



# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry  
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

**Číslo 1/2022**

Ročník XXVII.

## PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Hedviga Pivovarníková

## ODBORNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

## REDAKČNÁ RADA

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

---

Laboratórna Diagnostika  
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS  
Cukrová 2373/3, 811 08 Bratislava  
Evidenčné číslo periodickej tlače EV 5929/20  
ISSN 2729-9201 (online)  
Vychádza: 2-krát ročne

# OBSAH

## ÚVODNÍK

PRÍHOVOR PREZIDENTKY SSKB .....	5
---------------------------------	---

## IN MEMORIAM

Spomienka na dlhoročného kolegu a priateľa MUDr. Ivana Ondruša .....	8
Opustil nás Per Hyltoft Petersen.....	9
Spomienka na primára MUDr. Emila Bielika, CSc.....	12
<b>Magula Daniel:</b> Dr. Alexander Partos – lekár-pionier biochemického výskumu na Slovensku v medzivojnovom období .....	15
<b>Valovičová Eva:</b> Korene laboratórnej medicíny a reminiscencie na klinickú biochémiu.....	18

## ODBORNÉ ČLÁNKY

<b>Balla Ján:</b> Európsky špecialista v laboratórnej medicíne.....	27
<b>Gaško Rudolf, Hefler Margita, Pirošková Zuzana:</b> Nový fenotypový klasifikačný systém dyslipidemií založený na štandardnom lipidovom paneli.....	39
<b>Rácz Oliver:</b> Komentár k návrhu novej fenotypovej klasifikácie dyslipidemií podľa Sampsonovej a kol. (2021).....	46
<b>Turay Jozef:</b> Lipoproteín (a): prečo, ako a kedy ho stanovovať .....	49
<b>Hurajtová Anna, Guľašová Zuzana, Hertelyová Zdenka, Tomečková Vladimíra:</b> Metabolizmus lipidov počas rakoviny a ich diagnostický potenciál.....	60
<b>Morávek Marko, Rosocha Ján, Špaková Tímea:</b> Exozómy zo synoviálnej tekutiny ako zdroj potenciálnych biomarkerov osteoartritídy .....	67
<b>Lamancová Petra, Urban Peter:</b> Využitie exozómov pri diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.....	74
<b>Šalamonová Blichová Lenka, Fraenkel Emil, Szabóová Daniela, Beňačka Roman, Rácz Oliver:</b> C-peptid proinzulínu – charakteristika, fyziologické účinky a jeho možná úloha v patogenéze chronických komplikácií <i>diabetes mellitus</i> .....	81
<b>Švecová Monika, Lešová Dana, Karabinoš Anton, Dubayová Katarína, Mareková Mária:</b> Retrospektívna štúdia prítomnosti DNA patogénov HPV a Ureaplasma urealyticum v súbore gynekologických pacientok .....	87
<b>Balla Ján:</b> Implementačné úskalia nového nariadenia EU/2017/746 <i>in vitro</i> diagnostické zdravotnícke pomôcky .....	96
<b>ANOTÁCIA ODBORNEJ LITERATÚRY</b> .....	107
<b>ETICKÝ KÓDEX IFCC</b> .....	109
<b>IFCC CODE OF ETHICS 2021</b> .....	111

# CONTENT

## ABSTRACTS

<b>Balla Ján:</b> European specialist in laboratory medicine .....	27
<b>Gaško Rudolf, Heffer Margita, Pirošková Zuzana:</b> New phenotypic classification system for dyslipidemias based on the standard lipid panel .....	39
<b>Rácz Oliver:</b> Commentary on the proposal of a new phenotypic classification system for dyslipidemias according to Sampson et al. (2021).....	46
<b>Turay Jozef:</b> Lipoprotein (a): why, how and when to measure it.....	49
<b>Hurajtová Anna, Guľašová Zuzana, Hertelyová Zdenka, Tomečková Vladimíra:</b> Lipid metabolism during cancer and their diagnostic potential.....	60
<b>Morávek Marko, Rosocha Ján, Špaková Tímea:</b> Synovial fluid-derived exosomes as a source of potential biomarkers of osteoarthritis .....	67
<b>Lamancová Petra, Urban Peter:</b> Usage of exosomes in the diagnosis of neurodegenerative diseases .....	74
<b>Šalamonová Blichová Lenka, Fraenkel Emil, Szabóová Daniela, Beňačka Roman, Rácz Oliver:</b> C-peptide of proinsulin—characteristics, physiological effects and its possible role in the pathogenesis of chronic complications of <i>diabetes mellitus</i> .....	81
<b>Švecová Monika, Lešová Dana, Karabinoš Anton, Dubayová Katarína, Mareková Mária:</b> Retrospective study of the presence of DNA pathogens HPV and Ureaplasma urealyticum in a group of gynecological patients .....	87
<b>Balla Ján:</b> Implementation challenges of the new EU/2017/746 <i>in vitro</i> diagnostic medical devices regulation .....	96



## ÚVODNÍK

### **Vážené a milé kolegyně a kolegovia, vážení členovia Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie !**

Tento príspevok sa k Vám dostáva začiatkom roku 2022, kedy prvé lúče slnka a štebot vtáčikov veštia príchod jari, z čoho by mohla byť veselá naša myseľ. Po dlhých dvoch ťažkých rokoch kovidu by sme si to aj zaslúžili, aby sme sa opäť pustili na bežnú, ale aj tvorivú pracovnú odbornú cestu.

Ak sa pozrieme za naše východné hranice, rok 2022 nezasvedčuje tomu, že by bol lepším, dotýka sa nás. Nemali by sme na históriu zabúdať, všetko sa môže zopakovať, aj to, čo by nik v 21. storočí nečakal. O vojne som počula iba z rozprávania mojich rodičov, ktorí ju zažili ako malé deti v úkrytoch, ale tie hrôzy a zážitky si niesli celý život. Mne sa to zdalo už neopakovateľné, netýkalo sa ma to, ale vždy som si ich zážitky s pokorou vypočula a nepripúšťala, žeby sa to niekedy mohlo ešte zopakovať...

Aj obsahom tohto nového čísla časopisu Laboratórna diagnostika 1/2022 je kus histórie odboru klinickej biochémie, popísané korene laboratórnej medicíny a reminiscencie na klinickú biochémiu, jej zakladatelia, pokračovatelia a naše vzory, predchodcovia, ktorí aj keď už nepôsobia aktívne v klinickej biochémií, sú stále činorodí a chcú prispieť svojím pohľadom k ďalšiemu rozvoju medicínskeho odboru. Preto nezabúdajme !

Dovoľte mi v ďalších riadkoch zhrnúť aktivity našej odbornej spoločnosti za uplynulé obdobie a načrtnúť aj pripravované odborné podujatia.

### **Kolektívne členstvo v EFLM Academy**

SSKB sa podarilo úspešne zrealizovať kolektívnu prihlášku dobrovoľne prihlásených 16 členov do EFLM Academy.

### **EFLM Register špecialistov v laboratórnej medicíne**

Register je databáza špecialistov v laboratórnej medicíne v celej Európe (EuSpLM). Pri absencii registračných systémov a regulačných rámcov funguje register ako predchodca charty profesionálneho statusu, ktorý už podporuje jednotlivcov v mnohých krajinách. Identifikuje jednotlivcov schopných splniť rovnocennosť štandardov vo vzdelávaní a odbornej príprave.

Zastrešujúcim cieľom registra je podporiť uznanie špecialistov v laboratórnej medicíne podľa Smernice Komisie EÚ 2013/55/EÚ – **Uznávanie odborných kvalifikácií**. Smernica poskytuje povolenie na voľnú (neobmedzenú) profesionálnu migráciu cez hranice členských štátov EÚ, keď tretina členských štátov EÚ prijme spoločný rámec odbornej prípravy (ako stelesnený EFLM's Equivalence of Standards). Smernica bola transponovaná do národnej legislatívy členských štátov EÚ v januári 2016. Prostredníctvom práce EC4 a nedávno EFLM bol pripravený Spoločný rámec odbornej prípravy, ktorý identifikuje špecializovanú prax v laboratórnej medicíne, na návrh pre Komisiu.

Na zverejnenie sa pripravuje aj slovenská verzia dokumentu o prístupovom procese členov SSKB do registra EuSpLM (Európsky špecialista v laboratórnej medicíne).

**6. EFLM Konferencia o preanalytickej fáze „Preanalytická kvalita: medziodborová cesta“** sa konala virtuálne **15.–18. marca 2022**, ktorú viedol predseda organizačného výboru Janne Cadamuro, člen pracovnej skupiny (WG) pre preanalytickú fázu, pôsobiaci na Katedre laboratórnej medicíny Univerzitetnej nemocnice Salzburg, Paracelsus Medical University Salzburg – Rakúsko.

Nasledujúca konferencia by sa mala konať v roku 2024 s prianím organizačného výboru prezenčného konania a s nádejou osobných stretnutí.

1. EFLM Konferencia o preanalytickej fáze sa konala v Parme v roku 2011 (300 delegátov)
2. EFLM Konferencia sa konala v Záhrebe v roku 2013 (381 delegátov)
3. EFLM Konferencia sa konala v Porte v roku 2015 (530 delegátov)
4. EFLM Konferencia sa konala v Amsterdame v roku 2017 (561 delegátov)
5. EFLM Konferencia sa konala opäť v Záhrebe v roku 2019 (640 delegátov)
6. EFLM Konferencia o preanalytickej fáze v roku 2022 sa konala **virtuálne** a bola preložená z roku 2021 pre nepriaznivú pandemickú situáciu.

Ciele tohtoročnej konferencie boli rozdelené do štyroch dní s týmito hlavnými témami, obsahujúce preanalytické kazuistiky, odber krvi, problematiku hemolýzy, ikteru, lipémie, znalosť stability vzoriek, dopytu riadenia, POCT a preanalytiky, nové technológie:

1. Aktuálne výzvy v preanalytickej fáze
2. Čo je nové v preanalytickej fáze
3. Preanalytická fáza – medziodborový problém
4. Príklady spoločnej zmeny v preanalytickej fáze

**A. M. Simundic** zdôraznila potrebu vypracovania **štandardov** pre vykazovanie predanalytických výsledkových štúdií.

Prezentácie jednotlivých autorov boli zamerané na všetky fázy celkového procesu vyšetrovania a samozrejme aj na dôležitosť dodržiavania správneho **transportu** biologického materiálu na PCR testovanie SARS-CoV-2.

Využívanie **umelej inteligencie**, ktorá sa už rutinne používa v gastroenterológii, patológii aj rádiológii, by malo preventívne ovplyvniť neprimerane frekventné a početné ordinovanie laboratórných parametrov alebo naopak ich nedostatočné využívanie v procese diagnostiky patologických stavov. Umelá inteligencia by mala pomôcť v diferenciálnej diagnostike aj v iných medicínskych odboroch ako dermatológia, oftalmológia, kardiológia, psychiatria (depresie) etc., ale určite nenahradí odborníkov, expertov v medicíne – lekárov.

**Transrodová (transgender TG) medicína** si vyžaduje pozornosť aj v preanalytickej fáze, a to v určení jednoznačnej terminológie (pohlavie, rodová identita, cisgender, transgender, transžena, transmuž), definícii, odstránení bariér pre transrodové osoby a súčasné riziká, ktoré sa vyskytujú v používaní referenčných medzí, hormónov (voľ-

ný testosterón, androgény...), nádorových markerov (PSA, CA-125...), rôznych výpočtov napr. CKD-EPI.

Transrodový človek je človek, ktorého vzhľad, správanie alebo osobné charakteristiky sú odlišné od stereotypov typického muža alebo typickej ženy. WHO tento stav už neoznačuje za duševnú poruchu, ale za „rodovú nehodu“. Byť transrodovou osobou už nemá byť podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) považované za duševnú poruchu. Vyplýva to z nového zoznamu chorôb WHO (ICD-11).

Ako obvykle veľmi zaujímavou sekciou boli **kazuistiky** a interaktívne odpovede.

**V posterovej sekcii** bolo prihlásených 60 posterov.

**Z medzinárodne pripravovaných odborných podujatí pripomíname:**

- **XXIV. IFCC-EFLM Európsky kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny EUROMEDLAB 2021** sa mal konať v termíne 28. novembra–2. decembra 2021 v Mníchove. Vzhľadom na to, že Nemecko veľmi tvrdo zasiahla štvrtá vlna COVID-19, najmä v oblasti dejiska v Mníchove, IFCC a EFLM sa spolu s organizačným výborom kongresu rozhodli tento EUROMEDLAB odložiť. Dňa 26. 11. 2021 oznámili **nový termín konania 10.–14. apríla 2022.**

- **Medzinárodný kongres o kvalite v laboratórnej medicíne 2022** – Helsinky (Fínsko), (pôvodný termín 10.–11. februára 2022) **preložený na 20.–21. apríla 2022.**

- **3. strategická konferencia EFLM „SMART a ZELENÉ LABORATÓRIÁ – Ako implementovať IVDR, vznikajúce technológie a udržateľné postupy v lekárskech laboratóriách?“** sa bude konať plne online v pôvodne plánovanom termíne **27.–28. mája 2022.**

V mene výkonnej rady EFLM **prof. Tomris OZBEN** – Predsedníčka Strategickej konferencie EFLM informovala, že bude zorganizovaná skvelá strategická konferencia EFLM s najväčšou účasťou v Európe. Uskutoční sa plne online s využitím najmodernejších technických riešení vrátane virtuálnych výstavných stánkov umožňujúcich čítanie a videokonferencie medzi účastníkmi a zástupcami stánku.

Program konferencie bol navrhnutý tak, aby bol interaktívny vo virtuálnych podmienkach s vyhradením dostatočného času na diskusie:

- aké problémy sú v súčasnosti,
- na čo by sme sa mali zamerať v budúcnosti,
- kam by sme mali smerovať a
- ako by sme to mohli dosiahnuť.

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

**Z národných pripravovaných odborných podujatí pripomíname:**

• **XIV. Kongres SSKB s medzinárodnou účasťou sa bude konať 9.–11. 10. 2022 v Nízkych Tatrách, v hoteli Chopok\*\*\*\* v Demänovskej Doline.**

Na webovej stránke SSKB sú aktuálne zverejnené:

• **List SLS „Podpora a solidarita s lekármi, zdravotníkmi a všetkými obyvateľmi Ukrajiny“.**

• **VYHLÁSENIE Európske fórum lekárskeho asociácií (EFMA).**

• **VYHLÁSENIE Svetová lekárska asociácia (WMA) Stály výbor európskych lekárov (CPME) – NA UKRAJINE TREBA DODRŽIAVAŤ LEKÁRSKU NEUTRALITU.**

Našou snahou je, aby sa všetky aktuálne informácie vždy včas zverejňovali na webovej stránke [www.sskb.sk](http://www.sskb.sk).

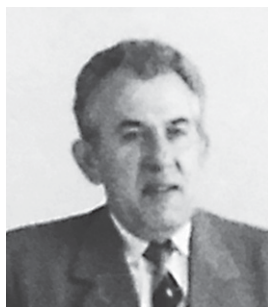
Podakovanie patrí všetkým...

Prajem zdravie, silu a nádej.

18. 3. 2022

Hedviga Pivovarníková  
prezidentka SSKB

## SPOMIENKA NA DLHOROČNÉHO KOLEGU A PRIATEĽA MUDr. IVANA ONDRUŠA



*„Človek odchádza, už sa nevracia, už sa neopakuje  
a predsa tu zanecháva vždy niečo po sebe, niečo, čo  
môže zostať jedine po človeku.“*

16. januára 2022 nás vo veku 83 rokov náhle opustil náš dlhoročný kolega a spolupracovník **MUDr. Ivan Ondruš**. Narodil sa 30. júna 1938 v Trenčíne. Neskôr sa s rodičmi a súrodencami presťahovali do Slatinky nad Bebravou v okrese Bánovce nad Bebravou, kde chodil na základnú školu, ktorú v roku 1953 ukončil. V štúdiu pokračoval na cirkevnej strednej škole v Trenčíne, kde v roku 1956 maturoval. Po maturite sa rozhodol študovať medicínu na Lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave. Štúdium ukončil v roku 1965. V roku 1982 a 1987 absolvoval špecializačné atestácie v odbore klinická biochémia.

Po ukončení štúdia začal pracovať ako asistent na katedre patofyziológie LF UPJŠ v Košiciach do roku 1968. V roku 1968 odišiel z LF UPJŠ pracovať na katedru biochémie Vysoké školy veterinárnej, ako vedúci RA pracoviska. Tu sa zoznámil s láskou svojho života Boženkou, s ktorou sa v roku 1971 oženil. V roku 1975 odišiel z VŠV pracovať do OÚNZ v Spišskej Novej Vsi ako primár oddelenia klinickej biochémie, kde pôsobil do roku 1984. So svojou rodinou sa v roku 1984 presťahoval na západné Slovensko a pracoval ako primár oddelenia klinickej biochémie v OÚNZ Dunajská Streda do roku 1987. V roku 1987 nastúpil na miesto primára oddelenia klinickej biochémie vtedajšieho

OÚNZ v Trnave, kde pôsobil 14 rokov. V ďalších rokoch pracoval ako odborný garant pre klinickú biochémiu v spoločnostiach Aliatros s. r. o. a AnalytX s. r. o.

**MUDr. Ivan Ondruš** bol dlhoročným členom Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie a Slovenskej lekárskej komory.

Celý svoj pracovný život zasvätil práci v biochémi, ktorá ho profesijne naplňovala a bola mu nielen prácou, ale aj koníčkom. Bol pre nás, nielen vzorom, ale aj učiteľom a priateľom. Viedol nás odborne, ale aj ľudsky. Problémy a ťažkosti, ktoré sa na pracovisku vyskytli, riešil vždy s nadhľadom, pokojným, múdрым a citlivým spôsobom. V mnohých prípadoch bol nielen šéf, ale hlavne priateľ ochotný pomôcť každému, kto to potreboval.

Zo svojej vedúcej pozície sa nás snažil naučiť samostatnosti, zodpovednosti, láske k práci, ale aj sebaúcte, úcte k ostatným ľuďom.

**Život sa smrťou človeka nemusí skončiť, najmä keď ho nosíme vo svojom srdci a spomienkach.**

**Češ' jeho pamiatke!**

Ing. Dagmar Berkešová  
MUDr. Jarmila Ambrušová  
AnalytX s. r. o.

## OPUSTIL NÁS PER HYLTOFT PETERSEN

(5. 3. 1937–15. 1. 2022)



15. januára 2022 nás navždy opustil európsky a svetový priekopník kontroly kvality v laboratórnej medicíne, **profesor Per Hyltoft Petersen** z Dánska. S veľkým uznaním a úctou sa skláňame nad jeho životným dielom a prínosom pre rozvoj teórie a praxe na poli kvality v klinickej biochémií a laboratórnej medicíne. Bol nielen vedcom svetového formátu, ale aj láskavým, prívetivým, skromným a prístupným človekom.

Niekdajší prezident EFLM, *profesor Sverre Sandberg* (Nórsko), ho považoval za svoj životný vzor a svetového lídra vo výskume zabezpečenia kvality a štatistiky. Povedal o ňom, že jeho nadšenie pre túto tému bolo inšpirujúce a nákazlivé. Jeho ambície pre túto tému boli veľké, ale jeho ambície vo vlastnom mene malé. *Profesorka Carmen Ricos* (Španielsko), ktorá s ním spolupracovala vyše 30 rokov na poli biologickej variácie, povedala, že bol úžasným človekom a veľkým majstrom kvality v laboratórnej medicíne. *Profesor Jean Claude Libeer* (Belgicko), jeden zo zakladateľov a prvých prezidentov Európskej federácie pre kontrolu kvality v laboratórnej medicíne (EQALM), sa vyjadril, že bol šikovným človekom, ktorý mal vrúcnu povahu a bol mu viac ako kolega: bol mu aj priateľom. *Profesorka Linda Thienpontová* (Belgicko) a *Dr. Dietmar Stöckl* (Nemecko) sa vyjadrili, že s ním veľa rokov spolupracovali na viacerých aspektoch kvality v laboratórnej medicíne, ale najviac si užívali jeho teplý a otvorený charakter, pre

ktorý si navždy našiel miesto v ich srdci ako vrúcna osobnosť. Obzvlášť osudové bolo jeho stretnutie s iným veľkým kontrolou kvality, *profesorom Jamesom Westgardom*, s ktorým sa nielen spriatelil, ale dlhé roky spolupracoval. Po prvýkrát sa stretli na Univerzite v Uppsale vo Švédsku v rokoch 1976–1977, kde *J. O. Westgard* trávil študijný pobyt u *Carla Henrika deVerdiera*, *Torstena Arronssona* a *Torgnyho Grotha*, *Per Hyltoft* pracoval u *Mogensa Hordera* na univerzite v Odense. Boli to, nielen škandinávski lídri na poli klinickej chémie, ktorí sa zapojili do NordKem zameraného na ciele a kontrolu kvality a iniciovali v ňom projekty, do ktorých sa *Jim* s *Perom*, ako mladí klinickí chemici, úspešne zapojili. Obaja sa od etablovaných vedcov učili a radi sa zúčastňovali projektov NordKem na tému „*Hodnotenie požiadaviek na kvalitu v klinickej chémii*“ (1980) a „*Kontrola kvality v klinickej chémii – úsilie nájsť efektívnu stratégiu*“ (1984). To viedlo neskôr k tomu, že *Per* strávil jeden semester na Univerzite Madisone a neskôr *Jim* strávil semester prácou s *Perom* v Odense. V roku 1991 *Jim* a *Per* spoločne publikovali priekopnícku prácu, v ktorej sa zamerali na laboratórne špecifikácie potrebné na zabezpečenie procesu testovania cholesterolu, aby spĺňal kvalitu požadovanú americkým Národným programom vzdelávania o cholesterole (NCEP, 1985). Spoločne vyvinuli model na stanovenie špecifikácií preanalytických a analytických parametrov metódy, ktoré môžu ovplyvniť



výsledok testu a dali ich do súvislosti s usmernením NCEP pre klinickú interpretáciu.

*Perova* vedecká dráha začala v roku 1963 na Univerzite v Kodani, kde získal titul Master of Science v klinickej biochémii. Po niekoľkých rokoch pôsobenia na Ústave *Nielsa Ryberga Finsena*, dánskeho nositeľa Nobelovej ceny, sa v roku 1971 zamestnal na Oddelení klinickej biochémie Univerzitnej nemocnice v Odense, kde pracoval až do roku 2005, kedy absolvoval svoj posledný pracovný deň. To však v žiadnom prípade neznamenalo, že *Per Hyltoft Petersen* ukončil aj svoju profesionálnu činnosť! Rutinná práca sa síce z jeho kalendára vytratila ako rosa na slnku, ale otvoril sa mu svet pre zaujímavé vedecké a vzdelávacie aktivity.

Oblasti jeho akademického a vedeckého záujmu sa nedajú opísať v skratke. Pre *Pera* boli najdôležitejšie špecifikácie kvality a ich štatistická interpretácia, ktorá bola jeho koníčkcom a zanechal v nej stopu nielen v akademicko-jej oblasti v Aarhuse. *Profesor P. H. Petersen* zorganizoval spolu s profesorom *G. Kováčom* v septembri 2003 na SZU v Bratislave Kurz štatistických metód v klinickej biochémii a laboratórnej medicíne v Bratislave, na ktorom prednášali *Per Hyltoft*, *Kristian Linnet*, *Dietmar Stöckl*, *Linda Thienpontová* a *Sverre Sandberg*.

*Per* bol celý život veľmi činorodý a aktívny. Od roku 2004 až do dôchodku vo veku 70 rokov bol zamestnaný ako hosťujúci profesor v Bergene, kam z Dánska prichádzal 4–6 krát do roka. Spolupracoval s profesorom *Sverre Sandbergom* (neskorší prezident EFLM) v Nórskej organizácii pre zlepšovanie kvality laboratórných vyšetrení (NOKLUS) na optimalizácii externého hodnotenia kvality a nevynechal ani severskú organizáciu SKUP (Škandinávská kooperácia pre vyhodnocovanie POCT prístrojov). V posledných rokoch veľa času venoval aj študentom doktorandského a magisterského štúdia. Výsledkom je niekoľko zaujímavých článkov publikovaných v medzinárodných časopisoch.

*Per Hyltoft Petersen* bol prvým autorom alebo spoluautorom približne 200 recenzovaných vedeckých publikácií v medzinárodných biochemických časopisoch, 25 recenzovaných vyžiadaných editoriálov. Redigoval asi 80 kníh, knižných kapitol či správ, 32 zborníkov z konferencií, 24 listov vydavateľovi (Letters to Editor) a viac ako 100 abstraktov na kongresoch. Spolupracoval s profesorom *Calumom Fraserom* (Škótsko), *Dr. Ivanom Brandslundom* a *Dr. Henkom Goldschmidtom* z Holandska a pravidelne sa zúčastňoval konferencií Quality in Spotlight. Bol naozajstným

majstrom grafiky, ktorú dokázal uplatniť v náročnej a komplikovanej štatistike, neraz aj ťažko chápanej vedeckou komunitou. Spolu s *Jamesom Westgardom* vyvinuli tzv. Graf operačných špecifikácií (OPSspecs Chart), na ktorom prezentoval vzťah medzi celkovou prípustnou chybou, presnosťou a bias a kontrolou kvality, ktorá garantovala zamýšľané použitie.

*Per Hyltoft Petersen* bol vedcom, inovátorom a komunikátorom, ktorý výrazne prispel k rozvoju numerických aspektov laboratórnej medicíny. Napísal množstvo prác o biologickej variácii, analytických špecifikáciách a výkonnostných charakteristikách. Zaoberal sa všetkými typmi kontroly kvality a štatistiky v laboratórnej medicíne. Obzvlášť výnimočná je jeho zásluha na Štokholmskej konsenzuálnej konferencii o stanovení globálnych špecifikácií analytickej kvality v laboratórnej medicíne, ktorú v roku 1999 zorganizovali spolu s *Andersom Kallnerom* a *Desmondom Kennym* (UK), a na ktorej bol dosiahnutý konsenzus v hierarchii stratégií na stanovenie špecifikácií analytickej kvality. Hierarchia, ktorú pred Štokholmskou konferenciou načrtli spolu s profesorom *Callumom Fraserom*, bola všeobecne prijatá a v roku 2014 sa stala základom 1. EFLM strategickej konferencie, na ktorej *Per Hyltoft Petersen* predstavil zhrnutie svojej práce o vplyve analytickeho výkonu na klinické rozhodovanie. Táto práca vynikala predovšetkým uznávanými grafickými prostriedkami, v ktorých bol *Per Hyltoft Petersen* majstrom. Do roku 2019 spolu so škótskymi a škandinávskymi kolegami publikoval ešte rad článkov o hodnotách referenčných zmien, čo bola ďalšia vedecká oblasť, ktorej sa venoval.

*Per Hyltoft Petersen* bol znamenitým, podmanivým rečníkom a žiadaným lektorom na medzinárodnom poli tak v Európe, ako ja v Amerike i Austrálii. Bol skvelým diskutérom, ktorý sa vďaka svojim vynikajúcim štatistickým vedomostiam nikdy nedal v diskusií strhnúť k politickým alebo emocionálnym sporom. Aj keď tvrdohlavo a otvorene presadzoval slobodu vedy, neuznával jej zovretie štandardami a oklieštenie predpismi, vždy akceptoval názory druhých a bol im otvorený. Riadil sa vyšším princípom, ktorý charakterizuje jeho výrok na jednej z jeho prednášok v Bratislave „*aj keď mám na vec iný názor ako moji predrečníci, nebráni mi v tom, aby sme boli priatelía*“. Bol presvedčený, že pokiaľ protistrany pracujú na riešení pozitívne, potom vzájomný nesúhlas je v poriadku.

Na Labkvalite v r. 2007 v Sielnici na Sliači mu Slovenská lekárska spoločnosť udelila titul Čestný člen Slovenskej

spoločnosti klinickej biochémie. Svoju vtedajšiu prednášku, ktorú sme mu v predstihu preložili s *Vladom Heribanom* do slovenčiny, uviedol s humorom „*to je moja prvá prednáška v živote, ktorej vôbec nerozumiem*“.

*Per Hyltoft Petersen* je jednou z mála osobností v klinickej biochémii, podľa ktorého bolo za jeho života pomenované ocenenie **Per Hyltoft Petersen Award** (Cena Pera Hyltofta Petersena).

Jeho univerzálnosť a ochota spolupracovať a pomáhať sa nezmazateľne podpísala a prispela ku vzniku nového medicínskeho odboru na Slovensku: laboratórnej medicíny, ktorý zjednocuje a univerzalizuje poskytovanie laboratórnej diagnostiky vo forme klinického laboratória ako zásadného pomocníka klinikom. Na jej vzniku a rozvoji sa podieľal osobne a aktívne ako člen Slovenskej spoločnosti pre laboratórnú medicínu a predseda výboru pre udeľovanie ceny Pera Hyltofta Petersena, ktorú každoročne udeľuje Slovenská spoločnosť pre laboratórnú medicínu kandidátom (či už zo Slovenska alebo zahraničia), ktorí sa najviac za uplynulý rok zaslúžili o rozvoj laboratórnej medicíny na Slovensku.

***Laboratórna medicína stratila v Perovi Hyltoftovi Petersenovi významného kolegu, skvelého vedca a vynikajúceho človeka.***

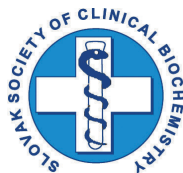
***Češť jeho pamiatke !***

*Ján Balla*  
*Slovenská spoločnosť klinickej biochémie*  
*Gustáv Kováč*  
*Slovenská spoločnosť pre laboratórnú medicínu*

## LAUREÁTI CENY PERA HYLTOFTA PETERSENA

\* \* \*

- 2002 *Dieter Johannes Vonderschmitt* (Švajčiarsko)
- 2003 *Åke Holmgård* (Švédsko)
- 2004 *Pavel Blažíček* (Slovensko)
- 2005 *Marek H. Dominiczak* (Škótsko)
- 2006 *Andrea Rita Horváth* (Maďarsko)
- 2007 *Anders Kallner* (Švédsko)
- 2008 *Ana Stavljениć Rukavina* (Chorvátsko)
- 2009 *Ján Balla* (Slovensko)
- 2010 *Henk Goldschmidt* (Holandsko)
- 2011 *Michal Farkaš* (Slovensko)
- 2012 *Ana Maria Šimundić* (Chorvátsko)
- 2013 *Grażyna Sypniewska* (Poľsko)
- 2014 *Michal Ondrejčák* (Slovensko)
- 2015 *Vladimír Krčméry* (Slovensko)
- 2016 *Elizabeta Topić* (Chorvátsko)
- 2017 *Oliver Rácz* (Slovensko)
- 2018 *Ján Štencl* (Slovensko)
- 2019 *Daniela Farkašová* (Slovensko)
- 2020 *Stanislav Oravec* (Slovensko)



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 12–14

## SPOMIENKA NA PRIMÁRA MUDr. EMILA BIELIKA, CSc.



(5. 2. 1928 Jasenie – 2. 12. 2014 Banská Bystrica)  
*osobnosti*

*Primára MUDr. Emila Bielika, CSc. možno bezpochyby zaradiť medzi najvýznamnejšie osobnosti slovenskej klinickej biochémie. Patril k zakladajúcim členom Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie SLS, bol dlhoročným podpredsedom výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie a pôsobil i vo Federálnom výbore spoločnosti klinickej biochémie J. E. Purkyňu. 35 rokov viedol oddelenie klinickej biochémie Krajského ústavu národného zdravia, neskôr Fakultnej nemocnice s poliklinikou F.D. Roosevelta v Banskej Bystrici.*

*Narodil sa v malebnej horehronskej obci Jasenie, v okrese Banská Bystrica, v štvordetnej rodine roľníka. Tu strávil svoje detstvo, získal základné vzdelanie, a z tohto obdobia si odniesol vlastnosti, ktorým ostal verný celý svoj ďalší život. Bol veľmi pracovitým človekom s príkladným vzťahom k plneniu si povinností. Mal veľmi rád prírodu, blízky vzťah k ľudovému umeniu. Bol výborný spevák a tanečník.*

*Stredoškolské štúdium absolvoval na gymnáziu v Banskej Bystrici, kde maturoval v roku 1947. Po maturite šiel študovať medicínu na Lekársku fakultu Univerzity Komenského v Bratislave. Patril k mladým študentom, ktorí sa popri náročnom štúdiu zúčastnili výstavby Trate*

*mládeže. V tom období sa formovali aj základy súboru Lúčnica a Emil Bielik patril spolu so svojim priateľom Štefanom Nosálom k jej zakladateľom. Medicínu ukončil promóciou v roku 1952.*

*Po úspešnom ukončení štúdia na LF UK Bratislava odišiel pracovať na svoje prvé biochemické pracovisko – na Biochemický ústav LF UPJŠ v Košiciach ako odborný asistent. Na tomto pracovisku pracoval 5 rokov, tu získal prvé skúsenosti s prednáškovou i publikačnou činnosťou, absolvoval špecializačnú skúšku v odbore klinická biochémia. Odboru biochémia, klinická biochémia ostal verný celý zvyšok svojho pracovného života.*

*Po piatich rokoch sa z Košíc vrátil do rodného kraja, do Banskej Bystrice. 1. mája 1957 začal pracovať vo funkcii prednostu oddelenia klinickej biochémie NsP KÚNZ Banská Bystrica.*

*Vo vtedajšej nemocnici boli laboratórne vyšetrenia zabezpečované „laboratórnymi pracoviskami“, ktoré boli súčasťou klinických oddelení, zaškolenými pracovníkmi, z väčšej časti rádovými sestrami (tie boli v známych udalostiach „z večera na ráno“ z nemocnice odstránené ešte pred rokom 1957). Na týchto pracoviskách bolo minimálne vybavenie laboratórnymi pomôckami, laboratórnymi*

prístrojmi (Pulfrichov fotometer, plameňový fotometer, pH meter...).

Mladý nadšenec klinickej biochémie sa musel naraz pustiť do riešenia problémov budúceho pracoviska, problémov priestorových, personálnych, materiálnych. Popri tom musel udržiavať úzku spoluprácu s užívateľmi biochemických vyšetrení, s lekármi oddelení a ambulancii. Zároveň neprestal veľmi intenzívne študovať všetky vtedy dostupné zdroje informácií z odboru klinická biochémia i príbuzných klinických odborov. V roku 1961 získal aj špecializáciu z vnútorného lekárstva I. stupňa. V rámci externej aspirantúry pracoval na kandidátskej práci o vplyve inhibítorov karboanhydrázy na experimentálne poruchy acidobázickej rovnováhy. Titul kandidáta vied získal obhajobou tejto práce v roku 1976. Tvrdou prácou získané informácie dokázal využiť nie iba vo svojej práci, ale odovzdával ich svojim spolupracovníkom, nielen z vlastného pracoviska, nemocnice, ale z pozície krajského odborníka aj pracovníkom odboru vo vtedajšom banskobystrickom kraji. Celodenné krajské metodické semináre majú dodnes významné miesto v myšliach ich vtedajších účastníkov. Nedostatok kvalifikovaných pracovníkov v prudko sa rozvíjajúcom medicínskom odbore pomohol riešiť aj tým, že sa zaslúžil o založenie a rozvoj vyučovania v odbore zdravotnícky laborant na SZŠ v Banskej Bystrici, i v Košiciach Patril k zakladajúcim členom odbornej spoločnosti klinickej biochémie pri Československej lekárskej spoločnosti J.E. Purkyně, mnoho rokov bol členom jej výboru. Neskôr sa podieľal aj na založení a práci slovenskej časti tejto odbornej spoločnosti. Okrem organizačnej práce bol aj častým, vítaným a uznávaným prednášateľom na akciách týchto spoločností.

Z pracoviska, ktoré vyrastalo pod vedením primára Bielika sa zakrátko stalo popredné pracovisko v rámci celého Československa. O jeho úrovni a kvalite svedčí aj to, že to bolo pracovisko, ktoré sa podieľalo na postgraduálnom vzdelávaní pracovníkov, klinických biochemikov. Niekoľko rokov organizoval na svojom pracovisku v Banskej Bystrici detašované školenia ILF a ULV SZP v problematike analytiky vnútorného prostredia. V roku 1962, keď u nás ešte pretrvávali pseudovedecké pohľady na genetiku, zorganizoval dvojdnú panelovú diskusiu o biochemických základoch dedičnosti a ich aplikácii v klinickej praxi. V roku 1972 zorganizoval prvý celoštátny pracovný deň o klinickom význame hyperlipoproteinémií. V druhej polovici 70-tych rokov zorganizoval pre lekárov nemocnice

viacdný kurz s problematikou diagnostikovania stavu výživy pacienta a riešenia jej porúch. Viacerí z účastníkov tohto kurzu neskôr spoluzakladali Slovenskú spoločnosť enterálnej a parenterálnej výživy a boli dlhoročnými organizátormi jej pravidelných podujatí v Banskej Bystrici.

Okrem funkcie krajského odborníka bol členom Poradného zboru Povereníctva a neskôr Ministerstva zdravotníctva pre klinickú biochémiu a dve desaťročia pracoval ako člen Komisie VR MZ SSR pre zdravotnícku techniku, niekoľko rokov vykonával funkciu predsedu HOK-28 Klinická biochémia a zastupoval ČSSR v komisii expertov RVHP pre technické vybavenie klinicko-diagnostických laboratórií.

Vo vedeckej a publikačnej činnosti sa venoval širokému spektru metodických, interpretačných a organizačných problémov klinickej biochémie. Publikoval desiatky prác (z toho 6 v zahraničnej odbornej literatúre) a predniesol stovky prednášok na rôznych odborných fórach (z toho 3 na zahraničných podujatiach). Zo širokého publikačného záberu treba spomenúť niektoré u nás prioritné práce: prvú publikáciu o aminotransferázach v ľudských sérach z roku 1956, originálny dihydroxyacetónový test pre energetickú bilanciu organizmu, originálnu modifikáciu určenia kreatinínu, pôvodné metódy stanovenia aminotransferáz, práce z problematiky na určenie bilirubinémie.

