopnost. Za biopsijo je stegenska mišica pogosto mišica izbora, saj omogoči »

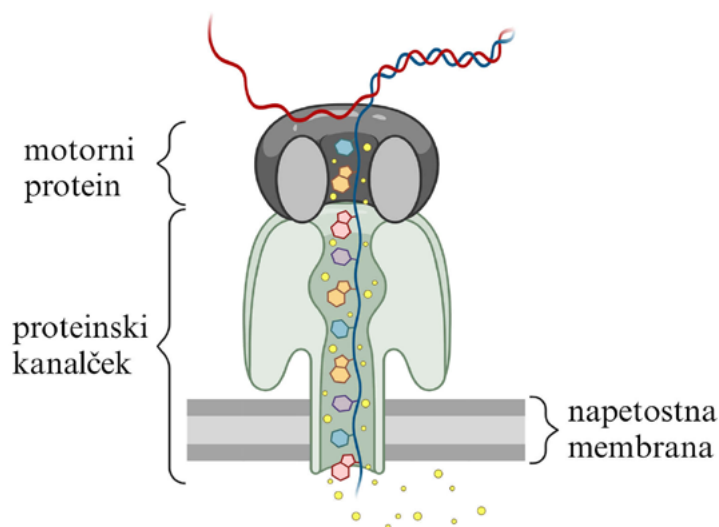
odvzem večjega vzorca, ki se uporabi za več diagnostičnih testov. Za določitev najboljšega mesta biopsije se prej izvede slikanje z magnetno resonanco (MRI), na podlagi katerega lahko ocenimo morfologijo in patologijo mišice (23). Mišična biopsija je invazivna metoda, zato se običajno najprej odvzame periferna kri, ki ni optimalen vzorec. V krvi se lahko stopnja heteroplazmije čez čas zmanjšuje. Delež MT-TL1 m.3243A>G naj bi se vsako leto zmanjšal za 1 %, zato je ta genetska sprememba pri starejših bolnikih z blažjimi oblikami velikokrat spregledana (24). Poleg tega se v hitro delečih celicah, kot so limfociti, zmanjšuje tudi delež posameznih preureditev na mtDNA (25). V nekaterih primerih je lahko urin vzorec izbora, saj je stopnja heteroplazmije v tem vzorcu stabilna in v nekaterih primerih (npr. MT-TL1 m.3243A>G) tesneje povezana s stopnjo heteroplazmije v mišici. Urin se je izkazal primerne tudi za detekcijo posameznih delecij (26). Kljub temu je v primerih, ko je rezultat negativen in obstaja klinični sum, potrebna mišična biopsija (16).

Za ustrezno interpretacijo genetskih sprememb na jedrni DNA in določanje patološkosti je ključno slediti najnovejšim smernicam, ki jih določa Ameriški zdravniški kolegij za medicinsko genetiko in genomiko (ACMG) (27). Razvrstitev genetskih sprememb na mtDNA glede na patološkost je pogosto bolj zahtevna. Za njihovo interpretacijo se uporabljajo nedavno objavljene ACMG smernice za mtDNA (28) ter podatkovna zbirka MITOMAP (29), ki velja za najboljšežnejši vir podatkov genetskih sprememb na mtDNA in se redno posodablja. Pri interpretaciji je treba upoštevati še pogostost v populaciji, haploskupine, heteroplazmijo in evolucijsko ohranjenost in funkcionalnost. Genetske spremembe, ki se v splošni populaciji pojavljajo s pogostostjo več kot 1/1000 kuriranih zaporedij GenBank v podatkovni zbirki MITOMAP (29) ali več kot 1/1000 homoplazmatskih zaporedij v gnomAD (30) in niso povezane z boleznijo, verjetno niso patološke. Haploskupine mtDNA opredeljujejo geografski izvor sprememb na mtDNA, ki so se nakopičile med evolucijo človeka. MITOMASER je dostopen na spletni strani MITOMAP (29) in zagotavlja napoved porazdelitve genetskih sprememb v različnih haploskupinah, ki se lahko upošteva pri ocenjevanju pogostosti genetske spremembe. Večina patoloških genetskih sprememb na mtDNA je heteroplazmatskih (31). Natančna določitev stopnje heteroplazmije je pomembna in se mora interpretirati ob upoštevanju testiranega tkiva. Stopnja heteroplazmatske genetske spremembe v klinič-

no prizadetem tkivu se mora ujemati s klinično sliko in z vsemi dodatnimi rezultati histokemičnih in biokemijskih preiskav. Za evolucijsko ohranjenost aminokislin in nukleotidov med različnimi vrstami se uporabljajo in silico orodja za napovedovanje, ki ocenjujejo variabilnost protein-kodirajočih regij. Posebno pozornost je potrebno nameniti genetskim spremembam mt-tDNA, pri katerih je še posebej pomembno oceniti vpliv spremembe na strukturo in funkcijo. Pri interpretaciji genetskih sprememb na mt-tRNA se uporabljajo podatkovne baze, kot je MitoTIP (32).

## SEKVENCIANJE DOLGIH ODČITKOV PRI MITOHONDRIJSKIH BOLEZNIH

Sekvenciranje dolgih odčitkov s tehnologijo ONT temelji na zaznavanju sprememb v električnem toku, ki nastanejo pri potovanju molekule DNA skozi proteinski kanalček – nanoporo. Sistem je sestavljen iz dveh komor, med katerima je napetostna razlika in sta ločeni z napetostno membrano. Napetostna razlika povzroči ionski tok skozi nanoporo in omogoči prehod enoverižne DNA. Pri prehodu DNA sodeluje motorni protein, ki odvijata dvovertižno DNA in skupaj z električnim tokom omogoči kontroliran prehod enoverižne DNA skozi nanoporo (Slika 2). Med sekvenciranjem se generirajo dolgi odčitki s povprečno dolžino več kot 10 kb, kar ima mnoge prednosti pred NGS tehnologijami, za katere so značilni kratki odčitki (150–300 bp) (33). Tehnologija ONT omogoča, da lahko celoten mitohondrijski genom v velikosti ~16,6 kb sekvenciramo z enim samim odčitkom (34). V okviru mitohondrijskih bolezni lahko s sekvenciranjem z dolgimi odčitki izboljšamo analizo heteroplazmatskih delecij, identifikacijo velikih kompleksnih preureditev, ki jih je težko zaznati s kratkimi odčitki, in natančnejšo lokalizacijo NUMTs v jedrnem genomu, saj dolgi odčitki zajamejo tako NUMTs kot sosednja jedrna zaporedja. Kljub mnogim prednostim, ki jih prinašajo dolgi odčitki, je ONT manj natančna pri identifikaciji SNV in majhnih insercij in delecij v primerjavi s tehnologijo NGS (35). >>



**Slika 2: Sekvenciranje dolgih odčitkov s tehnologijo ONT.** Sistem je sestavljen iz proteinskega kanalčka – nanopore, motornega proteina in napetostne membrane. Motorni protein odvija dvovertično DNA in skupaj z električnim tokom omogoči kontroliran prehod DNA skozi nanoporo. Pripravljeno z BioRender.com.

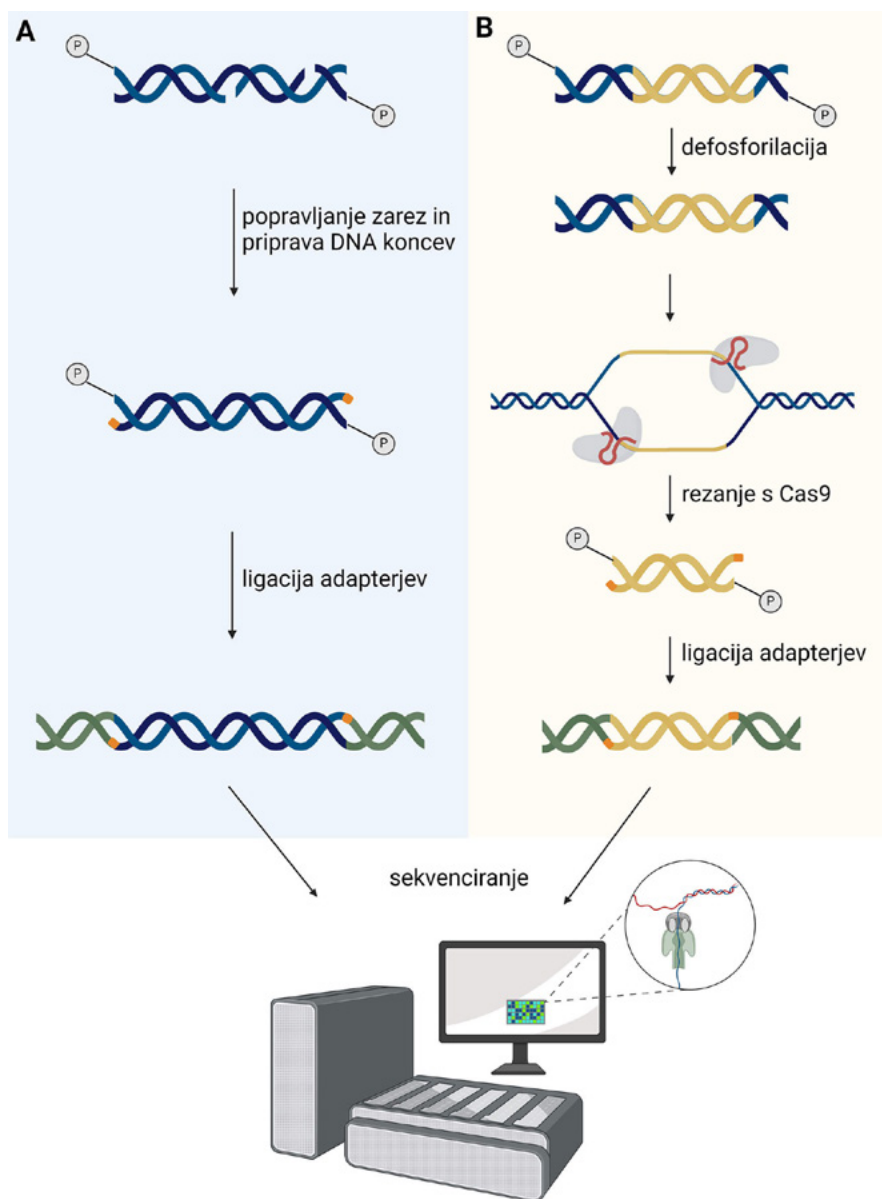
**Figure 2: Long-read sequencing using ONT technology.** The system comprises a protein nanopore, a motor protein, and a voltage membrane. The motor protein unwinds double-stranded DNA and, with the aid of an electric current, guides the controlled passage of the DNA strand through the nanopore. Created with BioRender.com

Za sekvenciranje s tehnologijo ONT moramo najprej pripraviti knjižnico. Za WGS popravimo zarezne na DNA (angl. *DNA nicks*), ki nastanejo ob izolaciji in tekom hranjenja vzorca, ter popravimo konce DNA tako, da postanejo primerni za ligacijo adapterjev. Sledi dodajanje adapterjev z motornim proteinom, ki med samim sekvenciranjem odvija DNA. Tako pripravljeno knjižnico nanese na prečno celico, kjer poteka sekvenciranje (Slika 3A).

ONT poleg WGS omogoča usmerjeno sekvenciranje mtDNA. mtDNA lahko obogatimo z uporabo encima Cas9, s čimer se izognemo PCR pomnoževanju mtDNA.

Pri usmerjenem sekvenciranju mtDNA se najprej načrtuje usmerjevalno RNA (sgRNA), ki določa mesto reza z encimom Cas9 na mtDNA. Celokupno DNA je potrebno s fosfatazo defosforilirati in ji dodati Cas9 z vstavljenjo sgRNA. Cas9 na mestu reza ustvari fosforilirane konce, kar omogoči ligacijo adapterskih zaporedij le na tarčno regijo. S takšnim usmerjenim sekvenciranjem mtDNA dobimo dobro pokritost mtDNA za uporabo v diagnostične namene (36) (Slika 3B).

>>



**Slika 3: Sekvenciranje s tehnologijo ONT.** (A) Priprava knjižnice za sekvenciranje celotnega genoma. (B) Priprava knjižnice za usmerjeno sekvenciranje izbrane regije. Pripravljeno z BioRender.com.

**Figure 3: Sequencing with ONT.** (A) Library preparation for whole genome sequencing. (B) Library preparation for targeted sequencing of a specific region. Created with BioRender.com.

Tehnologija ONT zaradi dolgih odčitkov izboljša identifikacijo, opredelitev in kvantifikacijo večjih strukturnih preureditev na mtDNA. Zaradi enakomerne pokritosti je identifikacija delecij in duplikacij lažja, saj jih opredelimo glede na globino pokritosti čez celoten mitohondrij-

ski genom. Hkrati bo zaradi dolžine odčitkov, ki jih pridobimo s sekvenciranjem, posamezna delecija razvidna že v posameznem odčitku (37). Z ONT lahko dosežemo tudi boljšo resolucijo točk preloma, saj je pri dolgih odčitkih večja verjetnost, da bo posamezna sprememba znotraj »

posameznega odčitka. To izboljša bioinformatično identifikacijo strukturnih sprememb in sprememb v številu kopij (CNV) (38). Med pripravo knjižnice za sekvenciranje z ONT DNA ne pomnožimo s PCR, kar nam omogoči natančnejšo oceno deleža DNA molekul z delecijo v primerjavi z molekulami divjega tipa (34,36). S tehnologijo ONT lahko prepoznavamo kompleksne preureditve z velikimi podvojitvami, saj dolgi odčitki vključujejo tudi podvojeno regijo (39,40) in tako omogočajo identifikacijo zapletenih preureditev, ki bi jih druge tehnologije zaradi fragmentacije med pripravo lahko zgrešile (35).

Tehnologija ONT prinaša inovacije v diagnostiko mitohondrijskih bolezni, predvsem zaradi sposobnosti natančnejše identifikacije obsežnih strukturnih preureditev. Poleg tega s tehnologijo sekvenciramo nativno DNA, kar dodatno omogoči še zaznavanje epigenetskih modifikacij, ki bodo verjetno v prihodnosti pomemben element tudi pri diagnostiki mitohondrijskih bolezni. Zaradi vseh prednosti, ki jih tehnologija prinaša, in z razvojem zanesljivih bioinformatičnih orodij bo verjetno v prihodnosti tehnologija ONT postala pomemben diagnostični element, saj bo omogočila še bolj natančno in celostno razumevanje genetskih mehanizmov.

## ZAKLJUČEK

Mitohondrijske bolezni obsegajo širok nabor kliničnih znakov, ker so posledica genetskih sprememb tako na jedrnem kot tudi na mitohondrijskem genomu. Genetska diagnostika bolezni je kompleksna zaradi njihove genetske heterogenosti, prisotnosti jedrno-mitohondrijskih zaporedij ter učinka stopnje heteroplazmije pri izražanju kliničnih simptomov. Diagnostika teh bolezni je ključna za opredelitev bolezenskega stanja in dodatne informacije o prognozi ter zdravljenju. Tehnologija sekvenciranja dolgih odčitkov prinaša inovacije z natančnejšo identifikacijo strukturnih sprememb, vendar bodo za njeno uporabo v diagnostične namene potrebni dodatne raziskave in validacija metode za detektiranje genetskih sprememb.

## LITERATURA

- Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(6):711–23.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiaik S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol.* 2006;16(14):R551–60.
- Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.* 2013;106(1):135–59.
- Lee W, Zamudio-Ochoa A, Buchel G, Podlesniy P, Marti Gutierrez N, Puigròs M, et al. Molecular basis for maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 2023;55(10):1632–9.
- Mitchell SL, Goodloe R, Brown-Gentry K, Pendergrass SA, Murdock DG, Crawford DC. Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Hum Genet.* 2014;133(7):861–8.
- Wei W, Pagnamenta AT, Gleadall N, Sanchis-Juan A, Stephens J, Broxholme J, et al. Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat Commun.* 2020;11(1):1740.
- Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16080.
- Aldossary AM, Tawfik EA, Alomary MN, Alsudir SA, Alfahad AJ, Alshehri AA, et al. Recent advances in mitochondrial diseases: From molecular insights to therapeutic perspectives. *Saudi Pharm J.* 2022;30(8):1065–78.
- Rosignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 2003;370(Pt 3):751–62.
- Schon KR, Ratnaike T, van den Ameel J, Horvath R, Chinnery PF. Mitochondrial diseases: A diagnostic revolution. *Trends Genet.* 2020;36(9):702–17.
- Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol.* 2015;77(5):753–9.
- Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain.* 2003;126(Pt 8):1905–12.
- Wei W, Tuna S, Keogh MJ, Smith KR, Aitman TJ, Beales PL, et al. Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity. *Science.* 2019;364(6442):eaau6520.
- Vrijenhoek T, Kraaijeveld K, Elferink M, De Ligt J, Kranendonk E, Santen G, et al. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(9):1142–50.
- Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020;21(10):597–614.
- Mavraki E, Labrum R, Sergeant K, Alston CL, Woodward C, Smith C, et al. Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines. *Eur J Hum Genet.* 2023;31(2):148–63.





17. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inher Metab Dis*. 2015;38(3):437–43.
18. Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, et al. Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA*. 2014;312(1):68–77.
19. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(2):113–28.
20. Rocha MC, Rosa HS, Grady JP, Blakely EL, He L, Romain N, et al. Pathological mechanisms underlying single large-scale mitochondrial DNA deletions. *Ann Neurol*. 2018;83(1):115–30.
21. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med*. 1989;320(20):1293–9.
22. Schlieben LD, Prokisch H. The dimensions of primary mitochondrial disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:600079.
23. Joyce NC, Oskarsson B, Jin LW. Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012;23(3):609–31.
24. Rahman S, Poulton J, Marchington D, Suomalainen A. Decrease of 3243 A>G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: A longitudinal study. *Am J Hum Genet*. 2001;68(1):238–40.
25. Poulton J, Deadman ME, Turnbull DM, Lake B, Gardiner RM. Detection of mitochondrial DNA deletions in blood using the polymerase chain reaction: non-invasive diagnosis of mitochondrial myopathy. *Clin Genet*. 1991;39(1):33–8.
26. McDonnell MT, Schaefer AM, Blakely EL, McFarland R, Chinnery PF, Turnbull DM, et al. Noninvasive diagnosis of the 3243A > G mitochondrial DNA mutation using urinary epithelial cells. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(9):778–81.
27. 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.
28. McCormick EM, Lott MT, Dulik MC, Shen L, Attimonelli M, Vitale O, et al. Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Hum Mutat*. 2020;41(12):2028–57.
29. MITOMAP [Internet]. [cited 2024 Mar 20]. Available from: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/WebHome>
30. Gudmundsson S, Singer-Berk M, Watts NA, Phu W, Goodrich JK, Solomonson M, et al. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Hum Mutat*. 2022;43(8):1012–30.
31. Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10654–9.
32. Sonney S, Leipzig J, Lott MT, Zhang S, Procaccio V, Wallace DC, et al. Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(12):e1005867.
33. Mantere T, Kersten S, Hoischen A. Long-read sequencing emerging in medical genetics. *Front Genet*. 2019;10:426.
34. Keraite I, Becker P, Canevazzi D, Frias-López C, Dabad M, Tonda-Hernandez R, et al. A method for multiplexed full-length single-molecule sequencing of the human mitochondrial genome. *Nat Commun*. 2022, 13(1):5902.
35. Macken WL, Falabella M, Pizzamiglio C, Woodward CE, Scotchman E, Chitty LS, et al. Enhanced mitochondrial genome analysis: bioinformatic and long-read sequencing advances and their diagnostic implications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2023;23(9):797–814.
36. Vandiver AR, Pielstick B, Gilpatrick T, Hoang AN, Vernon HJ, Wanagat J, et al. Long read mitochondrial genome sequencing using Cas9-guided adaptor ligation. *Mitochondrion*. 2022;65:176–83.
37. Frascarelli C, Zanetti N, Nasca A, Izzo R, Lamperti C, Lamantea E, et al. Nanopore long-read next-generation sequencing for detection of mitochondrial DNA large-scale deletions. *Front Genet*. 2023;14:1089956.
38. Wood E, Parker MD, Dunning MJ, Hesketh S, Wang D, Pink R, et al. Clinical long-read sequencing of the human mitochondrial genome for mitochondrial disease diagnostics. *bioRxiv*. 2019;597187.
39. Nicholls TJ, Zsurka G, Peeva V, Schöler S, Szczesny RJ, Cysewski D, et al. Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. *Hum Mol Genet*. 2014;23(23):6147–62.
40. Odoardi F, Rana M, Broccolini A, Mirabella M, Modoni A, D'Amico A, et al. Pathogenic role of mtDNA duplications in mitochondrial diseases associated with mtDNA deletions. *Am J Med Genet A*. 2003;118A(3):247–54.

# Sekvenciranje RNA in primer uporabe v diagnostiki

## *RNA sequencing and example of diagnostic use*

**Nika Breznik<sup>1</sup>, Klementina Črepinšek<sup>2,3</sup>, Maruša Debeljak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

<sup>3</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Avtor za korespondenco:

**asist. Nika Breznik, mag. lab. biomed.**

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

### POVZETEK

Sekvenciranje RNA je napredna molekularna tehnika, ki omogoča preučevanje transkriptov. Prvi korak pri sekvenciranju RNA je izolacija RNA iz biološkega vzorca, ki ji sledijo priprava knjižnice RNA, sekvenciranje in bioinformatična analiza. Glavna cilja sekvenciranja sta kvantifikacija in primerjava izražanja genov med različnimi pogoji, kar nam omogoča vpogled v biološko funkcijo analiziranih genov. Kljub številnim prednostim ima sekvenciranje RNA tudi nekatere omejitve in pomanjkljivosti. Eni izmed glavnih pomanjkljivosti sta nestabilnost RNA in občutljivost na razgradnjo z RNazami, ki se jih težko znebimo, zato je potrebna skrbna priprava vzorca. Klinična uporaba te tehnologije je prikazana na primeru bolnika z B-celično akutno limfoblastno levkemijo.

**Ključne besede:** sekvenciranje RNA, analiza različnega izražanja genov

### ABSTRACT

RNA sequencing is an advanced molecular technique that allows the transcriptomes to be studied in detail, representing a remarkable advance in transcriptome studies. The first step in RNA sequencing is the isolation of RNA from a biological sample, followed by RNA library preparation, sequencing, and bioinformatics analysis. The main objective is to quantify and compare gene expression between different conditions, providing insights into the biological function of the genes analyzed. Despite its numerous advantages, RNA sequencing also has certain limitations and drawbacks. These include the instability of RNA and its susceptibility to degradation by RNAses, which are difficult to remove and require careful sample preparation. The clinical application of this technology is demonstrated using the example of a patient with B-cell acute lymphoblastic leukaemia.