**Primár MUDr. E. Bielik, CSc.** bol veľa rokov aktívny i pedagogicky, začínajúc SZŠ, cez vybrané prednášky z oblasti z vodno-soľných a acidobázických porúch na viacerých katedrách ILF v Bratislave, ako i na ULV SZP v Bratislave i v Brne až po výučbu biochémie na Pedagogickej fakulte v Banskej Bystrici. Je spoluautorom učebníc biochémie a klinickej biochémie pre zdravotníckych laborantov.

V sedemdesiatych rokoch venoval veľkú pozornosť príprave prechodu pracoviska oddelenia klinickej biochémie do nových priestorov v novobudovanej nemocnici. Počas predlžujúcej sa výstavby novej bystrickej nemocnice opakovane, starostlivo upravoval plány potrebných priestorov, dbal o dopĺňanie a obnovu plánovanej techniky. Zhromaždil okolo seba kolektív pracovníkov, ktorí sa pod jeho vedením pripravovali na prácu v nových podmienkach. Po presťahovaní OKB do nového nemocničného areálu v roku 1981 sa systematicky venoval aj ambulantnej starostlivosti o pacientov s dyslipoproteinémiami.

Jeho práca a činnosť boli ohodnotené početnými diplomami a vyznamenaniami, ktoré si veľmi cenil. Patril k nim

Čestný odznak vlády ČSSR a ÚRO, ako aj vyznamenanie Za zásluhy o výstavbu Stredoslovenského kraja. Pri príležitosti životného jubilea v roku 1988 mu na návrh výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie udelila SLS Zlatú medailu za zásluhy o Slovenskú lekársku spoločnosť. SSKB udelila MUDr. E. Bielikovi, CSc. aj Čestné členstvo (v r. 1996) a za celoživotnú prácu aj Cenu profesora Ivana Pecháňa (2012). V roku 2008 mu Mesto Banská Bystrica udelilo Cenu primátora za rok 2008.

**Primár MUDr. Emil Bielik, CSc.** bol skromný, pracovitý človek, s neutíchajúcimi všestrannými záujmami, ktorý si získal autoritu predovšetkým svojou prácou. Všetci, ktorí sme mali to šťastie poznať ho, pracovať s ním a učiť sa od neho budeme s vďakou a úctou spomínať na roky strávené po jeho boku. Iste však nie je na škodu občas osobnosti jeho typu pripomenúť aj mladším generáciám.

MUDr. Drahoslav Gábor, emeritný primár  
Oddelenia klinickej biochémie  
FNsP F.D.Roosevelta v Banskej Bystrici



## O autorovi

**MUDr. Drahoslav Gábor** (nar. 28. 1. 1951 v Lučenci) – lekár, významný predstaviteľ slovenskej klinickej biochémie, emeritný primár Oddelenia klinickej biochémie Fakultnej nemocnice s poliklinikou v Banskej Bystrici v rokoch 1991–2013, nástupca primára MUDr. Emila Bielika, CSc.

Viac rokov bol členom výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie pri SLS, v rokoch 2010–2015 vykonával funkciu hlavného odborníka pre klinickú biochémiu pri Ministerstve zdravotníctva Slovenskej republiky.

Bol odborným garantom mnohých odborných seminárov

a hlavným organizátorom československého zjazdu klinickej biochémie v roku 1988 a X. zjazdu SSKB v roku 2012, ktoré sa konali v Banskej Bystrici. Je autorom viacerých publikácií v odborných časopisoch, spoluautorom monografie Juraj Hrnčiar a kol. Endokrinné a hormonálno-metabolické choroby, ich racionálna diagnostika a komplexná liečba.

Viac ako 40 rokov vyučoval na Strednej zdravotníckej škole v Banskej Bystrici, externe prednášal na Katedre klinickej biochémie IVZ Bratislava, ale aj na Pedagogickej fakulte a Slovenskej zdravotníckej univerzite v Banskej Bystrici.

Redakcia



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 15–17

**Dr. ALEXANDER PARTOS – LEKÁR-PIONIER BIOCHEMICKÉHO  
VÝSKUMU NA SLOVENSKU V MEDZIVOJNOVOM OBDOBÍ**  
**Dr. ALEXANDER PARTOS—DOCTOR-PIONEER OF BIOCHEMICAL  
RESEARCH IN SLOVAKIA IN THE INTERWAR PERIOD**

**Magula Daniel**

**Oddelenie klinickej biochémie, Špecializovaná nemocnica  
sv. Svorada Zobor, n. o., Nitra**

e-mail: magula@snozobor.sk  
*história odboru KB/LM*

V období po skončení prvej svetovej vojny, keď sa od roku 1923 na novozaloženej a jedinej lekárskej fakulte v Bratislave iba začala prednášať lekárska chémia, boli na Slovensku inštitucionálne predpoklady pre systematický výskum v rýchle sa rozvíjajúcom odbore biochémie veľmi skromné, resp. neboli vytvorené vôbec.

O to viac možno vyzdvihnúť aktivity Dr. Alexandra Partosa, ktorý sa ako súkromný lekár-internista pôsobiaci v Nitre – v tom čase azda ako jediný na Slovensku – systematicky venoval biochemickému výskumu a výsledky svojej práce pravidelne publikoval vo viacerých prestížnych vedeckých časopisoch. Nimi si získal aj významný medzinárodný ohlas.

Narodil sa 10. mája (niekde aj 21. februára) 1898 v Šuranoch v učiteľskej rodine. Stredoškolské štúdiá absolvoval v roku 1915 na františkánskom gymnáziu v neďalekých Nových Zámkoch a po získaní štipendia začal študovať medicínu na budapeštianskej univerzite. Štúdium však po rozpade Rakúsko-Uhorska už ukončil v roku 1920 na Lekárskej fakulte vo Viedni, čím sa mu naplnil životný sen stať sa lekárom.

Jeho mimoriadne nadanie, zápal pre vedeckú prácu i pracovitosť si všimli aj profesori na lekárskej fakulte. Sotva skončil vysokú školu, pozval ho za asistenta univerzitný profesor pražskej nemeckej lekárskej fakulty Dr. A. Biedl, kde pôsobil až do roku 1923. Následne získaval skúsenosti aj v Berlíne u profesora G. Klemperera.

V roku 1924 sa usadil pod Zoborom, v Nitre. Ordináciu si otvoril na Jesenského (dnešnej Farskej) ulici v centre mesta. Pre svoju všestrannú odbornosť ale aj hlboko ľudské charakterové vlastnosti si získal veľkú klientelu aj z najvyšších kruhov, ktorých honoráre mu umožňovali realizovať jeho sociálne cítenie a vedeckú prácu. Mnohých chudobných pacientov liečil bezplatne, prispieval



*Obr. 1. Dr. Partos vo svojom laboratóriu (Faith, 1940)*

im finančne aj na lieky. Značnú časť získaných finančných prostriedkov vložil do vybudovania výskumného biochemického laboratória a chovnej stanice pokusných zvierat v dome, kde mal zriadenú svoju ambulanciu. V tom čase pri diagnostike i pokusoch používal aj vlastný rtg prístroj.

Po celodennej práci lekára-internistu v ambulancii sa vo svojom laboratóriu dlho do noci venoval svojej výskumnej práci.

Oblasťou jeho výskumov boli biológia (najmä oblasť skúmania bunky), fyziologická chémia (biochémia) – venoval sa výskumu sacharidového metabolizmu, regulácii glykémie u zdravých jedincov, i u jedincov s diabetom mellitom, účinkom inzulínu, adrenalínu, ale aj problematike vplyvu hormónov hypofýzy, pohlavných hormónov a niektorých liečiv (napr. kurare) na bunkový metabolizmus. Vo svojom laboratóriu si pri pokusoch vyšetroval sám aj jednotlivé analyty – glukózu v sére a v moči novou mikroanalytickou laboratórnou metódou, ktorú iba prednedávnom uviedol do praxe pôvodcom nórsky biochemik Ivar Bang (Ivar Bang je celosvetovo považovaný za otca mikroanalytickej biochémie). Rovnako sám analyzoval čas zrážania krvi Wrightovou metódou, hematokrit, pH, ale aj prítomnosť inzulínu či kreatinínu v moči.

Pri jeho práci v laboratóriu mu pomáhal František Švec, študent gymnázia v Nitre, ktorého táto práca inšpirovala k štúdiu na lekárskej fakulte a pokračoval v nej spolu s niekoľkými študentami medicíny z Nitry aj počas jeho vysokoškolských štúdií na novozriadenej Lekárskej fakulte v Bratislave. Dr. Partos uviedol Františka Šveca, ešte ako študenta medicíny, ako spoluautora niekoľkých publikovaných prác – už v roku 1927 – v *Deutsche Medizinische Wochenschrift* a ďalších vedeckých časopisoch. MUDr. Františka Šveca po ukončení štúdia zaujala práca v odbore farmakológia, pracoval na Ústave farmakológie Lekárskej fakulty v Bratislave, neskôr sa v tomto odbore habilitoval na prvého slovenského docenta (neskôr univerzitného profesora). Neskôr stál aj pri založení Farmaceutickej fakulty v Bratislave a stal sa tak zakladateľom vedeckej farmácie na Slovensku. Slovenskú farmakológiu celosvetovo preslávil svojimi prácami najmä o srdcových glykozidoch.

Dr. Partos dostával pozvánky na rôzne lekárske kongresy, prednášal v Berlíne, Paríži, v roku 1932 mal veľký úspech v Budapešti. Aktívne sa zúčastnil na XIV. medzinárodnom kongrese lekárskej biológie v Ríme, ale i na kongresoch v Leningrade a v Moskve.

Jeho vedecké články a výstupy z nich z počiatkov pôsobenia v Nitre boli citované – povedľa takých mien ako boli O. F. Meyerhof, H. von Euler, manželia Coriovcí (vtedajší alebo neskorší nositelia Nobelovej ceny), F. Hoppe-Seylers, zakladateľ prvého časopisu fyziologickej chémie, J. Wohlgemuth, M. Somogyi, G. Embden, A. J. Carlson, a i. v medzinárodnom príručnom biochemickom lexikóne (*Biochemisches Handlexikon*), vydanom v roku 1931 berlínskym vydavateľstvom Julius Springer. Boli tu citované jeho práce publikované v nemčine v časopisoch *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, *Fermentforschung*, *Zeitschrift für experimentelle Medizin*, ktoré sa venovali regulácii metabolizmu sacharidov, podmienkam vylučovania inzulínu obličkami, tvorbe a odbúravaníu glykogénu za prítomnosti kyseliny mliečnej, zákonitostiam a vzťahu medzi obsahom glukózy v krvi a zrážaním krvi, účinkom elektrolytov na hladinu glykémie.

Vo vedeckej práci pokračoval, ďalšie publikácie okrem uvedených mu vychádzali aj v ďalších prestížnych vedeckých časopisoch, napr. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*, *Research in Experimental Medicine*, s témami o autonómnej schopnosti regulácie buniek vo vzťahu k fyziologickému a patologickému metabolizmu sacharidov, autonómnej regulácii buniek po podaní floridzínu, o metabolizme sacharidov a kyseliny mliečnej v krvinkách, experimentálnej hypofyzektómii u králikov a vplyve gonadotropných hormónov na zmeny krvných buniek (tzv. „zmužštenie“ krviniek samíc). Posledná práca vydaná v roku 1938 vyšla až po jeho predčasnej smrti. Dr. Faith v Zlatej knihe Nitry uvádza, že celkovo bol autorom približne 180 odborných a vedeckých diel.

Z prírodovedeckého pohľadu sa zamýšľal aj nad aspektami života vo fyziológii, jeho rozsiahlu úvahu a rozpravu „Pojem života vo fyziológii“ uverejnila *Filosofická revue*, vydaná v roku 1934 v Olomouci.

Široká klientela v ambulancii a sústavná, vyčerpávajúca výskumná práca v laboratóriu podlamovala jeho zdravie. Začiatkom roka 1937 ho postihol infarkt myokardu, po ktorom ho ošetroval chýrny viedenský kardiológ prof. Eppinger. Keď sa mu stav zlepšil, znova pokračoval v práci, avšak po recidíve ochorenia zomrel v Nitre, 18. októbra 1937.

Mesto Nitra si celoživotné dielo lekára-vedca-biochemika Dr. Alexandra Partosa uctilo významným miestom jeho posledného odpočinku na nitrianskom Mestskom

cintoríne, náhrobný bronzový reliéf vyhotovil jeho priateľ, známy nitriansky sochár Július Bártfay.

Význam práce a diela Dr. Alexandra Partosa spočíva v tom, že v období, kedy ešte výskumné inštitucionálne aktivity v oblasti biochémie na Slovensku boli iba v začiatkoch (aplikáciu biochemických metód v klinickej praxi začal až po roku 1931 asistent Propedeutickej kliniky Lekárskej fakulty v Bratislave Dr. F. Šimer), bol azda jediným lekárom pôsobiacim mimo nemocnice, ktorý sa systematicky venoval biochemickým výskumom, ktoré uznávala vtedajšia svetová vedecká komunita. Vo svojom laboratóriu zavádzal najnovšie svetové objavy chemickej analýzy v medicíne, napr. Bangovu mikrometódu stanovenia glukózy, a i. Svojou prácou inšpiroval k štúdiu na Lekárskej fakulte v Bratislave neskoršieho svetoznámeho profesora farmakológie MUDr. Františka Šveca, DrSc., zakladateľa a priekopníka farmaceutického štúdia na Slovensku. V medzivojnovom období prvej Československej republiky tak šíril dobré meno vtedajšej, iba sa formujúcej slovenskej medicíny vo svete.

Je vhodné nezabúdať na našich predchodcov, ktorí svojou prácou medzinárodného významu vytvorili predpolie pre neskorší rozvoj biochemického výskumu a aplikácie laboratórnych metód do lekárskej i farmaceutickej praxe. I keď v tom čase bol Dr. Partos viac-menej osamelým bežcom, napriek tomu zohral výnimočnú priekopnícku rolu, ktorou inšpiroval k vedeckej práci v medicíne i farmácii i ďalších nasledovníkov.

### PodĎakovanie

*Rád by som poďakoval za prvotnú inšpiráciu k napísaniu článku Mgr. Gabrielovi Točkovi, za pomoc pri vyhľadávaní cenných archívnych materiálov Ing. Štefanovi Košovianovi – nitrianskym regionálnym historikom – a za poskytnutie viacerých odborných materiálov a konzultácie Dr. h. c., prof. RNDr. Jozefovi Čižmárikovi, PhD., emeritnému profesorovi UK, Bratislava.*

## LITERATÚRA

- 1. Abderhalden, E. (1931):** *Biochemisches Handlexikon*, Band XIII. (6. Ergänzungsband). Berlin: Verlag von Julius Springer, 1085s.
- 2. Faith, F. (1940):** Nitra arany könyve. Nitra: Löwy Antal és Fiai, 63 s. + 23 s. obr.
- 3. Kučerová, M. (1992):** Prof. MUDr. František Švec, DrSc. (1906–1976), zakladateľ vedeckej farmácie na Slovensku. *Bratisl. Lek. Listy*, 93, č. 4, s. 213–214.
- 4. Martinček, L. (1977):** Pamiatke lekára. K nedožitým osemdesiatinám MUDr. Alexandra Partosa. *Život a kultúra mesta Nitry*, č. 11, s. 23.
- 5. Partos, A., Svec, F. (1927):** Gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen Blutzuckergehalt und Blutgerinnungsgeschwindigkeit. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1927; 53 (44): 1857–1858. DOI: 10.1055/s-0028-1126948. Dostupné na: Thieme E-Journals-DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift/Abstract (thieme-connect.com) (cit. 26.2.2022).
- 6. Partos, A. (1934):** Pojem života ve fyziologii, s. 4–8, s. 104–107. In **Habáň, M. (ed.):** *Filosofická revue*, Olomouc: roč. VI., 192 s. Dostupné na: <http://librinostri.catholica.cz/download/FiloRev06-r.pdf> (cit. 22.2.2022).
- 7. Partos Sándor-Wikipédia:** Dostupné na: [https://hu.wikipedia.org/wiki/Partos\\_Sándor](https://hu.wikipedia.org/wiki/Partos_Sándor) (cit. 22.2.2022).
- 8. Publikácie Dr. A. Partos:** *Alexander partos*. Študovňa Google (cit. 26.2.2022)
- 9. Sedláčková, E., Tichý, M. (1996):** Prof. MUDr. František Švec, DrSc. – priekopník farmakológie a farmaceutického štúdia na Slovensku. Bratislava, JUGA, 104 s., ISBN 80-85506-12-2.
- 10. Schmidt, V. (1986):** Ivar Christian Bang (1869–1918, founder of modern clinical microchemistry. *Clin. Chem.*, Jan; 32(1 Pt 1): p. 213–5.
- 11. Turský, T., Čársky, J. (1999):** 100 rokov od narodenia prof. MUDr. F. Šimera. *Medicínsky monitor*, č. 3, s. 40.
- 12. Valent, Š. (1998):** MUDr. Alexander Partos, lekár, výskumník, vedec. In **Pažitný, A. (ed.):** *Významné osobnosti Nitry*. Nitra: Mesto Nitra a Mestský úrad v Nitre, 208 s., ISBN 80-967814-8-0.





Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 18–26

## KORENE LABORATÓRNEJ MEDICÍNY A REMINISCENCIE NA KLINICKÚ BIOCHÉMIU THE ROOTS OF LABORATORY MEDICINE AND THE REMINISCENCES OF CLINICAL BIOCHEMISTRY

**Valovičová Eva**

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie  
Slovenská lekárska spoločnosť Bratislava

e-mail: [evavalovicova2@gmail.com](mailto:evavalovicova2@gmail.com)  
*história odboru KB/LM*

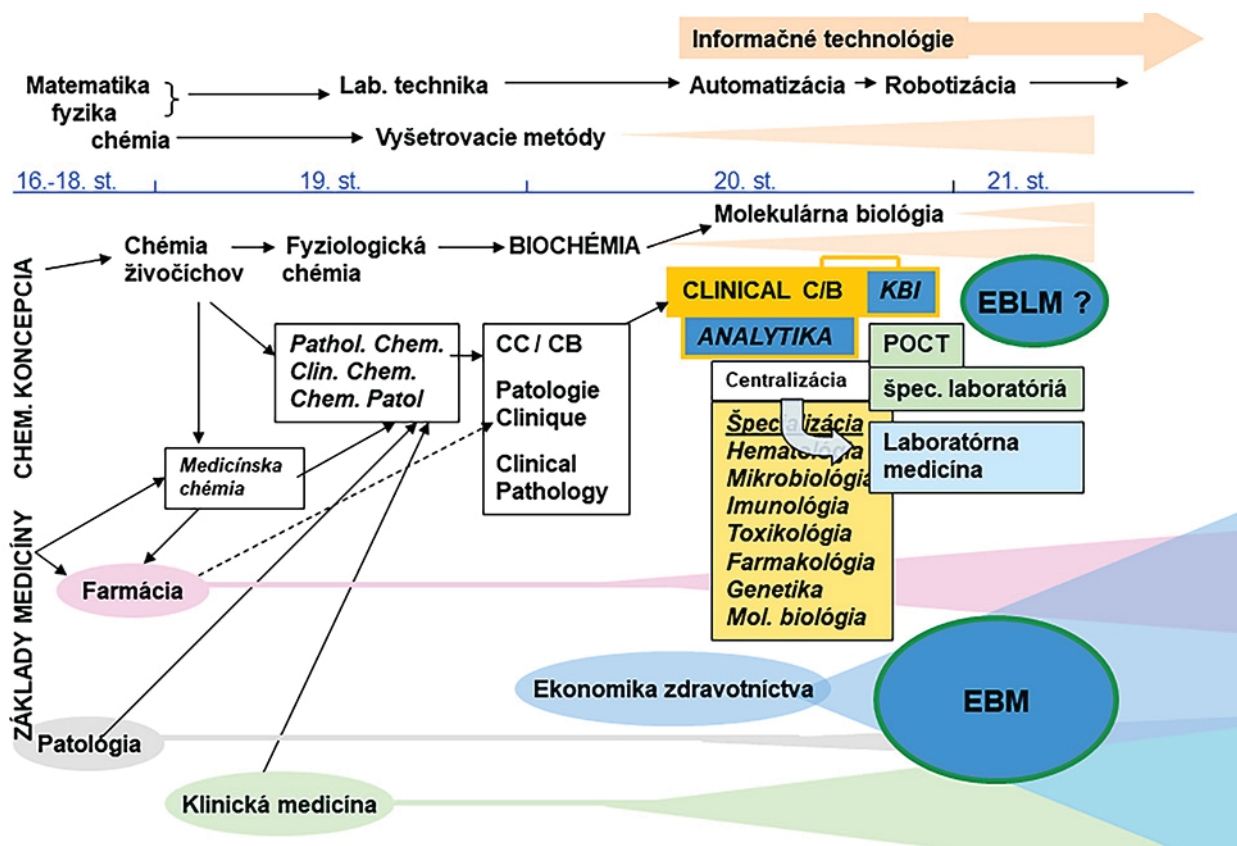
Korene laboratórnej medicíny siahajú do 16. storočia k Paracelsovi – lekárovi vzdelanom v prírodných vedách, ktorý je autorom chemickej koncepcie životných pochodov v ľudskom tele. Jej prebojovanie do myslenia lekárov trvalo dve storočia. Koncom 18. storočia, vďaka vývoju laboratórnej techniky a rozvoju chemických vyšetrovacích metód, vznikla chémia živočíchov. Jej pokračovaním je fyziologická chémia, ktorá so súčasným rozvojom farmácie, patológie a klinickej medicíny umožnila vznik prvých klinických laboratórií. Koncom 19. a začiatkom 20. storočia sa na základe fyziologickej chémie rodí klinická chémia. V Európe sa budovali laboratória klinickej chémie najskôr v nemecky, neskôr v anglicky hovoriacich krajinách a v Amerike. So vznikom biochémie, rozvojom laboratórnej techniky a spoluprácou vedcov s klinickými lekármi sa zrodila klinická biochémia. Jej ďalší vývoj bol rôzny. V Európe, v nemecky hovoriacich krajinách ju ovplyvňovala interná medicína, v anglosaských krajinách sa vyvinula z patofyziológie, vo Francúzsku bola ovplyvnená farmaceutickým priemyslom (Obr. 1).

20. storočie, ako storočie priemyselnej revolúcie prinieslo rozvoj laboratórnej techniky a nárast biochemických poznatkov a nových laboratórnych vyšetrovacích metód. Klinické laboratória sa stávali potrebou medicínskej praxe. Laboratórne vyšetrenia vstúpili do vedeckej i medicínskej

praxe ako vhodné „objektívne dôkazy“. Na lekárske fakultách sa začala prednášať lekárska chémia a biochémia.

V roku 1937 bol z pražskej Internej kliniky Lekárskej fakulty Karlovej univerzity prof. Pelnářa vyslaný do USA asistent MUDr. Jaroslav Hořejší s cieľom oboznámiť sa s činnosťou klinických laboratórií. Jeho mladší kolega MUDr. Teofil Rudolf Niederland v r. 1947 odišiel do USA na vedecké biochemické pracovisko Washingtonovej univerzity v St. Louis, kde pôsobili manželia Coriovci, laureáti Nobelovej ceny. Krátko po návrate do Prahy však odchádza v roku 1949 do Bratislavy na Lekársku fakultu Univerzity Komenského ako docent internej medicíny. V tom čase tam už v rámci patologickej fyziológie prednášal biochémiu asistent MUDr. Rudolf Korec, ktorý však odchádza na novozriadenú lekársku fakultu v Košiciach. Doc. Niederland začína v Bratislave prednášať biochémiu a zakladá Ústav lekárskej chémie LF UK. V trenčianskej nemocnici sa na začiatku 50-tych rokov kladú základy budúceho Inštitútu pre ďalšie vzdelávanie lekárov a farmaceutov (IĐVLaF) a MUDr. Zdenko Cicvárek v nej zakladá prvé klinicko-biochemické laboratórium.

V roku 1973 v ČSSR, dva roky po definovaní klinickej chémie/biochémie ako samostatného medicínskeho odboru, schvaľujú obe (české i slovenské) ministerstvá zdravotníctva koncepciu klinickej biochémie, ktorú pripra-



Obr. 1. Korene laboratórnej medicíny a klinická biochémia

vili prof. J. Hořejší a prof. T. R. Niederland. Vznikla tiež Československá spoločnosť klinickej biochémie (ČSSKB) pri Československej lekárskej spoločnosti Jana Evangelisty Purkyně, ktorá sa stáva členom IFCC (International Federation of Clinical Chemistry). Prvým predsedom sa stal prof. MUDr. J. Hořejší, I. podpredsedom ČSSKB bol prof. MUDr. T. R. Niederland a ďalším členom výboru zo Slovenska sa stal MUDr. Z. Cicvárek.

Pri 10. výročí vzniku klinickej biochémie (KB) v ČSSR sa mohlo konštatovať, že:

- všetky typy zdravotníckych zariadení mali oddelenia klinickej biochémie (OKB) s dostatočným počtom kvalifikovaných pracovníkov, systematicky vzdelávaných v rámci Inštitútu pre ďalšie vzdelávanie lekárov a farmaceutov (IĎVLaF) a dobudovávalo sa prístrojové vybavenie,
- OKB poskytovali biochemické, hematologické, sérologické vyšetrenia podľa potrieb daného zdravotníckeho zariadenia, pracovalo sa na štandardizácii a unifikácii analytických metód a hľadali sa možnosti zmeniť extenzívny typ ich využívania na racionálny,

- do praxe sa zavádzali nové analytické metódy s prihliadnutím na ich klinický význam, ekonomiku a možnosti štandardizácie, od r.1976 bol vypracovaný systém internej kontroly kvality laboratórií, ktorý mali v kompetencii okresní, krajskí odborníci a hlavný odborník pre KB pri MZ a postupne sa budovala externá kontrola analytickej kvality s vytvorením Národného referenčného laboratória v spolupráci s n.p. LACHEMA a IMUNA,
- v roku 1979 sa do praxe zaviedla Medzinárodná sústava jednotiek SI v zdravotníctve,
- konziliárnou službou a účasťou v preventívnych programoch sa klinická biochémia zúčastňovala liečebno-preventívnej starostlivosti a rozvíjala výskumnú činnosť v rámci Odborového plánu lekárskeho a farmaceutického výskumu (OP LaFV) pri Ministerstve zdravotníctva SSR,
- vydávala odborný časopis *Biochemia Clinica* Bohemoslovaca,
- usporadúvala odborné podujatia, v rámci odboru KB ale i medziodborovo s klinickými odbornými spoločnosťami,

- v danej geopoliticko-ekonomickej situácii spolupracovala na rozvoji odboru v rámci Rady vzájomnej hospodárskej pomoci (RVHP) na štandardizácii a unifikácii analytických vyšetrovacích metód.

Významnú úlohu pri vzniku a rozvoji mali nielen lekári, prichádzajúci do nového odboru predovšetkým s internistickou a endokrinologickou kvalifikáciou, ale v analytickej časti odboru aj vysokoškolsky vzdelaní nelekári. Ako prví doň vstúpili farmaceuti, neskôr inžinieri a prírodovedne vzdelaní vysokoškooláci. Spoločne sa všetci tiež podieľali na vzdelávaní laborantov.

V roku 1957 zakladateľ modernej klinickej biochémie Donald van Slyke, na III. medzinárodnom kongrese klinickej biochémie povedal: „*klinická biochémia zahŕňa nielen vývoj vyšetrovacích metód, ale tiež štúdium všetkých chemických procesov ľudského tela a ich narušení v chorobe*“. Pri prudkom rozvoji automatizácie v 2. polovici 70. rokov sa začali využívať biochemické vyšetrenia nielen v diagnostike ale aj v preventívnych programoch, vďaka čomu sa začala odhaľovať aj „falošná pozitivita“ týchto vyšetrení. Lekárov klinickej biochémie a internistov to viedlo k spolupráci na odhaľovaní jej príčin v predanalytickej fáze, ako i v potrebe riešenia referenčných hodnôt a inter- a intra-individuálnej variability výsledkov vyšetrení.

V roku 1975 bol v časopise Lancet uverejnený editoriaal spochybňujúci budúcnosť klinickej chémie/biochémie. Paul Astrup naň reagoval v časopise Clinical Chemistry článkom „*Quo vadis clinical chemistry ?*“ výzvou ku klinickým biochemikom-lekárom o potrebe venovať sa v záplave údajov a nadprodukcii laboratórných vyšetrení klinickej chémie v celej je komplexnosti. „Laboratórny servis“ už v tom období plne pohlcoval čas a profesionálne kapacity klinických biochemikov – lekárov, a neumožňoval dostatočne využívať potenciálne možnosti a riešenia v klinickej časti klinickej biochémie, vrátane aplikovania výskumno-vývojovej činnosti, ktorá by skúmala a bola zameraná na účinnosť a užitočnosť biochemických vyšetrení.

S prihliadnutím na tento vývoj odborníci konštatovali, že sa adekvátne neskvalitňuje diagnostika ani liečebná starostlivosť a v zdravotníctve významne rastú finančné náklady. Prvým pokusom o tzv. „ekonomizáciu zdravotníctva“ v oblasti laboratórnej diagnostiky bola centralizácia laboratórií. Klinická biochémia mala už v tom čase kvalitný a najprepracovanejší analytický systém ako i široký medicínsky záber. Vznikla ako základný, nie špecializovaný klinický odbor, a tak sa stala organizátorom budovania

centrálnych laboratórií v zdravotníckych zariadeniach. A koncom 20. storočia s nástupom stále sofistikovanejšej techniky a technológií sa stala aj garantom Laboratórnej medicíny (LM). Už na začiatku 80. rokov sa lekári v KB intenzívne zaoberali validitou laboratórných vyšetrení, analytická fáza vyšetrení vďaka technike, technológiám a kvalifikovanému nelekárskemu personálu dosahovala v tom čase už veľmi dobrú kvalitu. Nedostatky sa v tom čase zisťovali a presúvali predovšetkým do predanalytickej a postanalytickej fázy diagnostického procesu.

Mario Plebani v roku 2009 časopise Clinical Chemical Acta rozdelil fázy odhaľovania chýb v laboratórnej medicíne na:

- „starú éru“ v rokoch 1947–1990, kedy sa detegovali predovšetkým analytické chyby,
- „strednú éru“ 1990–2000, v ktorej sa pátralo po mimolaboratórných chybách a
- „modernú éru“ po roku 2000 zameranú na chyby laboratórnej medicíny s nasmerovaním na laboratórne chyby v diagnostickej medicíne.

Centralizácia laboratórií, ktorej cieľom bolo šetrenie financií v zdravotníctve, priniesla okrem pozitív i negatíva. Predovšetkým oneskorenie poskytovania výsledkov vyšetrení, zhoršenie možnosti komunikácie s klinickými pracovníkmi a pacientmi, čo viedlo k nárastu chýb v mimolaboratórných činnostiach pre- a post-analytickej fázy a nepriniesla očakávaný finančný výsledok. Nádejou bolo, že prvý nedostatok vyrieši vývoj POCT (point-of-care testing) diagnostiky pri lôžku pacienta a špecializované laboratória klinických odborov. Finančné náklady na LM, nie dostatočne kvalitné výsledky získavané POCT a uvádzanie do praxe nových vyšetrovacích metód bez navrhovaného potrebného 3-fázového vývoja, podobne ako je to v prípade liečiv, stále narastali a naďalej rastú. Na prelome storočí sú, napriek tomu, výsledky laboratórných vyšetrení stále považované za „objektívne vyšetrenia“ potrebné pre medicínske rozhodovanie. Narastajúce náklady na zdravotníctvo a skvalitnenie liečebnej starostlivosti vedú k potrebe zavedenia „EBM“ – (evidence-based medicine, medicíny založenej na dôkazoch). Keďže odborníci v KB, LM a klinickí lekári už takmer dve dekády upozorňujú na problémy súvisiace s užitočnosťou laboratórných vyšetrení, vzniká aj analogický pendant v laboratórnej medicíne – EBLM (evidence-based laboratory medicine, na dôkazoch založená laboratórna medicína). V ostatných 15 rokoch sa intenzívne venujú skvalitňovaniu využívania

laboratórných výsledkov v rámci EBLM nielen odborné spoločnosti klinickej biochémie, laboratórnej medicíny, ale aj špecializované klinické odbory. Poukazujú na mnohé problémy, ktoré je potrebné riešiť.

Z pohľadu viac ako 40-ročnej praxe klinického biochemika-lekára-internistu, ktorého OKB prešlo za toto obdobie nielen technickými, technologickými, organizačnými a významnými koncepčnými zmenami, jednak vo všeobecnej nemocnici s poliklinikou, zameranej na využívanie klinicko-biochemickej informácie (KBI) v prevencii až po OKB na špecializovanom onkologickom pracovisku, dovoľm si upozorniť na zásadné úlohy klinického lekára-biochemika:

1. na systém spolupráce s konkrétnymi klinickými pracoviskami a všetkými účastníkmi metódou „spätnej väzby“,
2. na trvalý edukačný a informačný systém pre všetkých spolupracovníkov a účastníkov celého vyšetrovacieho procesu, ktorý je nepretržite potrebné prispôbovať potrebám pacientov a lekárov na klinických oddeleniach a
3. na aktuálny systém, nielen internej a externej kontroly analytickej kvality, ale i kontroly lekárskej kvality vo všetkých fázach získavania KBI.

V nasledujúcich riadkoch uvádzam niekoľko príkladov problémov pri interpretácii KBI zo skúseností pri využívaní biochemických vyšetrení s vyhľadávaním metabolických porúch.

V 5-ročnej prospektívnej štúdií vyhľadávania porúch glukózovej tolerancie (PGT), dyslipoproteinémií (DLP) a hyperurikémie (hyperurikemického syndrómu – HUS) v populácii 20 až 65-ročných, pred viac ako 40 rokmi, v rámci preventívnych lekárskech prehliadok (PLP), zameraných na včasné vyhľadávanie rizikových faktorov aterosklerózy sme zapojili 11 ambulancií všeobecných lekárov. Projekt bol rozčlenený na etapu skríningu, reskríningu

	Vstupný súbor 1462 (828 ♂, 634 ♀)		
	PGT	DLP	HUS
<b>Skríning: 1976–1978</b> (n=1462)	15%	26%	4%
<b>Reskríning: 1978–1980</b> (n=1212)	10%	18%	1%

Obr. 2. Vzťah metabolických chorôb diabetu mellitu, poruchy glukózovej tolerancie (PGT), dyslipoproteinémie (DLP), hyperurikemického syndrómu (HUS) k ateroskleróze a jej komplikáciám (VRÚ OP LaFV na Slovensku č. 09-01-02, 1976–1980)

a záver sledovania po piatich rokoch. Poskytol nám nielen informácie o sledovaných metabolických poruchách, ale umožnil získať aj veľké skúsenosti so spoluprácou s lekármi, zdravotníckymi pracovníkmi a osobami zúčastňujúcimi sa PLP. Skríning sme robili po zaškolení všetkých spolupracovníkov a písomnom a ústnom poučení probandov za presne definovaných podmienok. V reskríningu som, ako internistka – klinická biochemička, vyšetrila všetky osoby s metabolickou poruchou, analyzovala som s nimi problémy, ktoré mohli vzniknúť v príprave na vyšetrenie, poučila som ich o možnostiach zlepšenia prípravy a dôsledkoch novej nesprávnej diagnózy, ako aj správnej liečby pri potvrdení diagnózy. Všetky osoby s patologickým nálezom som ďalej dispenzarizovala (Obr. 2).

V tomto 5-ročnom prospektívnom sledovaní orálny glukózotolerančný test (oGTT) podstúpilo 365 osôb, vek 20–65 r., 255 mužov a 110 žien. Opakovanie oGTT sa urobilo 3-5x, podľa v tom čase platných štandardných podmienok a rozhodovacích kritérií.

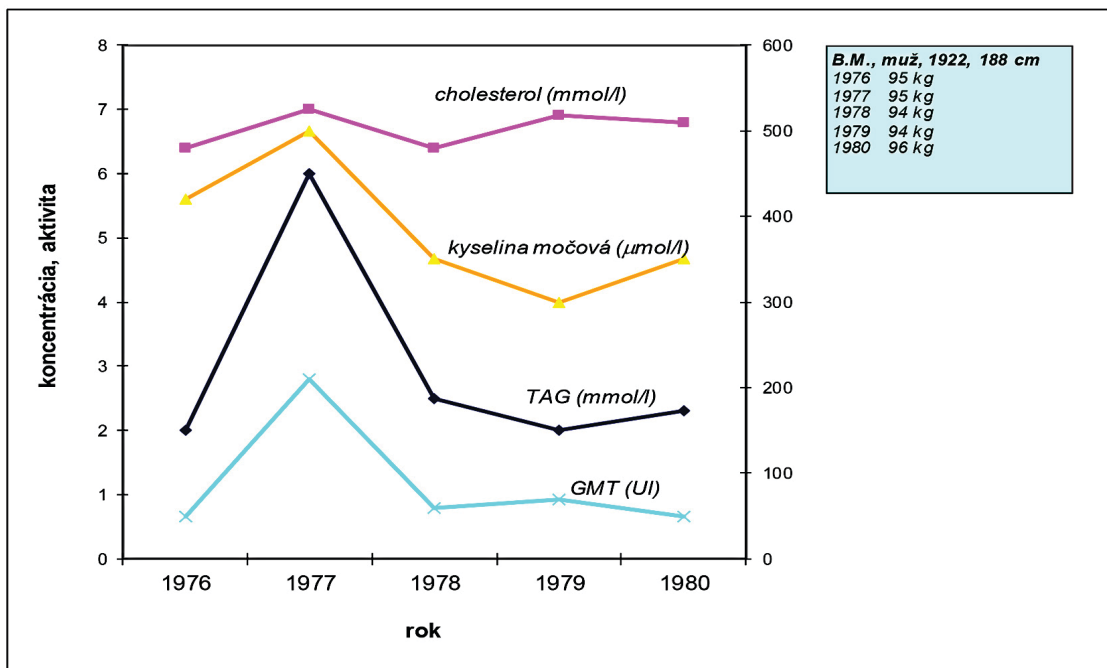
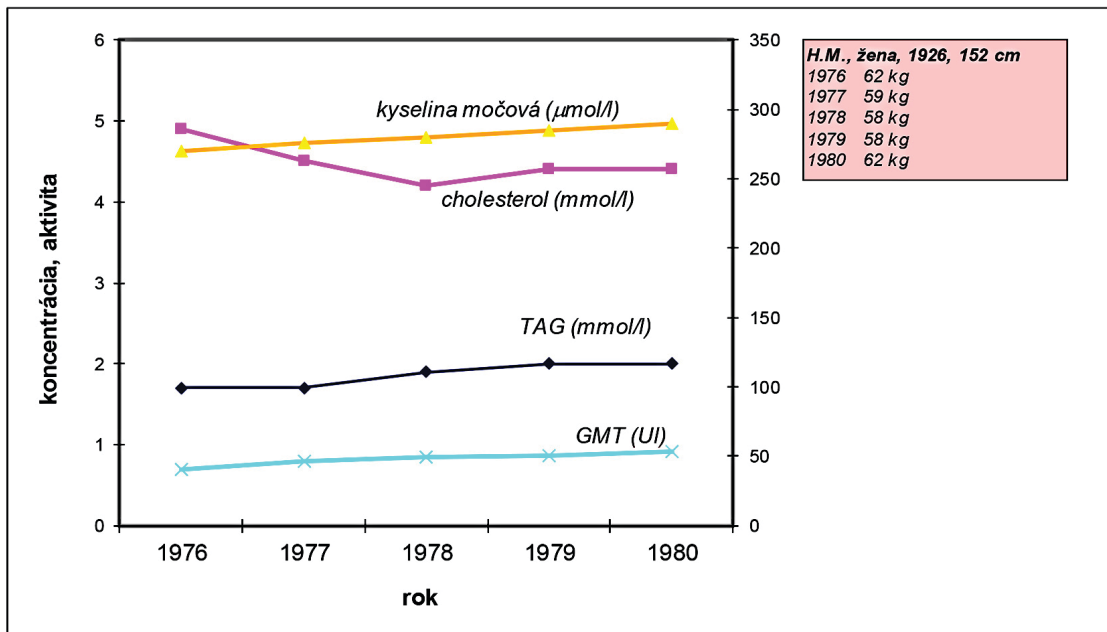
Tretina vyšetrených mala reprodukovateľne normálny oGTT, *diabetes mellitus* (DM) sme potvrdili u 2,7 % a PGT u 7,7 %. Viac ako polovica sledovaných vykazovala rôzne výsledky oGTT: od jasnej patológie cez normálny oGTT alebo PGT. Iba nález glykozúrie u probandov s opakovaným oGTT sa vyskytoval v 4 % trvale.

Nízkú výpovednú hodnotu oGTT ako diagnostického testu súčasne s nami potvrdili i autori ďalších prospektívnych sledovaní.

Glykémiu nalačno sme vyšetrili opakovane 749x – vyššia ako 7,0 mmol/l sa vyskytla u tretiny osôb s opakovane

<b>Súbor: 365 osôb, 20–65 r, ♂ 255, ♀ 110</b>	
o-GTT 3-5 x opakovaný (1976–1980), podľa platných štandardných podmienok a kritérií	
<b>Vyhodnotenie o-GTT po 5 rokoch:</b>	
PGT neprítomná.....	31,51 %
DM.....	2,74 %
PGT.....	67,0 %
„kolísavý o-GTT“.....	53,97 %
renálna glykozúria.....	4,11 %
<b>Glykémia nalačno vyšetrená 749x</b>	
vyššia ako 7,0 mmol/l u 6,38 % osôb,	
PGT nemalo .....	31,25 %
DM.....	12,5 %
PGT.....	2,5 %
„kolísavý o-GTT“.....	50,0 %

Obr. 3. Prospektívne, 5-ročné sledovanie o-GTT – prehľad výsledkov (VRÚ OP LaFV na Slovensku č. 09-01-02, 1976–1980)



Obr. 4. Kazuistiky sledovania intraindividuálnej variability sérového cholesterolu, triacylglycerolov (TAG), kyseliny močovej a  $\gamma$ -glutamyltransferázy (GMT)

negatívnym oGTT, zvýšená bola iba u 12,5 % diabetikov a u 2,5 % osôb s PGT a u osôb s nestálou PGT alebo oGTT bola 53 % (Obr. 3).

Keďže bolo zrejmé, že príčinou nestability výsledkov oGTT bola nedostatočná spolupráca probandov pri príprave na vyšetrenie oGTT, snažili sme sa zlepšiť kontrolu prípravy v bežnej praxi zavedením kontrolného dotazníka, ktorý ako riadený rozhovor vyplňala pred a po ukončení vyšetrenia s pacientom laborantka. Bola v ňom i otázka

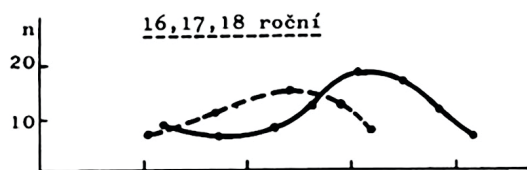
o znášanlivosti glukózovej záťaže, keďže sme zistili, že značná časť pacientov mala po glukózovej záťaži problémy, ktoré by mohli významne ovplyvniť výsledok v zmysle novej možnej falšnej negativity (FN). Výsledok oGTT sme zhodnotili a v prípade neznášanlivosti glukózovej záťaže doplnili o túto informáciu. Pacienta s nedostatočnou prípravou sme nevyšetřili. Vysvetlili sme mu dôsledky novej nesprávnej diagnózy a odporučili mu nápravné opatrenia. Po 18 mesiacoch sme prehodnotili účinnosť dotazníka. Vý-

**K Y S E L I N A M O Č O V Á - Uric Quant, Behringer**

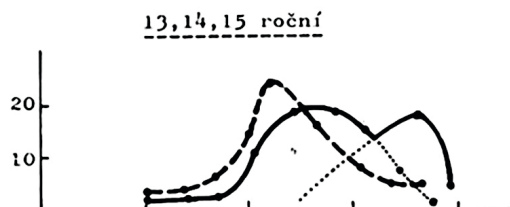
Presnosť : 3,15% / 2,16 - 4,35% /

Správnosť : - 0,55 - +6,0%

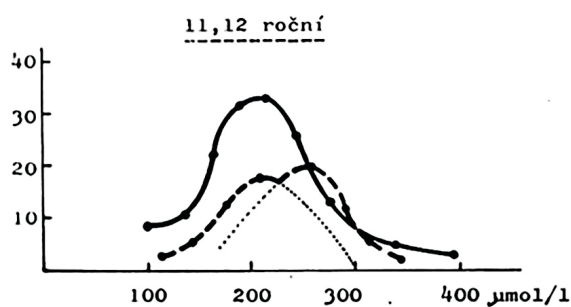
n  $\pm$  2s



-----○	♀	44	.....130 - 325 μmol/l
-----○	♂	49	.....182 - 420 μmol/l



-----○	♀	85	.....135 - 333 μmol/l
-----○	♂	84	.....156 - 391 μmol/l



-----○	♀	96	.....130 - 320 μmol/l
-----○	♂	109	.....130 - 330 μmol/l

Obr. 5. Histogramy sérovej kyseliny močovej u detí a mladistvých – VRÚ OP LaFV na Slovensku 28-02-03, 1981-1985 „Prehodnotenie fyziologických hodnôt niektorých biochemických parametrov vo vybranej populácii“



Obr. 6. Grafické znázornenie individuálneho biochemického profilu podľa Robertsona (1980)

znamne sa podarilo zlepšiť pozitívnu prediktívnu hodnotu oGTT, ktorá vzrástla z 38 % na 68 %.

Z dvoch znázornených kazuistík je zrejماً možnosť získania „individuálnej normy“, resp. zistenia intraindividuálnej variability, ktorá pod vplyvom premenných faktorov (konzum alkoholu v kazuistike č. 2 u muža) vedie pri jednorazovom vyšetrení k nesprávnej diagnóze s následnou nesprávnou liečbou, čo je v praxi časté (Obr. 4).

Skúsenosti zo skríningu a reskríningu porúch glukózovej tolerancie (PGT) a dyslipoproteinémií (DLP) nás viedli k odporúčaniam na zlepšenie účinnosti diagnostiky sledovaných metabolických porúch, ktoré možno zhrnúť do:

1. potreby písomného a individuálneho ústneho poučenia vyšetovaných osôb indikujúcim lekárom,
2. zabezpečenia kontroly prípravy na vyšetrenie riadnym dotazníkom a zhodnotenie výsledku vyšetrenia s komentárom upozorňujúcim na možnosť FN,
3. dlhodobjšieho sledovania pacienta pri odporúčanom životnom režime, pred nasadením medikamentózneho liečby; ak napriek úprave životosprávy porucha pretrváva, je potrebná diferenciálna diagnostika možnej sekundárnej poruchy.

Pri vznikajúcich problémoch s validitou vyšetrení sa koncom 70-tych rokov začala venovať pozornosť rozhodovacím kritériám. Referenčné hodnoty, referenčné intervaly zohľadňujú biologické, analytické, štatistické a medicínske hľadiská. Ich teória sa neustále vyvíja a ich získavanie naráža na početné problémy. IFCC vytvorila v r. 1978 prvú pracovnú skupinu na ich získavanie. Podľa odporúčaní IFCC sme v bývalom Štátnom ústave národného zdravia (ŠÚNZ) v r. 1981–1985 riešili výskumnú rezortnú úlohu (VRÚ) OP LaFV „Prehodnotenie fyziologických hodnôt niektorých biochemických parametrov vo vybranej populácii“.

Všeobecne sú známe problémy referenčných limitov detského a dorastového veku. Vývoj organizmu, ani jeho starnutie, sa neriadi kalendárnym vekom a preto je zložitú počas vývoja, i pri starnutí, stanovovať v týchto populáciách limity, pokiaľ nie sú dostupné „individuálne normy“. V detskom veku sú známe predovšetkým problémy s hodnotami kreatinínémie, alkalickej fosfatázy (ALP) a iných analytov.

Na obr. 5 prezentujeme náš zaujímavý nález urikémie v detskej a dorasteneckej populácii rozdelenej do troch vekových kategórií: 11–12, 13–15 a 16–18-ročných. Histogramy 11–12 a 13–15-ročných sa u chlapcov a dievčat líšia nielen v hodnotách ale aj vo vzhľade. V prvej skupine

je histogram 11–12-ročných dievčat bifázický a podobne je to u chlapcov až v 13.–15. roku. Ide o vekový posun dozrievania pohlavnej hormonálnej aktivity, ktorá ovplyvňuje urikémiu (známy je tento vzťah v klimaktériu žien). Teda i urikémia, podobne ako kreatinínémia a sérová aktivita ALP a iných parametrov v detskom období nekoreluje s kalendárnym vekom. „Norma“, resp. „fyziologická hodnota“ sa nedá relevantne získať na základe terminologických alebo štatistických konvencií. Ani žiadny pacient nie je „priemerom“ pacientov, resp. lekárskeho skúsenosti, ale je individuálnym klinickým modelom.

Priekopnícka práca R. J. Williamsa „Biochemická individualita“ z roku 1952 analyzuje, dnes už vďaka molekulárnej biológii, jeho všeobecne akceptovanú koncepciu. V knihe autor diskutuje tiež o vplyve patofyziologických zmien a vplyve rôznych exogénnych faktorov v organizme na „individuálnu normu“ biochemických parametrov.

V roku 1980 Robertson a spol. publikovali prácu o pokuse, v ktorom počas 6 týždňov opakovali biochemický profil 23 parametrov u 10 dobrovoľníkov. Využívajúc lineárne diskriminačné funkcie, odvodili špecifický profil každého individua a po 6 týždňoch vedeli pri zopakovaní vyšetrení s 96–100 % pravdepodobnosťou určiť daného jedinca. Po zopakovaní týchto vyšetrení po 2 rokoch správne identifikovali 90 % jedincov (Obr. 6).

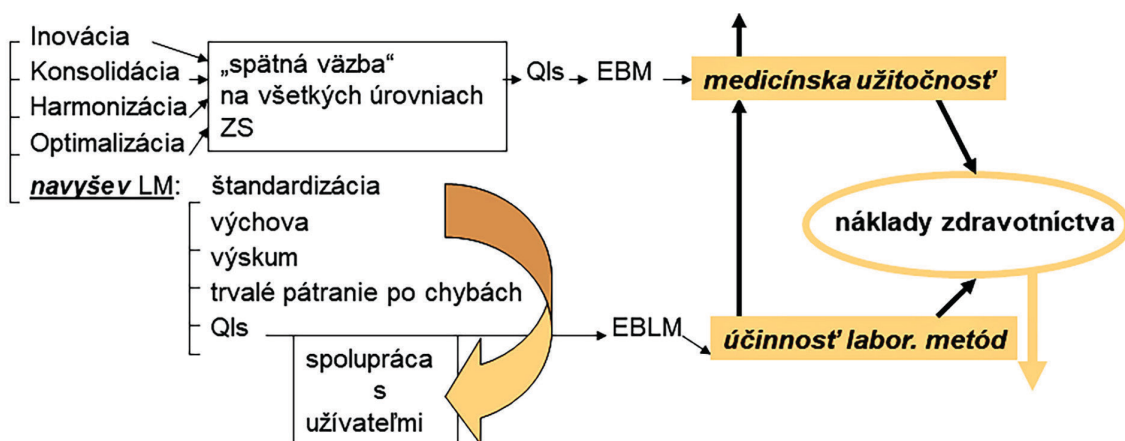
Raun a kol. (1982) v práci o intraindividuálnych referenčných intervaloch, založených na dlhodobom sledovaní plazmatických bielkovín a tukov u zdravých, tiež pri niektorých chronických patologických stavoch, poukázali na možnosť matematického vyjadrenia kolísania intraindividuálnej normy, ako i na neracionálne frekventné indikovanie analýz plazmatických tried bielkovín v priebehu akútnej infekčnej choroby. Upozornili na vysokú interindividuálnu variabilitu – 15–30 % u imunoglobulínov, reaktantov akútnej fázy i plazmatických lipidov.

Problém rozhodovacích kritérií so zameraním na intraindividuálnu variabilitu bolo možné riešiť adekvátne iba pri štandardizovaných, unifikovaných metódach v stabilnom zdravotníckom systéme s adekvátnou počítačovou technikou.

Otázku, či je kompatibilita medzi využívaním laboratórných výsledkov, kvalitnou zdravotnou starostlivosťou (ZS) a ekonomikou zdravotníctva si položili E. Peterson a A. E. Rodin v r. 1987. Rozoznávajú 3 kategórie falošného využívania laboratórných vyšetrení:

- nadužívanie

## STRATÉGIA



Obr. 7. Stratégia: Je kompatibilita medzi využívaním laboratórnych výsledkov, kvalitnou zdravotnou starostlivosťou a ekonomikou zdravotníctva ?

- nedostatočné užívanie
- nesprávne užívanie

Nadužívanie má nežiaduci efekt na zdravotnú starostlivosť, častá falošná pozitivita (FP) vyvoláva informačný šum, ktorý znekváľňuje zdravotnú starostlivosť. Pozorovali sme nadužívanie v rozmedzí 26–98 %. Podobne aj nedostatočné či nesprávne využívanie indikácií nemôže dosiahnuť očakávaný efekt týchto vyšetrení.

Znamená to, že iba správny test pre správneho pacienta v správnom čase, je správne urobený a správne využitý. Predpokladom je profesionalita včítane etiky, kvalitný – stabilný zdravotný systém, disciplína, a financie.

Stratégiou pre riešenie nastolenej otázky je inovácia, konsolidácia, harmonizácia a optimalizácia so spätnou väzbou na všetkých úrovniach zdravotnej starostlivosti. Navyše, v laboratórnej medicíne v súčasnom období sú problémy so štandardizáciou laboratórnych metód, terminológiou a zjednotením merných jednotiek – SI systému, ktorý sa stále nevyužíva celosvetovo. Nedostatky sú vo výchove laboratórnych pracovníkov, chýbajú erudovaní lekári – klinickí biochemici. Výskum a vývoj nie je zabezpečený inštitucionálne. V dennej praxi chýba systematické pátranie po chybách, predovšetkým v predanalytickej a postanalytickej fáze. Nádej sa vkladá do indikátorov kvality (QIs) a tiež do laboratórnej medicíny založenej na dôkazoch – evidence-based laboratory medicine (EBLM), ktoré nemôžu vzniknúť bez spolupráce všetkých pracovníkov v laboratórnej medicíne s klinickými užívateľmi. Náklady zdravotníctva je možné znížiť iba až keď bude v praxi reálna medicína založená na dôkazoch (EBM), ktorá zabezpečí

zvýšenie účinnosti klinickej medicíny. Toto nie je možné bez zlepšenia validity-plnoodhodnotnosti, účinnosti a užitočnosti laboratórnej medicíny – založenej na komplexných dôkazoch (EBLM).

Realizovanie EBM musí byť sprevádzané správnu klinickou a laboratórnou praxou, ktorej cieľom nie je administratívna certifikácia laboratórií, ale potreba zmeny v prístupe k využívaniu výsledkov na úrovni každej profesie v zdravotníctve, neustála výchova pri prepojení všetkých spolupracovníkov, disciplína a „spätná väzba“ v prospech pacienta (Obr. 7).

Indikátory kvality (QIs) – by mali objektívne obsahovať získané hodnoty všetkých súčastí zdravotnej starostlivosti: bezpečnosť pacienta, účinnosť, zameranie sa na konkrétneho pacienta, časovanie, a splnenie právnych požiadaviek. Je to základ pre využívanie EBM v praxi.

Brzdami kompatibility zo strany zdravotnej starostlivosti, laboratórnej medicíny a problémov EBM a EBLM sú:

### Brzdou v zdravotnej starostlivosti (ZS) sú:

- nevyvážený medicínsky a ekonomický pohľad na zdravotníctvo,
- problémy v inováciách v ZS bez analýz účinnosti a definovania zodpovednosti za ne,
- nedostatočná komunikácia medzi účastníkmi ZS,
- nedostatky vo vzdelávaní,
- nedostatočné finančné zdroje.

### Brzdou v laboratórnej medicíne sú:

- komerčné záujmy pri výrobe technológií a diagnostík,



- nezodpovedný prístup zavádzania nových technológií a vyšetrovacích metód do praxe,
- chýbanie „spätnej väzby“ pri získavaní poznatkov o medicínskej užitočnosti a účinnosti vyšetrení, ako aj o systematickom pátraní po chybách.

#### Problémy EBLM a EBM:

- nedostatočné využívanie indikátorov kvality,
- zlyhávanie v individuálnej medicíne,
- nedostatočná konziliárna činnosť.

Namiesto záveru si dovoľím odcitovať dve myšlienky Alberta Einsteina platné i pre laboratórnu medicínu. Sú vhodné na zamyslenie sa a uvedenie do praxe, pre zmenu kultúry celého zdravotníctva.

*„Nie všetko, čo je dôležité, sa dá merať a nie všetko merateľné je dôležité“.*

a

*„Informácia nie je vedomosť“.*

#### Podakovanie

*Ďakujem za technickú pomoc pri príprave prezentácie laureátskej prednášky na XI.kongrese SSKB v Martine primárke Oddelenia klinickej biochémie Národného onkologického ústavu v Bratislave MUDr. Alene Svobodovej a iniciátorovi tejto publikácie MUDr. Danielovi Magulovi, CSc., bez pomoci ktorého by sa publikácia nemohla realizovať.*

#### Literatúra – u autorok



#### O autorke

**Doc. MUDr. Eva Valovičová, CSc.** (nar. 2. 9. 1937 v Leopoldove) je významnou predstaviteľkou slovenskej medicíny, ktorá po generácii zakladateľov odboru klinickej biochémie na Slovensku, najmä akademikovi prof. MUDr. T. R. Niederlandovi, DrSc., primárovi MUDr. Z. Cícvárkovi a ďalších, pokračovala v budovaní odboru klinickej biochémie na Slovensku, a tak výrazne prispela k jeho ďalšiemu rozvoju.

Po absolvovaní Lekárskej fakulty UK v Bratislave nastúpila v roku 1961 na miesto odbornej asistentky Katedry Lekárskej biochémie LF UK, v roku 1968 obhájila kandidátsku dizertačnú prácu na tému „Asparagináza pri experimentálnej alergickej encefalitíde“. Po atestácii I. stupňa z vnútorného lekárstva absolvovala v roku 1973 aj atestáciu z novovzniknutého odboru klinická biochémia. Habilitačnú prácu obhájila v roku 1983. Externú pedagogickú činnosť v odbore klinická biochémia vykonávala na Ústave pre doškoľovanie stredných zdravotníckych pracovníkov, na Inštitúte doškoľovania lekárov a farmaceutov (neskôr Slovenskej postgraduálnej akadémii medicíny, resp. t. č. Slovenskej zdravotníckej univerzite) v Bratislave, ale i na Katedre biochémie Prírodovedeckej fakulty UK, kde sa v súčinnosti s KB KU v Prahe podarilo zabezpečiť pregraduálnu aj postgraduálnu výučbu v predmete aplikovaná biochémia-klinická biochémia.

V rokoch 1973–1990 pôsobila vo funkcii primárky Oddelenia klinickej biochémie a hematológie Štátneho ústavu národného

zdravia, po jeho transformácii na Národný onkologický ústav tamže až do roku 2003.

Významná je jej vedecko-výskumná činnosť, publikovala viac ako 100 prác (z toho 28 v zahraničných časopisoch); z oblasti klinickej biochémie realizovala výskumné úlohy hlavne v oblasti metabolických porúch, porúch vnútorného prostredia v onkológii, ale aj v nefrológii a výžive.

V rokoch 1970–1980 bola členkou výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie, v rokoch 1980–1990 predsedníčkou tejto spoločnosti, a 2 funkčné obdobia striedavo aj predsedníčkou Federálneho výboru oboch spoločností klinickej biochémie Československej lekárskej spoločnosti J. E. Purkyně.

Bola členkou Predsedníctva Slovenskej lekárskej spoločnosti, členkou Poradného zboru Hlavného odborníka pre klinickú biochémiiu pri MZ SSR, predsedníčkou Hlavnej problémovej komisie-28 – Klinická biochémia, OP LaFV Vedeckej rady MZ SSR.

Bola členkou redakčnej rady časopisov Biochemia Clinica Bohemoslovaca a Laboratórna diagnostika. Je nositeľkou Zlatej medaily „Propter merita“ SLS, Čestného členstva SSKB a SSLM.

V roku 2014 bola Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie ocenená Cenou profesora Ivana Pecháňa počas XI. Kongresu SSKB v Martine, kde vyššie publikovaná práca odznela vo forme laureátskej prednášky.

*Redakcia*



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 27–38

## EURÓPSKY ŠPECIALISTA V LABORATÓRNEJ MEDICÍNE EUROPEAN SPECIALIST IN LABORATORY MEDICINE

**Balla Ján**

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie  
Národný reprezentant

e-mail: jan.balla.sr@gmail.com  
*prehľadová práca*

### SÚHRN

Dlhoročné úsilie o prekonanie heterogenity vzdelávania v klinickej (bio)chémii v Európe viedlo v uplynulých troch desaťročiach k vytvoreniu platformy o uznávaní odborných kvalifikácií v profesii klinická biochémia a laboratórna medicína. Smernica 2013/55/EÚ o uznávaní odborných kvalifikácií umožňuje členským štátom rozhodnúť o spoločnom súbore minimálnych vedomostí, zručností a kompetencií, ktoré sú potrebné na výkon danej profesie prostredníctvom spoločného rámca odbornej prípravy. Kľúčovým dokumentom EFLM, schváleným všetkými odbornými spoločnosťami v Európe, ktorý predstavuje základ pre spoločný rámec odbornej prípravy v laboratórnej medicíne podľa tejto smernice je Syllabus pre postgraduálne vzdelávanie. Syllabus predstavuje základ pre Európsky register špecialistov v laboratórnej medicíne, deklaruje úroveň požiadaviek postgraduálnej prípravy na harmonizáciu postgraduálneho vzdelávania v Európskej únii a špecifikuje obsah národných vzdelávacích programov na získanie primeraných vedomostí a skúseností.

**Kľúčové slová:** EFLM, Akadémia, Normy rovnocennosti, Register, Syllabus

### ABSTRACT

Over the past three decades efforts to overcome the heterogeneity of education in clinical chemistry and laboratory medicine in Europe resulted in a common platform for the recognition of professional qualifications. Directive 2013/55/EU on the recognition of professional qualifications allows the Member States to decide on a common set of the minimum knowledge, skills, and competencies necessary for the exercise of the profession through a common training framework. The key document of the EFLM, approved by all National Societies which forms the basis for a common training framework in laboratory medicine is the EFLM Syllabus. The Syllabus forms the basis for the European Register of Specialists in Laboratory Medicine, declares the level of training requirements and the harmonization of postgraduate education in Europe, and specifies the content of national training programs to gain appropriate knowledge and experience

**Key words:** EFLM, Academy, Equivalence of Standards, Register, Syllabus

## Legenda

Smernica Európskej únie 2013/55/EÚ o uznávaní odborných kvalifikácií; Konfederácia Európskych spoločností klinickej chémie (EC4); Fórum európskych spoločností klinickej chémie (FESCC); Európska federácia pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (EFLM); Medzinárodná federácia pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (IFCC); Holandská spoločnosť pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (NKVC);

## Legend

Directive 2013/55/EU of The European Parliament and of The Council on the recognition of professional qualifications; European Communities Confederation of Clinical Chemistry (EC4); Forum of European Societies of Clinical Chemistry (FESCC); European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM); International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC); Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde (NKVC);

*If I am not both a chemist and a physician, then I am nothing; but the difficulty of my existence is in that combination*  
J. W. L. Thudichum, 1869

## ÚVOD

V sedemdesiatych rokoch minulého storočia sa mnohí klinickí (bio)chemici v Európe začali zaujímať o porovnateľnosť našej profesie v jednotlivých krajinách. Okolo roku 1977–1978 sa na európskom fóre klinickej chémie konalo neformálne stretnutie, ktorému predsedal Ad Jansen z Holandska. Jeho cieľom bolo formulovať víziu o praxi klinickej chémie v rôznych krajinách, o odbornom postgraduálnom vzdelávaní, systéme zabezpečenia kvality a iných otázkach do spoločného dokumentu pre profesiu klinickej chémie a zosúladiť ho s tými, ktoré už boli napísané pre iné povolania (Büttner, 1991; History of EFLM, 2017). Nádejali sa, že Európska komisia v Bruseli vydá pre klinickú chémiu konkrétnu smernicu. Ich úsilie však nebolo úspešné a na dlhšiu dobu bolo zmrazené. Definovať porovnateľné kompetencie a presadiť ich v orgánoch s rozhodovacou právomocou sa im v tom čase nepodarilo. Slobodu pohybu v Európskej únii mal len obmedzený počet povolání, ktorý bol v období 1975–1985 regulovaný tzv. sektorovými

smernicami (Directives 77/452/EEC, 77/453/EEC, 78/686/EEC, 78/687/EEC, 78/1026/EEC, 78/1027/EEC, 80/154/EEC, 80/155/EEC, 85/384/EEC, 85/432/EEC, 85/433/EEC, 93/16/EEC), ktoré obsahovali minimálne štandardy vzdelávania, školenia a praxe. Všetky ostatné povolania vrátane klinickej chémie spadali pod tzv. všeobecnú smernicu (Council Directive 89/48/EEC, 1988). Klinickí chemici v EÚ si želali, aby ich špecializácia bola regulovaná špecifickejšie. To znamenalo, že by musela mať zaručené spoločné normy (štandardy) vzdelávania, odbornej prípravy, školenia a neustáleho odborného rozvoja. Tieto snahy boli posilnené po oficiálnom založení Konfederácie klinickej chémie Európskych spoločností, EC4 (Sanders, Kelly, Breuer, 1995; Sanders, Kelly, Breuer et al., 1997; Blaton, 2004).

## EC4

**Konfederácia Európskych spoločností klinickej chémie** (European Communities Confederation of Clinical Chemistry) bola organizáciou spájajúcou všetky národné spoločnosti a/ alebo asociácie klinickej chémie členských štátov Európskej únie. René Dybkaer, jeden z najdlhšie slúžiacich prezidentov IFCC a muž s víziou a veľkým intelektom, pre ňu použil skratku ECLM (Dybkaer, 1997). Pre Konfederáciu Európskych spoločností klinickej chémie, ktorú Medzinárodná federácia klinickej chémie (IFCC) považovala a uznávala za svoju regionálnu organizáciu v Európe, sa však viac zaužívala skratka **EC4** (Sanders, Kelly, Breuer et al., 1995; Sanders, Kelly, Breuer et al., 1997; Sanders, Jansen, Beastall et al., 1999). Aj keď korene neformálnych aktivít a kontaktov EC4 siahajú až do roku 1973, jej stanovky boli formálne prijaté až po 20 rokoch 27. apríla 1993 na 10. Európskom kongrese klinickej chémie v Nice (Francúzsko). EC4 sa zasladovala o:

- spoluprácu a rozvoj klinickej chémie ako základnej vednej disciplíny v rámci Európskych spoločností;
- harmonizáciu podmienok odbornej prípravy klinických (bio)chemikov;
- reguláciu profesie na európskej úrovni na základe princípov voľného pohybu odborníkov v rámci EÚ;
- podporu a uľahčenie ďalšieho odborného vzdelávania;
- harmonizáciu podmienok pri certifikácii a akreditácii laboratórií;
- požiadavky na kvalifikáciu vedúceho laboratória klinickej chémie;

- organizáciu klinického laboratória (ISO 9000/EN-45001);
- systémy externého hodnotenia kvality;
- konzultácie a spoluprácu s klinickými lekármi a efektívne (racionálne) využívanie laboratórnych testov a služieb;
- profesionálne zapojenie do mnohých orgánov EÚ, ktoré sa zaoberali aspektmi klinickej chémie, napr. Technical committee for *In vitro* diagnostic systems (TC 140); European Committee for Standardisation (CEN).

EC4 vypracovala učebné osnovy, identifikovala požadované doby školenia, zaviedla **Európsky register klinických chemikov** a zostavila príručku k tomuto registru (Sanders, Kelly, Breuer et al., 1997; Jansen, 2002; Pazzagli, McMurray, Zerah, 2008). Dokument popisoval podmienky pre špecializačnú prípravu, minimálne štandardy pre registráciu (vysokoškolské vzdelanie a postgraduálne odborné vzdelávanie v trvaní minimálne osem rokov), kompetencie osôb spĺňajúcich požiadavky na registráciu a fungovanie registra. Registrácia mala zaručovať odborné a manažérske kompetencie v odbore klinická chémie (McMurray, 2010).

**Komisia Register EC4 Commission** (EC4RC) viedla, udržiavala a kontrolovala Európsky register a udeľovala titul, ktorý sa nazýval **Európsky klinický chemik**, EurClinChem (Gurr, Koller, Blaton et al., 2003). EC4 uznávala aj národné registre, pokiaľ boli založené na jej minimálnych štandardoch. Národné registre viedli pracovné skupiny (komisie, výbory) národných spoločností pre registráciu v klinickej chémii (NCCRC). NCCRC kontrolovali kvalitu vzdelávania vo svojich krajinách a hodnotili kandidátov na titul EurClinChem. Jednotlivec (občan EÚ alebo občan mimo EÚ ale vyškolený v krajine EÚ) mohol požiadať o európsky register EC4RC individuálne. K svojej žiadosti mohol priložiť dokument NCCRC z krajiny svojej registrácie, ktorý potvrdzoval, že žiadateľ má potrebnú kvalifikáciu. Pre občanov EÚ vyškolených mimo EÚ bolo potrebné rozhodnutie EC4RC. Občania zo štátov mimo EÚ, ktorí neboli vyškolení v krajine EÚ, nemali nárok na registráciu. Registrácia sa obnovovala raz za päť rokov. Prvé certifikáty Európsky klinický chemik boli udelené v Helsinkách v r. 1998 a v nasledujúcom roku ich bolo udelených už vyše 50 (Sanders, Jansen, Beastall et al., 1999).

## FESCC

Európske zjednocovanie klinických chemikov malo viacero cieľov. Zatiaľ čo odborníci v klinických laboratóriách v krajinách Európskeho hospodárskeho spoločenstva (EHS) považovali za dôležité riešiť jednoduchosť pohybu klinických chemikov medzi členskými krajinami EHS, paralelne rástlo aj úsilie o vytvorenie Fóra európskych spoločností klinickej chémie (FESCC), ktoré by odrážalo túžbu reprezentovať geografický kontinent Európy. V roku 1987 na Svetovom kongrese IFCC v Haagu zvolal Gerard Sanders, vtedajší prezident Holandskej spoločnosti pre klinickú chémiu (NVKC), stretnutie prezidentov európskych spoločností klinickej (bio)chémie, na ktorom inicioval potrebu založenia európskej regionálnej organizácie a programu odborného vzdelávania v klinickej (bio)chémii. Tieto aktivity vyústili v roku 1990, kedy vzniklo **Fórum európskych spoločností klinickej chémie** (FESCC) na čele s prof. Hermannom Wisserom (Nemecko) ako prvým prezidentom FESCC. Neskôr, za prezidentovania prof. Gerarda Siesta (Francúzsko) na čele Medzinárodnej federácie pre klinickú chémiu (IFCC), bolo FESCC uznané za európsku regionálnu organizáciu pre klinickú chémiu. FESCC zamerával svoje úsilie na vzdelávanie a bol obzvlášť aktívny na Balkáne (ktorý je v tejto iniciatíve aktívny dodnes, poznámka autora).

## EFLM

S rozširovaním EÚ sa zvyšovala aj zhoda cieľov medzi FESCC a EC4. Bolo jasné, že na presadzovanie záujmov klinických (bio)chemikov v Európe postačí jedna organizácia. Začiatkom 21. storočia odznievali na diskusiách európskych kongresov a konferencií otázky typu *why so many euro institutions?* (poznámka autora). Prezidenti FESCC a EC4 preto začali spolupracovať na vytvorení jednotnej európskej federácie, ktorú prezentovali na európskom kongrese EuroMedLab v roku 2007 v Amsterdame [https://www.eflm.eu/upload/docs/EFLM\\_History-last\\_rev2017-05.pdf](https://www.eflm.eu/upload/docs/EFLM_History-last_rev2017-05.pdf). Zlúčením dvoch predchodcových organizácií, Federácie európskych spoločností klinickej chémie (FESCC) a Konfederácie Európskych spoločenstiev klinickej chémie (EC4) vznikla nástupnícka organizácia Európska federácia klinickej chémie (EFCC), ktorá sa neskôr pri registrácii ako nezisková organizácia premenovala na **Európsku federáciu klinickej chémie a laboratórnej medicíny (EFLM)** (History of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM), 2017; Procedure manual of EFLM, 2021). Podľa belgického právneho poriadku bola

Európska federácia klinickej chémie a laboratórnej medicíny (EFLM) 29. 1. 2013 registrovaná notárskou listinou ako právnická osoba so sídlom v Bruseli. Zakladajúcimi členmi EFLM sú krajiny, ktoré na jej výzvu predložili svoje identifikačné doklady (zakladateľské listiny): Albánsko, Belgicko, Bulharsko, Cyprus, Česká republika, Francúzsko, Grécko, Holandsko, Chorvátsko, Írsko, Island, Litva, Maďarsko, Nemecko, Nórsko, Poľsko, Rakúsko, Rusko, Slovinsko, Veľká Británia (UK), Srbsko, Švajčiarsko, Švédsko, Taliansko a Ukrajina. Keďže Slovenská lekárska spoločnosť na výzvu EFLM nereagovala, Slovenská spoločnosť klinickej biochémie na listine zakladajúcich členov EFLM nefiguruje (EFLM bylaws, Set up of non-profit association EFLM, 4309/2013, Proposal of changes to the bylaws, 2016).

Aj keď Register EC4 aj po fúzii s EFLM pokračoval vo svojej činnosti naďalej ako autonómny subjekt, nakoniec predsa len došlo k úplnému zlúčeniu. Po fúzii EFLM a EC4 Register došlo k reorganizácii všetkých činností v EFLM. Okrem iných, bola vytvorená komisia a pracovná skupina EFLM, ktorá svojou činnosťou nadväzuje na pôvodný projekt EC4 Register. Neskorší vývoj v Európe ukázal, že táto fúzia sa osvedčila.

## EFLM v súčasnosti

EFLM sa v Európe stala lídrom klinickej chémie a laboratórnej medicíny pre národné spoločnosti, diagnostický priemysel a mimovládne organizácie. Jej cieľom je slúžiť verejnému záujmu v oblasti zdravotnej starostlivosti. Spája národné spoločnosti klinickej (bio)chémie a laboratórnej medicíny a vytvára platformu pre všetkých európskych „špecialistov v laboratórnej medicíne“ (Zerah, McMur-ray, Horvath, 2012).

Poslaním EFLM je:

- zlepšovať starostlivosť o pacienta,
- podporovať vedecké, odborné a klinické aspekty klinickej chémie a laboratórnej medicíny,
- zvýšiť úroveň kvality výsledkov,
- zabezpečiť efektívne zastúpenie laboratórnej medicíny tak na úrovni Európskej únie, ako aj pred ostatnými celoeurópskymi a subregionálnymi orgánmi.

Najvyšším riadiacim orgánom EFLM je Valné zhromaždenie (General Meeting, GM), ktoré tvoria nominovaní zástupcovia každej členskej spoločnosti (Národní reprezentanti). VZ sa podľa stanov schádza najmenej raz za dva roky. Medzi jeho rozhodovacie právomoci patrí:

- prijatie alebo vylúčenie členských spoločností (aso-

ciácií) z radov riadnych, dočasných alebo pridružených členov,

- voľba Výkonnej rady, schválenie účtov a rozpočtov,
- zmena stanov EFLM,
- schválenie navrhovaných politík Výkonnej rady.