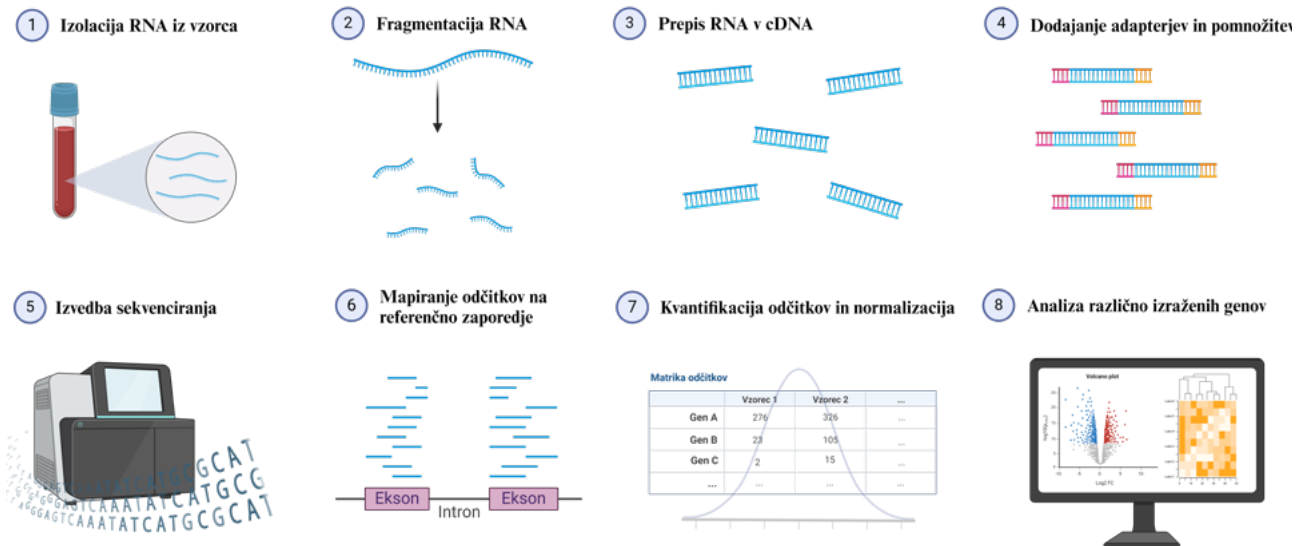
**Key words:** RNA sequencing, differential gene expression analysis >>

## UVOD

Sekvenciranje RNA je sodobna molekularna tehnika, ki omogoča vpogled v transkriptome številnih celic in tkiv. Prinesla je izjemen napredek na področju transkriptomskih študij. V primerjavi z mikromrežami je sekvenciranje RNA bolj občutljivo in ponuja številne aplikacije zaradi širokega dinamičnega razpona, možnosti prepoznavanja novih transkriptov ter ločljivosti na ravni posameznega nukleotida (1). Glavni cilj analize transkriptoma je običajno kvantificirati in primerjati izražanje genov med različnimi stanji in na podlagi teh podatkov sklepati o biološki funkciji analiziranih genov (2). Podatki, pridobljeni s sekvenciranjem RNA, se lahko uporabljajo pri anotaciji – procesu določanja lokacije in zaporedja genomskih elementov ter določanja njihove biološke funkcije. Medtem ko se za anotacijo uporabljajo tudi genomski podatki, transkriptomski podatki omogočajo pridobitev informacij o nekaterih elementih, ki jih zgolj z uporabo genomskih podatkov ni mogoče zaznati (npr. neprevedene regije UTR, nekodirajoče RNA in posttranskripcijski dogodki) (3).

Sekvenciranje RNA omogoča tudi odkrivanje različnega alternativnega spajanja – razlik v vzorcih spajanja eksonov med različnimi biološkimi pogoji. Alternativno spajanje eksonov je zelo razširjen mehanizem uravnavanja izražanja genov (4), pri čemer lahko napake v tem sistemu povzročajo številne bolezni (5). Nadaljnji napredek v zmogljivostih in dolžinah odčitkov tehnologij NGS je olajšal tudi odkrivanje fuzijskih transkriptov, ki jih pogosto najdemo v tumorskih celicah in lahko služijo kot bioznačevalci ali terapevtske tarče (6), poleg tega pa lahko analiziramo tudi prisotnost variant v kodirajočih delih genoma (7). V nadaljevanju bomo najprej opisali potek sekvenciranja RNA, od izolacije RNA iz biološkega vzorca do priprave knjižnic RNA in bioinformatične analize (Slika 1), nato bomo izpostavili nekaj pomanjkljivosti in omejitev sekvenciranja RNA. Na koncu bomo na kliničnem primeru predstavili še opis poteka sekvenciranja RNA pri bolniku z B-celično akutno limfoblastno levkemijo (B-ALL).

## Sekvenciranje RNA



Slika 1: Shema poteka sekvenciranja RNA, od izolacije RNA do analize različno izraženih genov. Posamezni koraki, ki so prikazani na shemi, so podrobneje razloženi v besedilu. Shema je bila pripravljena z BioRenderjem.

Figure 1: Image of RNA sequencing, from RNA isolation to the analysis of differentially expressed genes. The individual steps shown in the image are explained in more detail in the review. The image was created using BioRender.



## IZOLACIJA RNA

Prvi korak pri sekvenciranju RNA je izolacija RNA iz biološkega vzorca, ki jo lahko izvedemo iz gojenih celic, periferne krvi, kostnega mozga, plazme, seruma in drugih telesnih tekočin ali tkiv. Izolacija je možna tako iz svežega kot tudi zamrznjenega tkiva ali celo iz s formalinom fiksiranih vzorcev, vklopljenih v parafin (8). Za izolacijo RNA se najpogosteje uporabljajo pripravljene reagenčni kompleti, ki omogočajo učinkovito in kakovostno izolacijo (9). Pred začetkom priprave knjižnice je treba izolirati RNA določiti koncentracijo in kakovost (10). Za ocenjevanje kakovosti oz. degradiranosti RNA se uporablja parameter RIN (angl. *RNA integrity number*), katerega vrednosti so od 1 (popolnoma degradirana RNA) do 10 (intaktna RNA) (11).

## PRIPRAVA KNJIŽNIC RNA

### Obogatitev mRNA ali odstranitev rRNA

V celici najdemo več različnih zvrsti RNA, kar od 80 do 90 % vseh molekul RNA predstavlja ribosomalna RNA (rRNA), ki nas v procesu sekvenciranja ne zanima in jo je treba v prvem koraku priprave knjižnice odstraniti (12). To lahko naredimo s selekcijo poli-A koncev ali z deplecijo rRNA. Pri prvem pristopu uporabimo oligo-dT sonde, ki se povežejo s poli-A repi na zreli mRNA, in jih osamimo s pomočjo magnetnih kroglic. Vendar degradirani vzorci in številne nekodirajoče RNA, kot so mikro RNA (miRNA), ne vsebujejo poli-A koncev in jih z uporabo tega pristopa izgubimo. Za sekvenciranje celotnega transkriptoma je tako primernejši pristop deplecija rRNA, pri kateri uporabimo oligonukleotidne sonde s specifičnim zaporedjem, komplementarnim citoplazemskim in mitohondrijskim rRNA (13). Nastale oligo-DNA:RNA hibride nato odstranimo s pomočjo magnetnih kroglic (14) ali jih razgradimo z RNazo H (15).

### Fragmentacija RNA in dodajanje adapterjev

Odstranitvi rRNA sledi fragmentacija RNA, potrebna zaradi velikostne omejitve večine tehnologij sekvenciranja. Mogoči sta kemijska ali encimska fragmentacija. Kemijska fragmentacija poteka z uporabo alkalnih raztopin ali

raztopin z dvovalentnimi kationi (npr.  $Mg^{2+}$  ali  $Zn^{2+}$ ) pri povišani temperaturi, običajno pri 70 °C (16). Encimska fragmentacija poteka z različnimi encimi, kot je RNaza III (17). Fragmentacija ni povsem naključna in je lahko vir povečane zastopanosti določenih regij RNA. Fragmentirano RNA nato z naključnimi heksameri prepisemo v komplementarno DNA (cDNA). Redkeje se najprej izvede reverzna transkripcija RNA v cDNA in nato fragmentacija cDNA (18). Ta se običajno izvaja z ultrazvočnimi valovi ali z DNazami. Fragmentirani cDNA v nadaljevanju dodamo adapterje, ki omogočajo klonalno pomnožitev knjižnice in njeno sekvenciranje. Adapterje lahko dodamo na več različnih načinov, vendar je treba paziti, da pri tem ohranimo informacijo o smeri RNA (19). Z uporabo metode dUTP je mogoče ohraniti informacijo o smeri RNA. S to metodo se med sintezo cDNA pri pripravi knjižnice namesto dTTP uporabljajo dUTP, ki se vgradijo v drugo verigo. Pred pomnoževanjem PCR se druga veriga, ki vsebuje uracile, razgradi z uracil-N-glikozilazo, tako da se pomnoži samo prva veriga (20). Takšna priprava knjižnice omogoča določitev izražanja prekrivajočih genov, torej tistih genov, ki imajo vsaj delno prekrivajoče genomske koordinate, a se prepisujejo iz različnih verig (21). Posameznim vzorcem lahko v procesu priprave knjižnice dodamo tudi indekse oz. molekularne črtne kode, ki omogočajo identifikacijo posameznega vzorca po sekvenciranju. Z uporabo indeksov lahko pripravljene knjižnice združimo in s tem povečamo učinkovitost ter zmanjšamo stroške sekvenciranja.

### Klonalna amplifikacija knjižnice

Pripravljene knjižnice, označene z adapterji, je treba pred sekvenciranjem pomnožiti s PCR. Razlike v velikosti in sestavi cDNA lahko kljub le majhnemu številu ciklov povzročijo neenakomerno pomnoževanje. Za popravljanje pristranskosti PCR se lahko uporabljajo molekularne oznake, imenovane edinstveni molekularni identifikatorji (UMI, angl. *unique molecular identifiers*), ki omogočajo odstranitev PCR duplikatov (22). UMI so običajno vgrajeni v adaptersko zaporedje in se dodajo cDNA pred pomnoževanjem. Razlikujejo se po velikosti (številu baz) in kompleksnosti. Lahko so sestavljeni iz določenega ali naključnega zaporedja. Molekularno označevanje je še posebej uporabno pri manjših količinah vhodne RNA, kjer je potrebno večje število ciklov pomnoževanja (23).

»

## Sekvenciranje

Sekvenciranje RNA se izvaja na enakih platformah kot sekvenciranje celotnega eksoma ali celotnega genoma. Najpogosteje se uporablja tehnologija Illumina, ki omogoča sekvenciranje z visoko natančnostjo in zmogljivostjo. Določimo lahko zaporedje enega ali obeh koncev fragmenta DNA. Sekvenciranje s parnimi konci omogoča natančnejšo mapiranje odčitkov na referenčni genom (24).

## BIOINFORMATSKA ANALIZA

Po končanem sekvenciranju sledi bioinformatška analiza. Svetlobne ali električne signale, pridobljene med sekvenciranjem, najprej pretvorimo v nukleotidno zaporedje, med tem pa s pomočjo uporabljenih indeksov tudi določimo, kateri signali pripadajo kateremu vzorcu. Za vsak vzorec dobimo datoteko formata FASTQ, ki vsebuje podatke o sekvenciranju, surova sekvenčna zaporedja in oceno kakovosti za posamezno zaporedje. Najprej je treba preveriti kakovost odčitkov, kar izvedemo z orodjem FastQC. V tem koraku odstranimo baze z nizko kakovostjo, ki se običajno nahajajo na 3'-koncu, in adapterska zaporedja. V primeru, da smo uporabljali UMI, je treba tudi te pred poravnavo odstraniti. Med bioinformatško analizo je potrebno upoštevati priporočila, ki jih predvideva konzorcij za standardizacijo ENCODE (25). S tem zagotavljamo primerljivost in reproducibilnost podatkov.

### Poravnava zaporedji na referenčni genom ali transkriptom

V nadaljevanju je treba za vsak odčitek najti mesto, kjer se najbolje ujema z referenčnim zaporedjem, kar imenujemo poravnava oz. mapiranje odčitkov na referenčni genom ali transkriptom. Pri tem je treba upoštevati, da lahko odčitki vsebujejo polimorfizem posameznega nukleotida (SNP, angl. *single-nucleotide polymorphism*), delecije, insercije ali napake, nastale pri sekvenciranju, in se zato ne ujemajo popolnoma z referenčnim zaporedjem. Nekateri odčitki se lahko ujemajo z več lokacijami v referenčnem zaporedju. Takšne odčitke lahko algoritmi zavržejo (26), naključno mapirajo (27) ali mapirajo na podlagi povprečne pokritosti (28). Z uporabo sekvenciranja s parnimi konci se oba konca fragmentov nahajata blizu skupaj, kar v

nekaterih primerih lahko odpravi dvoumnost pri mapiranju. Treba je upoštevati, da odčitki izhajajo iz transkriptoma in ne iz genoma. Enostaven pristop je uporaba samega genoma kot reference, vendar odčitki, ki segajo preko meje eksonov, ne bodo mapirani. Transkripti z manj eksoni so tako bolje pokriti od daljših odčitkov pri enaki ravni izražanja (29). Za poravnavo na referenčno zaporedje se najpogosteje uporabljajo orodja BWA (30), bowtie (31) in STAR (32). Enostavnejši pristop je uporaba "psevdo-poravnave", pri kateri se odčitki ne poravnajo na referenčni genom na običajen način. Namesto tega se odčitki samo klasificirajo glede na to, iz katerega gena ali transkripta izvirajo. Gre za hitrejšo metodo, ki potrebuje manj računalniških virov, saj ne vključuje natančne poravnave vsakega odčitka na specifično mesto v genomu. Namesto tega se prepoznajo vzorci v odčitkih, ki jih povezujejo z znanimi geni ali transkripti, kar omogoča hitro in učinkovito "poravnavo". Orodji, ki omogočata "psevdo-poravnavo", sta Salmon (33) in Kallisto (34). Mapirani odčitki so shranjeni v standardnem formatu SAM (angl. *sequence alignment map*), ki ga lahko pretvorimo v binarno obliko – format BAM (angl. *binary alignment map*). Transkriptom pa je mogoče sestaviti tudi *de novo*, kar pomeni, da transkriptom sestavimo iz sekvenciranih odčitkov brez uporabe referenčnega genoma. Ta pristop se uporablja predvsem za organizme, pri katerih referenčni genom ni na voljo. V postopku sestavljanja transkriptoma *de novo* se kratki odčitki, ki jih dobimo pri sekvenciranju, na podlagi prekrivanja med njimi združujejo v daljše sekvence. Te daljše sekvence predstavljajo transkripte, ki jih je treba na koncu identificirati.

### Kvantifikacija genov oz. transkriptov

Po pridobitvi genomskih lokacij za čim več odčitkov sledi kvantifikacija odčitkov na biološko pomembne enote. Kvantifikacija je mogoča le na anotirane biološke enote; to pomeni, da imajo določene genomske koordinate ime in druge funkcionalne informacije. Običajno izvajamo kvantifikacijo na gene, mogoča pa je tudi kvantifikacija na eksone ali transkripte. V procesu kvantifikacije preštujemo, koliko odčitkov se prilega na določeno biološko pomembno enoto. Kot rezultat dobimo tabelo s številom odčitkov za vsako posamezno enoto (gen, transkript) pri vsakem vzorcu (35), ki jo imenujemo matrika odčitkov in je prikazana pri koraku 7 na Sliki 1.

»

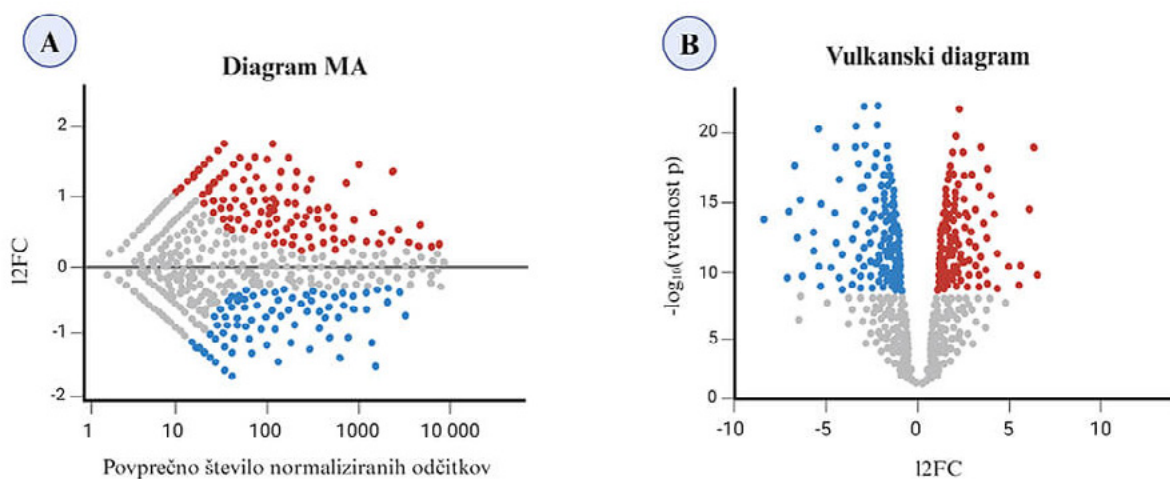
## Normalizacija

Normalizacija omogoča primerjavo izražanja genov med vzorci in znotraj vzorca. Pri primerjavi izražanja znotraj vzorca uporabljamo FPKM (angl. *fragments per kilobase per million mapped reads*) ali TPM (angl. *transcripts per million mapped reads*), ki omogočata primerjavo izražanja vsakega gena glede na druge gene v vzorcu in upoštevata tako velikost knjižnic kot tudi dolžino genov (36). Kar delamo primerjavo med različnimi vzorci, se tehnične napake večinoma izničijo, saj med seboj primerjamo iste gene. Ker pa gre za različne knjižnice, je normalizacija še zmeraj potrebna. Najpreprostejša in pogosto uporabljena normalizacija je prilagoditev glede na celokupno število odčitkov v knjižnici (37).

## Analiza različnega izražanja genov oz. transkriptov

Cilj analize je prepoznati gene, katerih izraženost se med skupinami vzorcev statistično značilno razlikuje. Najpogosteje se za ta namen uporabljata parametrični metodi

DESeq2 in EdgeR (38). DESeq2 se uporablja predvsem za podatke z manjšo variabilnostjo in natančno opredeljenimi skupinami (39), EdgeR pa je primeren za manjše, a kompleksnejše podatke z visoko variabilnostjo (40). Kot kriterij za določanje različne izraženosti genov uporabimo vrednost  $p$  in dvojiški logaritem spremembe (l2FC, angl. *log<sub>2</sub> fold change*) (41), pri čemer vrednost  $p$  pove, ali je rezultat statistično značilen, l2FC pa pove, kolikokrat višje oziroma nižje je izražanje gena v testni v primerjavi s kontrolno skupino. Zaradi večkratnega testiranja je treba vrednost  $p$  popraviti – običajno uporabimo Benjamini-Hochbergov popravek (42). Izbira mejnih vrednosti  $p$  in l2FC, s katerimi identificiramo različno izražene gene, je odvisna od poskusa (43). Rezultate statistične analize običajno grafično predstavimo na diagramu MA (44) ali z vulkanskim diagramom (45). Diagram MA podatke pretvori v lestvico M (logaritemsko razmerje) in lestvico A (povprečna vrednost); prvotno se je uporabljal za prikazovanje podatkov, pridobljenih z mikromrežami. Prikazuje vrednosti l2FC, odvisne od povprečnega normaliziranega števila odčitkov. Na vulkanskem diagramu pa je prikazana odvisnost vrednosti  $p$  od l2FC (Slika 2).



**Slika 2: Primer grafične predstavitev analize različnega izražanja genov.** (A) Diagram MA. Na osi x imamo povprečno število normaliziranih odčitkov, na osi y pa l2FC. Z rdečo so označeni geni s povečanim izražanjem, z modro geni z zmanjšanim izražanjem, s sivo so predstavljeni geni, ki niso statistično značilni. (B) Vulkanski diagram. Na osi x imamo l2FC, na osi y pa  $-\log_{10}$ (popravljenе vrednosti  $p$ ). Z rdečo so označeni geni s povečanim izražanjem, z modro geni z zmanjšanim izražanjem, s sivo so predstavljeni geni, ki niso statistično značilni. Slika je bila pripravljena z BioRenderjem. l2FC, dvojiški logaritem spremembe.

**Figure 2: Example of a graphical representation of differentially expressed genes.** (A) MA plot. The x-axis represents mean expression values of genes, the y-axis represents l2FC. Red represents upregulated genes, blue represents downregulated genes and gray represents genes that are not statistically significant. (B) Volcano plot. The x-axis represents l2FC, the y-axis represents  $-\log_{10}$ (adjusted p-value). Red represents upregulated genes, blue represents downregulated genes and gray represents genes that are not statistically significant. The image was created using BioRender. l2FC,  $\log_2$  fold change.

## POMANJKLJIVOSTI IN OMEJITVE

Sekvenciranje RNA prinaša mnogo priložnosti, kot vsaka metoda pa ima tudi svoje omejitve in pomanjkljivosti. V primerjavi z DNA je RNA bolj podvržena razgradnji zaradi vseprisotnih RNaz, kar zahteva poseben transport vzorcev (čim hitrejši in na ledu) in previdnost pri celotnem procesu, od izolacije RNA do koraka reverzne transkripcije v postopku priprave knjižnice. V primeru slabše kakovosti izolirane RNA (nižja vrednost RIN) je treba postopek priprave knjižnice prilagoditi z izpustitvijo dodatne fragmentacije (46). Zelo pomembna je tudi pravilna izbira vzorca glede na biološko vprašanje, na katerega želimo odgovoriti. Medtem ko je DNA načeloma enaka v vsaki celici določenega organizma, pa je izražanje genov tkivno specifično (47), torej je kri manj oz. neprimerna, če želimo analizirati transkriptom pri bolezni, ki se na primer izraža v mišičnem tkivu. Prav tako je lahko izražanje genov različno v vsaki posamezni celici, vendar s sekvenciranjem celotne RNA iz tkiva (angl. *bulk RNA sequencing*) izgubimo te podatke in dobimo samo sliko povprečnega izražanja. Za naslavljanje tega problema se že uporabljajo tehnike sekvenciranja posameznih celic (angl. *single-cell sequencing*) (48). Previdni moramo biti tudi pri analiziranju variant, saj lahko pogosto spregledamo variante z nizko frekvenco. Prav tako smo omejeni na variante v kodirajočih delih genoma in na variante v tistih genih, ki so dejansko izraženi (49).

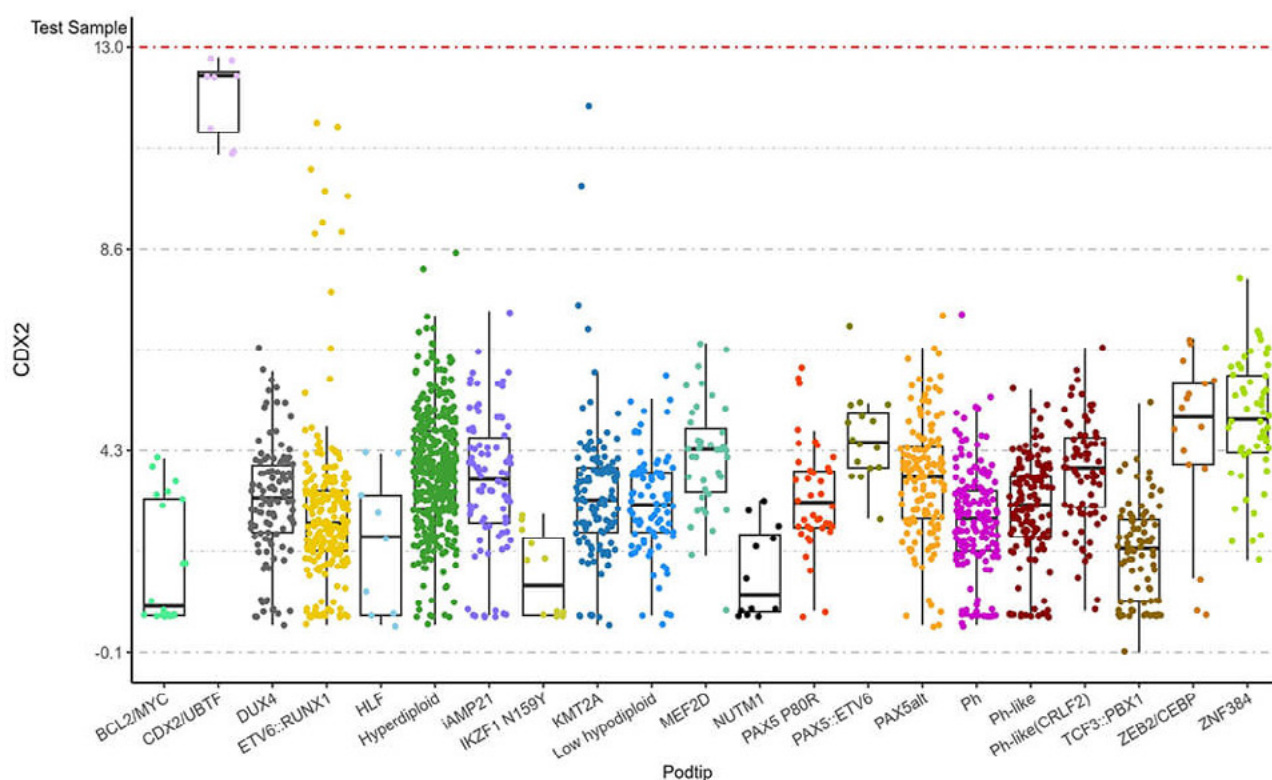
## KLINIČNI PRIMER

Za prikaz uporabe sekvenciranja RNA v diagnostiki navajamo primer bolnika z B-ALL, pri katerem s standardnimi diagnostičnimi preiskavami (kariotipizacija, fluorescentna *in situ* hibridizacija in multipleksni PCR) nismo našli nobenih ponavljajočih se genetskih sprememb. Raziskava je bila opravljena v skladu z načeli Helsinško-Tokijske deklaracije; preiskovanci so se strinjali z vključitvijo v raziskavo in so podpisali izjavo o zavestni in svobodni privolitvi k sodelovanju v raziskavi po poučitvi. Pri bolniku je prišlo do zgodnjega ekstramedularnega relapsa bolezni z nizko infiltracijo v kostnem mozgu (3 % blastnih celic). Takrat je bilo naročeno sekvenciranje RNA iz vzorca kostnega

mozga, odvzetega ob diagnozi, in tistega, odvzetega ob ponovitvi bolezni. Iz vzorcev smo izolirali RNA in pripravili knjižnico za sekvenciranje celotnega transkriptoma. Najprej smo odstranili rRNA, ki predstavlja večino RNA v celicah, vendar nas pri analizi ne zanima. Nato smo preostalo RNA fragmentirali in prepisali v cDNA. Temu je sledila priprava knjižnic, podobna postopku priprave knjižnic za sekvenciranje celotnega eksoma in genoma. Na oba konca cDNA smo ligirali adapterska zaporedja, s pomočjo katerih se fragmenti cDNA lahko vežejo na pretočno celico sekvenatorja. Ta zaporedja vsebujejo tudi zaporedja za unikatno označevanje vzorcev ("molekularna črtna koda"). Po pripravi knjižnice RNA smo izvedli sekvenciranje s sekvenatorjem Illumina NovaSeq6000. Po končanem sekvenciranju smo z bioinformatično analizo pretvorili svetlobne signale v zaporedje baz in tako določili nukleotidno zaporedje vseh fragmentov cDNA, s pomočjo "molekularne črtna koda" pa smo določili odčitke, ki so pripadali preiskovanima vzorcema. S specifičnim bioinformatičnim orodjem smo odčitke nalegali na referenčni genom, temu pa je sledilo štetje količine odčitkov, ki se nalegajo na posamezne gene. Nato smo uporabili program MD-ALL, ki deluje na podlagi strojnega učenja in lahko iz profila izraženih genov vzorce razvrsti v 26 različnih genetskih podtipov B-ALL. Oba vzorca preiskovanega bolnika sta bila uvrščena v podtip CDX2/UBTF, za katerega sta značilna visoko izražanje gena *CDX2* in prisotnost fuzijskega gena *UBTF::ATXN7L3*. Program MD-ALL omogoča tudi vizualizacijo količine izraženega gena v primerjavi z drugimi vzorci v bazi podatkov. Pri obeh vzorcih smo videli povišano izražanje *CDX2* (Slika 3). Potem smo uporabili še bioinformatični cevovod *nf-core rnafusion* (v. 2.3.4) (50), ki s pomočjo petih različnih orodij (Arriba, FusionCatcher, STAR-Fusion, Squid in Pizzly) določi prisotnost fuzijskih transkriptov, vendar analiza ni pokazala prisotnosti *UBTF::ATXN7L3*. Podatke smo nato pregledali še v interaktivnem genomskem pregledovalniku IGV (angl. *Integrative Genomics Viewer*). Ob pregledu regije na dolgi ročici kromosoma 17 smo našli približno 10 kilobaz veliko delecijo, ki vodi v nastanek iskanega fuzijskega gena (Slika 4). S tem smo pri preiskovanem bolniku potrdili prisotnost genetskega podtipa CDX2/UBTF ob diagnozi in relapsu. Ta podtip je bil prvič opisan šele leta 2022, gre pa za podtip z visokim tveganjem za ponovitev bolezni in odpornost na zdravljenje, pri katerem se priporoča intenzivnejše zdravljenje (51). Zanj je značilen tudi specifičen aberanten imunofenotip z »

odsotnostjo CD10 in prisotnostjo IgM (52), ki je bil viden tudi pri našem bolniku. S standardnimi diagnostičnimi preiskavami te fuzije nismo odkrili, najverjetneje zaradi omejitve algoritmov orodij, ki kličejo fuzije, saj imajo lahko ta orodja več problemov z iskanjem intrakromosomskih fuzij, prav tako pa lahko imajo določene kriterije za filtriranje lažno pozitivnih rezultatov. Na detekcijo lahko

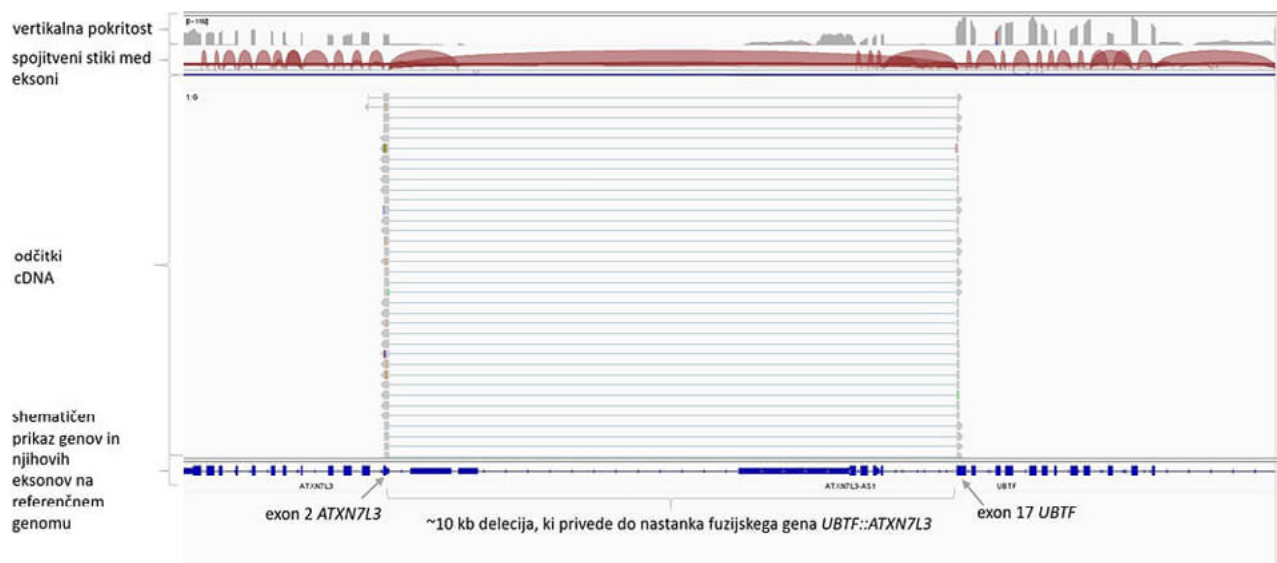
vplivajo nepopolne anotacije genov, kadar pa imajo geni homologne sekvence, se lahko odčitki nalegajo nepravilno in zato zgrešimo fuzijo. Primer tega bolnika nazorno prikazuje uporabnost sekvenciranja RNA pri bolnikih z B-ALL, sploh pri tistih, pri katerih standardne diagnostične preiskave ne pokažejo nobenih posebnosti (okoli 25 % vseh bolnikov z B-ALL).



**Slika 3:** Prikaz izražanja *CDX2* pri analiziranem vzorcu, odvzetem ob postavitvi diagnoze ("Test sample") v primerjavi z drugimi vzorci B-ALL v bazi podatkov. Na osi x so navedeni različni genetski podtipi B-ALL, na osi y pa je prikazano izražanje *CDX2* za posamezni vzorec. Gen *CDX2* je v testnem vzorcu zelo visoko izražen (rdeča črtkana črta), kar je tudi značilnost genetskega podtipa CDX2/UBTF.

**Figure 3:** Showing the *CDX2* expression of the analysed sample, collected at the time of diagnosis ("Test sample") compared to other B-ALL samples in the database. The x-axis shows the different B-ALL genetic subtypes and the y-axis shows the *CDX2* expression for each sample. The *CDX2* gene is highly expressed in the test sample, which is also a characteristic of the CDX2/UBTF genetic subtype. >>





**Slika 4:** Slika spojitenega mesta med eksonom 17 gena *UBTF* in eksonom 2 gena *ATXN7L3* na dolgi ročici kromosoma 17 iz interaktivnega genomskega pregledovalnika IGV (angl. *Integrative Genomics Viewer*). Prikazan je izbrani odsek na humanem genomu, kjer se nahaja omenjena genetska sprememba. Zgornje sivo področje prikazuje vertikalno pokritost, pod tem je z rdečo označeno, med katerimi eksoni je prišlo do spajanja. Spojitveni stik med eksoni prikazuje, da je prišlo do spajanja med genom *ATXN7L3*, ki se nahaja na eksonu 2, in genom *UBTF*, ki se nahaja na eksonu 17. Spodaj so odčitki cDNA, iz katerih prav tako vidimo, da sta bili mesti, ki sta sicer na referenčnem genomu med seboj oddaljeni 10 kilobaznih parov in ju ločuje več eksonov, pri tem bolniku prisotni na skupnem fragmentu RNA oziroma cDNA, ki smo ga sekvencirali (dolga ~300 baznih parov). Do tega je prišlo zaradi približno 10 kb delecije, ki vključuje eksone na 3'-koncu gena *UBTF* (eksoni 18–21) in večino intergenske regije med *UBTF* in *ATXN7L3*, posledično pa pride do nastanka fuzijskega gena *UBTF::ATXN7L3*.

**Figure 4:** Image of the junction site between exon 17 of the *UBTF* gene and exon 2 of the *ATXN7L3* gene on the long arm of chromosome 17 from the *Integrative Genomics Viewer* (IGV). The selected section of the human genome, where this genetic alteration is located, is shown. The upper gray area represents the vertical coverage, and below it, the junctions between exons are marked in red. From this section, we can see that splicing occurred between exon 2 of the *ATXN7L3* gene and exon 17 of the *UBTF* gene. Below are the cDNA reads, which also show that the sites, which are 10 kilobase pairs apart on the reference genome and separated by several exons, are present in this patient on a common RNA or cDNA fragment that we sequenced (approximately 300 base pairs long). This resulted from an approximately 10 kb deletion that includes exons at the 3'-end of the *UBTF* gene (exons 18–21) and most of the intergenic region between *UBTF* and *ATXN7L3*, leading to the formation of the fusion gene *UBTF::ATXN7L3*.

## ZAKLJUČEK

Sekvenciranje RNA je molekularna tehnika, ki se uporablja tako pri osnovnih kot tudi kliničnih raziskavah. Z njeno pomočjo lahko analiziramo izražanje genov, kar omogoča odkrivanje novih bioloških označevalcev, prav tako pa ima pomembno vlogo pri izboljšanju razumevanja kompleksnejših boleznih, kar je bilo predstavljeno na opisnem kliničnem primeru. S konstantnim tehnološkim napredkom postaja sekvenciranje RNA vse bolj dostopno in uporabno. S povezovanjem sekvenciranja posameznih celic s prostorsko transkriptomiko lahko dobimo vpogled v zgradbo tkiv, heterogenost celičnih populacij in vzorce izražanja genov. Takšen napredek izboljša razumevanje zapletenih bioloških sistemov in prispeva k razumevanju po-

teka bolezni. Predvidevamo, da bo uporaba sekvenciranja RNA v kliničnih laboratorijih naraščala. Kot je bilo prikazano na kliničnem primeru, se sekvenciranje RNA že uporablja v primerih, ko s standardnimi diagnostičnimi preiskavami ne odkrijemo nobenih genetskih sprememb. Na podlagi določenega molekularnega profila posameznih bolnikov lahko pomaga pri diagnostiki in usmerja odločitve o zdravljenju. Ta pristop se lahko uporablja predvsem pri raku, nevroloških in nevrodegenerativnih, imunskih ter drugih kompleksnih boleznih, kjer uporaba sekvenciranja RNA v zadnjih letih močno narašča, sploh v primerih, pri katerih je izplen sekvenciranja celotnega humanega eksoma in genoma negativen. Z integracijo sekvenciranja RNA z drugimi metodami lahko preučujemo interakcije med RNA in proteini oz. med RNA in RNA. S tem se izboljša tudi naše razumevanje regulatornih mehanizmov, »

kar bo v prihodnosti odprlo nove možnosti, predvsem na terapevtskem področju. Z napredkom strojnega učenja in umetne inteligence se izboljšuje tudi sposobnost interpretacije velike količine kompleksnih podatkov, ki jih dobimo s sekvenciranj RNA. To bo v prihodnosti dodatno olajšalo odkrivanje novih bioloških označevalcev in terapevtskih možnosti.

## LITERATURA

- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 2008;18(9):1509–17.
- Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet.* 2019;20(11):631–56.
- Chen G, Shi T, Shi L. Characterizing and annotating the genome using RNA-seq data. *Sci China Life Sci.* 2017;60(2):116–25.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* 2008;456(7221):470–6.
- Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell.* 2009;136(4):777–93.
- Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):371–81.
- Adetunji MO, Lamont SJ, Abasht B, Schmidt CJ. Variant analysis pipeline for accurate detection of genomic variants from transcriptome sequencing data. *PLoS One.* 2019;14(9):e0216838.
- Liu X, Harada S. RNA Isolation from Mammalian Samples. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013;103(1):4.16.1–16.
- Scholes AN, Lewis JA. Comparison of RNA isolation methods on RNA-Seq: implications for differential expression and meta-analyses. *BMC Genomics.* 2020;21(1):249.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 2016;17:13.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:3.
- O'Neil D, Glowatz H, Schlumpberger M. Ribosomal RNA depletion for efficient use of RNA-seq capacity. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013;103(1):4–19.
- Zhao S, Zhang Y, Gamini R, Zhang B, Von Schack D. Evaluation of two main RNA-seq approaches for gene quantification in clinical RNA sequencing: polyA+ selection versus rRNA depletion. *Sci Rep.* 2018;8(1):4781.
- Chen Z, Duan X. Ribosomal RNA depletion for massively parallel bacterial RNA-sequencing applications. *Methods Mol Biol.* 2011;733:93–103.
- Morlan JD, Qu K, Sinicropi D V. Selective depletion of rRNA enables whole transcriptome profiling of archival fixed tissue. *PLoS One.* 2012;7(8):e42882.
- Wery M, Describes M, Thermes C, Gautheret D, Morillon A. Zinc-mediated RNA fragmentation allows robust transcript reassembly upon whole transcriptome RNA-Seq. *Methods.* 2013;63(1):25–31.
- Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(1):10.1002/wrna.1364.
- Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-Seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010;89(1):4.11.1–13.
- Borodina T, Adjaye J, Sultan M. A strand-specific library preparation protocol for RNA sequencing. *Methods Enzymol.* 2011;500:79–98.
- Parkhomchuk D, Borodina T, Amstislavskiy V, Banaru M, Hallen L, Krobitch S, et al. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(18):e123.
- Zhao S, Zhang Y, Gordon W, Quan J, Hualin X, Du S, et al. Comparison of stranded and non-stranded RNA-seq transcriptome profiling and investigation of gene overlap. *BMC Genom.* 2015;16(1):675.
- Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods.* 2011;9(1):72–4.
- Fan HC, Fu GK, Fodor SPA. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science.* 2015;347(6222):1258367.
- Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. *Methods Mol Biol.* 2021;2242:15–42.
- Bulk RNA-seq Data Standards and Processing Pipeline [Internet]. [assessed on 29.7.2024]. Available from: <https://www.encodeproject.org/data-standards/rna-seq/long-rnas/>.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25.
- Li H, Ruan J, Durbin R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res.* 2008;18(11):1851–8.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008;5(7):621–8.
- Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science.* 2008;321(5891):956–60.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754–60.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21.
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417–9.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 2016;34(5):525–7.
- Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, Degner JF, Engelhardt BE, Nkadori E, et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature.* 2010;464(7289):768–72.
- Johnson KA, Krishnan A. Robust normalization and transformation techniques for constructing gene coexpression networks from RNA-seq data. *Genome Biol.* 2022;23(1):1.

37. Li X, Brock GN, Rouchka EC, Cooper NGF, Wu D, O'Toole TE, et al. A comparison of per sample global scaling and per gene normalization methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *PLoS One*. 2017;12(5).
38. Liu S, Wang Z, Zhu R, Wang F, Cheng Y, Liu Y. Three differential expression analysis methods for RNA sequencing: limma, EdgeR, DESeq2. *J Vis Exp*. 2021;2021(175).
39. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
40. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139–40.
41. Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Res*. 2011;21(12):2213.
42. Ghosh D. Incorporating the empirical null hypothesis into the Benjamini-Hochberg procedure. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2012;11(4):31.
43. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS One*. 2017;12(12):e0190152.
44. Zhao T, Wang Z. GraphBio: A shiny web app to easily perform popular visualization analysis for omics data. *Front Genet*. 2022;13:957317.
45. Wodrich MD, Sawatlon B, Busch M, Corminboeuf C. The genesis of molecular volcano plots. *ACS Cent Sci*. 2019;5(5):796–804.
46. Precautions for Handling of RNA [Internet]. [assessed on 12.6.2024]. Available from: <https://lifescience.roche.com/global/en/article-listing/article/precautions-for-handling-of-rna.html>.
47. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
48. Li X, Wang CY. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing. *Int J Oral Sci*. 2021;13(1):36.
49. Kaya C, Dorsaint P, Mercurio S, Campbell AM, Eng KW, Nikiforova MN, et al. Limitations of detecting genetic variants from the RNA sequencing data in tissue and fine-needle aspiration samples. *Thyroid*. 2021;31(4):589–95.
50. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol*. 2020;38:276–278.
51. Bastian L, Hartmann AM, Beder T, Hänzelmann S, Kässens J, Bultmann M, et al. UBTF::ATXN7L3 gene fusion defines novel B cell precursor ALL subtype with CDX2 expression and need for intensified treatment. *Leukemia*. 2022;36(6):1676–80.
52. Kimura S, Montefiori L, Iacobucci I, Zhao Y, Gao Q, Paietta EM, et al. Enhancer retargeting of CDX2 and UBTF::ATXN7L3 define a subtype of high-risk B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2022;139(24):3519–31.

# Metode za določanje različnih oblik testosterona v medicinskih laboratorijih

## *Methods for determining different forms of testosterone in medical laboratories*

**Barbara Ježek<sup>1,2</sup>, Kristina Drole<sup>3</sup>, Aleš Jerin<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup>Diagnostični laboratorij Medicare PLUS

<sup>2</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

<sup>3</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za šport, Inštitut za kineziologijo

<sup>4</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Avtor za korespondenco:

**Barbara Ježek, mag. lab. biomed.**

Diagnostični laboratorij Medicare PLUS, Erbežnikova ulica 2, 1000 Ljubljana

e-pošta: barbara@medicareplus.si

### POVZETEK

Testosteron je steroidni hormon, ki se v krvnem obtoku nahaja v prosti obliki in vezan na prenašalne proteine. Za merjenje koncentracije testosterona obstaja širok nabor metod. Pri izbiri metode za določanje testosterona je ključno upoštevati namen merjenja, saj ta vpliva na izbiro oblike testosterona, ki jo bomo analizirali, in določa zahtevane lastnosti metode. V prispevku bomo predstavili izvedbo in omejitve metod za merjenje celokupnega testosterona in njegovih biološko aktivnih oblik. Metode smo primerjali glede na zahtevnost in čas izvedbe analize ter cenovno dostopnost. V medicinskih laboratorijih se večinoma meri celokupni testosteron, za prosto ali biološko razpoložljivo obliko testosterona pa prevladujejo izračuni. Trenutno se za merjenje koncentracije celokupnega testosterona največ uporabljajo imunokemijske metode, vendar lahko v prihodnje pričakujemo, da bodo imele večjo vlogo kromatografske metode, sklopljene z masno spektrometrijo. Meritev koncentracije biološko aktivnih oblik testosterona je pomembna zlasti pri mejno znižanih koncentracijah celokupnega testosterona ali spremenjenih koncentracijah prenašalnih proteinov. Metode za določanje biološko aktivnih oblik so ravnotežna dializa, ultrafiltracija in selektivna precipitacija, vendar so delovno zahtevne in za-

mudne. Posledično so razvili različne izračune za oceno koncentracije prostega in biološko razpoložljivega testosterona. Rezultati, pridobljeni z različnimi metodami, med seboj niso primerljivi, zato je velika potreba po harmonizaciji in standardizaciji metod.