Riadnymi členmi EFLM v súčasnosti sú národné spoločnosti týchto 40 krajín: Albánsko, Rakúsko, Belgicko, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Chorvátsko, Cyprus, Česká republika, Dánsko, Estónsko, Fínsko, Francúzsko, Nemecko, Grécko, Maďarsko, Island, Írsko, Izrael, Taliansko, Kosovo, Lotyšsko, Litva, Luxembursko, Macedónsko, Čierna Hora, Holandsko, Nórsko, Poľsko, Portugalsko, Rumunsko, Rusko, Srbsko, Slovensko, Slovinsko, Španielsko, Švédsko, Švajčiarsko, Turecko, Ukrajina a Spojené kráľovstvo. EFLM má tiež 1 pridruženého člena: AEFA (Španielsko) a 1 dočasný člen: SSLM (Slovensko).

Operačnú štruktúru EFLM tvorí Výkonná rada (EB) a päť výborov/komisií (C), ktoré vykonávajú svoje úlohy prostredníctvom pracovných skupín (WG) a cieľových skupín (TFG) a pracovných skupín ad hoc (TG). Funkcionári EB (prezident, bývalý prezident, zvolený prezident, tajomník, pokladník a dvaja členovia) sú volení valným zhromaždením na obdobie 2 rokov. V súčasnej výkonnej rade EFLM (EB) sú zastúpené tieto krajiny: Turecko, Chorvátsko, Taliansko, Srbsko, Nemecko, Španielsko a Litva. Členstvo v komisiách a pracovných skupinách je na základe výziev otvorené pre nominácie národným spoločnostiam EFLM. Hlavné aktivity EFLM sa týkajú vzdelávania, výskumu, rozvoja profesie, požiadaviek na kompetenciu, kvalitu a akreditáciu laboratórií, organizáciu kongresov a publikačnú činnosť. EFLM má päť výborov: Veda (C-S), Kvalita a usmernenia (C-QR), Profesia (C-P), Vzdelávanie a odborná príprava (C-ET), Komunikácia (C-C).

## 1. Výkonná rada (Executive Board)

Výkonnú radu EFLM tvoria siedmi členovia: výkonná prezidentka (2022–2023) prof. Tomris Ozbenová (Turecko); predchádzajúca prezidentka (2020–2021) prof. Ana-Maria Šimundičová (Chorvátsko); novozvolený prezident (2024–2025) prof. Mario Plebani (Taliansko); tajomníčka (vedecká sekretárka) Dr. Snežana Jovičičová (2020–2021, 2022–2023); pokladník (2020–2021, 2022–2023) prof. Klaus P. Kohse (Nemecko) a dvaja členovia bez portfólia (Member at Large) (2020–2021, 2022–2023) Dr. Pilar Fernandez-Calle (Španielsko) a doc. Dalius Vitkus (Litva) (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1049>). Funkčné obdo-

bie členov EB je dva roky. Prezident po svojom zvolení nastupuje do EB na post President Elect (novozvolený prezident), kde zastáva funkciu viceprezidenta, po 2 rokoch sa z neho stáva výkonný prezident a po skončení mandátu výkonného prezidenta zostáva členom EB na poste bývalého prezidenta (Past President). Ostatní členovia výkonnej rady môžu byť po uplynutí dvojročného funkčného obdobia zvolení ešte raz na ďalšie dvojročné funkčné obdobie. Nikto však nemôže vykonávať jednu alebo viacero funkcií člena rady trikrát. Podľa stanov IFCC sa výkonný prezident EFLM stáva po odsúhlasení národnými spoločnosťami počas svojho dvojročného funkčného obdobia členom Výkonnej rady IFCC na poste zástupcu regionálnej organizácie (v súčasnej dobe je to prof. Tomris Ozbenová).

Organizačnú štruktúru EFLM dopĺňa v súčasnosti 14 pracovných skupín (Working group, WG), 3 operačné (zvlášťne) pracovné skupiny pre naliehavé úlohy (Task Force, TF) a 7 ad-hoc pracovných skupín pre aktuálne úlohy (Task Group, TG a Finish Group, T&FG).

- **Výbory/ komisie (Committees)**

- Komisia pre komunikáciu (Communication Committee)**

Predseda: Dr. Daniel Rajdl

(Česká republika, 2021–2023)

Komunikačný výbor je zodpovedný za komunikačné pravidlá, vývoj, aktualizáciu a monitorovanie účtov na sociálnych sieťach a elektronických médiách vrátane webu. Komunikačný výbor má pracovnú skupinu pre propagáciu a publikácie (Promotion & Publication) a dve ad-hoc pracovné skupiny (*Task Group*) TG pre Európsky laboratórny deň a TG mladých vedcov (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1116>).

- **Komisia pre vzdelávanie a odbornú prípravu (Education and Training Committee)**

Predsedička: prof. Daria Pašalićová

(Chorvátsko, 2020–2022)

Výbor pre vzdelávanie a odbornú prípravu je zodpovedný za koordináciu činností svojich pracovných skupín a zabezpečuje komunikáciu medzi pracovnými skupinami, EB a predsedami výborov. Má tri pracovné skupiny: Kongresy a postgraduálne vzdelávanie (*Congresses and Postgraduate Education*), Dištančné vzdelávanie a e-learning (Distance Education and e-Learning) a Kredity v laboratórnej medicíne (*Laboratory Medicine Credit Points*). Na všetky je v súčasnosti vypísaná výzva na obsadenie jed-

ného miesta riadneho člena na funkčné obdobie 2022–2023 (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1123>).

## 2. Profesijná komisia (*Profession Committee*)

Predsedička: prof. Evgenija Homšaková

(Slovinsko, 2020–2021)

Táto komisia zastupuje stavovské záujmy odborníkov v laboratórnej medicíne v celej Európe a usiluje sa dosiahnuť uznávanie odbornej kvalifikácie podľa legislatívy Európskej únie založenej na princípoch voľného pohybu odborníkov v rámci Európy. Výbor pre profesiu riadi pracovnú skupinu pre Register európskych špecialistov v laboratórnej medicíne a ad-hoc pracovnú skupinu pre otázky kurzu EFLM učebných osnov (*EFLM Syllabus Course*) (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1124>).

## 3. Komisia pre kvalitu a reguláciu (*Quality and Regulations Committee*)

Predseda: prof. Florent Vanstapel

(Belgicko, 2021–2023)

Výbor sa zaoberá harmonizáciou postupov v oblasti riadenia kvality, akreditácie medicínskych laboratórií, stykom s ISO, CEN a európskou spoluprácou v oblasti akreditácie. Zastupuje EFLM v európskych a medzinárodných regulačných a legislatívnych orgánoch. Má pracovnú skupinu pre akreditáciu a normy ISO/ CEN (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1125>).

## 4. Komisia pre vedu (*Science Committee*)

Predseda: prof. Michel Langlois

(Belgicko, 2022–2023)

Výbor pre vedu je zodpovedný za vedecké projekty v rámci EFLM (okrem tých, ktoré sa špecificky týkajú riadenia kvality). Činnosť výboru by sa mala zamerať najmä na podporu výskumu, ktorý prenáša vedecké výsledky klinickej chémie a laboratórnej medicíny do klinických aplikácií a zlepšuje starostlivosť o pacientov prostredníctvom vhodného využívania a interpretácie laboratórnych údajov v klinickej praxi. Do tejto komisie je začlenených 8 pracovných skupín: Skúšky autoimunity (*Autoimmunity Testing*); Biologická variácia (*Biological Variation*) s dvoma ad-hoc úlohami TG Databáza biologickej variácie a TFG Praktický prístup k neistote merania; Srdcové markery (*Cardiac Markers*); Harmonizácia (*Harmonisation*); Laboratórna medicína zameraná na pacienta (*Patient Focused Laboratory Medicine*); Predanalytická fáza (*Preanalytical*

Phase) s úlohou TFG Interferencie hemolýzy, ikteru a lipémie; Postanalytická fáza (*Postanalytical Phase*); Vyhodnocovanie testov (*Test Evaluation*) s ad hoc úlohou pre Výkonové špecifikácie a samostatnú TFG pre Močovú analýzu (<https://www.eflm.eu/site/page/a/1126>).

Členstvo v komisiách (C-), pracovných skupinách (WG-) a tematických úlohách (TF, TG a TFG) sa realizuje na základe výziev, ktoré sú otvorené pre nominácie kandidátov zo strany všetkých národných spoločností. Výber členov do komisií a pracovných skupín z nominovaných kandidátov sa uskutočňuje na základe vyhlásených podmienok. Nominovaní kandidáti musia preukázať dostatočnú profesionálnu a/alebo akademickú kariéru (vrátane publikačnej činnosti) najmä v oblasti zdôrazňujúcej otázky, ktoré sú rozhodujúce pre daný výber. Neúspešní nominanti sa môžu stať tzv. korešpondenčnými členmi komisie alebo pracovnej skupiny.

Oficiálnym vedeckým časopisom EFLM je **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, ktorý má vysoký impact faktor v rozmedzí 3–5. Sekretariát (kancelária) EFLM sa nachádza v Miláne (Taliansko).

### EFLMLabX

EFLMLabx je nová webová služba pre odborníkov v oblasti laboratórnej medicíny na vyhľadávanie a ponuku praktických školení a výmeny praxe v oblasti laboratórnej medicíny medzi krajinami EFLM (<https://efmlabx.eflm.eu/en/page/about>).

Má dva edukačné ciele:

1. vytvoriť európsku sieť klinických laboratórií ochotných a schopných ponúkať praktické a špecifické školenia v rôznych oblastiach laboratórnej medicíny;
2. ponúknuť praktický nástroj, ktorý umožní európskym špecialistom v laboratórnej medicíne vyhľadať a uchádzať sa o špecifické školenia v špičkovom európskom laboratóriu.

EFLMLabx je určená všetkým špecialistom v laboratórnej medicíne z krajín EFLM. Rovnako tým, ktorí sa chcú zdokonaľovať a získať vyššie vzdelanie, ako aj tým, ktorí chcú ponúknuť nové poznatky, vedomosti a zručnosti pri využití nových produktov a systémov IVD, ktoré sa nachádzajú v ich laboratóriách. Na školenie sa môžu prihlásiť štážiisti, mladí špecialisti a odborníci v laboratórnej medicíne z ktorejkoľvek krajiny EFLM. Širokému publiku by mali hostovanie ponúkať národné inštitúcie a klinické laboratóriá, ktoré sú známe svojou excelentnosťou v laboratórnej medicíne.

### TF Green Labs

Koncom roka 2021 založila EFLM v súlade s investičným plánom European Green Deal (EGD), známym aj ako Investičný plán udržateľnej Európy, novú pracovnú skupinu **EFLM TASK FORCE-GREEN LABS**. Cieľom EGD je do roku 2050 urobiť z Európy prvý klimaticky neutrálny kontinent na svete a EFLM sa podujala viesť komunitu laboratórnej medicíny smerom k uhlíkovej neutralite.

Zelená chémia nie je subdisciplínou chémie, ale je to zastrešujúci prístup, ktorý zahŕňa nielen všetky odbohy chémie, ale prakticky všetky odbory vedy, obchodu a umenia. Zelená chémia predstavuje chemické procesy a produkty, ktoré znižujú alebo eliminujú používanie alebo tvorbu nebezpečných látok. Mnohé materiály vo vede majú nebezpečné vlastnosti, degradujú sa alebo pretrvávajú v životnom prostredí. Aj energia je vo vede často prehliadaná ako odpadový produkt, ale mnohé reakcie a procesy je potrebné zahrievať alebo chladiť alebo vykonávať pri tlakoch nad alebo pod okolitým prostredím.

Cieľom zelenej chémie je obmedziť vplyv laboratórií na životné prostredie a znížením ich škodlivého vplyvu premeniť ich na bezpečné a udržateľné priestory. Klinické laboratóriá spotrebujú 10-krát viac energie a štyrikrát viac vody ako kancelárie a ročne vyprodukujú milióny ton odpadu, pričom takmer všetok sa považuje za nebezpečný. Prostredníctvom jednoduchých a ľahkých zmien môže personál laboratória dosiahnuť zníženie v každej z týchto štyroch kľúčových oblastí (energie, vody, odpadu a nebezpečných chemikálií) výsledkom čoho bude bezpečné a udržateľné laboratórium bez ohrozenia kvality zdravotnej starostlivosti. (*Zdá sa, že nie odbornosť ale nakoniec až Green Deal zbaví klinické laboratóriá takých metód, akou je napr. Jaffého metóda a jej podobné. Poznámka autora*).

### Akadémia EFLM

EFLM, ktorá od svojho založenia pokračovala v šľapajach svojich predchodcov, predstavuje v Európe viac ako 22 000 odborníkov v laboratórnej medicíne. Jednou z kľúčových aktivít EFLM za posledných 14 rokov bolo rozšírenie registra špecialistov a dosiahnutie ich uznania na medzinárodnom poli. S cieľom plniť túto úlohu a zvyšovať počet členov Registra európskych špecialistov v laboratórnej medicíne založila EFLM v r. 2020 inštitúciu **Akadémia EFLM** (THE EFLM ACADEMY Brochure, 2021). Po spustení Akadémie v januári 2020 došlo k výraznému nárastu

počtu členov registra, do Akadémie sa vtedy pripojilo viac 5000 členov (Simundic, 2021).

Akadémia EFLM je jedinečný, exkluzívny online zdroj a komunikačná platforma, prostredníctvom ktorej sa EFLM zameriava na podporu vzdelávania, školenia a nepretržitého profesionálneho rozvoja nielen špecialistov v laboratórnej medicíne, ale aj všetkých ostatných, ktorí sa zaujímajú o laboratórnu medicínu. Cieľom Akadémie EFLM je:

- Podporovať a zlepšovať vedu a vzdelávanie v oblasti klinickej chémie a laboratórnej medicíny.
- Zlepšiť efektívnosť, kvalitu a bezpečnosť starostlivosti o pacienta prostredníctvom najvyšších štandardov laboratórnej medicíny.
- Reprezentovať klinickú chémiu a laboratórnu medicínu na európskej úrovni vo vzťahu k politickým, odborným, vedeckým a iným orgánom vrátane patientskych organizácií.
- Zastupovať profesionálne záujmy európskych špecialistov v klinickej chémii a laboratórnej medicíne.
- Podporovať profesiu špecialistu v klinickej chémii a laboratórnej medicíne.
- Podporovať certifikáciu a registráciu odborníkov z oblasti klinickej chémie a laboratórnej medicíny prostredníctvom Registra európskych špecialistov v klinickej chémii a laboratórnej medicíne EFLM.

EFLM Akadémia poskytuje svojim členom tri základné benefity:

### **1. Bezplatný prístup k vedeckým, odborným a normalizačným zdrojom**

Množstvo vzdelávacích webinárov, ktoré pokrývajú aktuálne témy a problémy v oblasti laboratórnej medicíny a klinickej chémie. Rečníci webinára sú významnými odborníkmi vo svojom odbore z celého sveta. Živé a nahrané webináre sú dostupné prostredníctvom e-learningu EFLM <https://elearning.eflm.eu>.

Mnohí členovia Akadémie ocenia najmä plný a bezplatný prístup k publikáciám v najvýznamnejších svetových časopisoch: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, Critical Reviews in Clinical Laboratory, Clinical Biochemistry, Clinical Chemistry, The Journal of Applied Laboratory Medicine.

### **2. Príležitosti uchádzať sa o rôzne granty EFLM**

Znížené poplatky za všetky kongresy a konferencie

(s výnimkou EuroMedLab) a na postgraduálne kurzy organizované EFLM. Členovia Akadémie EFLM z krajín EFLM majú možnosť požiadať o rôzne cestovné granty EFLM pokrývajúce cestovné náklady na nasledujúce podujatia EFLM: Konferencia EFLM o predanalytickej fáze, Strategická konferencia EFLM, praktické školenie a výmenná prax na významných pracoviskách laboratórnej medicíny medzi krajinami EFLM v rámci programu EFLMLabX. Viac podrobností dostupných na <https://eflmlabx.eflm.eu/en>. Členovia Akadémie z krajín EFLM môžu požiadať aj o štipendium na úhradu nákladov na pobyt realizovaný prostredníctvom programu EFLMLabX

### **3. Akademické ocenenia**

Členovia Akadémie z krajín EFLM majú možnosť uchádzať sa o Cenu Akadémie EFLM (EFLM Academy Award). Cena EFLM Academy bola vytvorená s cieľom podporiť excelentnosť a oceniť výnimočných jednotlivcov, ktorí významne prispeli k vzdelávaniu v oblasti laboratórnej medicíny v Európe. Cieľom ocenenia je podporiť vzdelávacie aktivity a uznať hodnotu a dôležitosť vzdelávania pre EFLM <https://www.eflm.eu/site/upload/docs/EFLM-Academy-Award.pdf>.

Cena sa udeľuje každoročne autorovi najvýznamnejšej vzdelávacej aktivity alebo projektu za posledných 5 rokov, napr. za vysokokvalitné vzdelávacie materiály, vzdelávacie dokumenty, príručky, knihy alebo kapitoly z kníh, online vzdelávacie zdroje, vzdelávacie kurzy a workshopy. EFLM oceňuje najmä kompletnosť a dostupnosť materiálov pri zdieľaní zdrojov vo vzdelávaní. Aj keď sa do úvahy berú aj národné projekty, prednosť majú najvýznamnejšie európske projekty zamerané na široké medzinárodné publikum.

### **Európsky register špecialistov v laboratórnej medicíne**

**European Register of Specialists in Laboratory Medicine (EuSpLM)** je databáza odborníkov v laboratórnej medicíne v Európe, ktorá je otvorená všetkým členským národným spoločnostiam EFLM (McMurray, Zérah, Hallworth et al., 2010; Wieringa, Jassam, Homsak et al., 2020). Držitelia titulu EuSpLM sú profesionáli so súborom vedomostí na vysokej úrovni, zručností a kompetencií podľa akceptovaného európskeho sylabu a spoločného vzdelávacieho rámca pre špecialistov v laboratórnej medicíne. V súlade so **Smernicou EÚ 2013/55/ES o profesijnom uznávaní (DIRECTIVE 2013/55/EU OF THE EUROPE-**



**AN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2013)** je Register dôležitým krokom pokračujúceho úsilia EFLM v procese uznávania profesie Laboratórna medicína, ktorý:

- Identifikuje jednotlivcov, ktorí vykonávajú prax na špecializovanej úrovni, najmä ak neexistuje zavedený mechanizmus na takéto uznávanie cez európske hranice.
- Podporuje snahu EFLM dosiahnuť uznanie nelekárskych špecialistov prostredníctvom smernice EÚ 2013/55/ES.
- Prostredníctvom stanovenia rovnocennosti noriem (štandardov) podporuje poskytovanie vysokokvalitnej a rovnocennej laboratórnej medicíny v celej Európe čím následne zvyšuje kvalitu testovania a zaisťuje vyššiu bezpečnosť pacientov.
- Podporuje povedomie o úlohe laboratórnej medicíny a jej príspevku k lepšiemu zdraviu a najlepšej zdravotnej starostlivosti.

### **Kritériá rovnocennosti (*Equivalence of Standards, EoS*) definujú**

- Minimálne 9 (ideálne 10) rokov akademického (4–5 rokov) a špecializovaného (4–5 rokov) štúdia a vzdelávania/školenia;
- Priebeh vzdelávania a školenia podľa noriem stanovených v Sylabe EFLM;
- Titul (alebo jeho ekvivalent) v medicíne, farmácii alebo vede;
- Výstupnú kvalifikáciu (postgraduálny certifikát), ktorá spĺňa EFLM „Equivalence of Standards“, ako je uvedené v požiadavkách na študijné programy;
- Dôkaz o účasti na sústavnom odbornom rozvoji (kontinuálnom vzdelávaní, CPD).

Splnenie rovnocennosti štandardov je základným kameňom oprávnenosti vstupu do registra (Wieringa, Queraltó, Homšak et al., 2021). Žiadosti o vstup do registra sú otvorené pre jednotlivcov vyškolených v oblasti medicíny, vedy a farmácie, ktorí sú členmi národných, pridružených a dočasných spoločností EFLM a ktorých vzdelávanie/školenie bolo vyvážené počas 9 (najlepšie 10) rokov v nasledujúcich disciplínach:

- Všeobecná chémia – najmenej 35 %;
- Všeobecná chémia plus hematológia – najmenej 65 %;
- Zvyšných 35 % je flexibilných: všeobecná chémia, hematológia, mikrobiológia, genetika a IVF (*in vitro*

inseminácia, mimotelové oplodnenie) v pomere zodpovedajúcom požiadavkám v krajine určenia; pozostáva z pracovných skúseností, akreditovaných kurzov, príslušných skúšok v národných vzdelávacích programov a stáží.

**Žiadosti o vstup do registra** sa môžu podať iba prostredníctvom prihlášky do EFLM Academy. Tí žiadatelia, ktorí spĺňajú požiadavky pre EuSpLM a sú členmi Akadémie budú automaticky zapísaní do registra EFLM bez dodatočných nákladov. Existujú dva spôsoby, ako sa stať členom registra EuSpLM:

- Individuálna žiadosť
- Kolektívne členstvo prostredníctvom blokovej registrácie národnou spoločnosťou.

**Individuálnu prihlášku** podáva jednotlivec prostredníctvom webovej aplikácie <https://www.eflm.eu/academy-register/login> v prípade, že je členom Národnej spoločnosti EFLM, ktorá nemá blokujúcu registráciu. Žiadateľ, ktorý chce získať titul EuSpLM touto cestou, predkladá žiadosť spolu s požadovanou dokumentáciou priamo registrátorovi elektronickou cestou na adrese [registrar@eflm.eu](mailto:registrar@eflm.eu).

Pracovná skupina EFLM pre register (WG-Register) skontroluje predložené doklady, či žiadateľ spĺňa rovnocennosť noriem EFLM (***Equivalence of Standards, EoS***). Proces posudzovania trvá približne dva mesiace. Žiadosti sa prijímajú od jednotlivcov národných spoločností EFLM, ktorých vzdelanie a špecializačné školenie sa uskutočnilo v krajine, ktorá je uznaná ako krajina spĺňajúca EFLM rovnocennosť štandardov. Tento dôkaz poskytuje mieru, podľa ktorej je možné žiadosti následne posudzovať.

### **Kolektívne členstvo**

Kolektívne členstvo vylučuje v princípe individuálne členstvo. Pri kolektívnom členstve záujemcovia o členstvo v Akadémii a Registri EuSpLM nepodávajú žiadosti individuálne ale cestou blokovej prihlášky SSKB. Základom kolektívneho členstva je **Memorandum o porozumení (MoU)**, ktoré spoločne podpisujú Prezident Európskej federácie laboratórnej medicíny a Prezident národnej spoločnosti (Memorandum of Understanding between EFLM and SSKB, 2021). Po jeho podpise Národný reprezentant pre register môže predložiť pracovnej skupine EFLM WG Register zoznam členov NS, ktorí žiadajú o členstvo v Aka-

démii alebo aj o titul EUSpLM. Pri kolektívnom členstve žiadatelia o titul EuSpLM nepredkladajú svoje žiadosti individuálne, ale Národnému reprezentantovi pre Register. Národným reprezentantom pre Register je predseda pracovnej skupiny pre register, ktorú si národná spoločnosť zriaďuje na tento účel. Táto pracovná skupina sa stará o všetky žiadosti EuSpLM a je zodpovedná za hodnotenie spôsobilosti žiadateľov. Jej predseda je kontaktnou osobou pre komunikáciu s EFLM WG Register a zastáva funkciu korešpondenčného člena EFLM WG Register. V MoU je uvedené, že EFLM WG-Register môže vykonávať v NS pravidelné alebo náhodné kontroly dokumentácie.

Národné spoločnosti EFLM, ktoré sa chceli zapojiť do registra EuSpLM, boli v roku 2019 vyzvané, aby predložili dôkazy preukazujúce, že spĺňajú kritériá noriem rovnocennosti (*Equivalence of Standards, EoS*) vzdelávania v profesii Laboratórna medicína. Dokument o tom, že na Slovensku sú splnené normy EoS predložil Výbor SSKB po svojom schválení v novembri 2019 predsedovi pracovnej skupiny WG Register. Na jeho základe WG-R schválila profesionálny profil nelekárskych špecialistov v laboratórnej medicíne v celej Európskej únii. Členské štáty schopné splniť navrhovaný spoločný školiaci rámec sú v tomto profile zvýraznené zelenou farbou (Wieringa, Queraltó, Homšak et al., 2021). Na základe tohto dokumentu môžu národné spoločnosti navrhnúť na titul EuSpLM žiadateľov, ktorí uvedené podmienky spĺňajú.

Doklady, ktoré predkladá žiadateľ o titul EuSpLM bez ohľadu na to, či žiada individuálne alebo cestou kolektívneho členstva, sú nasledovné:

### 1. Životopis (*Curriculum Vitae*)

Musí byť napísaný v angličtine a musí obsahovať najmenej nasledujúce informácie:

- Vysokoškolské vzdelanie s dátumami a získanými kvalifikáciami;
- Postgraduálne školenie s dátumami a získanými kvalifikáciami;
- História zamestnania po ukončení štúdia vrátane miest a pozícií/zastávaných postov;
- Členstvo v odborných spoločnostiach s dátumami a úrovňou členstva (radový člen, funkcionár);
- Odborné zručnosti a/alebo počet recenzovaných vedeckých publikácií;

### 2. Akademický titul absolventa magisterského štúdia na univerzite alebo vysokej škole

- Uznávané sú rovnocenné lekárske, vedecké a farmaceutické tituly (napr.: MUDr., RNDr., Ing., Mgr., PharmDr., PhMr., ap.).

### 3. EFLM uznávaná ukončená kvalifikácia

- Osvedčenie (certifikát) o ukončení postgraduálneho vzdelávania a/alebo odbornej spôsobilosti;
- Kvalifikácia a certifikáty, ktoré nie sú uznané ako rovnocenné EOS, nie sú akceptované.

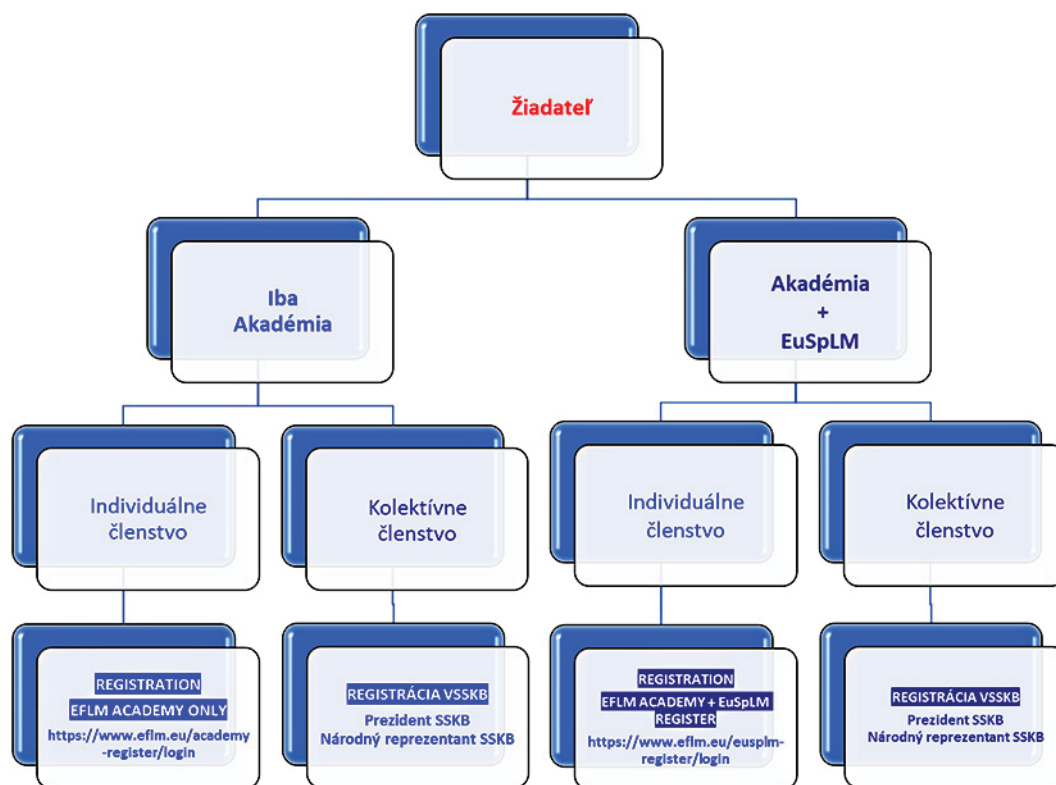
### 4. Nepretržitý profesionálny rozvoj (CPD)

- Žiadatelia o registráciu sú vyzvaní, aby predložili všetky relevantné dôkazy o získaných kreditoch za postgraduálne vzdelávanie (CPD).

Titul EuSpLM sa udeľuje na 5 rokov. Každý kalendárny rok musí nositeľ titulu obnoviť jeho platnosť splnením bodu 4/. V prípade individuálneho členstva v Akadémii predkladá doklady rovnakou cestou ako pôvodnú žiadosť, v prípade kolektívneho členstva predkladá požadované doklady Národnému zástupcovi pre register. Záujemcovia členstvo v registri EuSpLM si môžu o registri vyhľadať viac informácií na webovej stránke EFLM v časti **Profesijný výbor**.

## EFLM Syllabus

**Syllabus (učebné osnovy)** sú školský dokument, v ktorom sa konkretizujú výchovno-vzdelávacie ciele, obsah a rozsah vyučovania v učebných predmetoch a v študijných predmetoch podľa schváleného učebného plánu (<https://sk.wikipedia>). EFLM Syllabus sú učebné osnovy, ktoré predstavujú príležitosť zosúladiť spoločné princípy vzdelávania a odbornej prípravy európskych špecialistov v laboratórnej medicíne do vnútroštátnych právnych predpisov členských štátov na báze Smernice Európskej únie 2013/55/ES. Smernica umožňuje členským štátom rozhodnúť o spoločnom súbore vedomostí, zručností a kompetencií, ktoré sú potrebné na výkon danej profesie, prostredníctvom zavedenia rámcov spoločnej odbornej prípravy, Common Training Frameworks, CTF (Zerah, McMurray, Bousquet et al., 2006; Wieringa, Zerah, Jansen et al., 2012; Wieringa, Queraltó, Homšak et al., 2021). Odborníci, ktorí získali kvalifikáciu v rámci CTF, budú mať túto kvalifikáciu uznanú automaticky bez uloženia ďalších kompenzačných opatrení (napríklad obdobia adaptácie alebo skúšok spôsobilosti). Pri navrhovaní spoločného učebného plánu (CTF) pre nelekárskych špecialistov v laboratórnej medicíne je základným stavebným kameňom aktuálny, reprezentatívny učebný plán, ktorý načrtáva odborné zručnosti, znalosti a kompetencie potrebné na riadenie



Obr. 1. Formy žiadosti o členstvo v Akadémii EFLM

služieb v laboratórnej medicíne. CTF nenahrádza národné programy vzdelávania a odbornej prípravy. Pokiaľ štát nerozhodne inak podľa vnútroštátneho práva, uznáva sa, že rozsah vzdelávacej praxe je dostatočne rozsiahly na to, aby ho bolo možné považovať za spoločný učebný plán. Štvrtá verzia učebných osnov (Wieringa, G., Zerah, S., Jansen, R. et al.; 2012) bola postavená na generických zručnostiach, vedomostiach a kompetenciách špecialistu, zatiaľ čo piata verzia (Jassam, N., Lake, J., Dabrowska, M. et al., 2018) rozširuje požiadavky jednotlivých disciplín v klinickej chémii/imunológii, hematológii, krvnej transfúzii, mikrobiológii/virológii, genetike a mimotelového oplodnenia.

Podobu školiaceho programu a alokáciu zdrojov požadovaných účastníkmi školenia, ich supervízormi a inštitúciami, ktorú formulovali autori piatej verzie CTF rozvinula EFLM *Task group for Syllabus Course (TG-ESC)* do praktickej podoby vo forme učebného kurzu (Šimundić, A-M., Jovičić, S., Alić, L. et al., 2021). **Kurz Syllabus EFLM** sa stal hlavným vzdelávacím nástrojom CTF. Predstavuje sériu prednášok známych univerzitných profesorov, vysokokvalifikovaných lektorov, rečníkov a vážených odborníkov v danej oblasti, vynikajúcich a inšpiratívnych kolegov,

predsedov a členov mnohých pracovných skupín EFLM a iných funkčných jednotiek EFLM. Zdieľaním svojich vedomostí a prednášok pomohli vybudovať monumentálny vzdelávací nástroj, ktorý bude v nadchádzajúcich rokoch slúžiť generáciám študentov a mladých kolegov po celej Európe. Kurz je podľa jeho lídra prof. Any Marie Šimundićovej skutočnou zlatou baňou vedomostí a informácií.

Stručný prehľad osnov kurzu, štruktúry modulov a jednotlivých tém si môžu záujemcovia pozrieť na [web stránke SSKB](#). Podrobné informácie a plán učebného kurzu EFLM Syllabus môžu zájemci nájsť tu [EFLM SYLLABUS COURSE](#).

## ZÁVER

Klinická chémia a laboratórna medicína zohráva kľúčovú rolu v modernej zdravotnej starostlivosti. Predstavuje zásadnú úlohu pri skríningu chorôb, diagnostike, hodnotení rizika, výbere liečby, monitorovaní terapie, prognóze a ďalších aspektoch klinického rozhodovania. Historický vývoj a prax potvrdili, že klinická (bio)chémia a laboratórna medicína je spoločným profesionálnym odborom pre lekárov a prírodovedcov. Johannes Büttner už v roku

1991 napísal, že klinická chémia je s konečnou platnosťou interdisciplinárnym odborom medzi prírodovedou a medicínou (Büttner, 1991). Európsky vývoj nasvedčuje, že títo partneri budú musieť v laboratórnej medicíne spolupracovať ešte užšie ako v minulosti. Úspešná práca v laboratórnej medicíne si vyžaduje schopnosť viesť dialóg a tímovú spoluprácu s klinikom. Postgraduálne vzdelávanie musí okrem špeciálnych vedomostí a osobitných schopností priblížiť mladej generácii aj spôsoby myslenia lekára a prírodovedca.

Odbornú spôsobilosť na výkon práce v klinickom laboratóriu môžu pracovníci nadobudnúť absolvovaním pregraduálneho a postgraduálneho vysokoškolského štúdia. Kvalifikované postgraduálne vzdelávanie je v laboratórnej medicíne dôležitejšie ako povaha pregraduálneho študijného odboru. Je založené na rovnocennosti noriem vo vzdelávaní, odbornej príprave, kvalifikácii, vedomostiach, zručnostiach a kompetenciách. Odborníci, ktorí získali svoju kvalifikáciu v rámci spoločného rámca odbornej prípravy, budú v rámci štátov Európskej Únie automaticky uznávaní ako Európski špecialisti v laboratórnej medicíne.