**Ključne besede:** celokupni testosteron, biološko razpoložljivi testosteron, prosti testosteron, določanje testosterona

### ABSTRACT

Testosterone is a steroid hormone found in the bloodstream in both free form and bound to transport proteins. Various methods exist for measuring testosterone concentration, and selecting the appropriate method depends on the purpose of the measurement. This choice affects which form of testosterone will be analyzed and determines the method's required characteristics. The paper presents the description and limitations of methods for measuring total testosterone and its biologically active forms. Methods were compared based on their complexity, analysis time and cost-effectiveness. In medical laboratories, total testosterone is usually measured, while free or bioavailable testosterone is often calculated. Immunochemical meth- >>

ods are currently the most widely used for total testosterone measurement, but chromatographic methods coupled with mass spectrometry are expected to play a larger role in the future. Measuring biologically active forms of testosterone is particularly important when total testosterone levels are borderline low or when concentrations of transport proteins are altered. Methods for determining biologically active forms, such as equilibrium dialysis, ultrafiltration, and selective precipitation, are labor-intensive and time-consuming. Consequently, various calculations have been developed to estimate free and bioavailable testosterone. Due to the lack of comparability between methods, there is a strong need for harmonization and standardization.

**Key words:** total testosterone, bioavailable testosterone, free testosterone, determination of testosterone

## UVOD

Testosteron je analit, pri katerem je pomembna izbira oblike, ki jo bomo določali, in ne le izbira primerne metode za določitev. V prispevku bomo predstavili različne oblike testosterona in metode, s pomočjo katerih lahko izmerimo ali izračunamo koncentracijo določene oblike. Metode bomo med seboj primerjali glede na zahtevnost in čas izvedbe preiskave, cenovno dostopnost ter njeno občutljivost in specifičnost. Pri določanju koncentracije testosterona je namreč ključna izbira metode, ki je med drugim odvisna od oblike testosterona, ki jo bomo določali. Testosteron je steroidni hormon, ki se izloča pretežno iz Leydigovih celic v testisih. Njegovo izločanje je kontrolirano z negativno povratno zanko preko osi hipotalamus-hipofiza-testisi. Na tarčne celice testosteron učinkuje z vezavo na androgenski receptor (1). Testosteron spodbuja spermatogenezo, poleg tega ima tudi anabolni učinek, in sicer povečuje nastanek mišične mase, spodbuja tvorbo kostnine ter povečuje mineralno gostoto kosti. Prav tako spodbuja eritropoezo v kostnem mozgu in močno vpliva na razpoloženje. V času pubertete testosteron pri dečkih povzroči pojav sekundarnih spolnih znakov in poraščenosti (2,3). Testosteron je predhodnik estradiola, v katerega se pretvarja s pomočjo aromataze (4), zato je pomemben tudi pri ženskah, kjer ima vlogo metabolnega, vaskularnega in reproduktivnega hormona.

V krvnem obtoku se testosteron veže pretežno na albumin in spolne hormone vezoči globulin (SHBG, angl. *sex hor-*

*mone binding globulin*), v manjši meri je vezan tudi na nekatere druge vezavne proteine, le 0,5–2 % testosterona pa se nahaja v prosti obliki (5,6). Prosto obliko testosterona imenujemo tudi prosti testosteron (angl. *free testosterone*). Hipoteza o prostih hormonih pravi, da je biološko aktivna zgolj prosta oblika hormonov (7). Posledično je prosti testosteron biološko aktiven, kar pomeni, da je sposoben vezave na celične receptorje, s čimer sproži učinek v celicah (1,5). Na vezavni protein SHBG je testosteron vezan z veliko afiniteto, zato vezan testosteron ni na voljo za prevzem v celice v večini tkiv. Testosteron, vezan na SHBG, je biološko neaktiven, torej nima androgenega učinka (1). Na albumin je testosteron vezan z manjšo afiniteto, zato se od njega lažje odcepi in veže na tarčne celice, torej je biološko aktiven. Z izrazom celokupni testosteron opisujemo prosto in vezano obliko testosterona v telesu. Izraz biološko razpoložljivi testosteron (angl. *bioavailable testosterone*) pa se nanaša tako na prosto obliko testosterona kot tudi na testosteron, ki je vezan na albumin. Biološko razpoložljivi testosteron torej predstavlja ves biološko aktiven testosteron v telesu (1).

Koncentracijo testosterona merimo predvsem za oceno androgenega statusa tako pri moških kot tudi pri ženskah. Koncentracijo testosterona se najpogosteje izmeri pri diagnostiki hipogonadizma pri moških (8–10) ter za spremljanje nadomestne hormonske terapije s testosteronom (11) in pri diagnostiki hiperandrogenizma pri ženskah; slednji se večinoma pojavi v sklopu sindroma policističnih jajčnikov (12,13). Meritev koncentracije testosterona se uporablja tudi pri diagnostiki zakasnele ali prezgodnje pubertete pri fantih (14), diagnostiki kongenitalne adrenalne hiperplazije (11) in še nekaterih drugih stanjih. V zadnjem času se raziskujejo tudi povezave med testosteronom in različnimi metabolnimi motnjami, kot so debelost, metabolni sindrom, diabetes (15–17) in kardiovaskularne bolezni (18). Testosteron ima pri športnikih ključno vlogo pri oblikovanju fiziološkega odziva na trenajni dražljaj; s svojim anabolnim učinkom spodbuja rast mišic, razvoj moči in dvig splošne telesne zmogljivosti. Z nivojem testosterona pri športnikih torej spremljamo prilagoditev na trenajno obremenitev ter okrevanje po njej (19,20).

Pri določenih kliničnih indikacijah je treba poleg koncentracije celokupnega testosterona izmeriti še koncentracijo biološko aktivnih oblik testosterona, saj nam pomagajo pri postavitvi pravilne diagnoze. Merjenje le-teh se priporoča predvsem pri mejno znižanih koncentracijah celokupnega testosterona, pri moških za diagnostiko hipogonadizma ter pri različnih stanjih, ki vplivajo na koncentracijo »

SHBG-ja (21). Do spremenjene koncentracije SHBG-ja pride zaradi povišane koncentracije kompetitivnih steroidov predvsem estrogena, debelosti, diabetesa, hipo- ali hipertiroidizma, ciroze, hepatitisa in uporabe glukokortikoidov, androgenih steroidov ali estrogenov (8). Pri odstopanjih v koncentraciji SHBG-ja ni dovolj, če izvedemo zgolj meritev celokupnega testosterona, saj je lahko ta znotraj referenčnega območja, kar ni skladno s klinično sliko preiskovanca. Pri določanju biološko aktivnih oblik testosterona pa so vidna odstopanja, ki sovpadajo tudi s klinično sliko. Posledično se ob sumu na stanja s spremenjeno koncentracijo SHBG-ja priporoča merjenje biološko aktivnih oblik testosterona (5,21).

## **PREDANALITSKE ZAHTEVE ZA MERITEV KONCENTRACIJE TESTOSTERONA**

Za analizo testosterona se večinoma uporabljata vzorca krvne plazme in seruma. Za testosteron je značilno nihanje znotraj dneva, pri čemer so vrednosti najvišje zjutraj, zato se priporoča odvzem krvi v jutranjih urah (22). Različne smernice so med seboj usklajene ter priporočajo odvzem krvi za meritev testosterona med 7. in 11. uro na tešče (21,22). Odvzem krvi na tešče je priporočljiv, saj vnos hrane zniža koncentracijo testosterona (23,24). Za zanesljiv rezultat je priporočljivo odvzem krvi in meritev ponoviti v drugem dnevu, saj testosteron izraža dokaj velike razlike pri posamezniku med različnimi dnevi (21,25). Prav tako lahko nekatera zdravstvena stanja ali zdravilne učinkovine vplivajo na koncentracijo testosterona v krvi (21,26). Med spoloma so velike razlike v koncentraciji testosterona, saj imajo ženske približno 10-krat nižjo koncentracijo celokupnega testosterona kot moški. Posledično je potrebno široko območje merjenja, kar je problematično predvsem pri imunokemijskih metodah (27). Hkrati so pri ženskah prisotni tudi drugi podobni steroidi, ki so problematični z vidika navzkrižne reaktivnosti (28). Za analizo testosterona se lahko uporabi tudi vzorec sline, katerega glavna prednost je neinvaziven odvzem. Prednost sline kot vzorca je tudi dejstvo, da dobimo zgolj prosto frakcijo testosterona. Posledično lahko določimo ves testosteron v vzorcu in ločba proste frakcije od ostalega vzorca ni potrebna. Koncentracija testosterona v slini je nižja kot v krvi, zato

za analizo potrebujemo metode z nižjo mejo detekcije. Slabost sline kot vzorca je problematičen matriks, ki zahteva dodatno obdelavo pred analizo (npr. zamrzovanje in centrifugiranje). Če pri vzorčenju sline pride do kontaminacije s periferno krvjo zaradi ranic v ustih, lahko to povzroči lažno povišane rezultate zaradi mnogo višje koncentracije testosterona v krvi. Slina kot vzorec za določitev testosterona se večinoma uporablja v raziskovalne namene, saj je za diagnostiko pogosto poleg testosterona smiselno izmeriti še nekatere druge analite, za kar potrebujemo vzorec krvi (29). Pomanjkljivost sline kot vzorca za meritev testosterona je tudi pomanjkanje standardizacije metode, saj certificiran referenčni material za prosti testosteron trenutno še ni na voljo. Poleg tega prosti testosteron v serumu tudi ni primerljiv s testosteronom, merjenim v slini (29).

## **METODE DOLOČANJA KONCENTRACIJE CELOKUPNEGA TESTOSTERONA**

Pri merjenju koncentracije celokupnega testosterona izmerimo koncentracijo vsega testosterona, prisotnega v vzorcu, torej proste in vezane oblike. Celokupni testosteron lahko merimo z imunokemijskimi metodami ali s pomočjo kromatografskih metod, sklopljenih z masno spektrometrijo (30).

### **Imunokemijske metode**

Poznamo različne imunokemijske metode, ki temeljijo na protitelesih, ki se vežejo na določen analit, metode pa se razlikujejo predvsem glede na način detekcije (30). V preteklosti je za določitev celokupnega testosterona obstajala zgolj radioimunska metoda, danes pa obstajajo metode, ki temeljijo na detekciji s pomočjo encimov, imunofluorescence ali kemiluminiscence. Testosteron oz. steroidi na splošno so majhne molekule, zato je bil razvoj zanesljivih metod določanja težaven (31). Problematična je bila tudi navzkrižna reaktivnost s podobnimi steroidnimi molekulami (32). V preteklosti je bilo treba pred analizo izvesti še ekstrakcijo in kromatografijo, vendar so kasneje zaradi povečanega števila vzorcev za to preiskavo metodo poenostavili. Uvedli so direktne imunokemijske metode, za katere sta bili značilni slabša natančnost in specifičnost (31). >>

Boljše karakteristike metode so želeli doseči z uporabo kompetitivnih testov. Prednosti uporabe imunokemijskih metod za določanje celokupnega testosterona so predvsem široka dostopnost, nizki stroški in visoka zmogljivost zaradi avtomatiziranosti metod (30). Medtem ko pri moških imunokemijske metode zadovoljivo rešujejo problematiko merjenja celokupnega testosterona, so bile izražene skrbi glede njegove natančnosti pri ženskah in hipogonadalnih moških, predvsem zaradi manjše natančnosti rezultatov pri nizkih koncentracijah testosterona (33). Leta 2018 so v članku (34) primerjali različne imunokemijske metode ter ugotovili, da lahko nekatere od teh metod izmerijo tudi nižje koncentracije testosterona dovolj natančno, vendar pričakovano z manjšo natančnostjo kot metode masne spektrometrije. Različne metode med seboj ne dajejo primerljivih rezultatov, zato za zdaj še ne obstaja enotno referenčno območje. Priporočata se potrditev referenčnega območja, ki ga navaja proizvajalec, ali pa postavitev lastnega referenčnega območja (35). Poleg tega obstaja program, ki si prizadeva standardizirati metode za določanje koncentracije celokupnega testosterona, s čimer želi doseči večjo primerljivost med različnimi imunokemijskimi metodami ter zagotoviti čim bolj natančne rezultate (36,37).

## Kromatografska metoda, sklopljena z masno spektrometrijo

V medicinskih laboratorijih za merjenje koncentracije celokupnega testosterona prevladujejo imunokemijske metode. Zaradi slabše natančnosti in ponovljivosti imunokemijskih metod, predvsem pri nizkih koncentracijah celokupnega testosterona, so se pojavile metode masne spektrometrije (38). Masna spektrometrija se uporablja za kvantifikacijo analita, ločbo analita od matriksa pa dosežemo s predhod-

no opravljeno kromatografijo. Pri kromatografiji ločimo iskan analit od matriksa vzorca s pomočjo interakcij med analitom in stacionarno fazo. Pri kromatografiji čez sistem teče tekoča faza, ki je lahko plin ali tekočina oz. zmes tekočin, odvisno od tipa kromatografije. Od moči interakcij med analitom, trdo in tekočo fazo je odvisen čas potovanja analita do masnega spektrometra, imenovan retencijski čas, ki je pri stabilnih pogojih kromatografije specifičen za določen analit. Posledično lahko na podlagi retencijskega časa ločimo različne snovi med seboj. Masni spektrometer pri teh metodah služi kot detektor, ki na podlagi molekulske mase in strukture snovi prepozna ter kvantificira analit. Če imamo zaporedno vezana dva masna spektrometra, govorimo o tandemski masni spektrometriji, katere glavna prednost je večja specifičnost (28,39). V masnem spektrometru najprej poteče ionizacija, kar je prikazano na Slika 1: Shematski prikaz kromatografske metode, sklopljene z masno spektrometrijo. S pomočjo kromatografije se loči iskan analit od matriksa. Analit nato potuje v masni spektrometer, kjer najprej poteče ionizacija vzorca, s katero pridobimo nabite molekulske ione. Molekulski ioni se nato na podlagi razmerja med maso in nabojem ( $m/z$ ) ločijo s pomočjo električnega ali magnetnega polja. Detektor zazna različne molekulske ione, kar računalnik prikaže v obliki masnega spektra. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com. Slika 1. S pomočjo ionizacije nastanejo molekulske ioni, ki zaradi električnega ali magnetnega polja potujejo v vakuumu z določeno hitrostjo in smerjo do detektorja. Hitrost in smer sta pogojeni z razmerjem med maso in nabojem ( $m/z$ ), na podlagi česar masni detektor ločuje molekulske ione med seboj. Rezultat masne spektrometrije je masni spekter, ki je značilen za določeno snov, zato služi za identifikacijo analita, hkrati pa lahko analit tudi kvantificiramo (39,40).



**Slika 1: Shematski prikaz kromatografske metode, sklopljene z masno spektrometrijo.** S pomočjo kromatografije se loči iskan analit od matriksa. Analit nato potuje v masni spektrometer, kjer najprej poteče ionizacija vzorca, s katero pridobimo nabite molekulske ione. Molekulski ioni se nato na podlagi razmerja med maso in nabojem ( $m/z$ ) ločijo s pomočjo električnega ali magnetnega polja. Detektor zazna različne molekulske ione, kar računalnik prikaže v obliki masnega spektra. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

**Figure 1: Schematic representation of a chromatographic method coupled with mass spectrometry.** Using chromatography, the target analyte is separated from the matrix. The analyte then enters the mass spectrometer, where ionization of the sample occurs, producing charged molecular ions. These molecular ions are separated based on their mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) using an electric or magnetic field. The detector detects different molecular ions, which are displayed by the computer in the form of a mass spectrum. Created with BioRender.com.



Prve tovrstne metode so za določitev celokupnega testosterona uporabljale plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS), vendar je bila predpriprava vzorca zahtevna. Predpriprava vzorca je zagotovila večjo termo stabilnost testosterona, vendar izkoristek postopka ni bil vedno enak. Posledično so razvili različico GC-MS, ki temelji na izotopsko označenih internih standardih, pri katerih se med pripravo vzorca pojavi enak izkoristek kot pri analitu. Kalibracijska krivulja temelji na razmerju med odzivi analita in internega standarda, kar pripomore k bolj natančni kvantifikaciji. Kasneje so za kromatografsko ločbo uporabili tekočinsko kromatografijo, ki je bila sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), pri kateri je prav tako potrebna predpriprava vzorca. Za LC-MS/MS sta značilni nizka meja detekcije posameznega analita in dobra specifičnost (28,39). Metoda omogoča tudi analizo več različnih analitov hkrati, vendar ni mogoče vzporedno analizirati več vzorcev, kot je to mogoče pri imunokemijskih metodah, zato se čas izvedbe preiskave podaljša in je posledično metoda manj primerne za uporabo v rutinskih laboratorijih (25). Ena izmed prednosti hkratne analize več analitov v enem vzorcu je nizka cena na preiskavo, vendar je začetna investicija visoka, zaradi česar se metoda ne uporablja v rutinskih laboratorijih; kljub temu je njena uporaba v porastu. Izziv masne spektrometrije je predvsem potreba po visoko izobraženem in izkušenem osebju zaradi kompleksnosti analizatorja in zahtevnega procesa analize (28,39).

## METODE DOLOČANJA BIOLOŠKO AKTIVNIH OBLIK TESTOSTERONA

Ob mejno znižani koncentraciji celokupnega testosterona ali stanjih s spremenjeno koncentracijo SHBG-ja je poleg celokupnega testosterona potrebno določiti tudi koncentracijo biološko aktivne oblike, kamor spadata prosti in biološko razpoložljivi testosteron. Vendar je merjenje le-teh delovno zahtevno in zamudno, predvsem zaradi nizkih koncentracij in vezave na vezavne proteine, zato so razvili različne izračune, s pomočjo katerih ocenimo koncentracijo biološko aktivnih oblik testosterona, ki pri določenih kličnih stanjih zadovoljivo rešujejo to problematiko (21).

### Ravnotežna dializa in ultrafiltracija

Ravnotežna dializa je metoda, pri kateri z uporabo polprepustne membrane ločimo prosto in vezano frakcijo analita v vzorcu. Prosto frakcijo analita lahko nato kvantificiramo z imunokemijskimi metodami (npr. radioimunska metoda) ali z masno spektrometrijo (npr. LC-MS/MS) (6,11). Trenutno za referenčno metodo določanja prostega testosterona velja ravnotežna dializa v kombinaciji z LC-MS/MS, vendar se za zdaj zaradi visoke cene ne uporablja v rutinskih laboratorijih, se pa počasi vpeljuje v specializirane laboratorije (41). Ravnotežna dializa je zamudna in delovno zahtevna. Že manjše spremembe v delovnem postopku, kot so na primer redčenje vzorca, razlike v temperaturi, pH pufru ali tipu uporabljene membrane, lahko vplivajo na rezultat (6,11). Zelo pomembna je čistost radioaktivnega označevalca, kadar je ravnotežna dializa sklopljena z radioimunsko metodo, saj lahko nečistoče v njem povzročijo veliko odstopanje v rezultatu, ker se ne vežejo na SHBG. Prednosti ravnotežne dialize sklopljene z LC-MS/MS so predvsem njena dobra občutljivost, specifičnost in pravilnost rezultatov na celotnem merilnem območju, slabost pa je predvsem v težavni izvedbi ravnotežne dialize (42). Posledično je metoda primerna tako za ženske, ki imajo nižje koncentracije celokupnega testosterona, kot tudi za merjenje prostega testosterona ter za odkrivanje hipogonadizma pri moških. Zaradi zahtevnosti ravnotežne dialize je ujemanje med rezultati različnih laboratorijev slabo (33).

Z namenom razvoja delovno manj zamudne metode od ravnotežne dialize so razvili ultrafiltracijo, ki je prav tako sklopljena z imunokemijsko metodo ali masno spektrometrijo. Delovno je manj zahtevna, saj prosta oblika analita iz vzorca prehaja skozi polprepustno membrano s pomočjo centrifugalne sile. Kljub nekoliko hitrejši izvedbi je metoda zahtevna in zamudna (11).

### Selektivna precipitacija

Biološko razpoložljivi testosteron predstavlja prosti in na albumin vezani testosteron, torej ves biološko aktiven testosteron v telesu. Posledično bolje odraža androgeni status kot meritev celokupnega testosterona (43). Biološko razpoložljivi testosteron izmerimo s pomočjo selektivne precipitacije SHBG-ja v vzorcu z amonijevim sulfatom (44). Najprej vzorcu dodamo znano količino testosterona, označenega z radioaktivnim izotopom. Po dodatku označenega testosterona se ta v določeni meri veže na vezavne proteine iz vzorca, torej na SHBG in albumin. Nato pa s pomočjo 50 % amo- >>

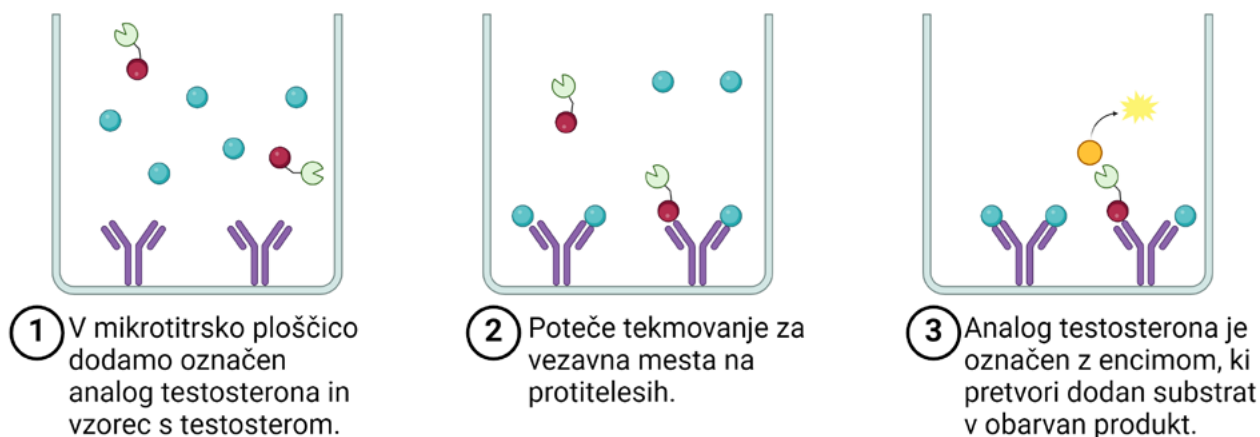


njivega sulfata oborimo ves testosteron, vezan na SHBG – tako testosteron iz vzorca kot tudi dodan testosteron označen z radioaktivnim izotopom. Vzorec centrifugiramo ter odlijemo supernatant, v katerem se nahajata prosti testosteron in testosteron, vezan na albumin. V supernatantu določimo radioaktivnost, ki je sorazmerna količini označenega testosterona, ki se ni vezal na SHBG. Za izračun koncentracije biološko razpoložljivega testosterona v vzorcu pomnožimo delež radioaktivno označenega testosterona, določenega v supernatantu, s koncentracijo celokupnega testosterona v vzorcu (3,44). Lahko pa izvedemo precipitacijo z amonijevim sulfatom in nato v supernatantu z direktno imunokemijsko metodo določimo koncentracijo biološko razpoložljivega testosterona. Meritev biološko razpoložljivega testosterona v supernatantu s pomočjo LC-MS/MS metode ni mogoča zaradi visoke koncentracije soli amonijevega sulfata. Rezultati so primerljivi meritvam z ravnotežno dializo, vendar je tudi ta metoda delovno zahtevna (11,42).

## Direktna imunokemijska metoda

Zahtevnost in zamudnost ravnotežne dialize sta privedli do razvoja različnih testov, ki temeljijo na direktni imunokemijski metodi. Vendar imunokemijske metode niso primerne za kvantifikacijo prostih oblik steroidov direktno v vzorcu zaradi zelo nizkih koncentracij le-teh ter pomanjkljive specifičnosti,

ki ne omogoča merjenja zgolj proste frakcije (5). Posledično direktna imunokemijska metoda temelji na kompetitivnem principu. Pri direktni imunokemijski metodi se uporablja označen analog testosterona, ki ima sposobnost reagirati z eksogenimi protitelesi proti testosteronu, nima pa sposobnosti vezave na prenašalne proteine za testosteron (38). Označen analog testosterona torej ne vpliva na ravnotežje prostega in vezanega testosterona. Vendar tekmuje za vezavna mesta na protitelesih, vezanih na dno mikrotitrskeske ploščice, s testosteronom prisotnem v vzorcu. V primeru encimsko-immunske metode, prikazane na Sliki 2, dodamo substrat, katerega encim, vezan na analog testosterona, pretvori v barvni produkt. Večja kot je koncentracija prostega testosterona v vzorcu, manj označenega analoga testosterona se lahko veže na vezavna protitelesa in manjši je končni odziv. Ravno nasprotno, ob nizki koncentraciji prostega testosterona v serumu dobimo visok odziv. Težko pa je narediti analog testosterona, ki se ne veže na prenašalne proteine in posledično ne vpliva na vzpostavljeno ravnotežje prostega in vezanega testosterona v vzorcu. Prednosti metode so predvsem v hitrih rezultatih, enostavnem postopku in potrebi po majhnem volumnu vzorca, vendar je metoda nezanesljiva, neobčutljiva in ni primerljiva med laboratoriji, zato v smernicah različnih združenj odsvetujejo njeno uporabo (21,26,33,38).



**Slika 2: Direktna imunokemijska metoda.** Na dno mikrotitrskeske ploščice so vezana protitelesa proti testosteronu, na katera se lahko vežeta označen analog testosterona ali testosteron iz vzorca. Število vezavnih mest na protitelesih je omejeno, zato pride do tekmovanja med označenim analogom testosterona in testosteronom iz vzorca. Nevezane snovi se odstranijo s spiranjem. Analog testosterona ima vezan encim, ki ob dodatku substrata omogoči nastanek obarvanega produkta, kar tudi zaznamo. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

**Figure 2: Direct immunoassay.** Antibodies against testosterone are bound to the bottom of the microtiter plate, to which a labelled testosterone analog or testosterone from the sample can bind. The number of binding sites on the antibodies is limited, leading to competition between the labelled testosterone analog and the testosterone from the sample. Unbound substances are removed by washing. The testosterone analog is linked to an enzyme, which, upon the addition of a substrate, enables the formation of a coloured product that can be detected. Created with BioRender.com.

»

## Izračuni biološko razpoložljivih oblik testosterona

Zahtevnost merjenja prostega in biološko razpoložljivega testosterona je privedla do enostavnejših in cenejših rešitev. Tako se je razvila vrsta različnih izračunov, s pomočjo katerih lahko ocenimo koncentracijo prostega testosterona. Izračuni temeljijo na koncentraciji celokupnega testosterona in SHBG-ja, nekateri pa upoštevajo tudi koncentracijo albumina. Poznamo izračune, ki temeljijo na linearnih ali alosteričnih modelih, in tiste, ki temeljijo na empiričnih pristopih (6). Izračuni temeljijo na predpostavki, da se testosteron v telesu normalno veže na proteine. Prav tako bodo vsi izračuni napačno ocenili koncentracijo prostega testosterona v primeru povišane koncentracije kompetitivnih steroidov, večjih odstopanj v koncentraciji vezavnih proteinov ter pri redkih genetskih polimorfizmih, kjer pride do spreminjene afinitete vezave SHBG-ja za testosteron (5,6,45).

Linearni model za izračun prostega testosterona temelji na zakonu o masi, ki predpostavlja, da lahko seštejemo prosto in vezano frakcijo analita ter tako dobimo celokupno količino analita. S pomočjo te predpostavke lahko z uporabo primerne enačbe, konstant afinitete vezave testosterona na prenašalne proteine ter znane koncentracije prenašalnih proteinov izračunamo prosto ali biološko razpoložljivo obliko testosterona (5). Poznamo več različnih enačb za izračun, razlikujejo pa se predvsem v uporabljenih afinitetnih konstantah, ki so sicer pridobljene s pomočjo eksperimentov, vendar za zdaj še niso poenotene (45). Ugotovili pa so, da vezava testosterona na prenašalne proteine ni linearna, kar razvrednoti izračun po linearnem modelu (6). Dejstvo je, da se le-ti, predvsem izračun po Vermeulenu (5), najbolj ujemajo z ravnotežno dializo, kljub napačni predpostavki o afiniteti vezave testosterona na SHBG.

Vermeulnova enačba temelji na predpostavki, da je koncentracija celokupnega testosterona enaka vsoti prostega testosterona (označen [S]), testosterona vezanega na albumin in na SHBG. Afinitetna konstanta za vezavo na albumin ( $K_A$ ) znaša  $3,6 \times 10^4$  L/mol, za SHBG ( $K_{SHBG}$ ) pa znaša  $10^9$  L/mol. V enačbi so izražene množine SHBG-ja, albumina (ALB) in testosterona, ki jih preračunamo iz koncentracije in znane molekulske mase analita. Koncentracijo albumina se vnese v g/L, za testosteron in SHBG pa se uporabi enota nmol/L. Vermeulnova enačba je enačba 2. reda, ki je prikazana spodaj (enačba 1).

$$[S]^2 \times (1 + K_A \times [ALB]) \times K_{SHBG} + [S] \times ([SHBG] \times K_{SHBG} - [T] \times K_{SHBG} + (1 + K_A \times [ALB])) - [T] = 0 \quad (1) \quad \gg$$

Za enačbo 2. reda je značilna oblika  $ax^2 + bx + c = 0$ . Re-

šitev enačbe 2. reda je zapisana v spodnji enačbi 2, koeficiente pa dobimo iz osnovne oblike enačbe. Rešitev enačbe predstavlja množino prostega testosterona, ki jo s pomočjo molekulske mase pretvorimo v koncentracijo (nmol/L). Enačba ima dve rešitvi, vendar je samo ena izmed njiju mogoča, saj ne moremo imeti negativne koncentracije prostega testosterona.

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (2)$$

Iz prostega testosterona lahko izračunamo tudi biološko razpoložljivi testosteron tako, da seštejemo prosti testosteron in testosteron, vezan na albumin (5).

Slabost izračuna po Vermeuleni enačbi so za 20–30 % previsoki rezultati glede na meritve prostega testosterona z referenčno metodo, vendar je odstopanje konstantno in je posledično problematično zgolj pri primerjavi različnih metod (45,46). Vermeulnova enačba ni enako zanesljiva na celotnem območju koncentracije albumina in SHBG-ja, saj na mejnih področjih referenčnega območja predpostavke, na katerih temelji, ne držijo več v celoti (6). Vermeulnovo enačbo priporočajo smernice Evropske akademije za andrologijo iz leta 2020, saj je izračunan prosti testosteron dovolj dober približek rezultatom, dobljenim z referenčno metodo. Izpostavljeno je tudi, da je najbolj primeren način za merjenje prostega testosterona ravno ravnotežna dializa, sklopljena z LC/MS-MS, vendar se zavedajo njene nedostopnosti v rutinskih laboratorijih (21).

Koncentracijo prostega testosterona je mogoče določiti tudi s pomočjo enačb, ki temeljijo na empiričnem modelu. Empirični model dobimo s pomočjo regresije s povratnim zankanjem, za kar je treba analizirati veliko številov vzorcev. Modeli dobro opisujejo populacijo, na kateri so bili postavljeni, vendar jih je težko prenesti v drug laboratorij, saj so specifični za določeno populacijo in metodo merjenja (6,11).

Linearni modeli predvidevajo, da vsak dimer SHBG-ja veže dve molekuli testosterona s podobno afiniteto brez alosterije. Novejše študije sklepajo, da se SHBG v krvi nahaja kot homodimer, na posamezno mesto na dimeru SHBG-ja pa se testosteron veže s kompleksno alosterično interakcijo. Posledično se afiniteta med obema vezavnima mestoma značilno razlikuje (47). Alosterični model je bolj skladen z ravnotežno dializo in posledično bolj pravilen za izračun prostega testosterona, vendar za zdaj njegova uporaba še ni tako razširjena (6,47).

Za izračun približne koncentracije prostega testosterona so razvili indeks prostih androgenov (FAI, angl. *free androgen index*), imenovan tudi indeks prostega testosterona (FTI, angl. *free testosterone index*), ki se ga izračuna s pomočjo spodnje enačbe 3, iz koncentracije SHBG-ja in celokupnega testosterona (48).

$$FAI = 100 \times \frac{\text{celokupni testosteron [nmol/L]}}{SHBG \text{ [nmol/L]}} \quad (3)$$

FAI je primeren za oceno koncentracije prostega testosterona pri ženskah, zato ni treba izmeriti koncentracije prostega testosterona z delovno bolj zahtevnimi metodami. Predvsem se FAI pri ženskah uporablja pri diagnostiki stanj, kjer pride do povišane koncentracije androgenov (49,50). Njegova uporaba je pri moških odsvetovana, saj FAI pri moških preceni koncentracijo prostega testosterona zaradi nizke koncentracije SHBG-ja (48).

## ZAKLJUČEK

Merimo lahko celokupni, prosti ali biološko razpoložljivi testosteron. Biološko aktivne oblike testosterona pa je mogoče tudi izračunati. Za osnoven vpogled v androgeni status posameznika je načeloma dovolj meritev celokupnega testosterona. Za nadaljnjo diagnostiko pa je treba določiti koncentracijo biološko aktivnih oblik testosterona; izbira posamezne metode je odvisna od namena merjenja. V medicinskih laboratorijih trenutno za merjenje koncentracije celokupnega testosterona prevladujejo imunokemijske metode zaradi možnosti vzporedne analize vzorcev in nizke cene. V prihodnje jih bodo, če bodo postale cenovno ugodnejše in delovno manj zahtevne, v določeni meri nadomestile metode masne spektrometrije, vendar bodo verjetno uporabljane predvsem v specializiranih laboratorijih. Merjenje koncentracije biološko aktivnih oblik testostero-

na je večinoma analitsko zahtevnejše, z izjemo direktne imunske metode, ki pa ni dovolj občutljiva in primerljiva med laboratoriji. Koncentracijo biološko aktivnih oblik lahko tudi ocenimo s pomočjo različnih izračunov, ki trenutno zadovoljivo rešujejo problematiko za večino kliničnih potreb, predvsem pri ženskah. Ker različne metode za merjenje koncentracije celokupnega testosterona ne dajejo primerljivih rezultatov, so zelo pomembna prizadevanja za večjo primerljivost s pomočjo harmonizacije in standardizacije metod.

## LITERATURA

1. Krakowsky Y, Grober ED. Testosterone Deficiency - Establishing A Biochemical Diagnosis. *EJIFCC*. 2015;26(2):105–13.
2. Wheeler MJ. The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann Clin Biochem*. 1995;32(4):345–57.
3. Zorn B, Vlasisavljević V, Pfeifer M. Fiziologija moda. V: *Interna medicina*, 5 izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Slovensko zdravniško društvo, Knjižništvo Buča d.o.o.; 2018. 792–5.
4. Parish SJ, Simon JA, Davis SR, Giraldo A, Goldstein I, Goldstein SW, *et al*. International Society for the Study of Women's Sexual Health Clinical Practice Guideline for the Use of Systemic Testosterone for Hypoactive Sexual Desire Disorder in Women. *Climacteric*. 2021;24(6):533–50.
5. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A Critical Evaluation of Simple Methods for the Estimation of Free Testosterone in Serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3666–72.
6. Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW, Krishna M, Matsumoto AM, Jasuja R. A Reappraisal of Testosterone's Binding in Circulation: Physiological and Clinical Implications. *Endocr Rev*. 2017;38(4):302–24.
7. Mendel CM. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J Androl*. 1992;13(2):107–16.
8. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, *et al*. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2536–59.
9. Kazi M, Geraci SA, Koch CA. Considerations for the diagnosis and treatment of testosterone deficiency in elderly men. *Am J Med*. 2007;120(10):835–40.
10. Dobs AS. The role of accurate testosterone testing in the treatment and management of male hypogonadism. *Steroids*. 2008;73(13):1305–10.
11. Shea JL, Wong PY, Chen Y. Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem*. 2014;63:59–84.
12. Nisenblat V, Norman RJ. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(3):224–31.
13. Sharma A, Welt CK. Practical Approach to Hyperandrogenism in Women. *Med Clin North Am*. 2021;105(6):1099–116.
14. Speiser PW. Interpretation of pediatric endocrine laboratory tests: pitfalls in steroid hormone measurements and genotyping. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2007;5 Suppl 1:578–83.



15. Saboor Aftab SA, Kumar S, Barber TM. The role of obesity and type 2 diabetes mellitus in the development of male obesity-associated secondary hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(3):330–7.
16. Selvin E, Feinleib M, Zhang L, Rohrmann S, Rifai N, Nelson WG, *et al*. Androgens and diabetes in men: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes Care*. 2007;30(2):234–8.
17. Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, *et al*. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1669–75.
18. Rosano GMC, Cornoldi A, Fini M. Effects of androgens on the cardiovascular system. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(3 Suppl):32–8.
19. Lee EC, Fragala MS, Kavouras SA, Queen RM, Pryor JL, Casa DJ. Biomarkers in Sports and Exercise: Tracking Health, Performance, and Recovery in Athletes. *J Strength Cond Res*. 2017;31(10):2920–37.
20. Adlercreutz H, Härkönen M, Kuoppasalmi K, Näveri H, Huhtaniemi I, Tikkanen H, *et al*. Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. *Int J Sports Med*. 1986;7 Suppl 1:27–8.
21. Corona G, Goulis DG, Huhtaniemi I, Zitzmann M, Toppari J, Forti G, *et al*. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males. *Andrology*. 2020;8(5):970–87.
22. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(3):907–13.
23. Caronia LM, Dwyer AA, Hayden D, Amati F, Pitteloud N, Hayes FJ. Abrupt decrease in serum testosterone levels after an oral glucose load in men: implications for screening for hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(2):291–6.
24. Lehtihet M, Arver S, Bartuseviciene I, Pousette A. S-testosterone decrease after a mixed meal in healthy men independent of SHBG and gonadotrophin levels. *Andrologia*. 2012;44(6):405–10.
25. van der Veen A, van Faassen M, de Jong WHA, van Beek AP, Dijk-Brouwer DAJ, Kema IP. Development and validation of a LC-MS/MS method for the establishment of reference intervals and biological variation for five plasma steroid hormones. *Clin Biochem*. 2019;68:15–23.
26. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, *et al*. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society\* Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(5):1715–44.
27. Diver M. Laboratory Measurement of Testosterone. *Adv Manag Testosterone Defic*. 2009;37:21–31.
28. Simoni M, Fanelli F, Roli L, Pagotto U. Methodology for measuring testosterone, dihydrotestosterone and sex hormone-binding globulin in a clinical setting. In: *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution*. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2012:60–86.
29. Lewis JG. Steroid Analysis in Saliva: An overview. *Clin Biochem Rev*. 2006;27(3):139–46.
30. Guzelce EC, Galbiati F, Goldman AL, Gattu AK, Basaria S, Bhasin S. Accurate measurement of total and free testosterone levels for the diagnosis of androgen disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(4):101683.
31. Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):3971–3.
32. Handelsman DJ, Jimenez M, Singh GKS, Spaliviero J, Desai R, Walters KA. Measurement of testosterone by immunoassays and mass spectrometry in mouse serum, testicular, and ovarian extracts. *Endocrinology*. 2015;156(1):400–5.
33. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):405–13.
34. La'ulu SL, Kalp KJ, Straseski JA. How low can you go? Analytical performance of five automated testosterone immunoassays. *Clin Biochem*. 2018;58:64–71.
35. Montagna G, Balestra S, D'Aurizio F, Romanelli F, Benagli C, Tozzoli R, *et al*. Establishing normal values of total testosterone in adult healthy men by the use of four immunometric methods and liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(11):1936–44.
36. Hormone Standardization Program for Testosterone and Estradiol | CDC [Internet]. 2023 [citrano 2024 Feb 4]. Dostopno na: [https://www.cdc.gov/labstandards/csp/hs\\_host.html](https://www.cdc.gov/labstandards/csp/hs_host.html)
37. Rosner W, Vesper H, Endocrine Society, American Association for Clinical Chemistry, American Association of Clinical Endocrinologists, Androgen Excess/PCOS Society, *et al*. Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):4542–8.
38. Nader Rifai. *Tietz Textbook of Laboratory Medicine - 7th Edition*. Let. 2022. Saunders.
39. Wang Y, Gay GD, Botelho JC, Caudill SP, Vesper HW. Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2014;436:263–7.
40. Rochat B. Quantitative and Qualitative LC-High-Resolution MS: The Technological and Biological Reasons for a Shift of Paradigm. In: *Recent Advances in Analytical Chemistry*. IntechOpen; 2018.
41. Narinx N, David K, Walravens J, Vermeersch P, Claessens F, Fiers T, *et al*. Role of sex hormone-binding globulin in the free hormone hypothesis and the relevance of free testosterone in androgen physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(11):543.
42. Trost LW, Mulhall JP. Challenges in Testosterone Measurement, Data Interpretation, and Methodological Appraisal of Interventional Trials. *J Sex Med*. 2016;13(7):1029–46.
43. Diver MJ. Clinical Science Reviews Committee of the Association for Clinical Biochemistry. Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. *Ann Clin Biochem*. 2006;43(Pt 1):3–12.
44. Cumming DC, Wali SR. Non-Sex Hormone-Binding Globulin-Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;61(5):873–6.

45. Fiers T, Wu F, Moghetti P, Vanderschueren D, Lapauw B, Kaufman JM. Reassessing free-testosterone calculation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry direct equilibrium dialysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(6):2167–74.
46. Ly LP, Sartorius G, Hull L, Leung A, Swerdloff RS, Wang C, *et al.* Accuracy of calculated free testosterone formulae in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;73(3):382–8.
47. Zakharov MN, Bhasin S, Travison TG, Xue R, Ulloor J, Vasani RS, *et al.* A multi-step, dynamic allosteric model of testosterone's binding to sex hormone binding globulin. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;399:190–200.
48. Ho CKM, Stoddart M, Walton M, Anderson RA, Beckett GJ. Calculated free testosterone in men: comparison of four equations and with free androgen index. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(Pt 5):389–97.
49. Sever MJ, Janić M, Kocjan T, Kovac V, Pavlic DR, Rakuša M, *et al.* Strokovna priporočila za diagnostiko in zdravljenje sindroma polističnih jajčnikov. 2023.
50. Christ JP, Cedars MI. Current Guidelines for Diagnosing PCOS. *Diagnostics.* 2023;13(6):1113.

# Aberrant glycosylation as a biomarker in oncology

## *Spremembe v glikozilaciji kot biomarker v onkologiji*

**Neža Gregorčič<sup>1</sup>, Shruti Jain<sup>2</sup>, Kamlesh Gidwani<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

<sup>2</sup>University of Turku, Faculty of Technology, Department of Life Technologies, Biotechnology Unit

*Avtor za korenspondenco:*

**Neža Gregorčič, Master of Science, Republika Finska**

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

e-pošta: neza.gregorcic@mf.uni-lj.si

### ABSTRACT

Cancer represents a significant global health challenge, with nearly 20 million new cases and over 9 million deaths annually. Early diagnosis is a key factor in improving survival rates, yet current diagnostic methods lack sensitivity, specificity, and accessibility. Glycosylation patterns of biomarkers offer a promising target for early detection of cancer and the development of personalized treatment strategies. The europium-doped nanoparticle-based glycovariant assay represents a novel approach that leverages time-resolved fluorescence for enhanced sensitivity and glycan moiety recognition for enhanced specificity. This review explores glycosylation changes in cancer, emphasizing their potential as diagnostic tools, with a particular focus on the europium-doped nanoparticle-based glycovariant assay. The assay has demonstrated potential for identifying specific cancer-associated glycovariants in ovarian, prostate, breast, colorectal, and bladder cancers. The assay has the capacity to distinguish cancer-specific glycovariants from nonmalignant sources. However, further optimization and bigger sample cohorts are necessary to enhance the diagnostic utility of the assay.

**Key words:** glycosylation, cancer, biomarker, time-resolved fluorescence, lectins

### POVZETEK

Rak je s skoraj 20 milijoni novih primerov in 9 milijoni smrti letno znatni izziv globalnemu zdravju. Za izboljšanje stopnje preživetja je ključna zgodnja diagnoza, vendar so trenutne diagnostične metode, kar se tiče občutljivosti, specifičnosti in dostopnosti, pomanjkljive. Spremembe v glikozilaciji biomarkerjev nudijo obetavno možnost za zgodnje odkritje in izdelavo personaliziranih strategij zdravljenja. Analiza glikovariant s pomočjo z evropijem polnjenih nanodelcev je nov pristop, ki uporablja fluorescenco s časovnim zamikom za povečano občutljivost in prepoznavanje sladkorne komponente molekul za večjo specifičnost. Članek se osredotoča na spremembe glikozilacij pri raku s poudarkom na njihovem diagnostičnem potencialu in metodah, v ospredju je s pomočjo z evropijem polnjenih nanodelcev. Ta metoda kaže visok potencial za identifikacijo določenih glikovariant, ki jih povezujemo z rakom jajčnikov, prostate, dojke, črevesja in mehurja. Zmožnost razlikovanja za raka specifičnih glikovariant in glikovariant nemalignega izvora odpira vrata za izboljšano obravnavo onkoloških pacientov. Za večjo uporabnost metode pa so še vedno potrebne optimizacije in analiza z večjim številom vzorcev.

**Ključne besede:** glikozilacija, rak, biomarker, fluorescenca s časovnim zamikom, lektini



## INTRODUCTION

With nearly 20 million new cases and over 9 million deaths reported annually, cancer remains a pressing global problem (1). The prognosis for most cancers could be markedly enhanced through the implementation of early disease intervention, which hinges on the ability to diagnose the disease at an early stage. However, current diagnostic and monitoring strategies often fall short in terms of sensitivity, specificity, and accessibility. While traditional methods, such as imaging techniques and tissue biopsies, have proven invaluable, there are limitations to their effectiveness. They are invasive, costly, and susceptible to sampling errors. Moreover, existing biomarkers, though informative in certain contexts, may lack the necessary specificity or sensitivity for early detection or accurate monitoring of disease progression (2–4).