## LITERATÚRA

1. **Blaton, V. (2004):** Education and training in clinical chemistry in the EU: Lessons from the experiences. *Jugoslovenska Medicinska Biohemija*, 2004, 23(3): 293–298. doi.org/10.2298/JMH0403293B
2. **Büttner, J. (1991):** Clinical Chemistry: A Professional Field for Physicians and Natural Scientists in Europe. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol.*, 29, 1991, pp. 3–12.
3. **COUNCIL DIRECTIVE (89/48/EEC)** of 21 December 1988 on a general system for the recognition of higher-education diplomas awarded on completion of professional education and training of at least three years' duration.
4. **DIRECTIVE 2013/55/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL** of 20 November 2013 amending Directive 2005/36/EC on the recognition of professional qualification and Regulation (EU) No 1024/2012 on administrative cooperation through the Internal Market Information System. Official Journal of the European Union, 28.12.2013.
5. **Directives 89/48/EEC and 92/51/EEC** on the general system for the recognition of professional qualifications and supplementing Directives 77/452/EEC, 77/453/EEC, 78/686/EEC, 78/687/EEC, 78/1026/EEC, 78/1027/EEC, 80/154/EEC, 80/155/EEC, 85/384/EEC, 85/432/EEC, 85/433/EEC and 93/16/EEC concerning the professions of nurse responsible for general care, dental practitioner, veterinary surgeon, midwife, architect, pharmacist and doctor. Brussels, 2. 12. 1997. COM(97) 638 final. 97/0345 (COD).
6. **Dybkaer, R. (1997):** The Origins of the European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1997; 35(12): 937.
7. **EFLM bylaws (2013):** Set up an international non-profit association 4309/2013 named European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. The acronym is EFLM for an indefinite period of time, established in Brussels, Coudeberg 70, located in the judicial district of Brussels. The Articles of Association is registered at the Office of the Clerk of the competent Commercial Court, when the Association is conferred legal personality. In the year two thousand and thirteen, on the 29th day of January, before us, Ms Aline Hugé, Associated Notary with « Mottard and Hugé—Associated Notaries », a civil company trading as a private limited company, situated in Liège. *Archív autora*.
8. **Gurr, E, Koller, U., Blaton, V., et al. (2003):** The European Register for Specialists in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Guide to the Register Version 2-2003 and Procedure for Reregistration. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 41: 238–47. doi.org/10.1515/cclm.2003.41.12.iii
9. **History of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) (2017):** [https://www.eflm.eu/upload/docs/EFLM\\_History-last\\_rev2017-05.pdf](https://www.eflm.eu/upload/docs/EFLM_History-last_rev2017-05.pdf)
10. **Jansen, R. T. P. (2002):** The EC4 Register of European Clinical Chemists and EC4 Activities. *Clin. Chim. Acta.*, 2002; 319: 143–48.
11. **Jassam, N., Lake, J., Dabrowska, M. et al. (2018):** The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine syllabus for postgraduate education and training for Specialists in Laboratory Medicine: version 5-2018. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018; aop. doi.org/10.1515/cclm-2018-0344
12. **McMurray, J., Zerah, S., Hallworth, M. et al. (2010):** The European Register of Specialists in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Guide to the Register, Version 3-2010. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2010; 48(7): 999–1008. doi.10.1515/CCLM.2010.223
13. **Memorandum of Understanding** between EFLM and SSKB for the block enrolment of individuals in the EFLM Academy. (2021). [http://www.sskb.sk/portal/wp-content/uploads/2021/12/Memorandum-signed\\_SSCB\\_2021.pdf](http://www.sskb.sk/portal/wp-content/uploads/2021/12/Memorandum-signed_SSCB_2021.pdf)
14. **Pazzagli, M., McMurray, J., Zerah, S. (2008):** The EC4 Euro-

- pean Register of Specialists in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinica Chimica Acta*, 393 (2008) 27—30. doi: 10.1016/j.cca.2008.03.027
15. **Procedure manual** of the European federation of clinical chemistry and laboratory medicine (EFLM) v1.18, released 19 April 2021.
  16. **Proposal of changes to the bylaws (2016)**: EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE AISBL Coudenberg, 70, 1000 Brussels. NN 524.835.227. November 2016.
  17. **Sanders, G., T., Beastall, G., H., Kohse, K., P., et al. (2002)**: The Practice of Clinical Chemistry in the European Union. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002; 40(2): 196—204.
  18. **Sanders, G., T., Jansen, R., T., Beastall, G., et al. (1999)**: Recent Activities of EC4 in the Harmonization of Clinical Chemistry in the European Union. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999; 37(4): 477—480.
  19. **Sanders, G., T., Kelly, A., M., Breuer, J., et al. (1995)**: The Role of European Communities Confederation of Clinical Chemistry (EC4) in the Harmonisation of Clinical Chemistry in the European Union. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1995; 33: 947—948.
  20. **Sanders, G., T., Kelly, A., M., Breuer, J., et al. (1997)**: The European Register for Clinical Chemists. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1997; 35(10): 795—796.
  21. **Simundic, A-M. (2021)**: The Academy of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine—benefits and opportunities. *Adv. Lab. Med.*, 2(2): 141—144. <https://doi.org/10.1515/almed-2021-0033>
  22. **Simundic, A-M., Topic, E., Cvoriscec, D., et al. (2011)**: Special themed issue: Education in clinical chemistry and laboratory medicine in various European countries. *Biochemia Medica*, 2011; 21(1): 15—21.
  23. **Šimundić, A-M., Jovičić, S., Alić, L. et al. (2021)**: EFLM SYLLABUS COURSE (2022). A top quality Revision Course designed by EFLM to increase the knowledge and exam confidence for postgraduate students. Free course for EFLM Academy members. Available from: January 2022.
  24. **THE EFLM ACADEMY (2021)**: This brochure aims to give the overview of the EFLM Academy, how to become a member and what are the benefits from becoming a member. June 2021. Version 1.1.
  25. **Wieringa, G., Jassam, N., Homsak, E., et al. (2020)**: The Academy of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the European Register of Specialists in Laboratory Medicine: guide to the Academy and the Register, version 4-2020. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2021; 59(3): 499—503. doi.org/10.1515/cclm-2020-1507.
  26. **Wieringa, G., Queraltó, J., Homšak, E., et al. (2021)**: A proposed Common Training Framework for Specialists in Laboratory Medicine under EU Directive 2013/55/EC (The Recognition of Professional Qualifications). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2021; 59(3): 505—512. doi.org/10.1515/cclm-2020-1504.
  27. **Wieringa, G., Zerah, S., Jansen, R., et al. (2012)**: The EC4 European Syllabus for Post-Graduate Training in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: version 4-2012. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012; 50(8): 1317—1328. Doi.10.1515/cclm-2012-0019
  28. **Zerah, S., McMurray, J., Bousquet, B., et al. (2006)**: EC4 European Syllabus for Post-Graduate Training in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: version 3-2005. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006; 44(1): 110—120. Doi.10.1515/CCLM.2006.021
  29. **Zerah, S., McMurray, J., Horvath, A., R. (2012)**: EFLM Position Statement. Our profession now has a European name: Specialist in Laboratory Medicine. *Biochemia Medica*, 2012; 22(3): 272—3.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 39–45

## NOVÝ FENOTYPOVÝ KLASIFIKAČNÝ SYSTÉM DYSLIPIDÉMIÍ ZALOŽENÝ NA ŠTANDARDNOM LIPIDOVOM PANELI NEW PHENOTYPIC CLASSIFICATION SYSTEM FOR DYSLIPIDEMIAS BASED ON THE STANDARD LIPID PANEL

Gaško Rudolf<sup>1, 2</sup>, Hefler Margita<sup>2</sup>, Pirošková Zuzana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddelenie klinickej biochémie a hematológie  
Psychiatrická Nemocnica Michalovce, n. o., Michalovce

<sup>2</sup>Klinická epidemiológia a bioštatistika, Košice

e-mail: biostatistikakosice@gmail.com

*prehľadová práca*

### SÚHRN

Po prehľade doterajších fenotypových klasifikácií dyslipidémii popisujeme nový fenotypový klasifikačný systém dyslipidémii, založený na štandardnom lipidovom paneli cholesterol, HDL-cholesterol a triacylglyceroly, ktorého autormi sú Maureen Sampson a spolupracovníci (2021) a upravujeme ho na použitie v SI jednotkách.

**Kľúčové slová:** fenotyp; klasifikácia dyslipidémii; klasifikácia dyslipoproteinémii; Sampson

### ABSTRACT

We describe new phenotypic classification system for dyslipidemias based on the standard lipid panel cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides, by Maureen Sampson and co-workers (2021) and modify it to use SI units.

**Key words:** phenotype; classification system; dyslipidemias; Sampson

### ÚVOD

#### Čo je fenotypová klasifikácia hyperlipidémii/ dyslipidémii a hyperlipoproteinémii/dyslipoproteinémii?

Je to klasifikácia na základe aktuálneho zastúpenia lipoproteínov v krvnej plazme alebo krvnom sére v čase vyšetrenia, stanovených kvantitatívnymi a kvalitatívnymi metódami. Predpony hyper- aj dys- sa v literatúre používajú rovnako, obdobne aj prípony -lipidémia a -lipoproteinémia (Mach a kol., 2020).

Klasifikácia porúch metabolizmu lipoproteínov podľa Fredricksona (Fredrickson a kol., 1967; WHO Memorandum, 1970) delí dyslipoproteinémie pôvodne do 5 a neskôr do 6 typov označených ako typ I, IIa, IIb, III, IV a V. Kvantitatívnymi hodnotami sú hladina celkového cholesterolu (TC) a triacylglycerolov (TAG). Kvalitatívnou charakteristikou je chladový (chylomikrónový) test krvného séra a elektroforéza lipoproteínov. Kvalitatívne sa hodnotí aj prítomnosť kožných prejavov. Zdôrazňujeme, ide o klasifikáciu dyslipoproteinémii bez ohľadu na ich etiológiu, teda aj primárnych aj sekundárnych.

Fredricksonova klasifikácia bola dlho celosvetovo používaná. Ešte v roku 2003 bola uvedená v slovenských lipidových odporúčaniach (Lipidový konsenzus – 2, 2003). V medzinárodných guidelineoch sme zachytili odporúčanie

jej používania do roku 1998 (Ahmed a kol., 1998), neskôr už nie. Dnes ju už praktickí lekári nepoužívajú. Aj v súčasnej odbornej literatúre je však uvádzaná, v historických súvislostiach (Martín-Campos, 2021) aj používaná v odborných štúdiách (Sniderman a kol., 2007; Quispe a kol., 2019; Pallazola a kol., 2020).

Zjednodušená fenotypová terapeutická klasifikácia, ktorú pre terapeutické účely zaviedla Európska spoločnosť aterosklerózy (EAS) v roku 1992 (Recommendations, 1992) vychádza zo stanovenia koncentrácie TC a TAG, na základe ktorého sa DLP delia na tri skupiny: izolovaná hypercholesterolémia, izolovaná hypertriacylglycerolémia a kombinovaná (zmiešaná) hyperlipoproteinémia.

Bez odkazu na primárny zdroj sú používané používané pojmy fenotyp ťažkej hypercholesterolémie, fenotyp familiárnej hypercholesterolémie (Grundy a kol., 2019; Saadatagah a kol., 2021), fenotyp familiárnej hypertriglyceridémie (Cruz-Bautista a kol., 2021). Tento zoznam nie je úplný, dobrý prehľad podáva práca Oravec (2012).

### **Aký význam má Fredricksonova fenotypová klasifikácia v súčasnosti?**

Klasifikácia podľa Fredricksona sa už podľa niektorých autorov, nepoužíva (Racek a kol., 1999), zdôvodňuje sa aj jej nepotrebnosť (Berberich, Hegele, 2021). Nie je uvedená ani v najnovšej verzii ESC/EAS (Mach a kol., 2020) a AHA (Grundy a kol., 2019) lipidových guidelinov, EAS a EFLM doporučení o kvantifikácii aterogénnych lipoproteínov (Langlois a kol., 2020) ani v najnovšej verzii ESC guidelinov o prevencii kardiovaskulárnych ochorení v klinickej praxi (Visseren a kol., 2021). Je však uvádzaná v aktuálnych základných knižných (Zima a kol., 2013, a iné) a vysokoškolských učebniciach (Oravec, 2012; Ďurovcová, Mareková, 2020, a iné).

Jej slabou stránkou, nevýhodou, je potreba vykonania elektroforézy lipoproteínov, pôvodne na papieri, neskôr na iných nosičoch, ktorá sa dneska nepoužíva rutinne, ale iba výskumne. Ani chylomikrónový test sa nepoužíva. Pokus použiť ako náhradu elektroforézy apolipoproteínom B, ako jeden z parametrov Fredricksonovej klasifikácie (Sniderman a kol., 2007; Varghese a kol., 2021) nebol príliš úspešný. Ako zaujímavosť uvádzame, že pred 50 rokmi bol publikovaný český (Olomoucký) pokus o klasifikáciu hodnotami TAG a TC (Kubašta a kol., 1972), samotnými autormi vyhodnotený ako neúspešný.

### **Nová klasifikácia podľa Sampsonovej a kol. z roku 2021**

Sampsonová a spolupracovníci (2021) vyvinuli nový algoritmus pre lipoproteínovú fenotypizáciu založený len na dvoch zložkách štandardného lipidového panelu, a to TAG a non HDL cholesterol (nonHDL-C = TC mínus HDL cholesterol). Nový klasifikačný systém závisí od 7 hraničných hodnôt lipidov, ktoré sú uvedené v pre USA platných guidelineoch pre manažment lipidov pacienta (Grundy a kol., 2019), navyiac sú použité dve netradičné pravidlá založené na hodnotách lipidoch. Označenie fenotypov nadväzuje na Fredricksonovo delenie. Delenie však nie je úplne totožné, už kvôli tomu, že používa iné klasifikačné kritériá. Tento nový klasifikačný systém nemôže byť používaný na identifikáciu veľmi zriedkavej dyslipidémie typu III (Pallazola a kol., 2020), identifikuje však ostatné Fredricksonove fenotypy. Je tiež popísaný nový fenotyp, typ VI, ktorý sa vyskytuje v dôsledku zriedkavých genetických porúch v metabolizme apoproteínu B a vyžaduje špecifickú liečbu. Zároveň sú popísané tri normolipidemické podtypy: vysoký (High, H), stredný (Moderate, M) a nízky (Low, L). Spolu je teda popísaných 10 fenotypov. Každému zo siedmich dyslipidemických fenotypov sú v tabuľkách priradené: možné klinické príznaky; diétna a farmakologická liečba; prehľad dodatočných upresňujúcich laboratórnych testov; pri ktorých ochoreniach ochoreniach sa fenotyp vyskytuje, ako primárna alebo sekundárna DLP. V podrobnostiach odkazujeme na uvedenú publikáciu.

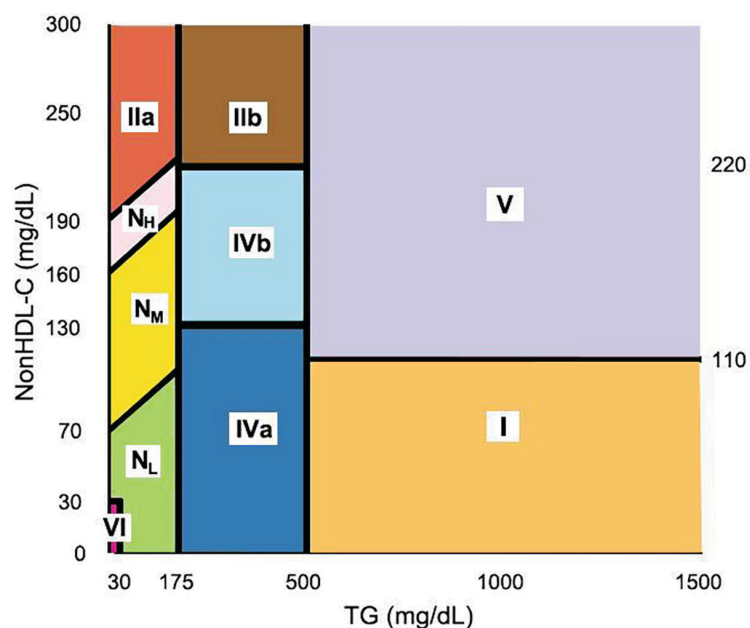
V našej práci sa zameriame na stručný prehľad s použitím prepočtu všetkých číselných hodnôt z jednotiek mg/dl (= mg%), používaných v USA, na jednotky mmol·L<sup>-1</sup>, používané u nás a v podstatnej časti Európy.

Použité konverzné faktory sú:

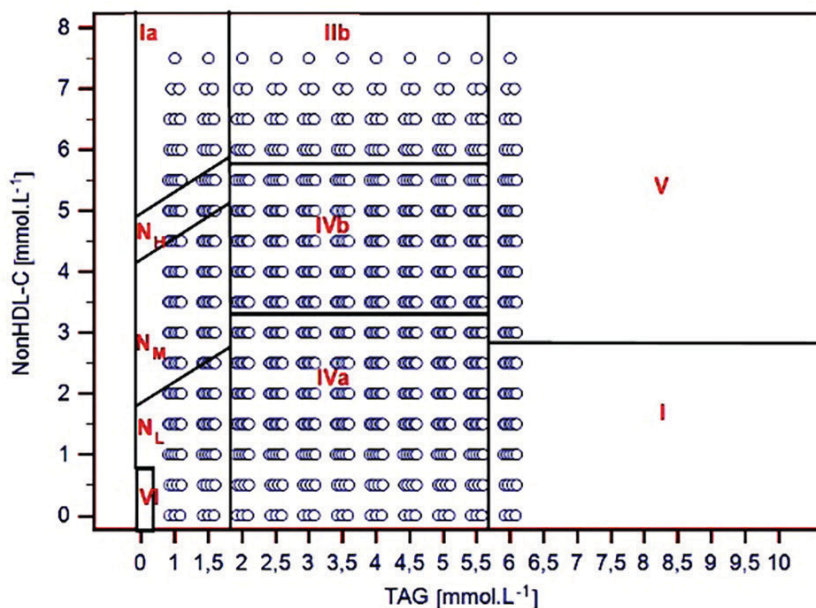
$$\text{nonHDL-C [mg/dl]} \times 0,02586 = \text{nonHDL-C [mmol·L}^{-1}\text{]},$$

$$\text{TAG [mg/dl]} \times 0,01125 = \text{TAG [mmol·L}^{-1}\text{]}.$$

Na Obr. 1 je schéma nového klasifikačného systému fenotypizácie lipoproteínov, obsahujúceho 3 normolipidemické podtypy (vysoký, stredný, nízky), a dyslipidemické typy I, IIa, IIb, IVa, IVb,, V, VI. Na Obr. 2 je tá istá schéma, s hodnotami prepočítanými na jednotky mmol·L<sup>-1</sup>. Do schémy sme vložili hodnoty 900-členného umelého súboru, popísaného v práci Gaško, 2021. Na Obr. 3 je vývojový diagram kritérií pre novú klasifikáciu lipoproteínového fenotypu, prevzatý z práce Sampson a kol.,



Obr. 1. Schéma nového klasifikačného systému fenotypizácie lipoproteínov, prevzatá z práce Sampson a kol., 2021  
 plné čiary označujú rôzne hraničné hodnoty nonHDL-C a TAG použité na definovanie rôznych lipoproteínových fenotypov (dyslipidémie typu I-VI  
 a normolipidemických podtypov (vysoký High, (H), stredný (Moderate, M) a nízky Low, (L)). Fenotypy sú farebne odlišené

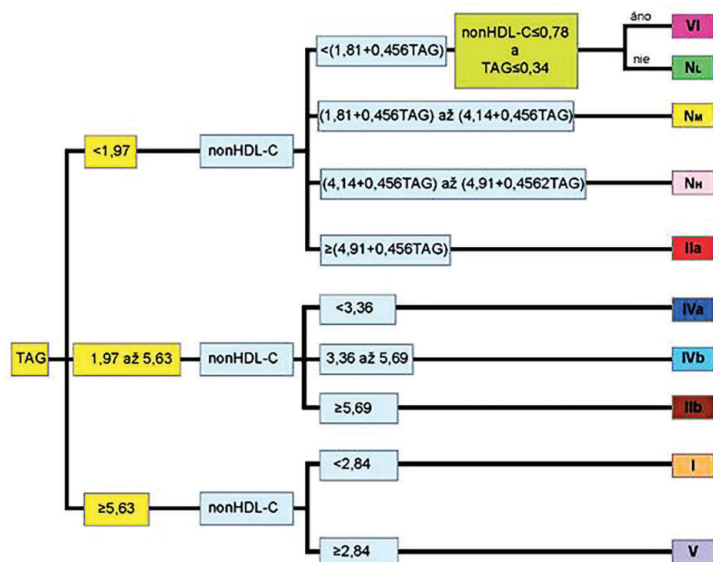


Obr. 2. Schéma nového klasifikačného systému fenotypizácie lipoproteínov  
 Pôvodnú schému z práce Sampson a kol., 2021, sme upravili. Hodnoty sú nami prepočítané na jednotky mmol.L<sup>-1</sup>.  
 Do schémy sme vložili hodnoty 900-členného umelého súboru, popísaného v práci Gaško, 2021

2021. Pomocou uvedených rozhodovacích pravidiel TAG a nonHDL-C je možné identifikovať všetky Fredricksonove fenotypy okrem typu III. V tabuľke 1 je uvedená frekvencia prítomnosti jednotlivých fenotypov v dvoch ich rôzne definovaných súboroch pacientov autorov pôvodnej práce Sampson a kol., 2021. Doplnili sme frekvencie fenotypov

v našom v súbore (Gaško a kol., 2011), ktoré sú približne rovnaké. Pre zaujímavosť sme pridali frekvenciu jednotlivých fenotypov v umelom súbore, vytvorenom na objektívne vzájomné porovnanie matematickými rovnicami vypočítavaných hodnôt LDL-cholesterolu (Gaško, 2021). Táto frekvencia je diametrálne odlišná od predošlých,





Obr. 3. Vývojový diagram kritérií pre novú klasifikáciu lipoproteínového fenotypu, prevzatý z práce Sampson a kol., 2021. Pomocou uvedených rozhodovacích pravidiel TAG a nonHDL-C možno pomocou tohoto klasifikačného systému identifikovať všetky Fredricksonove fenotypy okrem typu III. Hodnoty sú nami prepočítané na jednotky  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

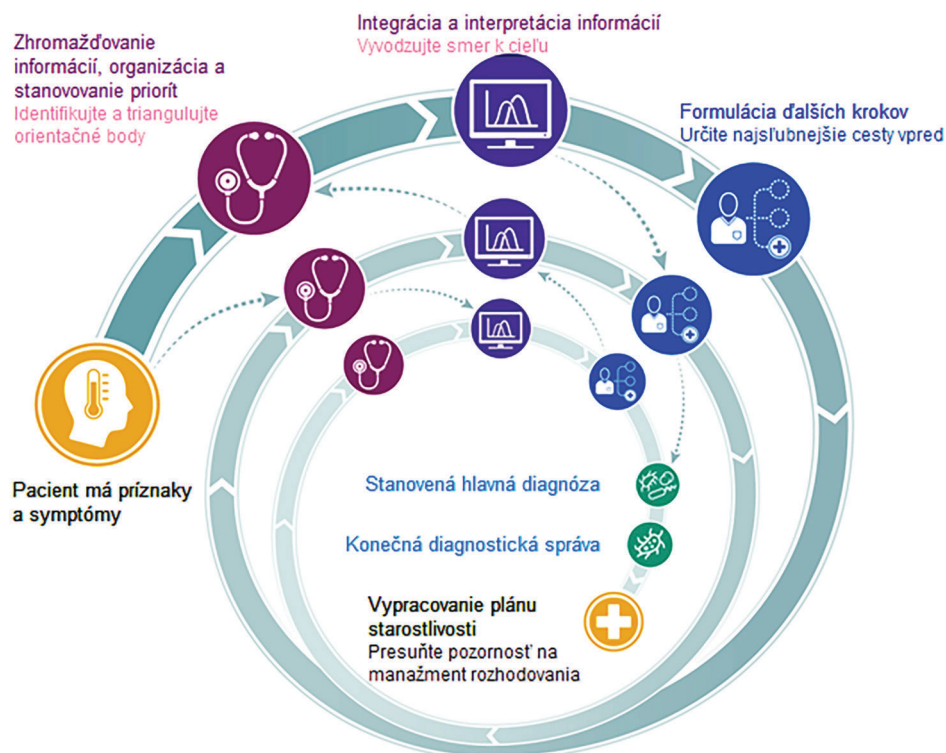
Tabuľka 1. Frekvencia fenotypov novej klasifikácie v dvoch súboroch z práce Sampson a kol., 2021, nami doplnená o frekvenciu v troch ďalších súboroch

	Sampson a kol., 2021		Gaško a kol. 2011	Yano a kol. 2019	Umelý súbor Gaško, 2021
	NIH	NHANES			
n	11365	13086	7393	32	900
NL	14,1%	7,7%	7,8%	0,0%	8,0%
NM	65,5%	66,8%	55,8%	9,4%	9,2%
NH	3,3%	5,4%	6,8%	3,1%	3,3%
I	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	3,3%
II a	1,5%	1,6%	2,9%	0,0%	4,4%
II b	1,3%	2,1%	3,5%	15,6%	8,9%
IV a	4,2%	3,0%	4,4%	15,6%	32,0%
IV b	8,3%	12,5%	17,6%	46,9%	25,8%
V	1,3%	0,9%	1,3%	9,4%	5,0%
VI	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

predovšetkým prítomnosťou podstatne vyššieho podielu typu I. Dajú sa však identifikovať aj reálne súbory s obdobným rozložením fenotypov, napríklad súbor z práce Yano a kol., 2019.

### Význam novej klasifikácie v súčasnosti a v budúcnosti

Význam novej klasifikácie je daný tým, že je založená na bežne stanovovaných troch parametroch, teda je nákladovo efektívna. Jej výpočet je umožnený v jednoduché Excel tabuľke, ktorá je voľne prístupná. Implementácia do



**Obr. 4. Proces dynamického spresňovania diagnostiky**

Plné šípky znázorňujú diagnostický proces a prerušované šípky znázorňujú, ako môžu nové informácie zmeniť proces. Nové informácie môžu zvýšiť neistotu a spôsobiť návrat k skoršiemu bodu a zváženie širšieho súboru možných ďalších krokov, alebo môžu tiež umožniť skok vpred v procese, čím sa zabráni ďalšiemu cyklu. Finálna – konečná diagnostická správa (diagnostický štítek) je konečná v tom, že spĺňa administratívnu požiadavku na zadanie kódu – kódov pre účely fakturácie, je však možná priebežná revízia diagnózy, ktorá riadi liečbu. Prevzaté z Adler-Milstein a kol., 2021

informačných systémov, laboratórnych, ambulantných, nemocničných, je jednoduchá. Môže slúžiť ako všeobecný návod alebo rámec, najmä pre lekára prvého kontaktu, nelipidového špecialistu, pri diagnostike a klinickom manažmente pacientov s vysokým rizikom aterosklerózy. Šanca na jej uplatnenie v každodennej klinickej medicíne a vo výskume (teda nezapadnutia v mori iných nových informácií) je zvýšená osobnosťou prvej autorky, Maureen Sampsonovej, ktorá s kolektívom pred dvoma rokmi priniesla novú metódu výpočtu LDL-cholesterolu, mimoriadne úspešnú (Sampson a kol., 2020; Gaško, 2021).

Lipoproteínový fenotyp, akoukoľvek metódou klasifikovaný, na rozdiel od genotypu nie je invariantný a môže sa meniť v reakcii na environmentálne faktory, ako je strava a fyzická aktivita, a následkom farmakoterapie. Napriek tomu určenie fenotypu môže pomôcť zamerať sa na manažment hyperlipidémie v každodennej praxi. Rozvoj genetického testovania dyslipidemií je síce výrazný a jeho reálna dostupnosť stúpa aj na Slovensku, ale má význam len u relatívne malého počtu dyslipidemií (Brown a kol., 2020; Hegele a kol., 2020).

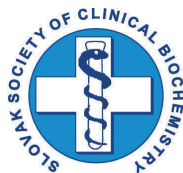
Paradigma modernej laboratórnej medicíny sa v poslednom období mení (Lippi et Plebani, 2020; Jabor a kol., 2020). V počínajúcej ére personalizovanej medicíny vždy záleží na formulácii diagnostickej a/alebo terapeutkej otázky a/alebo otázky prognózy, na ktoré sa bude hľadať odpoveď u konkrétneho pacienta. Do algoritmov, zapájaných do automatizovaného rozhodovacieho procesu, riadeného umelou inteligenciou- je výhodnejšie vkladať obrazy = fenotypové charakteristiky, ako číselné hodnoty dvoch alebo viacerých lipoproteínov. Schéma na Obr. 4 ukazuje predpokladané posunutie úlohy diagnostickej umelej inteligencie z predpovedania pravdepodobnostných scenárov na „hľadanie cesty“ (interpretáciu kontextu a poskytovanie podnetov, ktoré vedú k diagnostike). Význam fenotypovej typizácie v ére personalizovanej medicíny bude narastať (Sathiyakumar a kol., 2020; Sweeney a kol., 2021).

Softvér vyvinutý pre analýzu lipoproteínovej fenotypizácie novou metódou Sampson a kol., upravený na používanie SI jednotiek, si môžete voľne stiahnuť na nasledujúcej webovej stránke: <https://edustat.webnode.sk/software/>.

## LITERATÚRA

1. **Adler-Milstein, J., Chen, J. H., Dhaliwal, G. (2021):** Next-Generation Artificial Intelligence for Diagnosis: From Predicting Diagnostic Labels to “Wayfinding”. *JAMA*, 326(24), 2467—2468. doi: 10.1001/jama.2021.22396.
2. **Ahmed, S. M., Clasen, M. E., Donnelly, J. F. (1998):** Management of dyslipidemia in adults. *American family physician*, 57(9): 2192—2204.
3. **Berberich, A. J., Hegele, R. A. (2021):** A modern approach to dyslipidemia. *Endocrine Reviews*. doi: 10.1210/edrv/bnab037.
4. **Brown, E. E. et al. (2020):** Genetic testing in dyslipidemia: A scientific statement from the National Lipid Association. *J. Clin. Lipidol.*, Jul—Aug; 14(4): 398—413. doi: 10.1016/j.jacl.2020.04.011.
5. **Cruz-Bautista, I. et al. (2021):** Familial hypertriglyceridemia: an entity with distinguishable features from other causes of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.*, 20(1): 14. doi: 10.1186/s12944-021-01436-6.
6. **Đurovcová, E., Mareková, M. (2020):** *Clinical Biochemistry*. 2nd edition. UPIŠ Košice, 275 s. ISBN 978-80-8152-937-5 (pdf).
7. **Fredrickson, D. S., Levy, R. I., Lees, R. S. (1967):** Fat transport in lipoproteins—an integrated approach to mechanisms and disorders. *New Engl. J. Med.*, 276, 34—42.
8. **Gaško, R. (2021):** Stanovenie LDL-cholesterolu novými rovnicami Martin a Sampson, porovnanie so starým Friedewaldom na reálnych dátach a na umelom súbore. *Vnitr. Lek.*, 67(2): e09—17. doi: 10.36290/vnl.2021.028.
9. **Gaško, R. et al. (2007):** V akej zhode sú výsledky priameho a počítaného stanovenia LDL-cholesterolu v hraničných hodnotách podľa Európskych odporúčaní? Multicentrická štúdia. *Cardiol Letters*, 2011; 20(6): 468—475.
10. **Grundy, S. M. et al. (2019):** 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 73: e285—350. doi: org/10.1016/j.jacc.2018.11.003
11. **Hegele, R. A. et al. (2020):** Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, Jan, 8(1): 50—67. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30264-5.
12. **Jabor, A., Franeková, J. Kubíček, Z. (2020):** *Principy interpretace laboratorních testů*, 2. přepracované a doplněné vydání. Praha, Grada Publishing, 456 s. ISBN 978-80-271-1272-2.
13. **Kubašta, M. et al. (1972):** Ke snaze klasifikovat hyperlipidémie do typů podle Fredricksona jen na základě koncentrace cholesterolu a triglyceridů v séru. *Časopis lékařů českých*, 111, č. 24, s. 548—551.
14. **Langlois, M. R. et al. (2020):** European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Joint Consensus Initiative. Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 58(4): 496—517. doi: 10.1515/cclm-2019-1253.
15. **Lippi, G., Plebani, M. (2020):** A modern and pragmatic definition of Laboratory Medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 28; 58(8): 1171. doi: 10.1515/cclm-2020-0114.
16. **Mach, F. et al. (2020):** 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, 41, Issue 1, 111—188. doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455.
17. **Martín-Campos, J. M. (2021):** Genetic Determinants of Plasma Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels: Monogenicity, Polygenicity, and “Missing” Heritability. *Biomedicines*, 9, 1728. doi.org/10.3390/biomedicines9111728.
18. **Oravec, S. (2012):** *Hyperlipoproteinémie. Úvod do problematiky porúch metabolizmu lipoproteínov*. Univerzita Komenského v Bratislave, 71 s., ISBN 978-80-223-3290-3.
19. **Quispe, R. et al. (2019):** Characterization of lipoprotein profiles in patients with hypertriglyceridemic Fredrickson-Levy and Lees dyslipidemia phenotypes: the Very Large Database of Lipids Studies 6 and 7. *Arch. Med. Sci.*, 15 (5): 1195—1202. doi.org/10.5114/aoms.2019.87207
20. **Pallazola, V. A. et al. (2020):** Modern prevalence of dysbeta-lipoproteinemia (Fredrickson-Levy-Lees type III hyperlipoproteinemia). *Arch. Med. Sci.*, 16 (5): 993—1003. doi.org/10.5114/aoms.2019.86972.
21. **Racek, J. (1999):** *Klinická biochemie*. 1. vyd., Praha: Galén, 316 s., ISBN 80-7262-023-1.
22. **Saadatagah, S. et al. (2021):** Genetic basis of hypercholesterolemia in adults. *npj Genomic Medicine*, 6:28. doi.org/10.1038/s41525-021-00190-z.
23. **Sampson, M. et al. (2021):** A new phenotypic classification system for dyslipidemias based on the standard lipid panel.

- Lipids Health Dis.*, 20, 170. doi.org/10.1186/s12944-021-01585-8
- 24. Sampson, M. et al. (2020):** A New Equation for Calculation of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients With Normolipidemia and/or Hypertriglyceridemia. *JAMA Cardiology*, E1—E9. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0013
- 25. Sathiyakumar, V. et al. (2020):** Modern prevalence of the Fredrickson-Levy-Lees dyslipidemias: findings from the Very Large Database of Lipids and National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch. Med. Sci.*, 16(6): 1279—1287. doi: 10.5114/aoms.2019.86964
- 26. Sniderman, A. et al. (2007):** Diagnosis of type III hyperlipoproteinemia from plasma total cholesterol, triglyceride, and apolipoprotein B. *J. Clin. Lipidol.*, 1(4): 256—63. doi: 10.1016/j.jacl.2007.07.006.
- 27. Sniderman, A. D., Tsimikas, S., Fazio, S. (2014):** The severe hypercholesterolemia phenotype: clinical diagnosis, management, and emerging therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63(19): 1935—47. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.060.
- 28. Sweeney, T. et al. (2021):** The Use of Blood Biomarkers in Precision Medicine for the Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: a Review. *Expert. Rev. Precis. Med. Drug. Dev.*, 6(4): 247—258. doi: 10.1080/23808993.2021.1930531.
- 29. Varghese, B. et al. (2021):** Importance of the triglyceride level in identifying patients with a Type III Hyperlipoproteinemia phenotype using the ApoB algorithm. *Journal of Clinical Lipidology*, 15, 1: 104—115.e9, doi.org/10.1016/j.jacl.2020.09.011.
- 30. Visseren, F. L. J. et al. (2021):** 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*, 42, 3227—3337. doi: 10.1093/eurheartj/ehab484
- 31. Yano, M. et al. (2019):** Comparison of Two Homogeneous LDL-Cholesterol Assays Using Fresh Hypertriglyceridemic Serum and Quantitative Ultracentrifugation Fractions. *J. Atheroscler. Thromb.*, 26(11): 979—988. doi: 10.5551/jat.47191.
- 32. Zima, T. et al. (2013):** *Laboratorní diagnostika, třetí, doplněné a přepracované vydání.* Praha, Galén. 906 s. ISBN 978-80-7492-074-5 (pdf)
- 33. WHO Memorandum (1970):** *Classification of Hyperlipidaemias and Hyperlipoproteinaemias.* Bull. Wld. Hlth. Org. 43, 891—915.
- 34. Lipidový konsenzus – 2:** Odporúčania pre optimálnu diagnostiku a liečbu dyslipoproteinémií u dospelých (2003). *In-terná med.*, 3 (1): 10—18.
- 35. Recommendations of the European Atherosclerosis Society** prepared by the International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease: prevention of coronary heart disease: scientific background and new clinical guidelines. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 1992; 2: 113—156.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 46–48

## KOMENTÁR K NÁVRHU NOVEJ FENOTYPOVEJ KLASIFIKÁCIE DYSLIPIDÉMIÍ PODĽA SAMPSONOVEJ A KOL. (2021) COMMENTARY ON THE PROPOSAL OF A NEW PHENOTYPIC CLASSIFICATION SYSTEM FOR DYSLIPIDEMIAS ACCORDING TO SAMPSON ET AL. (2021)

**Rác Oliver**

UPJŠ Lekárska fakulta, Ústav patologickej fyziológie, Košice  
Miskolci Egyetem, Egészségtudományi Kar, Miskolc, Maďarsko

e-mail: olliracz@gmail.com  
*prehľadová práca*

### SÚHRN

Stručný komentár k návrhu fenotypovej klasifikácie dyslipidémií, ktorá vychádza zo stanovenia triacylglycerolov a non-HDL cholesterolu a delí dyslipidémie do šiestich tried podľa Fredericksonovej klasifikácie a zavádza tri nové triedy s hodnotami vyšetrení v normálnom rozmedzí.

**Kľúčové slová:** dyslipidémia; triacylglyceroly; non-HDL cholesterol; Fredericksonova klasifikácia

### ABSTRACT

Short commentary on the proposal of a new phenotypic classification system for dyslipidemias based on triacylglycerol and non-HDL cholesterol values. The classification divides dyslipidemias to 6 types according to Frederickson classification and introduces 3 new types with values in the normal range.

**Key words:** dyslipidemia; triacylglycerols; non-HDL cholesterol; Frederickson classification

### ÚVOD

Za posledné 2–3 desaťročia vedomosti o metabolizme lipidov v zdraví a chorobe prešli významným vývojom (Đurovcová a kol., 2020; Langlois a kol., 2020; Libby, 2021; Koplev a kol., 2022) a základný lipidový panel bol doplnený ďalšími biochemickými ukazovateľmi (Clouret-Foraison a kol., 2017; Khoury a kol., 2018; Jabor a kol., 2020), od ktorých sa očakáva lepšia predpovedná hodnota posúdenia rizika najčastejšieho a pre postihnutého najobávanejšieho následku dyslipidémie – koronárnej choroby srdca. Súčasne sa rozširujú aj možnosti genetických vyšetrení, a to nie len u monogénových foriem dyslipidémií (Gorabi a kol., 2020; Tada a kol. 2020; Josefs, Boon, 2020).

Rôzne formy dyslipidémie majú významný podiel na patogenéze aterosklerózy a následnej koronárnej choroby srdca a preto je potrebná ich jednoduchá klasifikácia na základe ukazovateľov, ktoré sú bežne prístupné v každodennej praxi na úrovni prvého kontaktu. Tieto ukazovatele by však mali byť v súlade so súčasnými poznatkami o metabolizme lipidov a ich vzťahu k rozvoju aterosklerózy.

## Od Fredericksona cez súčasné odporúčania a k novému návrhu

Fredericksonova klasifikácia (Frederickson a kol., 1967) bola dobrá, ale nebola etiologická a dnes v bežných biochemických laboratóriách nie je realizovateľná. Postupne sa prešlo na odporúčania podľa bežných meraní (celkový cholesterol, LDL-cholesterol počítaný alebo priamo meraný, HDL-cholesterol a triacylglyceroly), ktoré boli prístupné v každom laboratóriu a poskytovali užitočný, ale hrubý odhad rizika rozvoja koronárnej choroby srdca a ostatných následkov aterosklerózy (Đurovcová a kol., 2020, Jabor a kol., 2020, Langlois a kol., 2020). Pokusy zaviesť alternatívne klasifikácie neboli úspešné (Gaško a kol., 2022).

Nový návrh kolektívu Sampsonovej (2021) hodnotí lipidový status na základe dvoch ukazovateľov, koncentrácie triacylglycerolov a non-HDL cholesterolu (počítaný z celkového a HDL-cholesterolu). Stanovenie a hodnotenie LDL-cholesterolu z toho systému vypadol. Na základe týchto dvoch hodnôt delí probandov do 10 tried, z ktorých 6 zodpovedá s malými rozdielmi Fredericksonovej klasifikácii I, IIa, IIb, IVa, IVb a V. Rozdiel oproti Fredericksonovej klasifikácii spočíva v tom, že je zavedená nová skupina VI a je vynechaná skupina III. Okrem toho, nová klasifikácia zavádza 3 skupiny, ktoré nie sú považované za dyslipidémie v klasickom zmysle slova, hoci z hľadiska patofyziologického ich nemožno hodnotiť ako fyziologické. Ide o triedy „normal-high, -moderate, -low“ (normálny – vysoký, – stredný a – nízky). Konkrétne hraničné hodnoty sú uvedené v originálnej práci Sampsonovej a kol. (2021) a v prepočte na  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  v publikácii Gaško a kol. (2022).

### Prínos novej klasifikácie

1. Nová klasifikácia je krokom od „laboratórnej“ smerom k fenotypovej klasifikácii dyslipidemií\*.
2. Je jednoduchá, realizovateľná v každom biochemickom laboratóriu na veľkom počte probandov.
3. Je ekonomicky nenáročná.
4. Výsledky boli validované na niekoľkých iných veľkých súboroch probandov.

\* Podľa významových slovníkov aj laboratórne hodnoty je možné považovať za „fenotyp“, ale v bežnej lekárskej činnosti za fenotyp považujeme iné vlastnosti (vek, hmotnosť, prítomnosť xantómov na koži, ikterus a pod.).

5. Výsledky boli konfrontované s meraniami niektorých pokročilých ukazovateľov lipidového metabolizmu (apoproteín B, analýza počtu a rozmerov lipoproteínov metódou nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie a i.).

### Otázky v súvislosti s návrhom novej klasifikácie

1. Nie je celkom isté, či je potrebný návrat k Fredericksonovej klasifikácii.
2. Základný obrázok (Obr. 1. v práci Gaško a kol., 2022) práce je mierne zavádzajúci – pri prvom pohľade vyzerá tak, akoby najčastejšie boli typy I a V. Asi by bolo lepšie jednotlivé typy uviesť vo forme tabuľky (Tab. 1).
3. Väčšina probandov bola v skupinách bez klasickej dyslipidémie a len málo v triedach dyslipidemiických (približne 4 : 1).
4. Mnohí probandi už boli na liečbe, čo skresľuje informáciu poskytovanú pri vyšetrení probandov na úrovni prvého kontaktu. Veľa probandov v triedach s „normolipidémiou“ sa tam dostalo vďaka liečbe.
5. Zaradenie 3 tried s „normolipidémiou“ má z hľadiska patofyziológie význam, ale budú potrebné ďalšie štúdie na hodnotenie vývoja ukazovateľov lipidového metabolizmu časom a v súvislosti s prítomnosťou ostatných činiteľov rozvoja aterosklerózy a jej následkov predovšetkým u probandov pred začatím liečby.

### ZÁVER

Pri posúdení rozvoja rizika je potrebné brať do úvahy, že patogenéza aterosklerózy a jej klinicky manifestných následkov je extrémne komplexná. Metódy na posúdenie majú byť v súlade s rozvojom poznatkov základného, experimentálneho a klinického výskumu, ale majú byť realizovateľné v širokom meradle s prihliadnutím na technologické a ekonomické možnosti. Návrh novej klasifikácie je v tomto smere prínosom, otázky okolo jeho zavedenia sa dajú vyriešiť v ďalších štúdiách.

Tabuľka 1. Prehľad zaradenia probandov do jednotlivých tried

Trieda	Charakterizácia	Výskyt*, % n = 11 365
NORM, LOW	lowTG/lowNONHDL	17,0
NORM, MEDIUM	lowTG/medium1NONHDL**	79,1
NORM, HIGH	lowTG/medium2NONHDL	3,9
<b>Spolu normolipidémia: n = 9 425, 82,9%</b>		
Ila	lowTG/highNONHDL	8,6
Iva	mediumTG/lowNONHDL	24,9
IVb	mediumTG/mediumNONHDL	48,5
IIb	mediumTG/highNONHDL	7,9
I	highTG/lowNONHDL	1,0
V	highTG/highNONHDL	7,4
<b>Spolu dyslipidémia: n = 1 940, 17,1%</b>		

V tabuľke sú uvedené údaje zo súboru „NIH“ o celkovom počte 11365 vyšetrení. Najčastejšie zastúpenie v normo- a dyslipidemických triedach bolo v triede „medium“ a IVb (vyznačené farebne). Triedu VI v tabuľke kvôli nízkemu výskytu neuvádzam.

\*Percentuálny výskyt počítaný zvlášť pre triedy normolipidemické a dyslipidemické; \*\*Určité protirečenie je v tom, že triedy „Norm, medium“ a „Norm, high“ majú hodnoty non-HDL v oblasti „medium“

## LITERATÚRA

1. Clouet-Foraison, N. et al. (2017): Advanced lipoprotein testing for cardiovascular diseases risk assessment: a review of the novel approaches in lipoprotein profiling. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 55, 1453–1464. doi: 10.1515/cclm-2017-0091.
2. Ďurovcová E. a kol. (2020): *Klinická biochémia, vybrané kapitoly*. Osveta, Martin. 301 s., ISBN 978-80-8063-489-6.
3. Fredrickson, D. S., Levy, R. I., Lees, R. S. (1967): Fat transport in lipoproteins—an integrated approach to mechanisms and disorders. *New Engl. J. Med.*, 276, 34–42.
4. Gaško, R., Hefler, M., Pirošková Z. (2022): Nový fenotypový klasifikačný systém dyslipidémií (Sampson) založený na štandardnom lipidovom paneli. *Laboratórna Diagnostika*, 27(1).
5. Gorabi, A. M. et al. (2020): Epigenetic control of atherosclerosis via DNA methylation: a new therapeutic target? *Life Sci.*, 253:117682. doi: 10.1016/lfs.2020.117682.
6. Khoury, S. et al. (2018): Quantification of lipids: model, reality, and compromise. *Biomolecules*, 8:174. doi: 10.3390/biom8040174.
7. Jabor, A., Franeková, J. Kubíček, Z. (2020): *Principy interpretace laboratorních testů*. 2. přepracované a doplněné vydání, Praha, Grada Publishing, 456 s., ISBN 978-80-271-1272-2.
8. Josefs, T., Boon, R. A. (2020): The long non-coding road to atherosclerosis. *Curr. Atherosclerosis Rep.*, 22:55 doi: 10/1007/s1883-020-00872-6.
9. Koplev, S. et al. (2022): A mechanistic framework for cardiometabolic and coronary artery diseases. *Nature Cardiovasc. Res.* 1, 85—100. doi 10.1038/s44131-021-00009-1.
10. Langlois, M.R. et al. (2020): European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Joint Consensus Initiative. Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 58(4): 496—517. doi: 10.1515/cclm-2019-1253.
11. Libby, P. (2021): The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, 592, 524—533. doi: 10.1038/s41586-021-03392-8.
12. Sampson, M. et al. (2021): A new phenotypic classification system for dyslipidemias based on the standard lipid panel Lipids. *Health. Dis.*, 20, 170. doi: org/10.1186/s12944-021-01585-8
13. Tada, H., Takamura M., Kawashiri M. A. (2020): What is the mechanism of genetic contribution to atherosclerosis? *J. Atherosclerosis*, 307, 72—74 doi: 10.1016/j.atherosclerosis. 2020.05.006



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 49–59

## LIPOPROTEÍN (A): PREČO, AKO A KEDY HO STANOVOVAŤ LIPOPROTEIN (A): WHY, HOW AND WHEN TO MEASURE IT

**Turay Jozef**

Oddelenie klinickej biochémie a hematológie, Poliklinika – LDCH, s r. o., Detva

e-mail: jturay@upcmail.sk

*prehľadová práca*

### SÚHRN

Lp(a) – lipoproteín(a) je samostatný rizikový faktor pre rozvoj aterosklerózou podmienených kardiovaskulárnych ochorení, cerebrovaskulárnych ochorení, ochorení periférnych ciev a kalcifikácií aortálnej chlopne. Lp(a) pozostáva z LDL a LDL príbuzných častíc, na ktoré je naviazaný špecifický apolipoproteín(a) – apo(a). Apo(a) obsahuje reťazec variabilného počtu kringlových domén, ktoré tvoria 40 rôznych Lp(a) izoformiem, čo vedie k veľkej heterogenite Lp(a) častíc. Heterogenita častíc spôsobuje problémy v analytike pri stanovovaní Lp(a) v príprave referenčného materiálu, štandardizácii a validácii Lp(a). Doteraz neexistovala reálna liečba na ovplyvňovanie Lp(a), preto medzinárodné odporúčania pre prevenciu aterosklerózy ukladali stanoviť Lp(a) raz za život pacienta. Teraz sa situácia zmenila, lebo nová liečebná molekula antisense oligonucleotid – pelacarsen je schopná znižovať Lp(a) až o 80 %. Nutné je časté monitorovanie liečby- stanovovanie Lp(a), štandardizovanie stanovovania Lp(a), medzilaboratórne porovnateľné testy pre multicentrické štúdie a použiť matematickú korekciu Friedewaldovej rovnice vzhľadom na Lp(a).

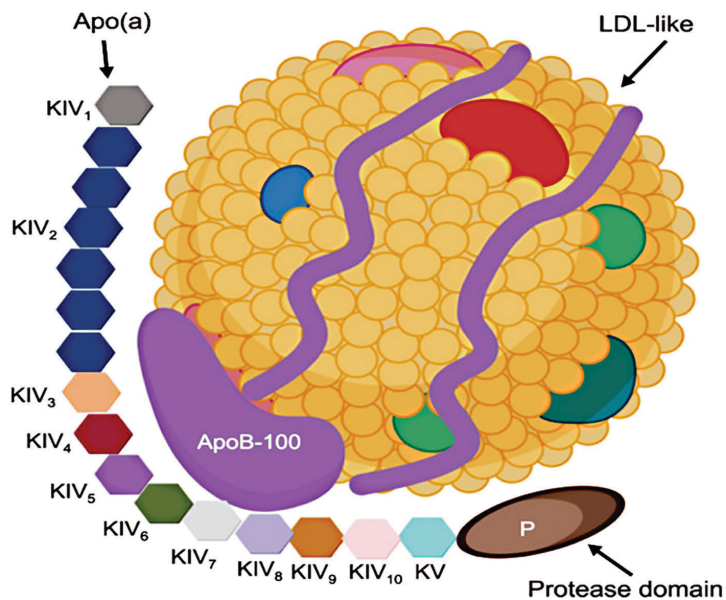
**Kľúčové slová:** lipoproteín(a); apolipoproteín(a); štruktúra; referenčný materiál; štandardizácia.

### ABSTRACT

Lp(a) – lipoprotein(a) is an independent risk factor contributing to development of a number of cardiovascular, cerebrovascular and peripheral arterial diseases and calcific aortic valve disease. Lp(a) is composed of LDL and LDL-like particles to which a specific apo(a) –apolipoprotein(a)—is bound. Apo(a) contains a chain of a variable number of kringle domains giving rise to 40 different Lp(a) isoforms which, in turn, is the cause of an appreciable heterogeneity of Lp(a) particles. The heterogeneity of such particles causes a number of issues affecting analytic procedures, determination of Lp(a) levels, preparation of reference materials and standardization and validation of Lp(a) assay methods. Up to this time, there has been no treatment aimed at affecting Lp(a) levels. Thus, international guidelines for the prevention of atherosclerosis recommend that Lp(a) levels be assessed at least once in the patient's lifespan. This, however, has changed as the novel drug pelacarsen (an antisense oligonucleotide) is able to reduce Lp(a) levels by up to 80 %. Frequent monitoring of the treatment is required involving Lp(a) assays, standardization of Lp(a) assays, interlaboratory comparable assays for multicentric trials and mathematical correction of the Friedewald equation for Lp(a).

**Key words:** lipoprotein(a); apolipoprotein(a); structure; reference materials; standardization





Obr. 1. Štruktúra lipoproteínu(a), (Liu a kol., 2021)

## ÚVOD

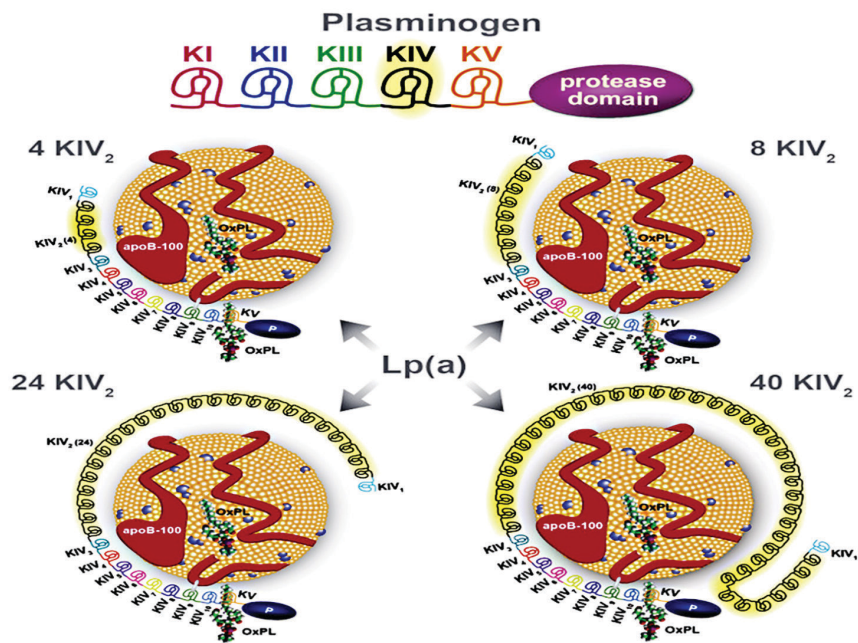
Lp(a) – lipoproteín(a) sa skladá z LDL častice, na ktorú je kovalentne naviazaný apolipoproteín(a) väzbou s apolipoproteínom B-100, ktorý je súčasťou v LDL častice. Molekulárny pomer apo(a) : apoB je 1 : 1. Apolipoproteín(a) je glykoproteín, ktorý sa skladá z 10 podtypov K4 kringlových domén (KIV1–KIV10), čo je základná štruktúra apolipoproteínu(a). KIV1 a KIV3–KIV10 majú jednu kópiu v apolipoproteíne (a), táto časť je označovaná aj ako konštantný región (Obr. 1).

Kringle KIV2 môže mať 3–40 kópií v závislosti od génovej expzie génov LPA. Počtom kópií KIV2 sú determinované izoformy apo(a). Niektorí autori uvádzajú 52–54 kópií KIV2 (Kostner a kol., 2013). Základná štruktúra apo(a) je homológna s plazminogénom.

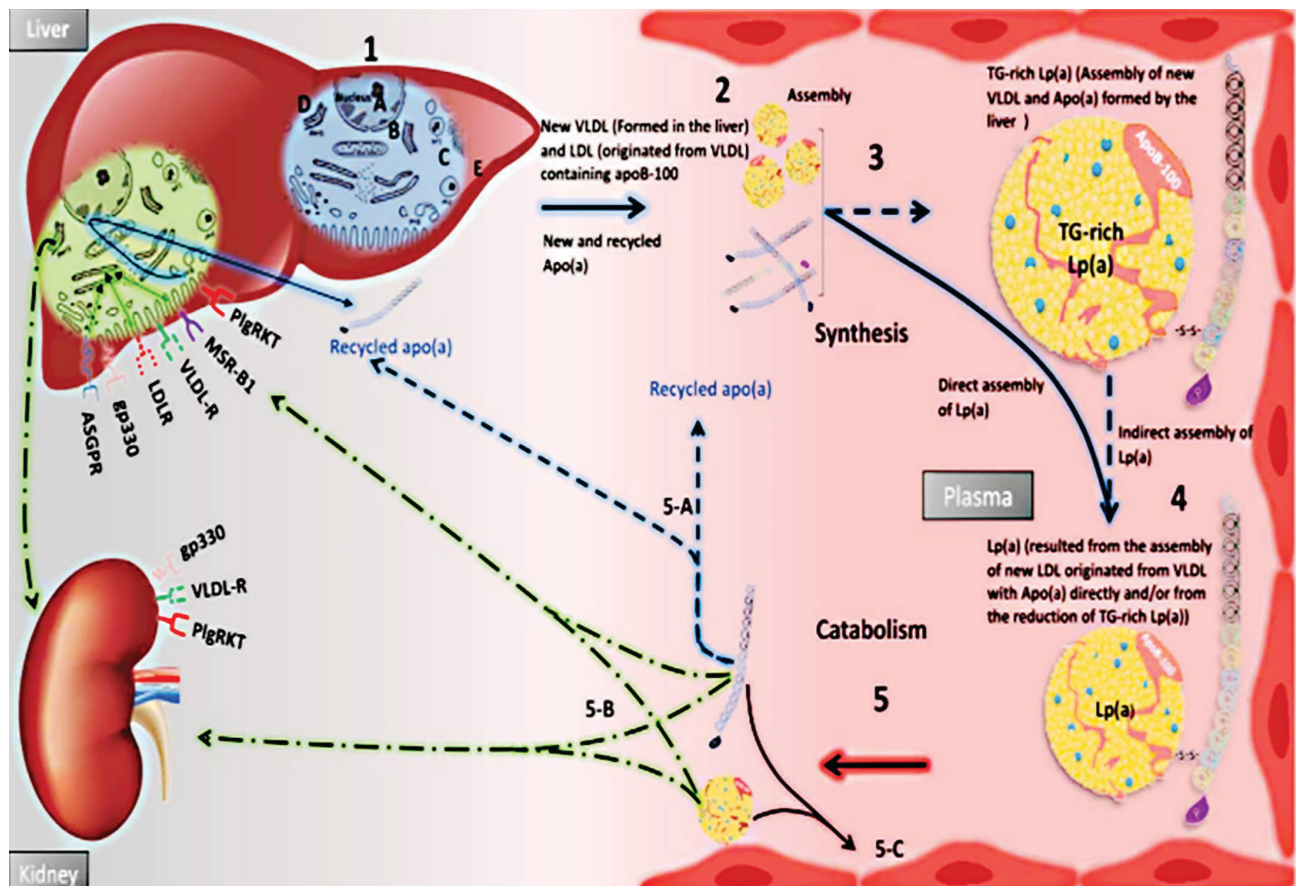
Obr. 2 ukazuje porovnanie Lp(a) s plazminogénom a veľkosť Lp(a) v závislosti od množstva kringlov KIV2.

Takáto veľká variabilita častice Lp(a) je jedinečným úkazom, lebo ostatné lipoproteíny majú relatívne konštantnú hmotnosť (Tsimikas, 2017). Viac ako 80 % ľudí má dve alely s rôznou veľkosťou pre-apo(a), preto jednotlivci môžu mať veľkosťou dve veľké, dve malé alebo dve zmiešané izoformy apo(a) (Enkhmaa a kol., 2016). Hmotnosť apo(a) je geneticky daná a kolíše v rozmedzí 275–800 kDa, čo spôsobuje veľké interindividuálne rozdiely. Medzi hmotnosťou izoforiem apo(a) a Lp(a) je negatívna korelácia, lebo malé apo(a) sú rýchlejšie syntetizova-

né pečeňou, čo vedie k vyššej koncentrácii Lp(a) v plazme, a naopak, veľké apo(a) sú syntetizované pomalšie a vedú k nižšej koncentrácii Lp(a) v plazme (Tsimikas, 2017, Enkhmaa a kol., 2016). Stravovacie zvyklosti a fyzická aktivita minimálne ovplyvňujú hladinu Lp(a) v plazme, lebo Lp(a) je determinovaný hlavne LPA génmi. Významné sú etnické rozdiely. Treba zdôrazniť, že v častici Lp(a) je viac premenných, ktoré určujú jej hmotnosť. Okrem apoB a cholesterolu je to aj množstvo triacylglycerolov, cholesterolových esterov, fosfolipidov a glycidov, ktoré sa môžu meniť a ovplyvňovať hmotnosť Lp(a). Všetky hore uvedené premenné faktory spôsobujú problémy pri príprave referenčného materiálu a štandardizácii vyšetřovania Lp(a) a najmä problémom sú rozdiely pri vyjadrovaní hmotnosti Lp(a) v mg% a vyjadrovaní koncentracie Lp(a) v nmol·L<sup>-1</sup>. Výskumy z posledných rokov okolo apo(a) umocňujú dané rozdiely. Apo(a) je výlučne syntetizované v pečevných bunkách. Problematické ostáva miesto naviazania („montovania“) apo(a) k LDL, ktoré spolu tvoria časticu Lp(a). Na základe izotopových kinetických štúdií s apo(a) k tejto väzbe dochádza intracelulárne (Fischmann a kol., 2012) alebo na povrchu pečevných buniek. Navyše apo(a) recirkuluje (Sharma a kol., 2017) a nachádza sa v plazme aj vo voľnej forme asi v 5 percentách z celkového apo(a). Novo syntetizované apo(a) uvoľňované z pečevných buniek sú nadväzované na apoB obsahujúce molekuly tvoriac Lp(a) aj s VLDL, ktoré sú postupne transformované na Lp(a) so štruktúrou LDL (Obr. 3). Niektoré apo(a) sú



Obr. 2. Porovnanie veľkosti lipoproteínu(a) a plazminogénu (Tsimikas, 2017)



Obr. 3. Model tvorby a odbúravania lipoproteínu(a) (Jawi a kol., 2020)

viazané priamo na LDL. Lp(a) bohaté na triacylglyceroly – TG-remnant Lp(a) – sú metabolizované a apo(a) je uvoľňované pre recirkuláciu (Sharma a kol., 2017). Katabolizmus apo(a) nie je dobre preskúmaný, predpokladá sa že hlavnými miestami katabolizmu sú pečeň a obličky. Poznanky, či sa apo(a) viaže na apoB obsahujúce lipoproteíny v pečeni alebo v plazme, získame asi v blízkej budúcnosti na základe liečby liekmi významne ovplyvňujúcimi Lp(a). Čas, po ktorom apo(a) a LDL zanikajú v plazme sa rôzni. Pri apo(a) je to 11 dní a pri LDL je to 5 dní (Diffenderfer a kol., 2016).

Päťbodový model na Obr. 3 je zostavený na základe izotopových kinetických štúdií apo(a):

1. Produkcia Lp(a) v pečeňových bunkách:
  - a) transkripcia génov apo(a) do mRNA v jadre,
  - b) vplyv translácie na rýchlosť produkcie apo(a),
  - c) v endoplazmatickom retikule prebieha skladanie kringlov apo(a),
  - d) v Golgiho aparáte dochádza ku glykácii apo(a),
  - e) transport na povrch bunky.
2. Miesto skladania Lp(a) presne nepoznáme.
3. apo(a) sa nadväzuje na triacylglyceroly bohaté na apoB častice.
4. Lp(a) obsahujúce triacylglyceroly je remodelované redukciami triacylglycerolov na častice LDL, resp. Lp(a).
5. Katabolizmus a klírens apo(a) a LDL prebieha separátne:
  - a) fragment apo(a) sa odštiepuje proteolytickou aktivitou elastázy a metaloproteináz, ktoré sú produkované bunkami arteriálnej steny. Takto vzniknuté apo(a) sa spája so súborom apo(a) produkovaným pečeňovými bunkami,
  - b) apo(a) je internalizované receptormi pečeňových buniek: scavengerovým receptorom B1, VLDL receptorom, plazminogénovým receptorom KT-(PIgRKT), asialoglykoproteínovým receptorom-(ASGRP), megalínovým receptorom (LRP-2/Gp330), členom rodiny LDL-receptorov. Po prijatí týmito receptormi apo(a) môže recyklovať,
  - c) obličkovými receptormi, megalínovým (LRP-2/Gp330) receptorom, VLDL receptorom a plazminogénovým receptorom-KT-(PIgRKT). Mnohé štúdie predpokladajú účasť obličiek na katabolizme Lp(a), ale priame dôkazy doteraz chýbajú. Navyše, klírens Lp(a) môže prebiehať aj v iných tkanivách, lebo VLDL-R sa nachádzajú aj v srdci, pľúcach

a tukovom tkanive. Plazminogénové receptory sa nachádzajú v mnohých tkanivách a megalínové receptory (LRP-2/Gp330) sa nachádzajú v pľúcach, mozgu a makrofágoch (Albers a kol., 2007).

Na druhej strane je množstvo dôkazov, že obličky zohrávajú dôležitú úlohu v klírense Lp(a):

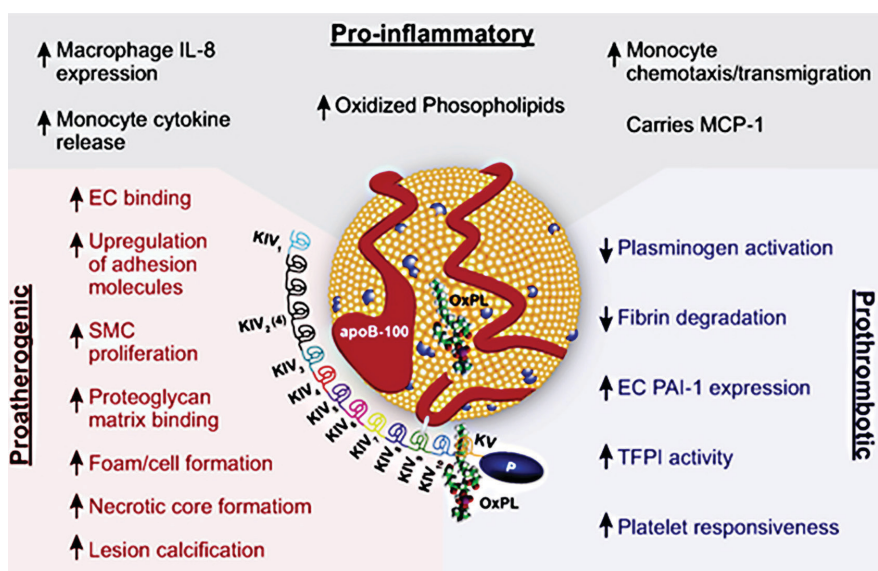
1. plazmatická koncentrácia Lp(a) stúpa pri zhoršenej funkcii obličiek,
2. zvyšovanie hladiny Lp(a) negatívne koreluje s glomerulárnou filtračnou rýchlosťou,
3. hladina Lp(a) v renálnych vénach je nižšia než v aorte.

Všetky tieto dôkazy a ďalšie iné nie sú dostatočnými na to, aby boli obličky určené ako hlavné miesto katabolizmu Lp(a) (Albers a kol., 2007, Reyes-Soffer a kol., 2017).

### Prečo stanovovať Lp(a)

Dnes na základe množstva skúmaní považujeme Lp(a) za príčinný faktor v rozvoji aterosklerózy a jej komplikácií (Tsimikas a kol., 2021), akými sú ischémia myokardu a infarkt myokardu, akútne cievne mozgové príhody, obliterácia periférnych artérií a kalcifikácia aortálnej chlopne. Lp(a) svojimi vlastnosťami a homológiou s plazminogénom ovplyvňuje aj trombotickú aktivitu pre aterosklerotickú aktivitu, zápalovú aktivitu (Obr. 4) a kalcifikačné procesy v aortálnej chlopni.

Aktivita Lp(a) podporujúca zápal je spôsobovaná najmä oxidovanými fosfolipidmi, ktorých hlavným prenášačom je Lp(a) (van Dijk a kol., 2012). Malé formy Lp(a) sú aterogénnejšie než veľké formy, lebo ľahšie prenikajú cez endoteliálnu bariéru. Lp(a) zvyšuje zápalovú reakciu prenosom oxidovaných fosfolipidov (viď Obr. 4), uvoľňovaním interleukínu-8 z makrofágov, produkciou cytokínov z monocytov, podporuje transmigráciu monocytov cez bariéru endotelov a prenáša monocytový proteín chemoatraktant. Proaterogénne aktivity Lp(a) sú spôsobované zvýšeným spájaním sa s extracelulárnymi komponentami subendotélia, zvýšenou aktivitou adhézných molekúl, Lp(a) sa viaže na subendoteliálne proteoglykany, podporuje tvorbu penových buniek, formáciu nekrotického jadra aterómového plátu a kalcifikáciu aterómového plátu. Protrombotické aktivity Lp(a) sú charakterizované zníženou aktivitou plazminogénu, znížením fibrínovej degradácie, zvýšenou aktivitou plazminogénového inhibítora, zvýšením aktivity inhibítora tkanivového faktora a zvýšenou senzibilitou trombocytov. Lp(a) a jeho komponenty



Obr. 4. Proaterogénne, prozápalové a protrombotické účinky lipoproteínu(a), (Tsimikas, 2017)

sú významné v rozvoji kalcifikácie aortálnej chlopne. Lp(a) a hlavne apo(a) s oxidovanými fosfolipidmi a autotaxínom prispievajú podstatnou mierou ku kalcifikácii aortálnej chlopne (Bolfá, Koschinsky, 2019). Aktivujú prokalcifikačné a osteogénne gény v chlopňových intersticiálnych bunkách (Zhenget a kol., 2019). Lp(a) v styku s intersticiálnymi bunkami chlopne spôsobuje hydroxyapatitové depozity a kalcifikáciu chlopne (Yu a kol., 2017).

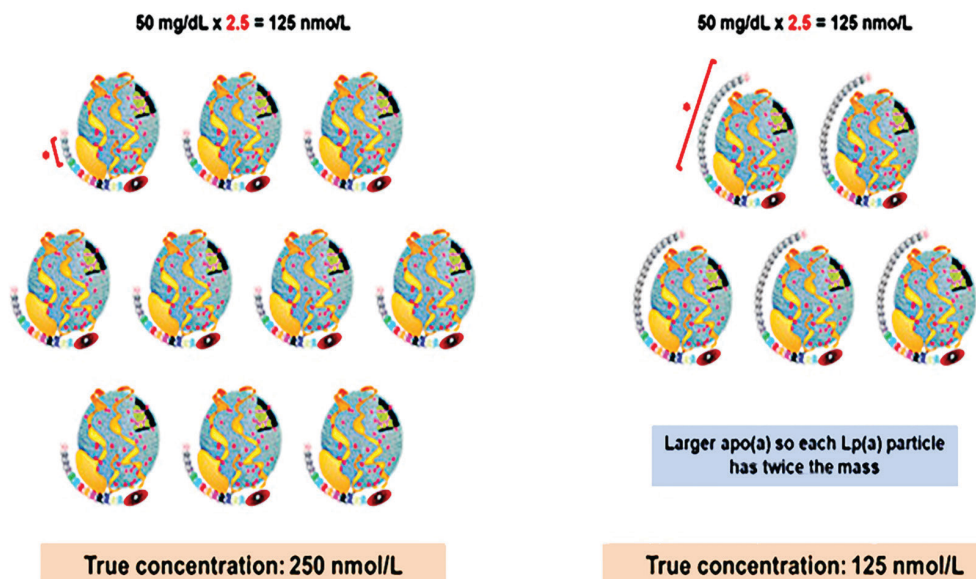
### Ako stanovovať Lp(a)

Prvé relevantné stanovenie Lp(a) bolo vykonané Albersom v roku 1977 RIA metódou (Albers a kol., 1977). Vzhľadom na to, že ešte nebola dostatočne poznaná štruktúra Lp(a) autori purifikovali Lp(a) z plazmy od jedného donora a separátne stanovili proteíny, lipidy a cukry. Suma týchto komponentov v mg% bola použitá ako kalibrátor. Dnes vieme, že toto je neakceptovateľné, ak uvážime dobre známu extrémnu variabilitu veľkosti a hmotnosti apo(a). Dnes sú stanovenia Lp(a) v praxi vykonávané na základe antigén-protilátkových vyšetrení – turbidimetria, nefelometria, za použitia špecifických protilátok proti apo(a). Tieto vyšetrenia majú dva hlavné problémy. Prvým problémom je už spomínaná geneticky podmienená variabilita apo(a), ktorá spôsobuje, že Lp(a) kolíše od menej ako 2 mg% do 2500 mg% (Jawi a kol., 2020), tým interindividuálna variácia v plazme môže byť až 1000-násobná. Ďalším problémom je vyjadrovanie Lp(a) v mg% – hmotnosť, resp. koncentrácia Lp(a) nmol·L<sup>-1</sup> (SI sústava). Obr. 5.

Obr. 5 ukazuje vzťahy medzi hmotnosťou a koncentráciou Lp(a) častíc pri rôznych veľkostiach apo(a) izoforiem. Čo sa týka hmotnosti častíc, je viac častíc Lp(a) ak sú apo(a) menšie, menej častíc ak sú apo(a) väčšie. Ak stanovenie vyjadrujeme v mg% zistujeme rovnakú „koncentráciu“ u oboch skupín, ale menšie formy apo(a) majú dvojnásobnú koncentráciu v nmol·L<sup>-1</sup>. Na základe dnešných poznatkov vieme, že apo(a) sa môže viazať na všetky apoB-100 obsahujúce lipoproteíny, ktoré majú rôznu hmotnosť, čo ešte viac zväčšuje bias.

Na Obr. 5. 50 mg% Lp(a) znamená 250 nmol·L<sup>-1</sup> pri malých apo(a) a 125 nmol·L<sup>-1</sup> pri veľkých apo(a). Používanie konverzného faktoru sa neodporúča, lebo nezohľadňuje heterogenitu apo(a) čo vedie k nesprávosti výsledkov a chybnú klinickú interpretáciu (Ianuzzo a kol., 2021). Z Obr. 5 vidieť, že konverzný faktor 2,5 dáva rovnakú hodnotu pre obe skupiny 125 nmol·L<sup>-1</sup>, ale skutočná hodnota je 250 nmol·L<sup>-1</sup> resp. 125 nmol·L<sup>-1</sup>. Dnes komerčne vyrábané diagnostické súpravy pre automatické analyzátory používajú na odstránenie variácie apo(a) 5-bodové kalibrátory, ktoré redukujú závislosť stanovenia od variácie apo(a), ale nie úplne. Protilátky nesmú byť senzitivné voči jednotlivým kringle zmenám. Pochopiteľne, že sú aj iné metódy na stanovenie Lp(a). Zlatým štandardom je ELISA vyšetrenie na základe monoklonálnych protilátok, ktoré nie sú závislé na variabilite kringle IV2, a sú použité protilátky proti konštantnému kringle IV9 (Marcovina a kol., 2021). Preto je táto metóda označovaná ako zlatý

50 mg/dL reported for each sample  
Suggested conversion factor: 2.5

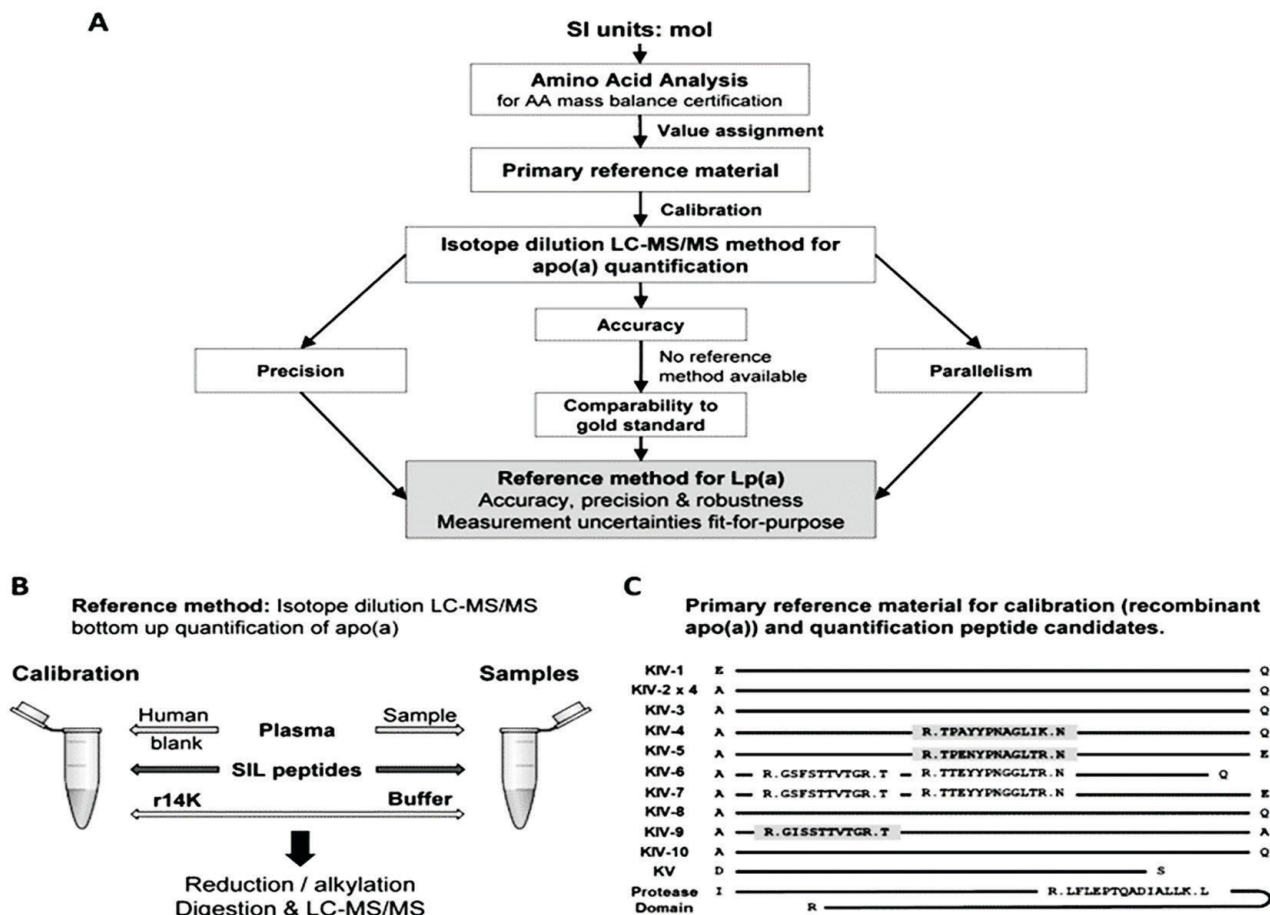


Obr. 5. Lipoprotein(a) – konverzné vzťahy medzi hmotnosťou a koncentráciou pri rôznych veľkostiach apo(a) izoformiem (Virani a kol., 2022)

štandard Lp(a) kvantifikácie. Hoci ELISA metóda je najpresnejšia zo všetkých metód používaných na stanovenie antigén-protilátkového komplexu, môže byť ovplyvňovaná konformačnými zmenami proteínov. Sú aj iné metódy na stanovenie Lp(a) ako napríklad Latex aglutinačná metóda, elektroforéza, imunofixačná elektroforéza (Wyness, Genzen, 2021) a VAP (vertical autoprotile method), ktorá sa ukázala ako problematická (Yeang a kol., 2016). Vzhľadom na praktické potreby a automatizovateľnosť vyšetrení sú turbidimetria a nefelometria metódy, ktoré potrebujeme aby boli presné, správne a porovnateľné. Pri porovnaní piatich metódik (Diazyme, Kaymia, Med Test, Randox a Roche) stanovených na analyzátore Roche Cobas c501, boli metodiky konfigurované pre vyjadrenie v mg%. Linearita bola potvrdená vo všetkých testoch. Nepresnosť bola v rozmedzí CV 2, 5–5, 2 %. Metódy Diazym a Med Test mali bias 26, 3 % resp. 21, 4 %. Kaymia – 23 %, Roche – 18 % a Randox – 6, 7 % (Wyness, Genzen, 2021). Pri konfigurácii v  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  – Randox, Diazym separátne, bol bias 6, 5 %. Je evidentné, že v harmonizácii stanovení Lp(a) je treba vyvinúť ešte veľa úsilia. Iná práca porovnávala 6 metód stanovenia Lp(a): metódy v mg% Denka Seiken, Abbott Quantia, Diasys 21 FS, Beckman, and Siemens N latex, alebo v  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Roche Tina Quant, Diasys21 FS. Výsledky porovnania testov boli divergentné (od

cieľových hodnôt 43, 3 mg%, resp. 96, 6  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ): –8 % pri súprave Siemens N Latex a +22 % pri Abbott Quantia (Scharnagl a kol., 2019). Komerčné imunologické metódy pre stanovenie Lp(a) sú rôzne kalibrované, bias metódik je významný a metodiky sú v klinicky relevantnej hranici nelineárne. Toto sa nedá vysvetliť len fenotypovou rozdielnosťou apo(a), (Scharnagl a kol., 2019). Preto je nutná medzinárodná harmonizácia Lp(a) stanovení. Pre harmonizáciu vyšetrení je potrebné, aby metóda nebola senzitivná voči izoformám Lp(a). Toto je problém aj preto lebo sú častice Lp(a), ktoré sú nekovalentne naviazané na triacylglyceroly bohaté na apoB-100 častice, čo môže viesť k zvýšeným hodnotám pri imunoturbidimetrických vyšetreniach. Iná možnosť je používať metódy, ktoré nie sú založené na používaní protilátok napr. používanie hmotnostnej spektrometrie. Vzhľadom na množstvo vyšetrení, ktoré bude potrebné vykonať, toto nie je ideálna cesta. Cesta k harmonizácii vyšetrení spočíva aj v inovácii kalibrácie, resp. prípravy referenčného materiálu. Doteraz je používaný a medzinárodne uznávaný WHO/IFCC referenčný materiál (Dati a kol., 2004). Z toho vyplývajú zásady pre stanovenie Lp(a):

- a) lipoprotein(a) by mal byť stanovovaný metódou, pri ktorej je efekt veľkosti izoformiem apo(a) minimalizovaný použitím vhodných protilátok a kalib-



Obr. 6. Návrh referenčnej metódy pre kvantifikáciu apo(a) v plazme (Marcovina a kol., 2021)

rátory sú v nadväznosti na WHO/IFCC referenčný materiál,

b) výsledky stanovovania Lp(a) sú uvádzané v  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

c) nie je vhodné používať prepočítavací faktor z  $\text{mg}\%$  na  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

d) odporúča sa ako vhodné pre stanovenie Lp(a) použitie Denka Seiken reagentov s kalibrátorom v  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  v nadväznosti na WHO/IFCC referenčný materiál (Cegla a kol., 2019).