A biomarker can be defined as “a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention” (5). A cancer biomarker is considered clinically useful if it is significantly elevated compared to levels in age-matched healthy and benign controls and/or reflective of the disease progression/regression, and is present in easily obtained bodily fluids, such as serum, plasma, and urine (6, 7). The characteristics of an ideal biomarker are largely dependent on its intended use. For screening purposes, the biomarker should be highly specific, reference values should be well known, it should be cost-effective, and there should be implications for therapeutic or lifestyle interventions. Conversely, a diagnostic biomarker should be highly sensitive, cost-effective, have therapeutic implications, and elucidate the molecular pathogenesis of the disease. Finally, an ideal biomarker for prognosis and treatment monitoring should be highly specific, with low intra-individual variability, it should respond to therapy, be predictive of treatment effectiveness, and add to already known prognostic indicators or models (8). The majority of cancer biomarkers currently used in clinical practice lack the necessary performance characteristics to be of diagnostic value. Consequently, the diagnostic use of biomarkers depends largely on emerging clinical symptoms, family history, or genetic susceptibility. The development of cancerspecific biomarkers that are easily accessible and sensitive is required to improve screening, early diagnosis, monitoring, and prediction of disease progression and treatment (6, 7, 9).

In recent years, there has been a growing interest in utilizing cancer-specific glycosylation patterns as diagnostic and prognostic biomarkers. These distinct glycan signatures have the potential to facilitate early detection, enable the development of personalized treatment strategies, and facilitate the assessment of disease progression (10). This article provides an overview of glycosylation changes in cancer, emphasizing their potential as diagnostic tools, with a particular focus on the europium-doped nanoparticle-based glycovariant (EuNP-based GV) assays for the detection of glycosylated cancer biomarkers.

## GLYCOSYLATION

Glycans are saccharide chains, which can either be free or in the form of glycoconjugates. As glycoconjugates, they are attached to lipids or proteins. This attachment of sugars to proteins or lipids occurs during a posttranslational process known as glycosylation, which occurs in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (11). The process is done in several steps, which depend on substrate and enzyme availability (11, 12). Glycosylation begins with the determination of proteins to be glycosylated and the transfer of the monosaccharide to an amino acid. This is a part of the initiation step, which occurs in the endoplasmic reticulum. The exceptions to this are two Oglycosylations, N-acetylgalactosamine-type and Xylitol-type, which are initiated in the Golgi apparatus, and O-linked-N-acetylglucosaminylation, which occurs in the cytosol and nucleus. The initiation step is followed by glycotransferases further adding monosaccharides to growing oligosaccharide chains, resulting in core extension, elongation, and branching, as well as the final capping of glycans (12).

Most of the membrane and secreted proteins are glycosylated. Their variety and abundance directly reflect their importance and many functions. Their roles can be divided into three general categories: structural and modulatory properties, specific recognition by other molecules, and the molecular mimicry of host glycans. The first category consists of structural and modulatory properties, which include protective, stabilizing, organizational, and barrier functions. For example, glycocalyx acts as a physical barrier, shielding cellular contents from proteolytic recognition, antibody binding, and microbial attachment. Glycosylation also modulates protein interactions and protects

»

important molecules by binding them to glycosaminoglycan chains within the extracellular matrix, preventing the diffusion of factors away from the site and prolonging their active lives. The second category is specific recognition, which involves intrinsic interactions between glycans and glycan-binding proteins on cell surfaces. These interactions are crucial for cell-cell and cell-matrix interactions. An example is selectins, which recognize glycans on ligands to mediate the binding of blood and vascular cells in various situations. Finally, the third category, molecular mimicry of host glycans, refers to glycans that are specifically bound by various viruses, bacteria, and parasites, and glycans, targeted by toxins. These glycans play numerous roles. For example, some organisms can mask or modify glycans typically recognized by microorganisms or toxins, thus preventing their binding or damage (13).

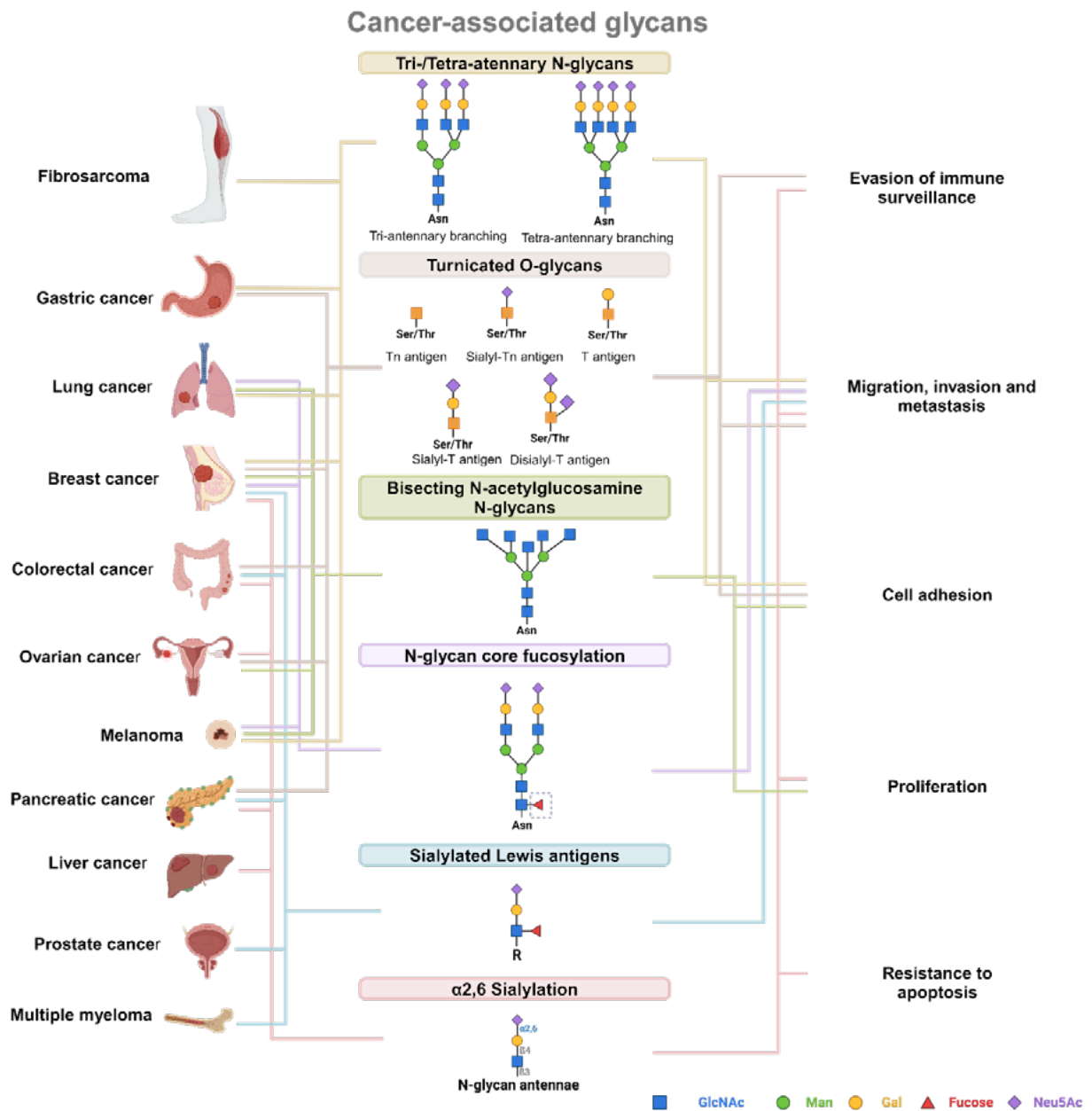
### Glycosylation changes in cancer

In the context of tumor progression, several glycan aberrations have been identified as pivotal pathophysiological events. These include the loss or overproduction of some glycans, the increased production of truncated glycans, and the synthesis of novel glycans (14–16). Such alterations stem from two main mechanisms: incomplete synthesis and neo-synthesis. Incomplete synthesis often occurs in early cancer stages, where normal synthesis of complex

glycans is impaired, resulting in the biosynthesis of truncated structures. On the other hand, neo-synthesis is more prevalent in advanced cancers, where cancer cells acquire genes involved in glycan biosynthesis, leading to abnormal glycosylation patterns (10). These changes in the glycosylation pathway may occur in the expression of specific glycotransferases, glycosidases, molecular chaperones, or lysosomal hydrolases. Another possibility is the mislocalization of the glycosyltransferases or a change in their nature. Glycosylation changes may also occur due to altered availability of protein substrates or nucleotide sugars and 3-phosphoadenosine-5-phosphosulfate, activity of nucleotide sugar and monosaccharide transporters, glycoprotein turnover kinetics, and pH of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (17).

Glycosylation aberrations that frequently occur in cancer include an increase in sialyl-Lewis structures, abnormal core fucosylation, increased sialylation, elevated N-glycan branching or exposure of the mucin-type O-glycan, and formation of Thomsen-Friedenreich (T) and Thomsennoveau (Tn) antigens. These changes play a role in many oncogenic processes, such as evasion of cell division checkpoints, evasion of death signals and immune surveillance, and migration to metastatic sites (10, 16, 18). Cancer-associated glycans are shown in Figure 1. >>





**Figure 1: Cancer-associated glycans.** The figure shows glycans commonly found in cancers. N-acetylglucosamine (GlcNAc), Mannose (Man), Galactose (Gal), N-Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac), Asparagine (Asn), Serine (Ser), Threonine (Thr). Created with BioRender.com.

**Slika 1: Z rakom povezani glikani.** Na sliki so prikazani glikani, pogosto prisotni pri rakavih obolenjih. N-acetilglukozamin (GlcNAc), manoza (Man), galaktoza (Gal), N-acetilneuraminska kislina (Neu5Ac), asparagin (Asn), serin (Ser), treonin (Thr). Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.



## Glycosylation of extracellular vesicles

Extracellular vesicles (EVs), membranous particles with a size range of 40 to 1000 nm, enclosed by a phospholipid bilayer, are secreted by various cells and represent a potential analyte for diagnosis and treatment monitoring of cancer (19, 20). EVs carry clinically relevant information, as they reflect the cell condition from which they originate. Furthermore, their production is increased in proportion to tumor size and growth rate (7). Moreover, since they can be found in bodily fluids like urine, plasma, and saliva, they can be obtained non-invasively (19). Similarly to free cancer-specific glycoproteins, EVs also present a unique set of glycan epitopes on their membrane (7).

Cancer-derived EVs have been found to display a tumor-associated glycocalyx, which could serve as crucial markers for the detection and isolation of EVs, and notably, for malignant and nonmalignant distinction. These changes have been observed in the early stages of the disease, indicating a potential use for early diagnosis (7, 21). Some of the reported glycocalyx aberrations include high-mannose and complex type N-glycans, polylactosamine, and sialylated glycans, specifically  $\alpha$ 2,6linked sialic acids (21).

## CANCER-SPECIFIC GLYCOSYLATION BIOMARKERS

Glycosylation changes in cancer have long been considered a hallmark of cancer and most of the currently recognized and used cancer biomarkers are glycoproteins. However, they are normally monitored for their total protein level. Currently, only two glycosylated biomarkers, alpha fetoprotein-L3 and cancer antigen 19-9 (CA19-9), are defined by their glycan moiety in clinical practice. The discovery and recognition of cancer-specific GVs could improve the specificity of these cancer biomarkers (2, 10, 16, 22–24). The most commonly employed glycoproteins used as cancer biomarkers are listed in Table 1, along with reported glycan alterations and the potential utility of glycan-specific detection. Some promising glycan targets, which are not yet in clinical use, are also listed.

**Table 1. Glycoproteins as cancer biomarkers.** Some of the most used glycoprotein cancer biomarkers and some potential new cancer biomarkers, glycosylation alterations reported in cancer, and the potential of glycovariant detection.

**Tabela 1. Glikoproteini kot onkološki biomarkerji.** Najpogostejši glikoproteini, ki se uporabljajo kot onkološki biomarkerji v praksi, in nekateri potencialni novi biomarkerji, za raka specifične spremembe v glikolizaciji in potencialna uporaba glikovariant.

Biomarker	Cancer type	Clinical use	Glycosylation alterations found in cancer	Potential utility of GV detection	Ref.
AFP-L3	Hepatic	Diagnosis, prognosis	Core-fucosylation	Already in clinical use	(27)
CA19-9	Pancreatic	Diagnosis, prognosis	Sialyl-Lewis A structure	Already in clinical use	(27)
CA15-3	Breast	Monitoring of disease progression and response to therapy	Core 1-based O-glycosylation in place of the normal core 2based O-glycosylation, Tn and T-sialylation, and 3O sulphated or 3-sialylated core 1 and extended core 1	Increased specificity and sensitivity	(68)
CA125	Ovarian	Diagnosis, monitoring treatment response, detecting recurrence	Increased core-fucosylated biantennary mono-sialylated glycans, high-mannose type, and complex type N-glycan. Decreased bisecting biantennary and nonfucosylated glycans. Core 1 and 2 type glycans with branched core 1 antennae	Increased sensitivity and specificity	(56, 57)

Biomarker	Cancer type	Clinical use	Glycosylation alterations found in cancer	Potential utility of GV detection	Ref.
CEA	Colorectal	Monitoring treatment response, detecting recurrence	Branched N-glycans, higher density of O-glycans, incomplete glycan synthesis, increased sialylation and fucosylation	Screening	(69)
PSA	Prostate	Diagnosis, monitoring treatment response, detecting recurrence	Changes in core fucosylation and sialylation, highly branched N-glycans, low molecular weight PSA without N-glycans, and Lewis X antigen	Improved specificity	(66, 71)
Hp	Hepatic	Prognosis	Increased bi-fucosylation	Diagnosis	(27, 72)
	Ovarian	Prognosis	Increased fucosylation	Diagnosis	
Fetuin-A	Hepatic		Increased fucosylation	Diagnosis, prognosis	(27)
	Cholangio				
Total serum/plasma profiles	Hepatic		Increased multi-antennary glycans with fucose residues	Diagnosis	
	Gastric		Decreased core-fucosylated glycans; increased hybrid and multi-branched structures and decreased monoantennary, galactose, bisecting type, and core fucose structures	Diagnosis, monitoring progression	
	Pancreatic		Increased core-fucose residues	Diagnosis	
	Breast		Increased sialylation, branching, and outer-arm fucosylation and decreased high-mannosylated and biantennary core-fucosylated glycans	Diagnosis	
IgG	Hepatic		Decreased galactosylation; increased core-fucosylation	Diagnosis, prognosis	
	Colorectal		Decreased galactosylation; decreased galactosylation and sialylation; increased core-fucosylation of neutral glycans and decreased corefucosylation of sialylated glycans	Diagnosis	
	Gastric		Decreased galactosylation	Diagnosis	
	Lung		Decreased galactosylation	Diagnosis	
	Ovarian		Decreased galactosylation	Diagnosis	
AIAT	Lung		Increased galactosylation, fucosylation, and poly-LacNAc structures	Diagnosis	
	Hepatic		Increased fucosylation	Diagnosis	

»

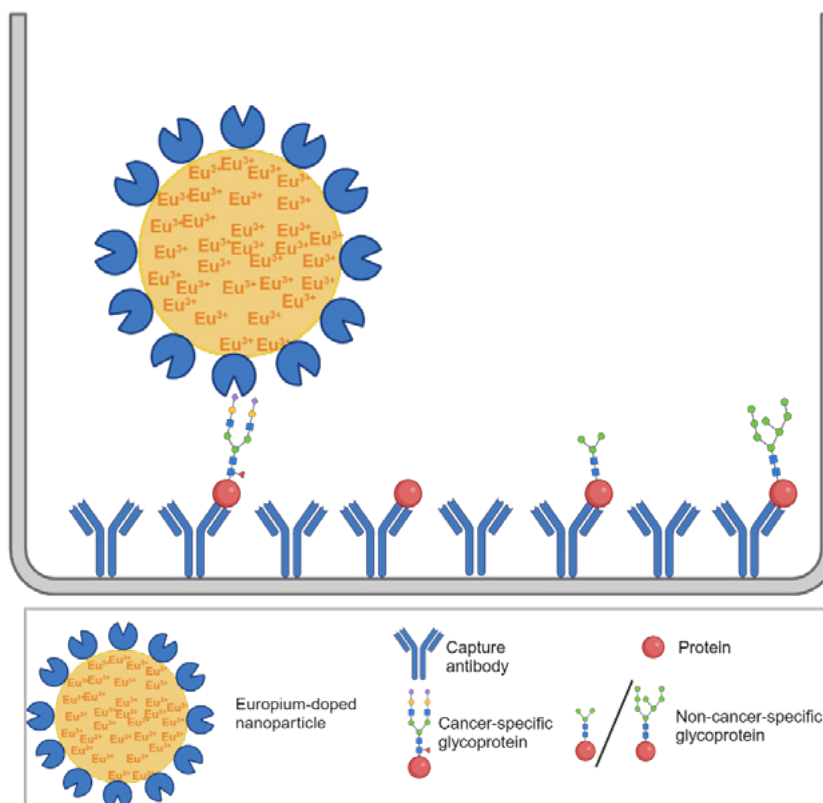
Glycovariant (GV); References (Ref.); Alpha-fetoprotein (AFP-L3); Cancer antigen 15-3 (CA153); Cancer antigen 19-9 (CA19-9); Cancer antigen 125 (CA125); Carcinoembryonic Antigen (CEA); Prostate-Specific Antigen (PSA); Haptoglobin (Hp); Immunoglobulin G (IgG);  $\alpha_1$ Antitrypsin (AIAT);  $\alpha_1$ -Acid glycoprotein (AGP); Ceruloplasmin (CP)

## Europium-doped nanoparticles-based glycovariant assay

Several advanced techniques are used to analyze glycoproteins to target glycan alterations in cancer, each with distinct advantages and limitations. Detailed glycoprotein characterization methods, such as high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy, provide high sensitivity and specificity for detailed structural and quantitative analysis but require complex preparation, skilled personnel, expensive equipment, and a lot of time. Thus these methods, while useful for novel biomarker discovery, are not suitable for routine clinical use (25–27). To this end, a range of lectin-based assays has been developed, including microarrays, enzyme-linked lectin assays, lectin immunosorbent assays, and affinity chromatography. Their key advantage is the ability to differentiate between vario-

us glycan structures without the removal of the sugar component from glycoproteins or the addition of fluorescent labels. Although these methods show promise for the detection of cancer glycoproteins because of their simplicity and suitability for high-throughput screening, they exhibit several disadvantages, such as the need to deglycosylate antibodies used for capture or detection, and lower sensitivity and specificity due to the binding of lectins to glycans expressed by unrelated proteins (25, 27).

The EuNP-based GV assay is a sandwich-like immunoassay. In this assay, immobilized capture antibodies recognize and bind the protein moiety of the analyte, while lectins or glycan-specific antibodies coated on EuNPs recognize and bind the cancer-specific glycan moiety. The amount of glycoprotein is then measured as time-resolved fluorescence (28). This principle is shown in Figure 2.



**Figure 2: Europium-doped nanoparticle-based glycovariant assay.** In this assay, immobilized capture antibodies recognize and bind the protein moiety of the analyte, while lectins or glycan-specific antibodies coated on nanoparticles recognize and bind the cancer-specific glycan moiety. The amount of glycoprotein is then measured as time-resolved fluorescence. Created with BioRender.com.

**Slika 2: Analiza glikovariant s pomočjo z evropijem polnjenih nanodelcev.** Pri tej metodi imobilizirana protitelesa prepoznajo in vežejo beljakovinski del analita, medtem ko lektini ali za glikane specifična protitelesa, vezana na zunanosti nanodelcev, prepoznajo in vežejo za raka specifični glikanski del. Količina glikoproteina se nato izmeri kot fluorescenca s časovnim zamikom. : Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.



The use of different capture and tracer (captured glycoprotein<sup>tracer</sup>) combinations in EuNP-based GV assays has shown promise for the specific detection of cancer-associated glycovariants across multiple cancer types, including prostate, breast, colorectal, and bladder (28–38). Furthermore, this method has shown potential for the detection of glycosylation changes on the surface of EVs. It has been proposed that cancer-specific EVs could be effectively characterized using capture antibodies and EuNP-linked lectins and antibodies targeting specific proteins or glycan structures known to be present on the EV surface, such as tetraspanins (e.g., CD9, CD63, CD81) and integrins (20,39–42).

## COMPONENTS OF THE EUROPIUM-DOPED NANOPARTICLE-BASED GLYCOVARIANT ASSAY

The performance of the EuNP-based glycovariant assay hinges on several essential equipment components and materials. Firstly, the assay requires the use of fluorescent NPs, specifically (Eu<sup>3+</sup>)-chelate-doped NPs, which exhibit time-resolved fluorescence. Consequently, a time-resolved fluorescence microplate reader is required to measure the signal produced. Secondly, lectins or glycan-specific antibodies must be coated on the aforementioned NPs so that they can bind to the glycan moiety of the target glycoprotein. Thirdly, biotinylated capture antibodies must be immobilized on a streptavidin-coated low-fluorescence microtitration plate in order to bind the protein moiety of the target glycoprotein. Additionally, some basic materials, such as wash and assay buffers, are required to maintain proper conditions during the assay. Lastly, conventional laboratory equipment, such as plate shakers for incubation and centrifuges for sample preparation, is needed (28–30, 32, 35, 43).

### Lectins

Lectins are proteins of nonimmune origin that specifically recognize and reversibly bind glycans without changing their structure (15, 44). They can form bonds with

monosaccharides, oligosaccharides, and sugar residues in complex molecules. The carbohydrate-lectin interaction depends on many factors, such as lectin valence, the structure of binding sites, and their spatial arrangement (44).

As an analytical tool, the most important aspect of lectins is their specificity. This characteristic is determined by carbohydrate residues in glycans (44, 45). Each lectin exhibits a specific affinity for a particular carbohydrate structure (45). Carbohydrate residues may be located either at the terminus of a carbohydrate chain or within the chain itself. Some lectins can recognize and bind terminal residues, while others can bind those within a chain. Lectins are often specific to the definite anomeric form of carbohydrate molecules ( $\alpha$ - or  $\beta$ -anomer) and they differentiate between sequences of carbohydrate residues (44).

Another crucial aspect of lectins' analytical utility is their affinity for the analyte. Unlike antibodies, which exhibit high affinity with dissociation constants in the range of  $10^{-8}$  to  $10^{-12}$  M, lectins typically have lower affinity, with dissociation constants ranging between  $10^{-4}$  and  $10^{-7}$  M. However, when lectins interact with polysaccharides through polyvalent interactions, their affinities can be comparable to those observed in immune reactions (38, 44).

### Glycan-binding antibodies

Antibodies possess diverse structures, enabling them to bind specifically and with high affinity to a wide range of targets. However, their effectiveness in detecting carbohydrates is limited compared to proteins due to various factors, such as the less T-cell dependent nature of anti-glycan immune responses and the preference for larger, non-carbohydrate portions of biomolecules. Despite these challenges, efforts have been made to develop anti-glycan antibodies against various targets including cancer epitopes, such as the monoclonal anti-Sialyl-Tn (anti-STn) antibody. However, the process of generating these antibodies is often tedious due to the lack of accessibility of pure glycans. The antibodies themselves can also suffer from issues such as specificity and affinity (46).

### Europium-doped nanoparticles

Polystyrene NPs, employed as labels in the EuNP-based GV assay, have a diameter of 107 nm and contain approximately 30 000 chelated Eu<sup>+3</sup> ions per particle. Due to the

»

high concentration of  $\text{Eu}^{+3}$  chelates in each NP, the signal is amplified by a factor of 30 000 compared to a single  $\text{Eu}^{+3}$  chelate. The coupling of several antibodies or lectins on the surface of a single NP enables the creation of a high density of binding sites on the surface of NPs, thereby increasing their avidity. The combination of high avidity and signal amplification significantly enhances the sensitivity of the assay (6, 47).

## Time-resolved fluorescence

Fluorescence is a phenomenon whereby a fluorophore, a molecule with the capacity to fluoresce, absorbs electromagnetic radiation, typically from ultraviolet or visible light, and subsequently emits a photon of lower energy, which implies a smaller frequency and a longer wavelength. The distinction between the absorbed and emitted energy is referred to as the Stokes shift (48). Fluorometric measurement presents certain challenges, including autofluorescence and nonspecific fluorescence, which can result in decreased sensitivity (49).

Lanthanides, such as Eu, and their chelates, exhibit distinctive fluorescent properties, including long fluorescence decay times (up to over 2 ms when in a complex), sharp emission peaks, and large Stokes shifts (50, 51). These properties render them an optimal label for detection with time-resolved fluorescence. The application of time-resolved fluorescence measurement has been shown to reduce the background interference of biological matrix fluorescence and to improve the sensitivity of such assays (51).

## Samples

The sensitivity of the EuNP-based GV assay allows for its performance on small sample volumes (a few microliters), which is an advantage over traditional enzyme-linked immunosorbent assays (52). The types of samples required for these assays are typically bodily fluids in which cancer markers are present. Commonly used samples include serum, plasma, and more specialized fluids such as ovarian cyst fluid, placental homogenate, and ascites fluid (28, 32, 34, 36, 52, 53). The choice of sample depends on the specific cancer being investigated (52).

## Ovarian cancer

Ovarian cancer is one of the most prevalent gynecological cancers, with over 300 000 reported new cases worldwide according to Globocan 2022 statistics (1). The primary challenge associated with this cancer is a high mortality rate, which is largely attributable to late-stage diagnosis in the majority of cases. Currently, diagnosis is based on serum cancer antigen 125 (CA125) concentration in symptomatic women. If values are elevated, an ultrasound of the abdomen and pelvis is used to confirm the diagnosis (54).

CA125 is a membrane-bound mucin – a highly O-glycosylated glycoprotein. O-glycans account for over 50% of its mass. The high amounts of glycosylation are due to tandem repeats with high amounts of serines and threonines creating many glycosylation sites, which leads to many subspecies. As a serum biomarker, it is typically employed for the diagnosis and monitoring of epithelial ovarian cancer. However, elevated concentrations have been observed in several other conditions, including endometriosis, liver disease, ovarian cysts, pregnancy, ovulatory cycles, heart failure, and some other malignant conditions (55). The biomarker's extensive glycosylation suggests the potential for increased specificity if cancer-specific glycovariants can be distinguished. Elevated concentrations of core-fucosylated biantennary monosialylated glycans in serum samples of cancer patients have been reported. In contrast, levels of mostly bisecting biantennary and non-fucosylated glycans have been found to be decreased. Furthermore, a prevalence of high-mannose type and complex type Nglycan structures has been observed. In addition, O-glycans in ovarian cancer cell lines, such as OVCAR3, are predominantly composed of core 1 and 2 type glycans with branched core 1 antennae (56, 57).

## Europium-doped nanoparticles-based glycovariant assay in ovarian cancer

The EuNP-based GV assay was used to identify lectins that can discriminate between CA125 from epithelial ovarian cancer and non-cancer sources. It was found that macrophage galactosyltransferase lectin (MGL)-coated EuNPs specifically bind to the CA125 isoform produced by cancer cells. In addition, the detection of CA125 from non-malignant sources was reduced compared to the conventional immunoassay (58). Similar observations were made with anti-STn monoclonal antibodies coated on  $\text{Eu}^{+3}$ -doped NPs, which efficiently recognized the epithelial ovarian cancer- >>

rassociated CA125 isoform produced by OVCAR-3. The assay also detected this CA125 GV in serum with a sensitivity of 73.3%, while 95% of endometriosis cases remained undetected (59). The performance of the CA125<sup>STn</sup> assay is particularly impressive at high specificity (90% or greater), with improvements of 10.6% and 8.9% over conventional CA125 immunoassay with and without borderline cases. An even more dramatic improvement was seen in postmenopausal cases, with 17.2% higher detection at 90% specificity compared to the conventional immunoassay (60).

Both MGL and anti-STn coated NPs were also evaluated as a potential tool in the differential diagnosis of pelvic masses in a larger sample cohort; 549 patients with epithelial ovarian cancer, benign ovarian tumors, and endometriosis. Both GV assays demonstrated superior area under the ROC curve (AUC) and lower false positive rates compared to the conventional CA125 immunoassay. The sensitivity of the CA125<sup>STn</sup> assay was significantly better than the conventional immunoassay, with 85% vs. 74% sensitivity at 90% specificity (61). Both GVs were also studied to determine their potential for monitoring treatment and follow-up in high-grade serous ovarian cancer. The study showed promising results for the CA125<sup>STn</sup> assay in differentiating between low and high tumor burden. Patients with complete cytoreduction were found to have significantly lower STn glycoprotein levels at diagnosis than those with suboptimal cytoreduction. In contrast, patients with suboptimal cytoreduction could not be differentiated using the conventional CA125 immunoassay. The nadir value of CA125<sup>STn</sup> was predictive of the patients' progression-free survival. The CA125<sup>STn</sup> test improved the detection of disease recurrence, showing a higher biomarker increase in 80.0% of patients and an earlier increase in 37.0% of patients (62).

While CA125<sup>STn</sup> appears to be the most promising combination to date, other EuNP-based GV assays have also shown some potential in discriminating epithelial ovarian cancer, such as CA153<sup>STn</sup>, CA15-3<sup>Tn</sup>, integrin  $\alpha 3^{\text{STn}}$ , and CD63<sup>STn</sup> (39, 60).

## PROSTATE CANCER

With about 1.5 million newly reported cases in 2022, prostate cancer ranks as the most common cancer in males world-

wide (1). The most commonly used biomarker and one of the oldest biomarkers assisting in prostate cancer diagnosis is the serum prostate-specific antigen (PSA). PSA is a kallikrein glycoprotein with a single N-oligosaccharide chain attached to Asn-54 produced by prostate epithelial cells (63, 64). An elevation in serum PSA levels is typically indicative of disruption to the prostate basement membrane, which is normally caused by cancer cells. However, it can also be caused by benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatitis, or manipulation of the prostate. A lack of specificity frequently results in the overdiagnosis of patients and the administration of unnecessary treatments (63, 65). A significant proportion of PSA's mass is constituted by heavy O-glycosylation. Studies have reported alterations in glycosylation patterns, including increased core fucosylation and sialylation, in prostate cancer. Detection of these aberrant glycovariants could improve discrimination between malignant and benign conditions (66).

### Europium-doped nanoparticles-based glycovariant assay in prostate cancer

The EuNP-based GV assay was employed to specifically identify fucosylated PSA. The glycan moiety was bound by Aleuria aurantia lectin as a proof-of-concept study on a small cohort of 36 tissue samples (11 benign and 25 cancerous) and 42 urine samples (16 cancerous, 15 BPH, and 11 young males). The findings revealed a markedly elevated PSA fucosylation level in malignant tissue in comparison to benign tissue. In urine samples, the EuNP-based GV assay demonstrated superior discrimination between the three groups compared to total PSA and free PSA concentrations in urine. However, the promising results observed in urine samples did not translate into serum and plasma samples due to the high variability of the LN-CaP cell line PSA standard recovery and high background signal. EVs may also represent a promising target for the GV assay. Higher integrin  $\alpha 3$  levels were observed in more aggressive prostate cancer-derived cell lines, whereas less aggressive cell lines exhibited higher epithelial cell adhesion molecule levels (40). A further investigation into the potential of lectins for cancer biomarker detection has been conducted, with five lectins identified as having the greatest promise for detection in serum and plasma. These include mannose-binding lectin, *Trichosanthes japonica* agglutinin II, Wheat Germ Agglutinin (WGA), *Wisteria floribunda* lectin and MGL (6).

»

## BREAST CANCER

Breast cancer is the most common cancer in women, with over 2 million reported new cases in 2022 (1). Cancer antigen 15-3 (CA15-3) is normally expressed in secretory epithelial cells at the apical plasma membrane. Elevated CA15-3 is observed in the majority of breast cancer patients. Elevation of the mucin also occurs in different types of advanced adenocarcinoma, such as pancreatic, gastric, and lung adenocarcinoma (67). Alterations in the glycosylation pattern of CA15-3 have been observed in breast cancer, including the presence of core 1-based Oglycosylation in place of the normal core 2-based O-glycosylation, Tn and T-sialylation, and 3O-sulfated or 3-sialylated core 1 and extended core 1 (68).

### Europium-doped nanoparticles-based glycovariant assay in breast cancer

CA15-3 was glycoprofiled with 28 lectins to identify those that recognize the carbohydrate structural changes associated with breast cancer. The most promising tracers were MGL and WGA-doped NPs, with clinical sensitivities of 67.9% and 81.1%, respectively, and specificities of 90%. In comparison, the conventional CA15-3 assay demonstrated a sensitivity of 66.0% at 90% specificity (68). In a subsequent study, the CA15-3<sup>WGA</sup> assay was again identified as a promising assay for breast cancer detection, in conjunction with the CA125<sup>WGA</sup> assay and the CD63 immunoassay. Significant differences were observed between the case and control groups for the CA125<sup>WGA</sup>, CA15-3<sup>WGA</sup>, and CD63 immunoassay measurements. Furthermore, significant improvements were reported in the AUCs of the new GV assays, particularly in combination with CD63 immunoassay, as compared to the conventional immunoassay (41).

## COLORECTAL CANCER

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide, with over a million reported new cases in 2022 (1). Screening programs that identify precancerous polyps or diagnose colorectal cancer using colonoscopy tend to be successful for the 80% of colorectal cancers that develop from these polyps (69). Biomarkers can prove particularly

useful in monitoring colorectal cancer treatment. Currently, the most widely used biomarker for this purpose is carcinoembryonic antigen (CEA). However, high concentrations of CEA also appear in benign conditions such as hepatitis, pancreatitis, inflammatory bowel disease, and Crohn's disease. Other biomarkers can assist with diagnosis, postoperative follow-up, and treatment monitoring. These include CA19-9, CA125, cancer antigen 72-4 (CA72-4), and tumor-associated glycoprotein 72 (TAG 72) (40, 50). Several glycosylation processes occur during malignant transformation in colorectal cancer, including increased branching of N-glycans, higher density of O-glycans, incomplete glycan synthesis, glycan neo-synthesis, increased sialylation, and increased fucosylation (69).

### Europium-doped nanoparticles-based glycovariant assay in colorectal cancer

A small cohort of 22 colorectal cancer patients was evaluated, comprising 11 early-stage (I–II) and 11 late-stage (III–IV) cases. CA125<sup>WGA</sup>, CA19-9<sup>Ma696</sup>, and CA19-9<sup>Con-A</sup> assays demonstrated high sensitivity and specificity in detecting late-stage samples, whereas the CD151<sup>CD63</sup> assay exhibited limited performance in recognizing early-stage colorectal cancer. CA125<sup>WGA</sup> identified 11 out of 22 colorectal cancers, CA19-9<sup>Ma696</sup> recognized 9 out of 22 colorectal cancers, CA19-9<sup>Con-A</sup> detected 11 out of 22 colorectal cancers, and CD151<sup>CD63</sup> assay detected 8 out of 11 early-stage colorectal samples. A combination of all three assays may be useful for the post-treatment follow-up, for the detection of early relapse, and for the screening of colorectal cancer. However, a larger sample cohort is necessary for the evaluation of the assays (42).

## BLADDER CANCER

Bladder cancer is the second most common urological cancer, with over 6 hundred thousand new cases reported in 2022 (1). The current diagnostic approach for bladder cancer is based on cystoscopy and urine cytology. While cystoscopy is an invasive and expensive procedure, cytology lacks sensitivity to low-grade tumors, necessitating the development of a targeted, less invasive, more sensitive, and highly specific approach for bladder cancer diagnosis (70).



## Europium-doped nanoparticles-based glycovariant assay in bladder cancer

One potential avenue for improving the diagnosis process is the utilization of Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I)-coated NPs in a GV integrin  $\alpha 3^{UEA-I}$  assay. The assay was conducted on a limited cohort of urine samples, comprising 13 patients with bladder cancer and 9 patients with BPH. The assay demonstrated encouraging outcomes, with a statistically significant differentiation between cancer and benign samples. However, further research is necessary (20).

## CONCLUSION

In conclusion, cancer remains a major global health problem and early diagnosis is crucial for improving survival rates. Current diagnostic methods have limitations, and there is a need for easily accessible and sensitive cancer biomarkers. Glycosylation patterns have shown promise as diagnostic and prognostic biomarkers, and the EuNP-based GV assay has demonstrated potential in detecting glycosylated cancer biomarkers. However, further research and development are needed to validate these biomarkers and improve their sensitivity and specificity.

## REFERENCES

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [accessed on 20. 5. 2024]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/en>
2. He K, Baniasad M, Kwon H, Caval T, Xu G, Lebrilla C, et al. Decoding the glycoproteome: a new frontier for biomarker discovery in cancer. *J Hematol Oncol.* 2024;17(1).
3. Crosby D, Bhatia S, Brindle KM, Coussens LM, Dive C, Emberton M, et al. Early detection of cancer. *Science.* 2022;375(6586).
4. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, Gonçalves AC, Sarmiento-Ribeiro AB, Melo JB, et al. Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes (Basel).* 2021;12(3):1–20.
5. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
6. Gidwani K, Kekki H, Terävä J, Soukka T, Sundfeldt K, Pettersson K. Nanoparticle-aided glycovariant assays to bridge biomarker performance and ctDNA results. *Mol Aspects Med.* 2020;72.
7. Grzesik K, Janik M, Hoja-Lukowicz D. The hidden potential of glycomarkers: Glycosylation studies in the service of cancer diagnosis and treatment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2023;1878(3).
8. Burlina A, Brand E, Hughes D, Kantola I, Krämer J, Nowak A, et al. An expert consensus on the recommendations for the use of biomarkers in Fabry disease. *Mol Genet Metab.* 2023;139(2).
9. Sarhadi VK, Armengol G. *Molecular Biomarkers in Cancer.* Biomolecules. 2022;12(8).
10. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(9):540–55.
11. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(6):346–66.
12. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(12):729–49.
13. Varki A, Gagneux P. Biological Functions of Glycans. In: Varki A, Cummings R, Esko J, editors. *Essentials of Glycobiology.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.
14. Bellis S, Reis C, Varki A, Kannagi R, Stanley P. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings R, Esko J, et al., editors. *Essentials of Glycobiology.* 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022.
15. Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(7):526–42
16. Hakomori S. Tumor Malignancy Defined by Aberrant Glycosylation and Sphingo(glyco)lipid Metabolism. *Cancer Res.* 1996;56(23):5309–5318
17. Stowell SR, Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:473–510
18. Dimitroff CJ. I-branched carbohydrates as emerging effectors of malignant progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(28):13729–37
19. Moghassemi S, Dadashzadeh A, Sousa MJ, Vlieghe H, Yang J, León-Félix CM, et al. Extracellular vesicles in nanomedicine and regenerative medicine: A review over the last decade. *Bioact Mater.* 2024;36:126–56
20. Islam MK, Syed P, Dhondt B, Gidwani K, Pettersson K, Lamminmäki U, et al. Detection of bladder cancer with aberrantly fucosylated ITGA3. *Anal Biochem.* 2021;628.
21. Martins AM, Ramos CC, Freitas D, Reis CA. Glycosylation of cancer extracellular vesicles: Capture strategies, functional roles and potential clinical applications. *Cells.* 2021;10(1):1–26
22. Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clin Proteomics.* 2011;8(1)
23. Hashim OH, Jayapalan JJ, Lee CS. Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ.* 2017;5:e3784
24. Das S, Dey MK, Devireddy R, Gartia MR. Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Sensors.* 2024;24(1).
25. Kekki H, Peltola M, van Vliet S, Bangma C, van Kooyk Y, Pettersson K. Improved cancer specificity in PSA assay using Aleuria aurantia lectin coated Eu-nanoparticles for detection. *Clin Biochem.* 2017;50(1–2):54–61.
26. Haga Y, Ueda K. Glycosylation in cancer: its application as a biomarker and recent advances of analytical techniques. *Glycoconj J.* 2022;39(2):303–13.
27. Wang M, Zhu J, Lubman DM, Gao C. Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: A promising and thorny journey. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(4):407–16.



28. Gidwani K, Nadeem N, Huhtinen K, Kekki H, Heinosaalo T, Hynninen J, et al. Europium Nanoparticle-Based Sialyl-Tn Monoclonal Antibody Discriminates Epithelial Ovarian Cancer-Associated CA125 from Benign Sources. *J Appl Lab Med*. 2019;4(3):299–310.
29. Jain S, Nadeem N, Ulfenborg B, Mäkelä M, Ruma SA, Terävä J, et al. Diagnostic potential of nanoparticle aided assays for MUC16 and MUC1 glycovariants in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2022;151(7):1175–84.
30. Jain S, Parimelazhagan Santhi P, Vinod R, Afrin Ruma S, Huhtinen K, Pettersson K, et al. Aberrant glycosylation of  $\alpha 3$  integrins as diagnostic markers in epithelial ovarian cancer. *Clin Chim Acta*. 2023;543.
31. Salminen L, Nadeem N, Rolfsen AL, Dørum A, Laajala TD, Grønman S, et al. Exploratory Analysis of CA125-MGL and-STn Glycoforms in the Differential Diagnostics of Pelvic Masses. *J Appl Lab Med*. 2020;5(2):263–72.
32. Gidwani K, Huhtinen K, Kekki H, Van Vliet S, Hynninen J, Koivuviita N, et al. A nanoparticle-lectin immunoassay improves discrimination of serum CA125 from malignant and benign sources. *Clin Chem*. 2016;62(10):1390–400.
33. Terävä J, Verhassel A, Botti O, Islam MK, Leivo J, Wittfooth S, et al. Primary breast cancer biomarkers based on glycosylation and extracellular vesicles detected from human serum. *Cancer Rep*. 2022;5(8).
34. Islam MK, Syed P, Dhondt B, Gidwani K, Pettersson K, Lamminmäki U, et al. Detection of bladder cancer with aberrantly fucosylated ITGA3. *Anal Biochem*. 2021;628.
35. Salminen L, Nadeem N, Jain S, Grønman S, Carpén O, Hietanen S, et al. A longitudinal analysis of CA125 glycoforms in the monitoring and follow up of high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2020;156(3):689–94.
36. Vinod R, Mahran R, Routila E, Leivo J, Pettersson K, Gidwani K. Nanoparticle-aided detection of colorectal cancer-associated glycoconjugates of extracellular vesicles in human serum. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
37. Bayoumy S, Hyytiä H, Leivo J, Talha SM, Huhtinen K, Poutanen M, et al. Glycovariant-based lateral flow immunoassay to detect ovarian cancer-associated serum CA125. *Commun Biol*. 2020;3(1).
38. Syed P, Gidwani K, Kekki H, Leivo J, Pettersson K, Lamminmäki U. Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. *Proteomics*. 2016;16(8):1257–65.
39. Jain S, Parimelazhagan Santhi P, Vinod R, Afrin Ruma S, Huhtinen K, Pettersson K, et al. Aberrant glycosylation of  $\alpha 3$  integrins as diagnostic markers in epithelial ovarian cancer. *Clin Chim Acta*. 2023;543.
40. Islam MK, Syed P, Lehtinen L, Leivo J, Gidwani K, Wittfooth S, et al. A Nanoparticle-Based Approach for the Detection of Extracellular Vesicles. *Sci Rep*. 2019;9(1).
41. Terävä J, Verhassel A, Botti O, Islam MK, Leivo J, Wittfooth S, et al. Primary breast cancer biomarkers based on glycosylation and extracellular vesicles detected from human serum. *Cancer Rep*. 2022;5(8).
42. Vinod R, Mahran R, Routila E, Leivo J, Pettersson K, Gidwani K. Nanoparticle-aided detection of colorectal cancer-associated glycoconjugates of extracellular vesicles in human serum. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
43. Gidwani K, Huhtinen K, Kekki H, Van Vliet S, Hynninen J, Koivuviita N, et al. A nanoparticle-lectin immunoassay improves discrimination of serum CA125 from malignant and benign sources. *Clin Chem*. 2016;62(10):1390–400.
44. Hendrickson OD, Zherdev AV. Analytical Application of Lectins. *Crit Rev Anal Chem*. 2018;48(4):279–92.
45. Bojar D, Meche L, Meng G, Eng W, Smith DF, Cummings RD, et al. A Useful Guide to Lectin Binding: Machine-Learning Directed Annotation of 57 Unique Lectin Specificities. *ACS Chem Biol*. 2022;17(11):2993–3012.
46. Ward EM, Kizer ME, Imperiali B. Strategies and Tactics for the Development of Selective Glycan-Binding Proteins. *ACS Chem Biol*. 2021;16(10):1795–813.
47. Soukka T, Antonen K, Härmä H, Pelkkikangas AM, Huhtinen P, Lövgren T. Highly sensitive immunoassay of free prostate-specific antigen in serum using europium(III) nanoparticle label technology. *Clin Chim Acta*. 2003;212:45–85.
48. Boreham A, Brodwolf R, Walker K, Haag R, Alexiev U. Time-resolved fluorescence spectroscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy for characterization of Dendritic polymer nanoparticles and applications in Nanomedicine. *Molecules*. 2017;22(1).
49. Härmä H, Soukka T, Lövgren T. Europium Nanoparticles and Time-resolved Fluorescence for Ultrasensitive Detection of Prostate-specific Antigen. *Clin Chem*. 2001;47(3):561–8.
50. Shen Y, Xu S, He D. A novel europium chelate coated nanosphere for time-resolved fluorescence immunoassay. *PLoS One*. 2015;10(6).
51. Yuan J, Matsumoto K, Kimura H. A New Tetradentate  $\beta$ -Diketone-Europium Chelate That Can Be Covalently Bound to Proteins for Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Anal Chem*. 1998;70(3):596–601.
52. Gidwani K, Kekki H, Terävä J, Soukka T, Sundfeldt K, Pettersson K. Nanoparticle-aided glycovariant assays to bridge biomarker performance and ctDNA results. *Mol Aspects Med*. 2020;72.
53. Kekki H, Peltola M, van Vliet S, Bangma C, van Kooyk Y, Pettersson K. Improved cancer specificity in PSA assay using Aleuria aurantia lectin coated Eu-nanoparticles for detection. *Clin Biochem*. 2017;50(1–2):54–61.
54. Ovarian cancer: recognition and initial management Clinical guideline [Internet]. [accessed on 20. 5. 2024]. Available from: [www.nice.org.uk/guidance/cg122](http://www.nice.org.uk/guidance/cg122)
55. Scholler N, Urban N. CA 125 in ovarian cancer. *Biomark Med*. 2007;1(4):513–23.
56. Saldova R, Struwe WB, Wynne K, Elia G, Duffy MJ, Rudd PM. Exploring the glycosylation of serum CA125. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):15636–54.
57. Wong NK, Easton RL, Panico M, Sutton-Smith M, Morrison JC, Lattanzio FA, et al. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J Biol Chem*. 2003;278(31):28619–34.
58. Gidwani K, Huhtinen K, Kekki H, Van Vliet S, Hynninen J, Koivuviita N, et al. A nanoparticle-lectin immunoassay improves discrimination of serum CA125 from malignant and benign sources. *Clin Chem*. 2016;62(10):1390–400. »
59. Gidwani K, Nadeem N, Huhtinen K, Kekki H, Heinosaalo T, Hynninen J, et al. Europium Nanoparticle-Based Sialyl-Tn Monoclonal Antibody Discriminates Epithelial Ovarian Cancer-Associated CA125 from Benign Sources. *J Appl Lab Med*. 2019;4(3):299–310.
60. Jain S, Nadeem N, Ulfenborg B, Mäkelä M, Ruma SA, Terävä J, et al. Diagnostic potential of nanoparticle aided assays for MUC16 and MUC1 glycovariants in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2022;151(7):1175–84.