Novšie pohľady na stanovenie Lp(a) uvádzajú, že aj referenčný materiál WHO/IFCC je z niektorých pohľadov problematický, lebo je vytvorený zo 4 po sebe nasledných krokov, vykonaných je 27 testov (vychádza z aminokyselínovej bázy kringle IV19) a neznáma je komutabilita WHO/IFCC referenčných materiálov (Cobbaert a kol., 2021). Potrebný je nový referenčný materiál, ktorý bude zohľadňovať požiadavky ISO. ISO technická komisia 212, pracovná skupina 2 pripravila viacero ISO medzinárodných stan-

dardov. Medzi nimi ISO15193 (požiadavky na referenčné metódy a postupy), ISO15194 (požiadavky na referenčný materiál), ISO15195 a 17025 (požiadavky a kompetencie kalibračných laboratórií) a ISO17511: 2020 (metrologická nadväznosť na kalibrátory). Všetky uvedené ISO štandardy vytvárajú globálnu infraštruktúru a návody pre štandardizáciu testov používaných v medicíne. Hmotnostná spektrometria je pripravená ako prvá skutočná metóda na tvorbu referenčných metód (Rappold, 2021). Čo sa týka malých molekúl, ako vhodná metóda sa javí kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS), (Hoofnagle a kol., 2021). Táto metóda je vhodná pre kvantifikáciu proteínových peptidových fragmentov, ktoré vznikajú enzymatickou proteolýzou. Kalibrácia s peptidovými štandardami má tri dôležité kritériá:

- peptidy a označený vnútorný štandard musí byť v procese enzymatického štiepenia stabilný,
- vybratý štandard z peptidov musí byť čistý,

- c) musí byť dokázateľné ekvimolárne tvorenie vybra- tých peptidov (Hoofnagle a kol., 2021).

IFCC pracovná skupina pre kvantifikáciu apolipoproteínov spolupracuje, s metrologickým inštitútom a Joint Research Centre (JRC) v Belgicku, ktoré je kandidátom pre referenčné laboratórium založené na LC-MRP-MS (MRM—multiple reaction monitoring) – pre tvorbu referenčného materiálu apolipoproteínov v spolupráci biochemikmi a genetikmi. Referenčný systém stanovovania apolipoproteínov je dvojkrokový, okrem tvorby referenčného laboratória a materiálu je vypracovaný aj systém referenčnej procedúry, na ktorom sa zúčastňovali laboratória univerzitných nemocníc v Lipsku – Nemecko, Leiden – Holandsko a Atlanta Georgia – USA (Cobbaert a kol., 2021).

V roku 2021 bol predstavený systém, ktorý je kandidátom na referenčnú metódu a štandardizáciu Lp(a), Obr. 6.

Návrh referenčnej metódy pre kvantifikáciu apo(a) v plazme podľa Obr. 6 (Marcovina a kol., 2021) ukazuje:

- vývoj a validáciu referenčnej metódy v SI sústave,
- kvantifikačnú stratégiu s cieľom izotopovej dilúcie LC-MS/MS – načrtáva prípravu vzoriek kalibrátorov,
- sekvenciu rekombinácie apo(a) kalibrátorov- rekombináciu apo(a) a kvantifikáciu peptidových kandidátov.

Táto metóda dobre koreluje s ELISA metódou, ktorá sa dodnes považuje za zlatý štandard. Definitívne výsledky by mali byť známe koncom roku 2022 (Cobbaert a kol., 2021).

### Kedy stanovovať Lp(a)

Lp(a) pokladáme za príčinný faktor v rozvoji aterosklerózy. Doteraz ale nebola účinná liečba, ktorá by bola schopná potvrdiť, či ovplyvňovanie Lp(a) vedie k poklesu aterosklerózou podmienených kardiovaskulárnych ochorení, čo je rozhodujúce pre odporúčania pre liečbu jednotlivých patologických stavov a neboli presne stanovené cut-off hodnoty (dohodnutá hodnota, oddeľujúca od seba fyziologické a patologické hodnoty). Nová liečba na základe antisense oligonukleotidov známa ako AKCEA-APO(a) – LRx licencovaná firmou Novartis ako liek pelacarsen bola použitá na klinickú štúdiu HORIZONT (NCT4023552), (Ionis Pharmaceutical News, 2021), ktorá má ukázať či selektívne znižovanie Lp(a) vedie k poklesu kardiovaskulárneho rizika. Štúdia prebieha od roku 2019 do roku 2025, kedy budú definitívne výsledky. Štúdia bude zahrňovať 7680 probandov. Predbežné výsledky a výsledky iných štúdií

(Karwatowska-Prokopczuk a kol., 2021, Tsimikis a kol., 2020) naznačujú úspešnosť liečby, preto sú tvorené nové odporúčania pre ovplyvňovanie Lp(a), ktoré zatiaľ nie sú jednotné a harmonizované. V bežnej populácii (Copenhagen General Population Study) sa stupňovalo riziko na báze percentilovej distribúcie nasledovne: ako malé riziko bolo označené Lp(a) 32–90 nmol·L<sup>-1</sup>, stredné riziko 90–200 nmol·L<sup>-1</sup> a vysoké riziko 200–400 nmol·L<sup>-1</sup> a viac ako 400 nmol·L<sup>-1</sup> veľmi vysoké riziko (Cegla a kol., 2021).

AHA/ACC 2018 (American Heart Association/American College of Cardiology) uvádzajú cieľovú hodnotu 50 mg% a indikácie pre vyšetrovanie a) pozitívnu rodinnú anamnézu predčasných kardiovaskulárnych ochorení (KVO) alebo pacientov s KVO bez iných rizikových faktorov, b) dospelých vo veku 40–75 rokov, bez iných príznakov s hypercholesterolémiou (Liu a kol., 2021).

ESC/EAS (European Society of Cardiology/European Atherosclerosis Society) 2019 – cieľová hodnota 50 mg%, indikácie pre vyšetrovanie:

- vykonať raz za život, aby boli identifikovaní vysokorizikoví jedinci, to sú pacienti, ak Lp(a) je viac ako 180 mg% (> 430 nmol·L<sup>-1</sup>) a majú KVO, alebo familiárnu hypercholesterolémiu,
- pacienti s rodinnou anamnézou predčasných KVO (Liu a kol., 2021).

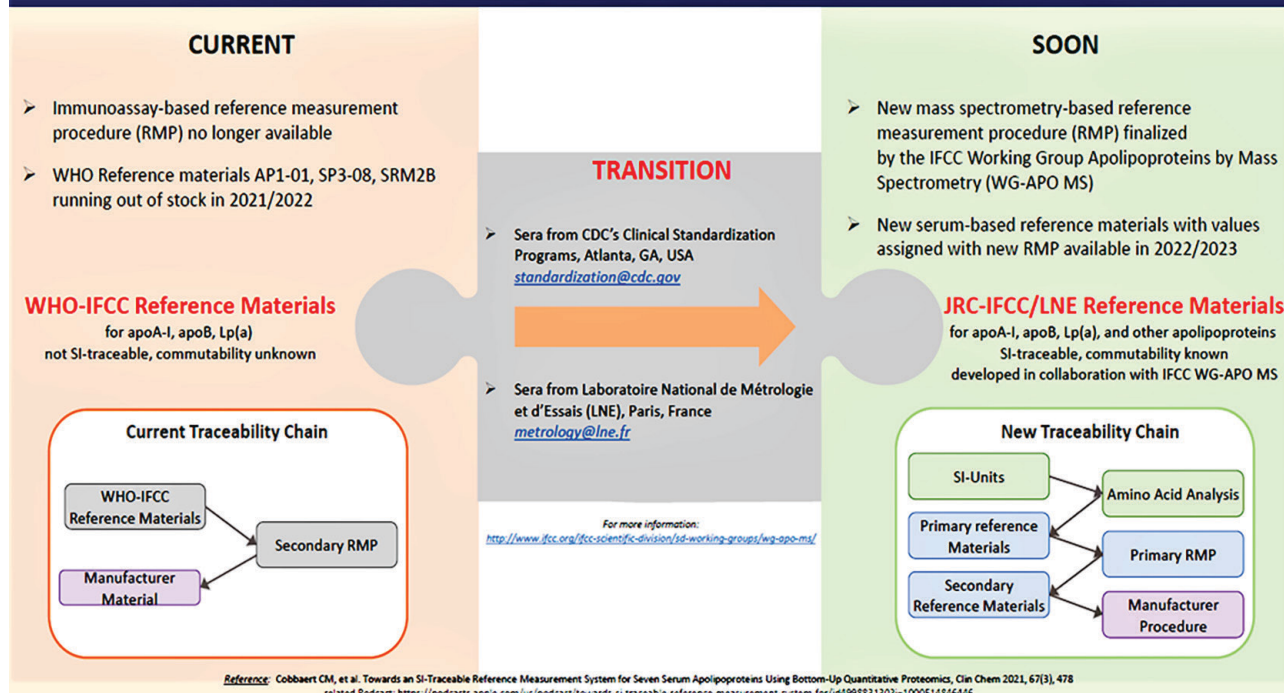
Podľa UK (United Kingdom Consensus) – je potrebné stanovovať Lp(a) :

- ak sa jedná o predčasné KVO < 60 rokov u jednotlivca, alebo v rodine,
- ak prvostupňoví príbuzní majú Lp(a) > 200 nmol·L<sup>-1</sup>,
- ak sú to pacienti s familiárnou hypercholesterolémiou, alebo inou geneticky podmienenou dyslipoproteinémiou,
- ak je prítomná stenóza a kalcifikácia aortálnej chlopne,
- ak je prítomné stredne zvýšené 10-ročné riziko kardiovaskulárnych ochorení (Cegla a kol., 2019).

Education in cardiovascular medicine odporúča stanovovať Lp(a):

- u pacientov v sekundárnej prevencii kardiovaskulárnych ochorení (KVO),
- u pediatrických pacientov s KVO,
- u pacientov v primárnej prevencii s vysokým rizikom Lp(a) > 150 mg% (375 nmol·L<sup>-1</sup>),
- s familiárnou hypercholesterolémiou a Lp(a) > 70 mg% (175 nmol·L<sup>-1</sup>),

## METROLOGICAL TRACEABILITY OF APOLIPOPROTEIN TESTS: TRANSITIONING TO AN SI-TRACEABLE REFERENCE MEASUREMENT SYSTEM



Obr. 7. Metrologická nadväznosť apolipoproteínových testov: transformácia na SI metrologickú nadväznosť systému stanovovania (Cobbaert a kol., 2021)

- e) so SCORE (riziko KVO) > 10 % + Lp(a) > 70 mg% (175 nmol·L<sup>-1</sup>),
- f) pacienti so stenózou aortálnej chlopne (Stroes a kol., 2021). Okrem indikácii vyšetrení a cut-off stanovení Lp(a) je potrebné stanovovať aj pre korekciu Friedewaldovej rovnice na výpočet LDL-C. Doteraz bol do výpočtu LDL-cholesterolu ((LDL-C) zahrnutý aj Lp(a).

EAS a EFLM (European Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) odporúčajú korigovať hodnoty LDL-C na základe nasledovných rovníc (Shah a kol., 2020) LDL-C upravené pre Lp(a)(mg%) = LDL-C(mg%) – [Lp(a) mg% × 0,30]. LDL-C upravené pre Lp(a)(mmol·L<sup>-1</sup>) = LDL-C (mmol·L<sup>-1</sup>) – [Lp(a) mmol·L<sup>-1</sup> × 0,0078].

AHA/ACC a EAS odporúčajú cut-off hodnoty 50 mg% a viac ako hodnotu, ktorá znamená zvýšené kardiovaskulárne riziko. 30 mg% Lp(a) je hranica od ktorej začína stúpať riziko KVO (Mach a kol., 2019).

## DISKUSIA A ZÁVER

Jedným zo základných problémov vo vzťahu k Lp(a) je to, že napriek vyše 50-ročnému skúmaniu nepoznáme jeho fyziologickú funkciu v organizme človeka. Všetky doterajšie skúmania sú ovplyvnené nejednotnou metodikou stanovenia a vyjadrovania v mg% resp. v nmol·L<sup>-1</sup> a to sa deje aj pri analytických procesoch tak, že v niektorých prípadoch sú kalibrátory prepočítavané prepočtovým faktorom. Dnes vieme, že to nie je možné. Veľké sú etnické rozdiely v hodnotách Lp(a). Distribúcia Lp(a) u černoškého obyvateľstva je väčšinou gaussovská, zatiaľ čo u kaukazského obyvateľstva nachádzame asymetrické rozdelenie Lp(a), asi 50 % obyvateľstva má Lp(a) menej ako 10 mg%, asi 25 % má Lp(a) viac ako 30 mg% (Cobbaert a kol., 2021). Afričania majú najvyššie hodnoty Lp(a), nasleduje potom zostupným trendom Južná Ázia, kaukazské obyvateľstvo, Hispánci a obyvatelia Východnej Ázie (Tsimikas, 2017). Aj preto môže byť Lp(a) ako rizikový faktor v jednotlivých štúdiách variabilný. Faktorov, ktoré sú v súvislosti s Lp(a) nedoriešené, je viacero. Jedným zo závažných problémov je, že napr. statíny, ktoré jednoznačne lie-



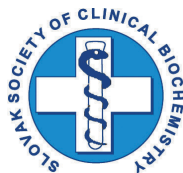
čia aterosklerózou podmienené ochorenia (KVO), zvyšujú Lp(a) o 20 %, čo môže spôsobovať v niektorých prípadoch znížený účinok liečby. Základným kľúčom k problému okolo Lp(a) je vyriešenie bezproblémovej analytiky Lp(a), ktorá by mala byť doriešená tento rok na medzinárodnej úrovni. Rozdiel medzi terajším stavom a blízkou budúcnosťou ukazuje Obr. 7

Ľavá strana Obr. 7 ukazuje terajší stav reťazca nadväznosti WHO/IFCC referenčného materiálu pre Lp(a), ktorý nie je v metrologickej nadväznosti na SI sústavu a nepoznáme komutabilitu. Pravá strana obrázku ukazuje nový reťazec nadväznosti Lp(a) referenčného materiálu na SI sústavu pri známej komutabilite.

## LITERATÚRA

1. **Albers, J. J., Adolphson, J. L. and Hazzard, W. R. (1977):** Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1016/s0022-2275(20)41683-9.
2. **Albers, J. J., Koschinsky, M. L. and Marcovina, S. M. (2007):** Evidence mounts for a role of the kidney in lipoprotein(a) catabolism. *Kidney International*. doi: 10.1038/sj.ki.5002240.
3. **Boffa, M. B., Koschinsky, M. L. (2019):** Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. doi: 10.1038/s41569-018-0153-2.
4. **Cegla, J. et al. (2019):** HEART UK consensus statement on Lipoprotein(a): A call to action. *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.10.011.
5. **Cegla, J. et al. (2021):** Lp(a): When and how to measure it. *Annals of Clinical Biochemistry*. doi: 10.1177/0004563220968473.
6. **Cobbaert, C. M. et al. (2021):** Towards an SI-Traceable Reference Measurement System for Seven Serum Apolipoproteins Using Bottom-Up Quantitative Proteomics: Conceptual Approach Enabled by Cross-Disciplinary/Cross-Sector Collaboration. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/hvaa239.
7. **Dati, F. et al. (2004):** First WHO/IFCC International Reference Reagent for Lipoprotein(a) for Immunoassay—Lp(a) SRM 2B. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. doi: 10.1515/CCLM.2004.114.
8. **Diffenderfer, M. R. et al. (2016):** Distinct metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein(a). *Metabolism: Clinical and Experimental*. doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.031.
9. **Enkhmaa, B., Anuurad, E. and Berglund, L. (2016):** Lipoprotein (a): Impact by ethnicity and environmental and medical conditions. *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1194/jlr.R051904.
10. **Frischmann, M. E. et al. (2012):** *In vivo* stable-isotope kinetic study suggests intracellular assembly of lipoprotein(a). *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.031.
11. **Hoofnagle, A. N. et al. (2021):** Should LC-MS/MS Be the Reference Measurement Procedure to Determine Protein Concentrations in Human Samples? *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/hvaa256.
12. **Iannuzzo, G. et al. (2021):** Lipoprotein(A) where do we stand? from the physiopathology to innovative therapy. *Biomedicines*. doi: 10.3390/biomedicines9070838.
13. **Ionis Pharmaceutical News (2021), Aug 02:** Dostupné na: <http://www.ionispharma.com> (cit. 15. 3. 2022)
14. **Jawi, M. M., Frohlich, J., Chan, S. Y. (2020):** Lipoprotein(a) the Insurgent: A New Insight into the Structure, Function, Metabolism, Pathogenicity, and Medications Affecting Lipoprotein(a) Molecule. *Journal of Lipids*. doi: 10.1155/2020/3491764.
15. **Karwatowska-Prokopczuk, E. et al. (2021):** Prevalence and influence of LPA gene variants and isoform size on the Lp(a)-lowering effect of pelacarsen. *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.036.
16. **Kostner, K. M., März, W. and Kostner, G. M. (2013):** When should we measure lipoprotein (a)? *European Heart Journal*. doi: 10.1093/eurheartj/ehz053.
17. **Liu, T., Yoon, W. S., Lee, S. R. (2021):** Recent Updates of Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease. *Chonnam Medical Journal*. doi: 10.4068/cmj.2021.57.1.36.
18. **Mach, F. et al. (2020):** 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
19. **Marcovina, S. M. et al. (2021):** Development of an LC-MS/MS Proposed Candidate Reference Method for the Standardization of Analytical Methods to Measure Lipoprotein(a). *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/hvaa324.
20. **Rappold, B. A. (2021):** Clinical Protein Analysis by Mass Spectrometry: A New Higher Order. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/hvaa335.
21. **Reyes-Soffer, G., Ginsberg, H. N., Ramakrishnan, R. (2017):** The metabolism of lipoprotein (a): An ever-evolving story. *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1194/jlr.R077693.

- 22. Shah, N. P. et al. (2020):** Lipoprotein (a): An Update on a Marker of Residual Risk and Associated Clinical Manifestations. *American Journal of Cardiology*. doi: 10.1016/j.amjcard.2020.03.043.
- 23. Sharma, M. et al. (2017):** Recycling of apolipoprotein(a) after PLgRKT-mediated endocytosis of lipoprotein(a). *Circulation Research*. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310272.
- 24. Scharnagl, H. et al. (2019):** Comparison of lipoprotein (a) serum concentrations measured by six commercially available immunoassays. *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.015.
- 25. Stroes, E., Kronenberg, I., Sattar, N. (2021):** Lp(a): From CV risk marker to therapeutic target. PACE-CME-education innovation in cardiovascular medicine. Dostupné na: <https://pace-cme.org/2021/09/08-L-1p-a-from-cv-risk-marker-to-the-therapeutic-target/> (cit 15.3.2022)
- 26. Tsimikas, S. (2017):** A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *Journal of the American College of Cardiology*. doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.042.
- 27. Tsimikas, S. et al. (2018):** NHLBI Working Group Recommendations to Reduce Lipoprotein(a)-Mediated Risk of Cardiovascular Disease and Aortic Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.014.
- 28. Tsimikas, S. et al. (2020):** Lipoprotein(a) Reduction in Persons with Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/nejmoa1905239.
- 29. Van Dijk, R. A. et al. (2012):** Differential expression of oxidation-specific epitopes and apolipoprotein(a) in progressing and ruptured human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1194/jlr.P030890.
- 30. Virani, S. S. et al. (2022):** Global think tank on the clinical considerations and management of lipoprotein(a): The top questions and answers regarding what clinicians need to know. *Progress in Cardiovascular Diseases*. W. B. Saunders. doi: 10.1016/J.PCAD.2022.01.002.
- 31. Wyness, S. P., Genzen, J. R. (2021):** Performance evaluation of five lipoprotein(a) immunoassays on the Roche cobas c501 chemistry analyzer. *Practical Laboratory Medicine*. doi: 10.1016/j.plabm.2021.e00218.
- 32. Yeang, C., Clopton, P. C., Tsimikas, S. (2016):** Lipoprotein(a)-cholesterol levels estimated by vertical auto profile correlate poorly with Lp(a) mass in hyperlipidemic subjects: Implications for clinical practice interpretation of Lp(a)-mediated risk. *Journal of Clinical Lipidology*. doi: 10.1016/j.jacl.2016.09.012.
- 33. Yu, B. et al. (2017):** Lipoprotein(a) Induces Human Aortic Valve Interstitial Cell Calcification. *JACC: Basic to Translational Science*. doi: 10.1016/j.jacbts.2017.03.015.
- 34. Zheng, K. H. et al. (2019):** Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.070.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 60–66

## **METABOLIZMUS LIPIDOV POČAS RAKOVINY A ICH DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL LIPID METABOLISM DURING CANCER AND THEIR DIAGNOSTIC POTENTIAL**

**Hurajtová Anna<sup>1</sup>, Guľašová Zuzana<sup>2</sup>  
Hertelyová Zdenka<sup>2</sup>, Tomečková Vladimíra<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

<sup>2</sup>Ústav experimentálnej medicíny, UPJŠ LF, Košice

e-mail: vladimira.tomeckova@upjs.sk  
*prehľadová práca*

### **SÚHRN**

Lipidy sú zdrojom energie a základnými stavebnými zložkami všetkých živých buniek. Strava má vplyv na vznik rakoviny, na obsah špecifických lipidov v membráne buniek a metabolizmus lipidov. Experimenty potvrdili preprogramovaný metabolizmus rakovinových buniek na bunkových aj zvieracích modeloch, ktoré sú popísané v tomto prehľadovom článku. Výsledky týchto štúdií ukazujú, že rast rakoviny a metastáz môžu byť indukované alebo inhibované exogénnymi lipidmi v diéte. Vybrané lipidové markery môžu byť skúmané pomocou rôznych biologicko-chemických analýz: PCR, ELISA, Western blot, plynovej chromatografie (GC-FID) a kvapalinovej chromatografie (LC-MS/MS; UPLC/ICPMS). Sledovaním vybraných markerov by sme chceli experimentálne detegovať vybrané signálne cesty lipidov, ktoré sa podieľajú na rakovine prsníka.

**Kľúčové slová:** lipidy; rakovina; metabolické preprogramovanie; signalizácia; autofágia

### **ABSTRACT**

Lipids are the source of energy and the basic building blocks of all living cells. The cancer is closely linked to diet, by the presence of specific lipids in the cell membrane, and lipid metabolism. This claim is supported by the experiments on the reprogrammed metabolic mechanism in human cancer cells and in animal models that are described in this review article. The results of these studies indicate that cancer growth can be induced or inhibited by exogenous dietary lipids. Selected lipid markers are determined by various biochemical analyzes: PCR, ELISA, Western blot, gas chromatography (GC-FID) and liquid chromatography (LC-MS/MS; UPLC/ICPMS). By monitoring selected markers, we would like to experimentally detect selected lipid signaling pathways that are involved in breast cancer.

**Key words:** lipids; cancer; metabolic reprogramming; signaling; autophagy

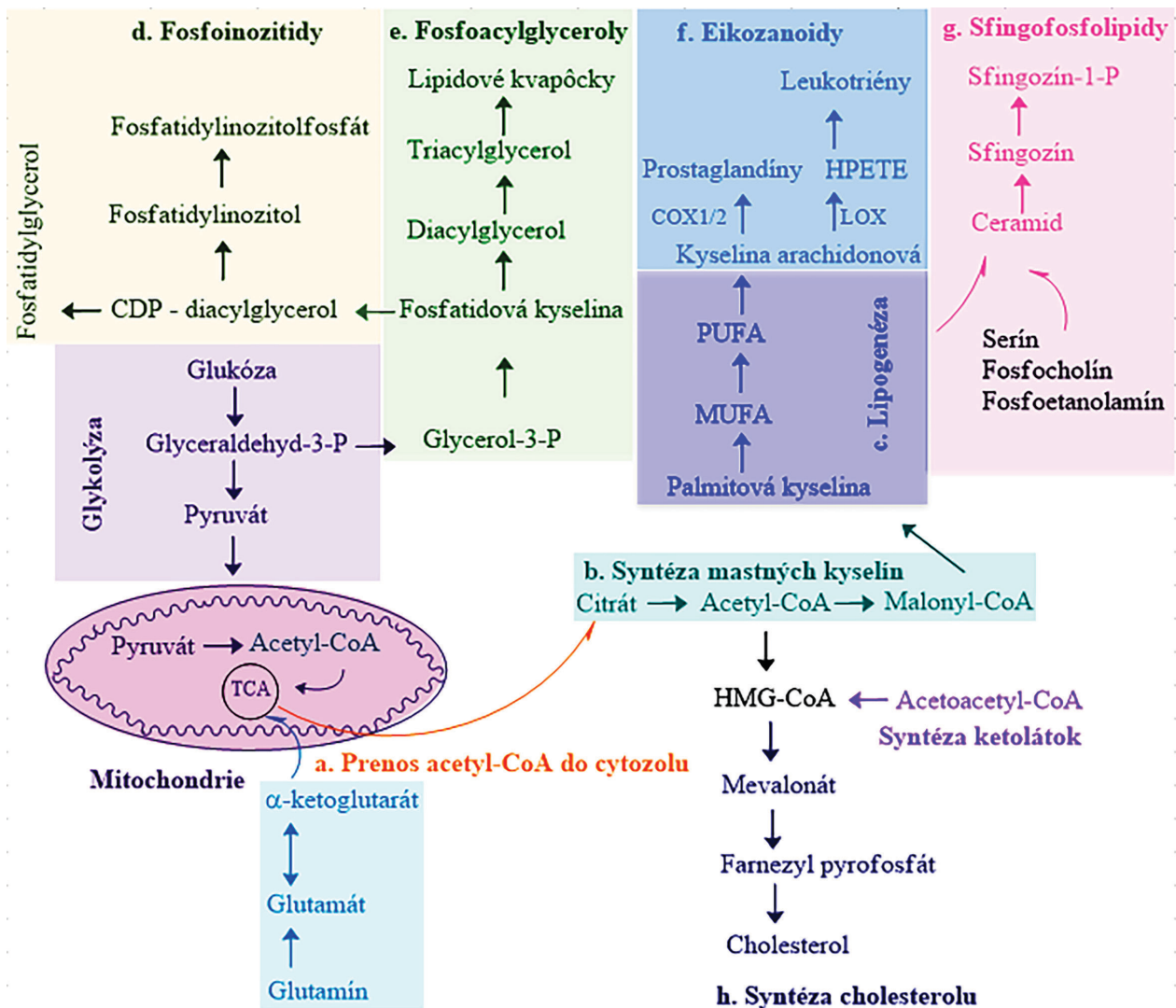
## ÚVOD

Zjednodušene možno nádory popísať ako akumulujúci sa biomateriál s nekontrolovaným abnormálnym rastom buniek, rýchlym delením a množením, potrebou stáleho zdroja energie a živín, o ktorý súťažia so zdravými bunkami. Mnohé druhy rakoviny sa prispôbili svojmu nepriaznivému súťaživému prostrediu zmenou svojich metabolických profilov, preprogramovaním sa. Biosyntéza základných stavebných jednotiek bunky: proteínov, mastných kyselín a nukleových kyselín je modifikovaná a dysregulovaná tak, aby sa zvýšila proliferácia a rast buniek. Na biosyntézu lipidovej membrány nádorových buniek sú potrebné najmä lipidy a mastné kyseliny, a preto sa zvy-

šuje syntéza nasýtených mastných kyselín, mononenasýtených kyselín aj zložitých lipidov (Karagiota, Chachami, Paraskeva, 2022).

## Metabolizmus lipidov v nádoroch

Mastné kyseliny a ich deriváty tvoria základnú štruktúru bunkovej membrány, slúžia ako zásobáreň energie a ako mediátory v bunkových signálnych dráhach. V bunkách sa lipidy buď získavajú z potravín alebo sa syntetizujú z acetyl-CoA. Acetyl-CoA vzniká v mitochondriách, v ktorých enzým **pyruvátdehydrogenáza** premieňa pyruvát na acetyl-CoA. Acetyl-CoA sa následne premení na citrát pomocou **citrátsyntázy**. Pomocou citrátu sa acetyl-coA z mitochondrií transportuje do cytozolu, kde prebieha



Obr. 1. Schematické zobrazenie syntézy lipidov

a – Prenos acetyl-CoA z mitochondrií do cytozolu pomocou citrátu; b – syntéza mastných kyselín; c – predlžovanie reťazca mastných kyselín, vznik mononenasýtených a polynenasýtených mastných kyselín; d – syntéza fosfoinozítidov; e – syntéza fosfoacylglycerolov; f – syntéza eikozanoidov; g – syntéza sfingofosfolipidov; h – syntéza cholesterolu; upravené podľa Baenke, Miess, Schulze, 2013

syntéza mastných kyselín. Z citrátu v cytozole pomocou **ATP citrátlyázy** vzniká acetyl-CoA, z ktorého **acetyl-CoA karboxylázou** vzniká malonyl-CoA. Malonyl-CoA sa viaže na ACP proteín (acylový nosičový proteín) a opakovane sa predlžuje **syntázou mastných kyselín** za vzniku 16-uhlíkovej kyseliny palmitovej. Kyselinu palmitovú možno ďalej desaturovať, predlžovať za vzniku derivátov nenasýtených mastných kyselín, ktoré slúžia ako stavebné zložky na syntézu iných lipidov: fosfoglyceridov, fosfoinozitolov, eikozanoidov a sfingolipidov (Bian a kol., 2021) (Obr. 1).

Pri prebytku sacharidov sa pyruvát premieňa na acetyl-CoA, aby slúžil ako prekurzor mastných kyselín. Glukóza je primárnym prekurzorom biosyntetizovaných mastných kyselín nádorov, nie je metabolizovaná citrátovým cyklom, ale prednostne glykolýzou. Farmakologická inhibícia **syntázy mastných kyselín** u myší a opíc zlepšila metabolizmus glukózy a potlačila zápal v makrofágoch. Kyselinu palmitovú možno predĺžiť na stearovú pomocou **elongázy** vyšších mastných kyselín. Keď je inaktivovaná **elongáza** vyšších mastných kyselín, indukuje obezitu. K ďalšiemu predlžovaniu reťazca mastných kyselín môže dôjsť buď v mitochondriách pomocou **enoyl-CoA reduktázy** alebo v mikrozómoch. Reťazec mastnej kyseliny sa predlžuje, kým sa nedosiahne vhodná dĺžka. Mastné kyseliny sú potom esterifikované glycerolom za vzniku triacylglycerolov (Nigam a kol., 2022; Brenna, Kothapalli, 2022).

Acetyl-CoA sa tiež používa na syntézu cholesterolu mevalonátovou cestou. Tento proces zahŕňa najprv premenu acetyl-CoA na lanosterol (cez medziprodukty zahŕňajúce

3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA, mevalonát, izopen-tenylpyrofosfát, farnezylypyrofosfát a skvalén), ktorý sa potom viacstupňovým enzymatickým procesom premení na cholesterol.

V nádoroch sú bežne upregulované **ATP citrátlyáza**, **acetyl-CoA** karboxyláza, syntáza mastných kyselín a bolo preukázané, že inhibícia alebo zníženie aktivity týchto enzýmov obmedzuje rast rakovinových buniek. Upregulácia enzýmov súvisiacich so syntézou mastných kyselín prebieha prostredníctvom transkripčného faktora, proteínu viažuceho sterolový regulačný element (SREBP). SREBP transkripčne kontroluje viaceré gény pre syntézu a vylučovanie rôznych mastných kyselín, cholesterolu, triacylglycerolov a fosfolipidov a je regulovaný komplexom mTORC1 (King, Singh, Mehla, 2022).

Predchádzajúce štúdie rôznych druhov rakoviny popisali dysreguláciu signalizácie mTORC1 pri sprostredkovaní

proliferácie rakovinových buniek. Signalizácia komplexom mTORC1 vedie k upregulovanej biosyntéze mastných kyselín v rakovinových bunkách aktiváciou SREBP. Dysregulácia komplexu mTORC1 hrá ústrednú metabolickú úlohu pri podpore rastu a proliferácie rakovinových buniek tým, že im umožňuje preprogramovať ich metabolizmus. Signalizácia komplexu mTORC1 zvyšuje aj biosyntézu proteínov a nukleotidov (Yi a kol., 2020).

### Angiogenéza a lipidy

V normálnych zdravých bunkách počas embryonálneho vývoja a hojenia rán sa nové cievy tvoria pomocou VEGF-A (Apte, Chen, Ferrara, 2019).

V nádorovej angiogenéze je významným lipidom sfingozín-1-fosfát. Funkcia sfingozín-1-fosfátu je porovnateľná s rastovými faktormi VEGF-C a bFGF. Sfingozín-1-fosfát stimuluje angiogenézu. Interakcie medzi sfingozín-1-fosfátom a proangiogénnymi rastovými faktormi VEGF-C a bFGF podporujú rozvoj cievnej siete (Balaji Rangunathrao, 2019).

VEGF-C je hlavným mediátorom lymfangiogenézy a diseminácie metastáz v lymfatických uzlinách. Signály VEGF-C aktivujú v endotelových bunkách tvorbu SREBP1 a SREBP2, aby indukovali proliferáciu, migráciu a tvorbu ciev. Naopak, inhibícia SREBP1 viedla k zníženej tvorbe proangiogénnych faktorov. Metastázy u ľudí s nádorovým ochorením, sú jednou z hlavných príčin úmrtnosti. Angiogenéza a lymfangiogenéza poskytujú nádorom živiny a metastázy.

Aby si rakovinové bunky udržali zvýšené požiadavky na rast, prísun kyslíka a živín, ako aj expanziu do iných tkanív, indukujú angiogenézu. Mikroprostredie nádoru sa skladá z rôznych heterogénnych typov buniek. Keď sa nádor zväčšuje, dochádza k hypoxii, nedostatku živín a k tvorbe VEGF-C a cytokínov a vylučovaniu do jeho okolitého mikroprostredia, čo iniciuje angiogenézu. Tvorba cievy môže poskytnúť nádoru viac kyslíka a živín, ale v konečnom dôsledku tento stav nie je ideálny. Cievny systém nádoru má nepravidelný tvar, presakuje a často je funkčne abnormálna (Apte, Chen, Ferrara, 2019).

Vyššia priepustnosť nádorových ciev indukuje zhromažďovanie krvných doštičiek, ktoré následne uvoľňujú do mikroprostredia angiogénne stimulačné faktory na ďalšiu podporu angiogenézy. Tieto novovytvorené nádorové krvné cievy podporujú disemináciu metastáz do iných tkanív. Nádorové bunky môžu využívať na disemi-

náciu metastáz aj lymfatickú cievnú cestu. Cievny systém nádorov je užitočný aj pri odstraňovaní koncových metabolitov napr. kyseliny mliečnej, ktorá sa hromadí vplyvom Warburgovho efektu (Kong a kol., 2021).