61. Salminen L, Nadeem N, Rolfsen AL, Dørum A, Laajala TD, Grønman S, et al. Exploratory Analysis of CA125-MGL and-STn Glycoforms in the Differential Diagnostics of Pelvic Masses. *J Appl Lab Med*. 2020;5(2):263–72.
62. Salminen L, Nadeem N, Jain S, Grønman S, Carpén O, Hietanen S, et al. A longitudinal analysis of CA125 glycoforms in the monitoring and follow up of high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2020;156(3):689–94.
63. Amiri M, Asadi Samani L, Kashi AH, Khadem N, Ziaee SAM, Mowla SJ. New Molecular Markers for Prostate Cancer Diagnosis. *UrolJ*. 2024;21(1):1–13.
64. Peracaula R, Tabarés G, Royle L, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, et al. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology*. 2003;13(6):457–70.
65. Gabriele C, Prestagiacomo LE, Cuda G, Gaspari M. Mass spectrometry-based glycoproteomics and prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10).
66. Song E, Mayampurath A, Yu CY, Tang H, Mehref Y. Glycoproteomics: Identifying the glycosylation of prostate specific antigen at normal and high isoelectric points by LC-MS/MS. *J Proteome Res*. 2014;13(12):5570–80.
67. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23–24):1869–74.
68. Terävä J, Tiainen L, Lamminmäki U, Kellokumpu-Lehtinen PL, Pettersson K, Gidwani K. Lectin nanoparticle assays for detecting breast cancer-associated glycovariants of cancer antigen 15-3 (CA15-3) in human plasma. *PLoS One*. 2019;14(7).
69. Chandrasekar D, Guerrier C, Alisson-Silva F, Dhar C, Caval T, Schwarz F, et al. Warning signs from the crypt: Aberrant protein glycosylation marks opportunities for early colorectal cancer detection. *Clin Transl Gastroenterol*. 2023;14.
70. Fan J, Chen B, Luo Q, Li J, Huang Y, Zhu M, et al. Potential molecular biomarkers for the diagnosis and prognosis of bladder cancer. *Biomed Pharmacother*. 2024;173.
71. Ideo H, Kondo J, Nomura T, Nonomura N, Inoue M, Amano J. Study of glycosylation of prostate-specific antigen secreted by cancer tissue-originated spheroids reveals new candidates for prostate cancer detection. *Sci Rep*. 2020;10(1).
72. Tai CS, Lin YR, Teng TH, Lin PY, Tu SJ, Chou CH, et al. Haptoglobin expression correlates with tumor differentiation and five-year overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2017;12(2).



**03**

Kratki prispevki  
s strokovnih  
srečanj

# Pregled ortopedskih vsadkov s podatki Registra artroplastike Valdoltra - Povezava s podatki o kostnih okužbah

## *Review of orthopedic implants using data from the Valdoltra Arthroplasty Registry - Link to bone infection data*

**Vesna Levašič**

Ortopedska bolnišnica Valdoltra

Avtor za korespondenco:

**dr. Vesna Levašič, dr. med.**

Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Jadranska cesta 31, 6280 Ankaran, Slovenija

e-pošta: vesna.levasic@ob-valdoltra.si

### **POVZETEK**

Registri artroplastike so dobro orodje za prepoznavanje uspešnosti vsadkov. Velik problem predstavlja okužba vsadka. V Ortopedski bolnišnici Valdoltra (OBV) smo Register artroplastike Valdoltra (RAV), ki deluje že od leta 2002, povezali z Registrom kostnih okužb OBV, in sicer za 10-letno obdobje od 2013 do 2022. Ugotavljali smo, ali je RAV dovolj zanesljiv pri detekciji, ter tudi, katere bakterije in v kolikšnem številu se pojavljajo pri zgodnjih okužbah znotraj treh mesecev po predhodni operaciji oz. pri poznih okužbah.

Med revizijskimi operacijami je bilo povprečno 27 % zgodnjih okužb in 73 % poznih. Prevladujoči bakteriji v vseh primerih sta bili *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis*.

Kombinacija RAV z Registrom kostnih okužb je omogočila vpogled še v ostale primere okužb, ki v RAV niso bili zabeleženi, ter tudi možnost analize, kateri so najpogostej-

ši mikrobi, ki so prisotni pri zgodnji ali pozni okužbi endoproteze. Potrebne so bolj natančne statistične analize, da bi lahko ocenili uporabnost povezave obeh registrov.

**Ključne besede:** register artroplastike, vzroki revizij, kostne okužbe

### **ABSTRACT**

Arthroplasty registries are a good tool for identifying the success of implants. Infection of the implant is a major problem, leading to premature revision of the implant. At the Valdoltra Orthopedic Hospital (OBV), we connected the Valdoltra Arthroplasty Register (RAV), which has been in operation since 2002, to the OBV Register of Bone Infections for a 10-year period from 2013 to 2022. We wanted to find out whether the RAV is sufficiently reliable in detecting infections, and which bacteria and in what numbers appear in early infections within 3 months after the previous surgery or in late infections. »

During revision surgeries, the average number of early and late infections was 27% and 73%, respectively. The predominant bacteria in all cases were *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.

The combination of the RAV with the Register of Bone Infections provided insight into other cases of infection that were not recorded in the RAV, as well as the possibility of analyzing which are the most common microbes present in early or late endoprosthesis infections. More precise statistical analyses are needed to be able to assess the usefulness of the link between the two registries.

**Key words:** arthroplasty registry, causes of revisions, bone infections

## UVOD

Registri artroplastike so odlično orodje za prepoznavanje manj uspešnih vsadkov. Revizija primarnega vsadka namreč pomeni ‚smrt‘ vsadka, t.j. endoproteze kolka ali kolena. Prepoznavanje vzrokov, zakaj pride do neuspeha endoproteze, je ključno za razvoj in ovrednotenje posameznih vsadkov. Register artroplastike Valdoltra (RAV) deluje od leta 2002 in ima že preko 40.000 vnosov o primarnih in revizijskih operacijah kolkov in kolen ter je zato tudi postal osnova za leta 2019 ustanovljen Register endoprotetike Slovenije (RES).

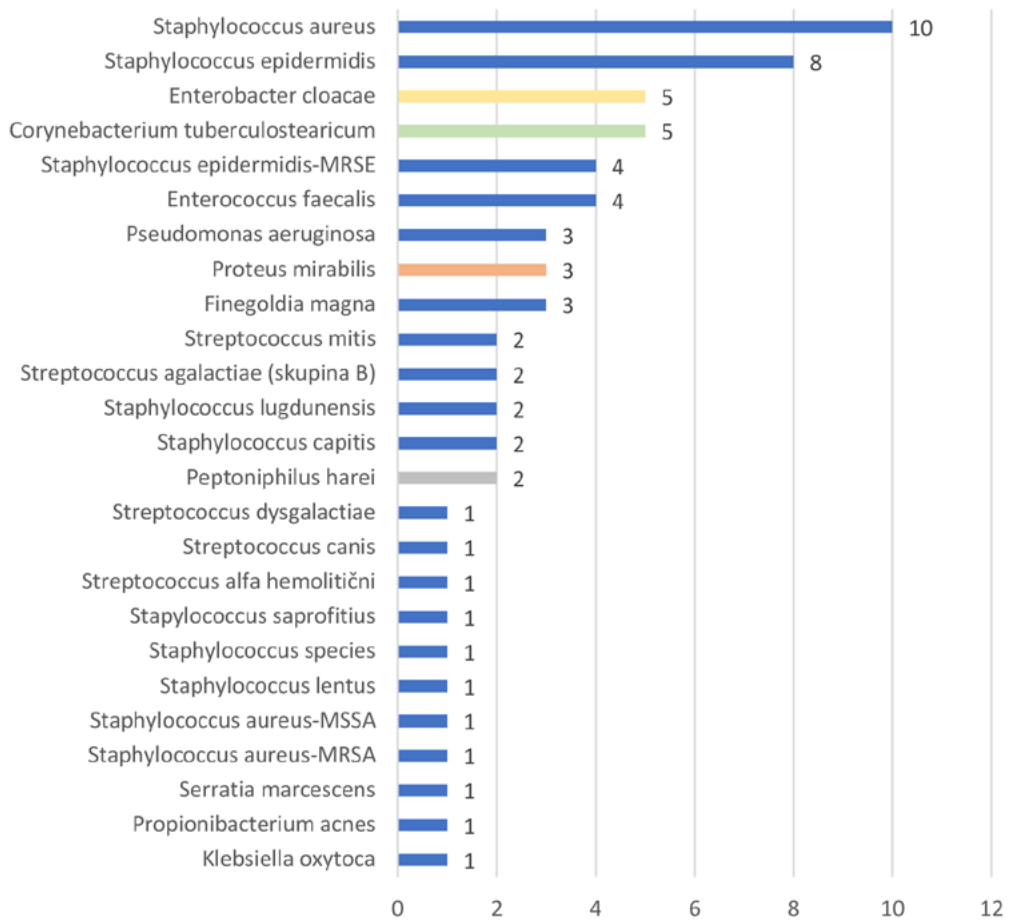
## METODE

RAV je zbirka iz seznama drugih informatiziranih zbirk podatkov, ki jih OBV vodi na podlagi področne zakonodaje v skladu z ZVOP-2 in GDPR. Od leta 2013 pa na oddelku za kostne okužbe vodijo Register kostnih okužb. Za namen tega predavanja sem povezala oba registra, da bi ugotovila skladnost in pridobila podatke o mikrobiološkem vzorcu pri revizijah zaradi okužbe.

## RAZPRAVA

Več kot 20-letne izkušnje kažejo, da je uspešnost kolčnih endoprotez v OBV po desetih letih več kot 95 %, po 20 letih pa več kot 89 %, kar nas uvršča med boljše izvajalce dejavnosti artroplastike kolkov in kolen v primerjavi z Evropo (1–4). Glavni vzroki revizij pri kolčnih endoprotezah so omajanje v 52 %, globoki infekt v 13 %, sledijo periprotečni zlom v 9 % in dislokacija v 5 %. Pri kolenskih endoprotezah je glavni vzrok revizije globoki infekt v 26 %, sledi omajanje v 21 % ter težave zaradi nestabilnosti in neuravnosti v 14 %. Poudarek prispevka je na okužbah, zato smo analizirali revizije v RAV glede na čas po operaciji. Izkazalo se je, da je razmerje revizij zaradi infekta pri kolkih 72 % pri poznih in 28 % pri zgodnjih infektih, pri kolenih pa je razmerje 74 % pri poznih ter 26 % pri zgodnjih infektih. Pogostnost infekta kot vzroka revizije je povezana tudi s tem, kaj je bila predhodna operacija. Naredili smo 10-letno študijo med 2013 in 2022. Rezultati so pokazali, da je po totalni artroplastiki kolka 14 % okužb, po parcialni 8 %, če je predhodno že bila opravljena menjava pa 23 %. Podobno pri kolenih: po totalni artroplastiki kolena je bilo 31 % okužb, po parcialni 4 %, po menjavi 50 %. Ko sem podatke iz tega obdobja povezala s podatki iz registra kostnih okužb, sem ugotovila, da je bil pri 1433 revizijah kolčnih endoprotez iz 10-letnega obdobja material za mikrobiološke preiskave odvzet pri 184 operacijah, 19 je bilo negativnih, čeprav je bilo od teh v RAV 13 označenih kot okužba. Ostalih 165 pozitivnih vzorcev je bilo v 135 primerih tudi na obrazcih RAV označenih kot okužba, v 13 kot omajanje in 17 kot ostali vzroki. Pomembno je vedeti, da kirurg izpolni obrazec neposredno ob operaciji, zato nima takoj odgovora, ali bo to, kar oceni kot infekt, tudi dejansko potrjeno z mikrobiološko preiskavo. Pri preiskavi pozitivnih vzorcev pri kolčnih revizijah sem ugotovila, da je pri zgodnjih okužbah (< 3 mesece) več izvidov z 2–6 bakterijami (31 %) kot pri poznih (> 3 mesece po predhodni operaciji), t.j. 15 %. Pri zgodnjih okužbah kolčnih endoprotez je najpogostejša bakterija *Staphylococcus aureus*, nato sledijo *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Corynebacterium tuberculostrictum*, MRSE, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Fingoldia magna* in druge (Slika 1). »

## Zgodnji infekti KOLKI



Slika 1: Bakterije po pogostnosti v pozitivnih vzorcih, odvzetih pri reviziji kolčnih endoprotez.  
Figure 1: Bacteria by frequency in positive samples collected during revision hip arthroplasty.

Pri poznih revizijah kolkov prevladuje *Staphylococcus aureus*, nato sledijo *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (B), *Staphylococcus capitis*, MRSE in drugi.

Od 849 revizijskih operacij kolenskih endoprotez iz 10-letnega obdobja je bil material za mikrobiološke preiskave odvzet pri 231 operacijah, 74 je bilo negativnih, čeprav je bilo od teh v RAV 40 označenih kot okužba. Ostalih 157 pozitivnih vzorcev je bilo v 144 primerih tudi na obrazcih RAV označenih kot okužba, v štirih kot omajanje in

devetih kot ostali vzroki. Pri preiskavi pozitivnih vzorcev pri kolenskih revizijah sem ugotovila, da je pri zgodnjih okužbah (< 3 mesece po predhodni operaciji) več izvidov z 2–6 bakterijami (39 %) kot pri poznih (> 3 mesece), t.j. 17 %. Pri zgodnjih okužbah kolenskih endoprotez je najpogostejša bakterija *Staphylococcus aureus*, nato sledijo *Staphylococcus epidermidis*, MRSE, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium species*, *Corynebacterium jeikeium* in druge (Slika 2).

»





Slika 2: Bakterije po pogostnosti v pozitivnih vzorcih, odvzetih pri reviziji kolenskih endoprotez.

Figure 2: Bacteria by frequency in positive samples collected during revision knee arthroplasty.

Pri poznih revizijah kolenskih protez prevladuje *Staphylococcus aureus*, nato sledijo *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus disgalactiae*, *MRSE*, *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus capitis*, *MSSA*, *Enterococcus faecalis* in drugi.

ke še o ostalih primerih, ki v RAV niso bili zabeleženi ter tudi možnost analize, kateri so najpogostejši mikrobi, ki so prisotni pri zgodnji ali pozni okužbi endoproteze. Potrebne so bolj natančne statistične analize, da bi lahko ocenili uporabnost povezave obeh registrov.

## ZAKLJUČEK

RAV se je izkazal kot dokaj zanesljiva evidenca okužbe kot vzroka revizij kolčnih ali kolenskih endoprotez. V kombinaciji z Registrom kostnih okužb smo pridobili podat-

»

## LITERATURA

1. Valdoltra Hip Arthroplasty Registry Report 2023 [Internet]. [assessed on 28.06.2024]. Available from: [https://www.ob-valdoltra.si/sites/www.ob-valdoltra.si/files/upload/files/valdoltra\\_hip\\_arthroplasty\\_registry\\_2002-2022.pdf](https://www.ob-valdoltra.si/sites/www.ob-valdoltra.si/files/upload/files/valdoltra_hip_arthroplasty_registry_2002-2022.pdf)
2. Valdoltra Knee Arthroplasty Registry Report 2023 [Internet]. [assessed on 28.06.2024]. Available from: [https://www.ob-valdoltra.si/sites/www.ob-valdoltra.si/files/upload/files/analiza\\_tpg\\_in\\_ppg\\_22\\_splet\\_ang.pdf](https://www.ob-valdoltra.si/sites/www.ob-valdoltra.si/files/upload/files/analiza_tpg_in_ppg_22_splet_ang.pdf)
3. The German Arthroplasty Registry (EPRD) Annual Report 2022 [Internet]. [assessed on 28.06.2024]. Available from: [https://www.eprd.de/fileadmin/user\\_upload/Dateien/Publikationen/Berichte/AnnualReport2022-Web\\_2023-03-30\\_F.pdf](https://www.eprd.de/fileadmin/user_upload/Dateien/Publikationen/Berichte/AnnualReport2022-Web_2023-03-30_F.pdf)
4. National Joint Registry 20th Annual Report [Internet]. [assessed on 28.06.2024]. Available from: <https://reports.njrcentre.org.uk/Portals/0/PDFdownloads/NJR%2020th%20Annual%20Report%202023.pdf>





**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, ki so dostopna na [www.laboratorijska-medicina.si](http://www.laboratorijska-medicina.si), in poslan v elektronski obliki** (wordov dokument) **kot priloga po elektronski pošti na elektronski naslov [laboratorijska.medicina@szkklm.si](mailto:laboratorijska.medicina@szkklm.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/>





## 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, krepimo svoj ugled in razvijamo poslovanje.



Avtorske pravice © 2024 Takeda Pharmaceutical Company Limited.  
Vse pravice pridržane. Takeda in logotip Takeda sta zaščiteni blagovni znamki družbe Takeda Pharmaceutical Company Limited, ki se uporabljata na podlagi licence.

VV-MEDMAT-109367  
datum priprave: 08/2024

**Takeda Pharmaceuticals d.o.o.**  
Bleiweisova cesta 30, 1000 Ljubljana, Slovenija  
Tel.: + 386 (0) 59082480  
E-pošta: [info-si@takeda.com](mailto:info-si@takeda.com)  
[www.takeda.com](http://www.takeda.com)

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

  
**THE PLUS  
VERSION**



PROVEN PERFORMANCE



IMPROVED USER INTERACTION

**PULMODATA**  
*Profesionalna medicinska oprema*

Analizatorji iSED® uporabljajo kapilarno fotometrijo in pomagajo optimizirati učinkovitost laboratorija, tako da rezultat zagotovijo v 20 sekundah z minimalnim rokovanjem.

#### GLAVNE ZNAČILNOSTI:

- hitri, točni in zanesljivi rezultati že v 20-ih sekundah,
- direktna meritev agregacije eritrocitov iz primarne EDTA epruvete s 100 mikroL vzorca,
- kompatibilen s pediatričnimi epruветami MAP,
- avtomatiziran sistem mešanja epruвет, odčitavanja črtnih kod, tiskanja rezultatov,
- 2-nivojska notranja kontrola (stabilizirana polna kri, odprta uporabna 60 dni, shranjevanje na sobni temperaturi).



» If not using photometric rheology, results are influenced by the HCT and MCV, which could lead to inaccurate results. iSED technology measures RBC aggregation using a photometric reading cell, which is **not affected** by HCT and MCV of the sample to provide accurate results. «

## NOVO: 6-diff hematološki analizator z vključenim ESR\* Yumizen H550E

- Nova patentirana tehnologija za ESR
  - rezultati v samo 60 sekundah
  - odlična korelacija z referenčno metodo.
- Za ESR niso potrebni dodatni reagenti.
- Možnost tudi izbire profilov:
  - Malaria/Dengue
  - krvna banka.

\* hitrost sedimentacije eritrocitov



Več o ESR  
tehnologiji





Abbott



IT'S MORE  
THAN A TEST.  
IT'S CLINICAL  
CONFIDENCE.

## LOVE YOUR HEART – KNOW YOUR RISK

Simply adding Abbott's High Sensitive Troponin-I blood test to patients' health checks could help assess their risk of a future heart attack.

TAKE ACTION  
TALK TO YOUR PATIENTS  
KNOW THEIR RISK

#### INTENDED USE

For in vitro diagnostic use only.

The ARCHITECT and Alinity STAT High Sensitive Troponin-I assay is a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) for the quantitative determination of cardiac troponin-I (cTnI) in human plasma and serum on the Alinity and ARCHITECT System analyzers.

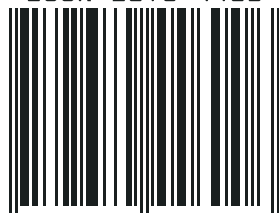
The ARCHITECT and Alinity STAT High Sensitive Troponin-I assay is to be used as an aid in the diagnosis of myocardial infarction (MI) and to aid in the assessment of 30-day and 90-day prognosis relative to all-cause mortality and major adverse cardiac events (MACE) consisting of myocardial infarction, revascularization and cardiac death in patients who present with symptoms suggestive of acute coronary syndrome (ACS).

The cTnI values may also be used, in conjunction with clinical and diagnostic findings, to aid in stratifying the risk of cardiovascular disease, including cardiovascular death, MI, coronary revascularization, heart failure or ischemic stroke in asymptomatic individuals.

© 2023 Abbott. All rights reserved.

All trademarks referenced are trademarks of either the Abbott group of companies or their respective owners. Any photos displayed are for illustrative purposes only. Any person depicted in such photos may be a model. ACD-194253-EMEA-EN-08/23

ISSN 2670-4463



9 772670 446006

[www.laboratorijska-medicina.si](http://www.laboratorijska-medicina.si)

PAPP-A —  
PIGF —  
sFlt-1

# Pre-eclampsia throughout pregnancy with PAPP-A, PIGF and sFlt-1 assays

Improve pre-eclampsia management for better clinical decision-making



## B·R·A·H·M·S KRYPTOR GOLD

Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ PAPP-A KRYPTOR™,  
Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ PIGF plus KRYPTOR™



## B·R·A·H·M·S KRYPTOR compact PLUS

and Thermo Scientific™ B·R·A·H·M·S™ sFlt-1 KRYPTOR™ assays  
are used in combination with B·R·A·H·M·S™ KRYPTOR™ analyzers