### Lipidy ako promótoory rakoviny

Prvé experimenty ukázali, že zloženie lipidov nádorových buniek je odlišné od lipidov normálnych zdravých buniek. Lipidové zloženie závisí od typu nádorového tkaniva a pravdepodobne tiež koreluje so štádiom nádoru.

Lipidy, napríklad sfingolipidy udržiavajú integritu lipidovej dvojvrstvy membrány aj pri zdravej bunke, aj pri rakovine. Sfingozín možno syntetizovať kondenzáciou kyseliny palmitovej so serínom alebo štípením zvyškov mastných kyselín z ceramidov ceramidázou. Výsledný sfingozín je fosforylovaný **sfingozínkinázou**, čím vzniká sfingozín-1-fosfát. Základnou úlohou fosfosfingolipidov na povrchu membrány je zvýšiť fluiditu a selektívnu funkciu lipidovej membrány bunky. Prostredníctvom väzby na viaceré typy bunkových receptorov vstupuje sfingozín-1-fosfát do početných bunkových signálnych dráh. Podporuje proliferáciu, migráciu, inváziu, prežitie rakovinových buniek, vyhýbania sa imunitným odpovediam hostiteľa, malígnu transformáciu, schopnosť predchádzať apoptóze a podporovať rezistenciu voči protirakovinovým terapiám. Inhibícia syntézy sfingolipidov obmedzuje rast tumoru. Sfingozín-1-fosfát sprostredkúva komunikáciu medzi hostiteľskou a rakovinovou bunkou zapojením signalizácie závislej alebo nezávislej od receptora sfingozín-1-fosfátu (S1P) spojeného s G proteínom. Rakovinové bunky uvoľňujú sfingozín-1-fosfát do svojho mikroprostredia, kde sa naviažu na receptory S1P, čo indukuje angiogénu aj lymfangiogénu a uľahčuje šírenie nádoru (Bhadwal a kol., 2020; Hii a kol., 2021).

Expresia sfingozín-1-fosfátu je upregulovaná v rôznych nádoroch rakoviny pľúc a kolorektálneho karcinómu. Vysoké hladiny sfingozín-1-fosfátu zvyšujú migráciu a tvorbu krvných aj lymfatických ciev v endotelových bunkách. Angiogénne a lymfatické metastázy sú stimulované aj sekréciou prostaglandínov. Pri rakovine prsníka sa prostaglandíny PGE(2) viažu predovšetkým na príslušný receptor GPCR a indukujú angiogénne regulačné gény pre proliferáciu, tvorbu ciev a metastáz. Pri rakovine prostaty, PGE(2) aktivuje angiogénu prostredníctvom prostanoidných dráh (Finetti a kol., 2020).

Sfingolipidy a ich deriváty sa podieľajú na regulácii sig-

nálnych kaskád vo viacerých aspektoch patogenézy a terapie rakoviny, či už pri supresii nádorov alebo pri prežívaní rôznych druhov rakoviny (Pani a kol., 2021).

Ceramidy sú syntetizované a sprostredkujú apoptické signály bunky prostredníctvom apoptózy, nekrotózy alebo mitofágie pri strese, pri chemoterapii alebo po vplyve ultrafialového (UV) žiarenia. Boli navrhnuté rôzne spôsoby, ktorými ceramid reguluje apoptózu. Počas apoptózy vyvolanej žiarením, ceramidy aktivujú apoptózu mitochondrií prostredníctvom zvýšenia priepustnosti vonkajšej membrány mitochondrií (Ízgördü a kol., 2020).

Lipidy pôsobia ako endogénne signálne mediátory rakoviny. Vysoké koncentrácie exogénnych lipidov v potrave môžu indukovať tumorigénu a tvorbu metastáz. Viaceré štúdie na myšiach sledovali vplyv vysokolipidovej diéty (vysoký obsah cho-lesterolu a triacylglycerolov) s nevhodným zložením mastných kyselín a vplyv ketogénnej diéty a pozorovali zvýšený rast nádorov a metastáz (Lane a kol., 2021; Zick a kol., 2018; Watanabe a kol., 2020). Vznik rakoviny iniciovali špecifické lipidy prítomné v diéte napr. cholesterol, kyselina palmitová, kyselina palmitolejová. Ketogénna diéta s vysokým obsahom tuku podávaná myšiam *ad libitum* aktivovala signálnu cestu ERK1/2. ERK1/2 zvyšuje signalizáciu mTORC1 v obličkových nádoroch. V inej štúdií diéty s vysokým obsahom tuku zvýšili v krvnom sére myší hladinu acetoacetátu, čo viedlo k zvýšenému rastu nádoru ľudského melanómu (Lope a kol., 2020; Sukumar a kol., 2021).

Ďalším mechanizmom, ktorým by diéty s vysokým obsahom tuku mohli zvýšiť tvorbu nádoru, je signálna cesta Ras-Raf-MEK-ERK pomocou mitogénom aktivovanej proteínkinázy (MAPK), ktorá aktivuje SREBP a lipogénu pri rakovine prostaty s metastázami (Lin a kol., 2022). Nadbytočný príjem cholesterolu, buď prostredníctvom potravy alebo zvýšením endogénnej bunkovej biosyntézy cholesterolu (môže byť aj geneticky podmienená), stimulovalo rast nádorov v gastrointestinálnom trakte buniek. Kyselina palmitová zvyšovala invazívnosť rakovinových buniek pankreasu sprostredkovanou metabolickou cestou cez Toll-like receptor 4 (TLR4). Tieto štúdie naznačujú, že nadbytok lipidov v strave môže iniciovať vznik rakoviny (El-Kharashy a kol., 2021).

### Lipidy ako supresory rakoviny

Polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) inhibujú rozvoj rakoviny. Bežnou  $\omega$ -3 PUFA v diéte je kyselina  $\alpha$ -lino-

lénová (ALA), kyselina eikozapentaénová (EPA) a kyselina dokózahexaénová (DHA) a bežné  $\omega$ -6 v potrave sú kyselina linolová (LA) a kyselina arachidónová (AA). Súčasné trendy naznačujú, že pomer 4 : 1 ( $\omega$ -3 PUFA:  $\omega$ -6 PUFA) majú priaznivé protirakovinové účinky. Zatiaľ čo prevažujúce  $\omega$ -6 PUFA v strave zvyšujú pravdepodobnosť vzniku rakoviny (Giordano a kol., 2020).

Epidemiologický prieskum, ktorý sledoval viac ako 72 000 účastníčok a ich diéty s  $\omega$ -6 PUFA počas 8 rokov ukázal, že keď konzumovali vyššie množstvá  $\omega$ -6 PUFA v porovnaní s  $\omega$ -3 PUFA, zvýšilo sa u nich riziko vzniku rakoviny prsníka. Priaznivé vlastnosti ALA (aj  $\omega$ -3) sú však menšie v porovnaní s EPA a DHA. Na vzniku rakoviny prsníka sa podieľa  $\omega$ -6 PUFA LA, hoci jej úloha je v súčasnosti stále nejasná. Ďalšia  $\omega$ -6 PUFA, AA, sa študuje v kontexte zvyšovania rastu rakoviny prostaty. Presná úloha PUFA pri rakovine s najväčšou pravdepodobnosťou závisí od mnohých ďalších faktorov vrátane typu rakovinových buniek, štádia a metabolizmu hostiteľa týchto PUFA, pričom všetky by sa mali podrobnejšie preskúmať, aby sa PUFA využili v protirakovinovej terapii (Frankhouser, 2022).

### Lipidy ako signálne mediátory pri rakovine

Mnohé signálne hormóny a rastové faktory bunky majú lipidovú štruktúru, napríklad: prostaglandíny, kyselina lyzofosfatidová, steroidné hormóny a iné.

Prostaglandíny sú podtriedou eikozanoidov syntetizované oxidáciou 20-uhlíkových esenciálnych mastných kyselín pomocou **cyklooxygenázy (COX)**. Prostaglandín E2 (PGE(2)) priamo moduluje tumorigenézu, napríklad podávanie exogénneho PGE(2) potkanom viedlo k vyššiemu výskytu a multiplicitě črevných adenómov. K zvýšenej karcinogénze hrubého čreva dochádza prostredníctvom väzby PGE(2) na E-prostanoidné (EP) membránové receptory 1–4 (Shirakami a kol., 2021).

Štúdia *in vitro* ukázala, že liečba s PGE(2) zvýšila proliferáciu epitelových buniek a expresiu COX-2 v črevných adenómoch, o ktorých sa predpokladá, že pôsobia prostredníctvom signálnej cesty **Ras-mitogénom aktivovanej proteínkinázy**. PGE(2) v bunkách pľúcneho karcinómu indukuje tvorbu **MMP-9** a VEGF, centrálnych regulátorov angiogenézy a následne tvorbu metastáz, čo ďalej poukazuje na signálnu úlohu prostaglandínov v progresii rakoviny.

Kyselina lyzofosfatidová je fosfolipid, ktorý sa viaže na receptory spojené s G proteínom (GPCR) na aktiváciu

bunkovej proliferácie, prežitia a migrácie. Na ľudských rakovinových bunkách pečene sa ukázalo, že kyselina lyzofosfatidová sa viaže na lyzofosfatidový receptor 1, a tak aktivuje **MMP-9** a podporuje inváziu rakovinových buniek (Hirata a kol., 2022).

Pri tumorigenéze a expanzii rakoviny dochádza k dysregulovanej expresii a signalizácii kyseliny lyzofosfatidovej. Na tvorbe kyseliny lyzofosfatidovej sa podieľa sekrečný enzým **autotaxín**. Tento enzým je markerom hyperproliferácie a invázivnosti nádoru. Nadmernú expresiu **autotaxínu** a receptorov kyseliny lyzofosfatidovej pozorovali pri niekoľkých rakovinách vrátane glioblastómu a invázivných nádorov rakoviny prsníka (Litchfield a kol., 2021; Lei a kol., 2022).

### Lipidy a autofágia pri rakovine

Recyklácia a cirkulácia lipidov v bunke je regulovaná lyzozómami. Tieto membránové organely obsahujú hydrolytické enzýmy. Degradácia lipidov v lyzozómoch pomocou autofágie udržiava homeostázu bunkových lipidov v rôznych tkanivách. Autofágia je nevyhnutná pre prežitie buniek v podmienkach nedostatku živín, kde lyzozóm degradáciou lipidov, proteínov, membrán aj organel, slúži ako alternatívny zdroj recyklovanej energie.

Dysregulácia autofágie je spojená s množstvom rôznych metabolických, kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení aj starnutím a rakovinou. Okrem svojej úlohy počas hladovania, rastu, diferenciácie a odstraňovania dysfunkčných aj poškodených cytoplazmatických proteínov a organel, bola autofágia pozorovaná aj pri regulácii nádorov rakoviny. Na začiatku tumorigenézy, autofágia pôsobí ako supresor tumoru. Ak rakovina postupuje, autofágia je v bunke nevyhnutná. Rakovinové bunky upregulujú autofágiu pomocou zvýšenia tvorby Ras proteínu, aby podporili tumorigenézu a prežitie nádorových buniek. Materiál bunky označený autofagozómom je určený na degradáciu, počas neskorších štádií autofágie. Predpokladá sa, že lipidové kvapôčky a enzým **fosfolipáza D** regulujú biogénu autofagozómov a autofágiu *in vivo*. Zníženie proteínu **beklínu-1** bolo pozorované pri rakovine vaječníkov, prsníka a prostaty. Hladovaním môže SREBP priamo aktivovať autofágiu. Inhibícia autofágie zosilňuje terapeutické a protirakovinové účinky pri nádorovom ochorení rakovine prsníka, hrubého čreva a ďalších. Lipidy a lipidové enzýmy majú nenahraditeľnú úlohu v autofágii a môžu ovplyvňovať autofágiu v rôznych štádiách.

Signálne molekuly fosfatidylinozitol-3-fosfát, diacylglycerol a fosfatidové kyseliny podporujú autofágiu, a tak znižujú mTORC1 (Ho a kol., 2019; Flynn, Schiemann, 2019; Wijshake a kol., 2021).

## ZÁVER

Zastúpenie lipidov v strave, metabolizmus a signalizácia lipidov majú hlavnú úlohu pri vzniku rakoviny. Pri tomto ochorení sa funkcie enzýmov modifikujú, dysregulujú, môže sa zvýšiť iniciácia biosyntézy a metabolizmus lipidov, dochádza k zmene štruktúry, zloženia a lokalizácie bioaktívnych lipidov v membráne rakovinových buniek. Rast nádorov podporujú rôzne procesy, napr. angiogénna (rast nových ciev), ale aj autofágia zdravých buniek, ako forma recyklácie lipidov pre rast nádorových buniek. Množstvo celkového cholesterolu, triacylglycerolov a HDL sme už stanovili spektrofotometricky. Zmeny zastúpenia mastných kyselín napr. kyseliny palmitovej, palmitolejovej, a-linolénovej, eikozapentaénovej, dokozaheptaénovej sme stanovili pomocou plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID), čomu predchádzala izolácia lipidov zo vzorky krvi a následná transesterifikácia na metylestery mastných kyselín. Plynovou chromatografiou analyticky určíme rôzne lipidy: prostaglandíny, nasýtené mastné kyseliny: napr. kyselinu palmitovú, ale aj monone-nasýtené mastné kyseliny: napr. kyselinu palmitolejovú, polynenasýtené mastné kyseliny: napr.  $\alpha$ -linolénovú, eikozapentaénovú, dokozaheptaénovú, glycerofosfolipidov: napr. kyselinu lyzofosfatidovú. Kvapalinovou chromatografiou stanovíme fosfatidylinozitol-3-fosfát (LC-MS/MS), sfingozín-1-fosfát (LC-MS/MS) a cyklooxygenázu 2 (UPLC/ICPMS). Molekulová úroveň expzie génov mTORC1, SREBP, VEGF-C, beklín-1, autotaxín je študovaná pomocou metódy real-time PCR, kým molekulové zmeny na úrovni proteínov sú sledované pomocou metód Western blot a ELISA. Túto štúdiu by sme chceli experimentálne aplikovať na detekciu metabolického profilu rakoviny prsníka pomocou sledovania vybraných markerov lipidov a ich signálnych ciest v krvnej plazme pacientov.

## LITERATÚRA

1. **Apte, R. S., Chen, D. S., Ferrara, N. (2019):** VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6), pp. 1248—1264. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
2. **Baenke, F., Miess, B.P.H., Schulze, A. (2013):** Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models and Mechanism*, 6(6), pp. 1353—1363. doi:10.1242/dmm.011338.
3. **Balaji Ragunathrao, V. A. et al. (2019):** Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activity Promotes Tumor Growth by Amplifying VEGF-VEGFR2 Angiogenic Signaling. *Cell Reports*, 29 (11), pp. 3472—3487.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.036.
4. **Bhadwal, P. et al. (2020):** LC-HRMS based approach to identify novel sphingolipid biomarkers in breast cancer patients. *Scientific Reports*, 10(1), pp. 4668. doi: 10.1038/s41598-020-61283-w.
5. **Bian, X. et al. (2021):** Lipid metabolism and cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 218(1), pp. e20201606. doi: 10.1084/jem.20201606.
6. **Brenna, J. T., Kothapalli, K. (2022):** New understandings of the pathway of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 25(2), pp. 60—66. doi: 10.1097/MCO.0000000000000810.
7. **El-Kharashy, G. et al. (2021):** Association between serum soluble Toll-like receptor 2 and 4 and the risk of breast cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, 14(2), pp. 38. doi: 10.3892/mco.2020.2200.
8. **Finetti, F. et al. (2020):** Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology (Basel)*, 9(12), pp. 434. doi: 10.3390/biology9120434.
9. **Flynn, A. L. B., Schiemann, W. P. (2019):** Autophagy in breast cancer metastatic dormancy: Tumor suppressing or tumor promoting functions? *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 5, pp. 43. doi: 10.20517/2394-4722.2019.13.
10. **Frankhouser, D. E. (2022):** Dietary omega-3 fatty acid intake impacts peripheral blood DNA methylation -anti-inflammatory effects and individual variability in a pilot study. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 99, pp. 108839. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108839.
11. **Giordano, C. et al. (2020):** n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Amides: New Avenues in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), pp. 2279. doi.org/10.3390/ijms21072279.



12. Hii, L. W. et al. (2021): Sphingosine Kinase 1 Signaling in Breast Cancer: A Potential Target to Tackle Breast Cancer Stem Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, pp. 748470. doi: 10.3389/fmolb.2021.748470.
13. Hirata, N. et al. (2022): Lysophosphatidic Acid Promotes the Expansion of Cancer Stem Cells via TRPC3 Channels in Triple-Negative Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), pp. 1967. doi: 10.3390/ijms23041967.
14. Ho, M. et al. (2019): Exploiting autophagy in multiple myeloma. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 5, pp. 70. doi: 10.20517/2394-4722.2019.25.
15. İzgördü, H. et al. (2020): Characteristics of apoptosis induction in human breast cancer cells treated with a ceramidase inhibitor. *Cytotechnology*, 72(6), pp. 907—919. doi: 10.1007/s10616-020-00436-1.
16. Karagiota, A., Chachami, G., Paraskeva, E. (2022): Lipid Metabolism in Cancer: The Role of Acylglycerolphosphate Acyltransferases (AGPATs). *Cancers*, 14(1), pp. 228. doi: 10.3390/cancers14010228.
17. King, R. J., Singh, P. K., Mehla, K. (2022): The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer. *Trends in Immunology*, 43(1), pp. 78—92. doi: 10.1016/j.it.2021.11.007.
18. Kong, D. et al. (2021): VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk. *Oncogene*, 40(5), pp. 964—979. doi: 10.1038/s41388-020-01539-x.
19. Lane, J. et al. (2021): Ketogenic diet for cancer: Critical assessment and research recommendations. *Nutrients*, 13(10), 3562. <https://doi.org/10.3390/nu13103562>.
20. Lei, J. et al. (2022): Lysophosphatidic acid receptor 6 regulated by miR-27a-3p attenuates tumor proliferation in breast cancer. *Clinical & Translational Oncology: Official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 24(3), pp. 503—516. doi: 10.1007/s12094-021-02704-8.
21. Lin, S. et al. (2022): The Chinese Herbal Formula Ruyan Neixiao Cream Inhibits Angiogenesis of Precancerous Breast Lesions via Regulation of Ras/Raf/MEK/ERK Signaling Pathway. *Integrative cancer therapies*, 21, pp. 15347354211069397. doi: 10.1177/15347354211069397.
22. Litchfield, M. et al. (2021): Positron Emission Tomography Imaging of Autotaxin in Thyroid and Breast Cancer Models Using [18F]PRIMATX. *Molecular Pharmaceutics*, 18(9), pp. 3352—3364. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00265.
23. Lope, V. et al. (2020): Serum Phospholipids Fatty Acids and Breast Cancer Risk by Pathological Subtype. *Nutrients*, 12(10), pp. 3132. doi: 10.3390/nu12103132.
24. Nigam, S. et al. (2022): Nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals dysregulation of monounsaturated fatty acid metabolism upon SPINK1 attenuation in colorectal cancer. *NMR in Biomedicine*, pp. e4705. Advance online publication. doi: 10.1002/nbm.4705.
25. Pani, T. et al. (2021): Alternative splicing of ceramide synthase 2 alters levels of specific ceramides and modulates cancer cell proliferation and migration in Luminal B breast cancer subtype. *Cell death & disease*, 12(2), pp. 171. doi: 10.1038/s41419-021-03436-x.
26. Shirakami, Y. et al. (2021): Inhibitory effects of a selective prostaglandin E2 receptor antagonist RQ-15986 on inflammation-related colon tumorigenesis in APC-mutant rats. *PLoS One*, 16(5), pp. e0251942. doi: 10.1371/journal.pone.0251942.
27. Sukumar, J. et al. (2021): Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(2), pp. 135—148. doi: 10.1080/14737140.2021.1840984.
28. Wijshake, T. et al. (2021): Tumor-suppressor function of Bcl-1 in breast cancer cells requires E-cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(5), pp. e2020478118. doi: 10.1073/pnas.2020478118.
29. Watanabe, M. et al. (2020): Scientific evidence underlying contraindications to the ketogenic diet: An update. *Obes. Rev.*, 2020 Oct., 21(10): e13053. doi: 10.1111/obr.13053.
30. Yi, J. et al. (2020): Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(49), pp. 31189—31197. doi: 10.1073/pnas.2017152117.
31. Zick, S. M., Snyder, D., Abrams, D. I. (2018): Pros and Cons of Dietary Strategies Popular Among Cancer Patients. *Oncology*, (Williston Park). 2018 Nov 15, 32(11): 542—7.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 67–73

## EXOZÓMY ZO SYNOVIÁLNEJ TEKUTINY AKO ZDROJ POTENCIÁLNYCH BIOMARKEROV OSTEOARTRITÍDY SYNOVIAL FLUID-DERIVED EXOSOMES AS A SOURCE OF POTENTIAL BIOMARKERS OF OSTEOARTHRITIS

Morávek Marko, Rosocha Ján, Špaková Tímea  
Združená tkanivová banka, UPJŠ LF, Košice

e-mail: marko.moravek@student.upjs.sk  
*prehľadová práca*

### SÚHRN

Osteoartritída je degeneratívne ochorenie pohybového aparátu trápiace milióny ľudí po celom svete. Preto je výskum v oblasti správnej diagnostiky a efektívnej liečby osteoartritídy veľkou celospoločenskou objednávkou. Exozómy ako extracelulárne produkty buniek s obsahom nukleových kyselín, proteínov a lipidov spĺňajú, okrem iného, aj úlohu medzibunkovej komunikácie a ovplyvňujú biologickú aktivitu buniek. Táto práca sa venuje popisu patogenézy osteoartritídy a biogenézy, zloženia a funkcie exozómov asociovaných s týmto degeneratívnym ochorením. Skúmanie funkcie exozómov pri osteoartritíde pomôže objasniť patogenézu a preskúmať nové potenciálne biomarkery tohto ochorenia.

**Kľúčové slová:** exozómy; biomarkery; osteoartritída

### ABSTRACT

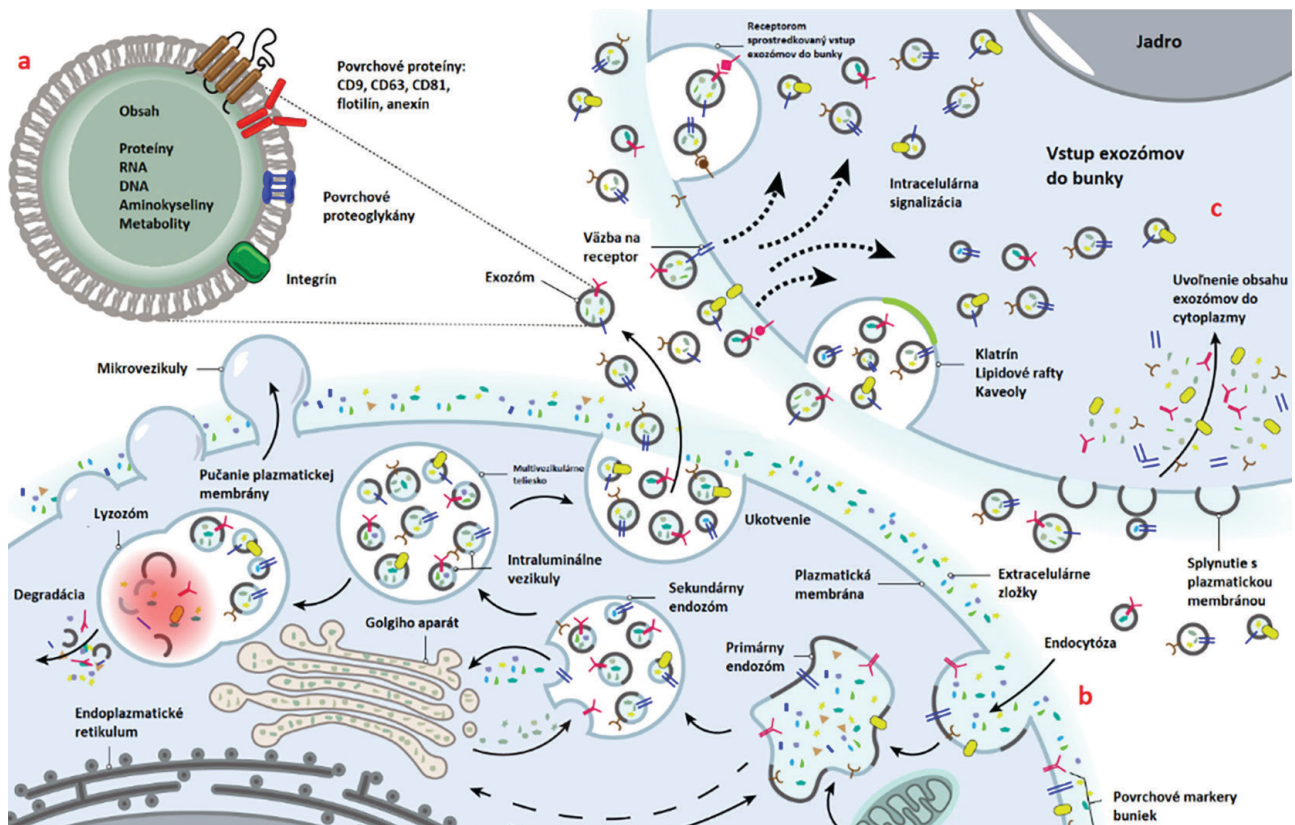
Osteoarthritis is a degenerative disease of the musculoskeletal system affecting millions of people around the world. Therefore, research focusing on the correct diagnosis and effective treatment of osteoarthritis represents a major society-wide order. Exosomes as

extracellular products of cells containing nucleic acids, proteins and lipids fulfill, the role of intercellular communication and affect the biological activity of cells. This article describes the pathogenesis of osteoarthritis and the biogenesis, composition and function of exosomes associated with this degenerative disease. Investigation of exosomes function in osteoarthritis will help to elucidate the pathogenesis and investigate other new potential biomarkers of this disease.

**Key words:** exosomes; biomarkers; osteoarthritis

### ÚVOD

Osteoartritída (OA) kolenného kĺbu patrí medzi najrozšírenejšie ochorenia pohybového aparátu. Je sprevádzaná rôznymi typmi prejavov od bolesti kolenného kĺbu, cez zápal synoviálnej membrány (synovitída) a degeneráciu chrupky až po zväčšenie (hyperplázia) subchondrálnej kosti (Malemud, 2015). Dlho sa predpokladalo, že OA je ochorenie spôsobené primárne mechanickým opotrebovaním chrupky. Základným pilierom tejto teórie bol fakt, že chrupka je tvorená jediným typom buniek – chondrocytmi, ktoré majú nízku metabolickú aktivitu a teda nedokážu obnovovať poškodenú chrupku. Navyše tento typ



**Obr. 1. Biogenéza exozómov**

(a) – zloženie exozómu obsahujúceho proteíny, RNA a DNA molekuly; (b) – viackroková biosyntéza exozómov zahrňujúca endocytózu, vznik endozómov a multivesikulárnych teliesok; (c) – možnosti vstupu exozómov do bunky: receptorom, klatrínom, raftami, fúziou s plazm. membránou bunky (Ni a kol., 2020, upravené)

tkaniva nie je fyziologicky inervovaný a vaskularizovaný čo taktiež sťažuje potenciálnu regeneračnú schopnosť. Od tejto teórie sa ale s pribúdajúcimi vedeckými poznatkami ustúpilo a nahradila ju tzv. „teória zápalového prostredia“. Tá vychádza z pôsobenia molekúl ako sú cytokíny a prostaglandíny, ktoré výrazne ovplyvňujú produkciu matrix metaloproteináz (MMP) chondrocytmi, a tým prispievajú ku postupnej degradácii kĺbnej chrupky (Berenbaum, 2013). Cytokíny sú sekretované chondrocytmi, synoviálnymi bunkami a množstvom ďalších buniek prítomných v kĺbe a sú detekovateľné v synoviálnej tekutine u pacientov s OA. Štúdie z predchádzajúcich rokov potvrdili významnú úlohu synoviálnej membrány na patologické zmeny chrupky prostredníctvom buniek imunitného systému nachádzajúcimi sa v synovii, čím dochádzalo ku progresii OA (Wang a kol., 2018).

Exozómy patria medzi extracelulárne vezikuly s veľkosťou 30–150 nm. Sú produkované množstvom buniek a nájdeme ich vo viacerých telesných tekutinách (plazma, sérum, moč, cerebrospinálna a synoviálna tekutina). V minulosti boli exozómy považované za tzv. odpadové

produkty metabolizmu buniek. Dnes sa už na základe vykonaných štúdií vie, že majú celý rad dôležitých funkcií. Exozómy obsahujú biologicky aktívne molekuly ako napr. nekódujúce RNA (ncRNA), proteíny, mikroRNA (miRNA), messenger RNA (mRNA) a i. Predpokladá sa, že práve vďaka špecifickému „obsahu“ dokážu exozómy ovplyvňovať mikroprostredie a zabezpečovať medzibunkovú komunikáciu (Thery a kol., 2018). Bolo dokázané, že aktívované synoviálne fibroblasty majú schopnosť prostredníctvom týchto malých transportérov priamo ovplyvniť patogenezu OA. Existuje viacero metód akými sa dajú exozómy izolovať, či už z média kondicionovaného bunkami alebo z tkaniva (Chen a kol., 2020). Medzi takéto metódy patria: diferenciálna centrifugácia, hustotná gradientová centrifugácia, chromatografia na základe veľkostí častíc, filtrácia, precipitácia a imunomagnetická separácia.

### Biogenéza exozómov

Exozómy obsahujú širokú škálu proteínov, nukleových kyselín, aminokyselín a metabolitov (obr. 1a). Niektoré z nich sú využívané ako exozomálne markery (CD9, CD63,

CD81, flotilín, anexín a i.). V primárnom kroku syntézy exozómov vstupujú extracelulárne zložky spolu s bunkovými povrchovými proteínmi do buniek procesom endocytózy a invaginácie plazmatickej membrány (obr. 1b). Takto vytvorené vaky na luminálnej strane plazmatickej membrány do seba začleňujú zložky pochádzajúce z endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a mitochondií. Tento proces vedie ku vzniku endozómov. Následne prebieha modifikácia obsahu týchto vezikúl pričom dochádza ku tvorbe viacerých intraluminálnych vezikúl v rámci jedného multivezikulárneho telieska. Časť takto vytvorených multivezikulárnych teliesok s obsahom intraluminálnych vezikúl podlieha degradácii v lyzozómoch. Druhá časť multivezikulárnych teliesok putuje ku plazmatickej membráne, kde sa ukotvujú a následne uvoľňujú intraluminálne vezikuly v procese exocytózy v podobe exozómov (Thery a kol., 2002). ESCRT, Alix a TSG-101 sú proteíny zodpovedné za tvorbu a uvoľňovanie exozómov z bunky do extracelulárneho priestoru (Mayers, Audhya, 2012). Vstup exozómov do cieľovej bunky môže byť realizovaný viacerými spôsobmi (obr. 1c). Exozóm dokáže jednoducho splynúť s plazmatickou membránou bunky, a tým uvoľníť svoj obsah do cytoplazmy. Druhou možnosťou je vstup exozómu do bunky po naviazaní sa na špecifický receptor. Exozómy môžu vstupovať do bunky aj v procese endocytózy, ktorá je indukovaná prítomnosťou klatrínu, lipidových raftov alebo caveol v cytoplazmatickej membráne bunky.

### Synoviálna tekutina ako zdroj exozómov

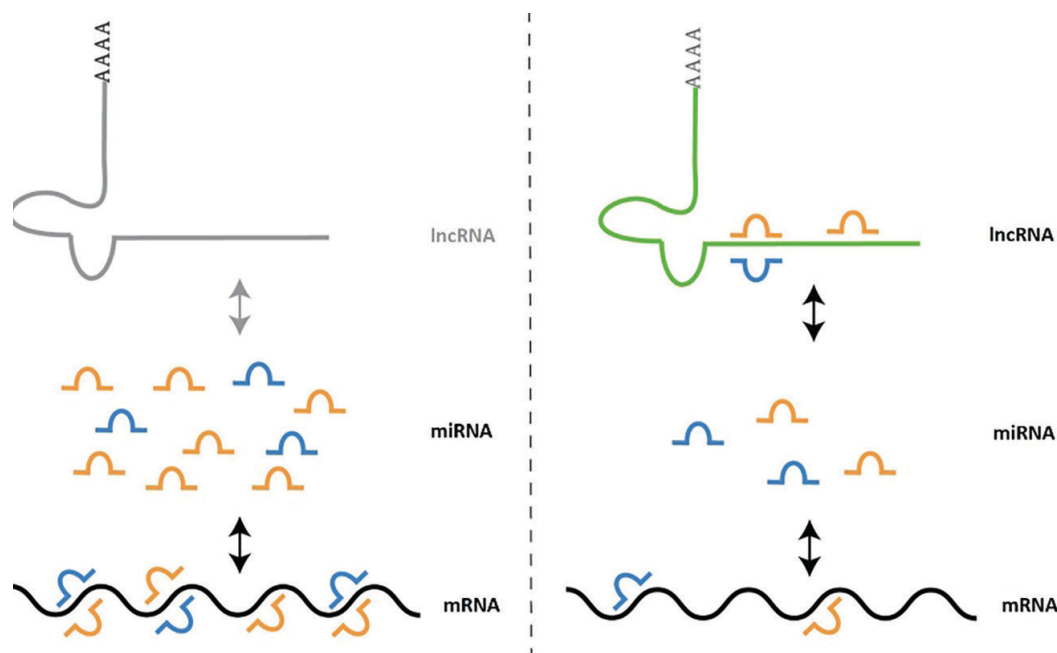
Kedže krvná plazma je zdroj informácií z celého organizmu a nemožno presne určiť odkiaľ informácie z exozómov izolovaných z plazmy pochádzajú, hľadajú sa možnosti na presnejšiu diagnostiku OA. Jednou z možností je diagnostika na základe analýzy synoviálnej tekutiny a exozómov z nej izolovaných. Synoviálna tekutina je vhodným zdrojom informácií pri sledovaní rozvoja patogenézy OA pretože priamo prepája a zabezpečuje komunikáciu medzi tkanivami v kĺbom púzdre ako sú synoviálna membrána, chrupka, tukové Hoffovo tkanivo a i. Výhodou synoviálnej tekutiny je aj to, že sa v nej zmeny v procese OA prejavia skôr ako v iných biologických tekutinách (Munjal a kol., 2019). V zdravých kĺboch chrupka a synoviálna tekutina spolupracujú na vytváraní čo najmenšieho trenia. Samotná tekutina zabezpečuje mechanické tlmenie nárazov, lubrikáciu a výživu chrupky. Synoviálna tekutina je produkovaná vnútornou membránou kĺbu (synoviálnou mem-

bránou) a obsahuje hlavne sérový albumín, hyaluronan, lubricín a  $\gamma$ -globulíny. Pri trení, ktoré sa vyskytuje v kĺbe pri fyziologickom pohybe, dochádza ku zmenám v zložení synoviálnej tekutiny. Prírodzene tenká vrstva homogénnej tekutiny sa pôsobením trecích síl mení na hrubšiu heterogénnu zmes tekutiny a zrazenín (Bonnievie a kol., 2015). Súčasný výskum je zameraný na charakterizáciu proteínov a miRNA ako potenciálnych biomarkerov OA prítomných v synoviálnej tekutine.

### miRNA a lncRNA ako diagnostické biomarkery OA

Základným predpokladom úspešnej liečby väčšiny ochorení je ich včasná diagnostika. Exozómy poskytujú dostatok informácií v podobe miRNA, dlhej nekódujúcej RNA (lncRNA), mRNA a i., ktoré by mohli byť využité aj pri diagnostike OA poprípade aj pri stanovení konkrétneho stupňa tohto ochorenia. Len malá časť genómu kóduje proteíny a zvyšok patrí do tzv. nekódujúcej RNA (ncRNA), ktorá nie je preložená do proteínov v procese translácie. Jedným z typov takýchto nekódujúcich RNA molekúl sú miRNA zložené z 19–23 nukleotidov. Tieto molekuly sa dokážu komplementárne viazať na 3'UTR cieľovej mRNA, a tým regulovať množstvo biochemických reakcií zúčastňujúcich sa patogenézy viacerých ochorení. Heterogénnosť lncRNA je spôsobená ich veľkosťou, ktorá sa pohybuje od niekoľko sto po niekoľko tisíc nukleotidov. Majú dôležitú regulačnú úlohu v procesoch vývoja, diferenciácie, proliferácie, apoptózy a metabolizmu buniek. Zdá sa však, že nie ich veľkosť ale sekundárna a terciárna štruktúra sú zásadné pri správnom plnení funkcií týchto molekúl. V posledných rokoch patria miRNA a lncRNA medzi najviac študované molekuly v exozómoch v rámci výskumu potenciálnych diagnostických biomarkerov OA (Kazimierczyk a kol., 2020).

V nedávnej štúdii boli porovnávané exozomálne miRNA zo séra a synoviálnej tekutiny u pacientov s OA. Pozorovali 31 „upregulovaných“ a 33 „downregulovaných“ miRNA v synoviálnej tekutine v porovnaní so sérom. Potvrdenie teórie, že sérové exozómy obsahovo nekopírujú exozómy synoviálnej tekutiny, má do budúcnosti veľký význam pre optimalizáciu diagnostiky OA (Xie a kol., 2022). Xie a kol. dokázali signifikantne vyššiu hladinu miR-210 v synoviálnej tekutine pacientov s OA v porovnaní s kontrolnou vzorkou bez ohľadu na štádium ochorenia. Analýzy miR-210 odhalili asociáciu tejto miRNA s VEGF. Podporená angiogenéza môže byť potenciálnym mechanizmom, ktorým



**Obr. 2. Mechanizmus interakcií medzi lncRNA, miRNA a mRNA**  
*lncRNA dokáže viazať miRNA, čím redukuje pôsobenie miRNA na mRNA*  
*(Xie a kol., 2020, upravené)*

miR-210 prispieva k rozvoju OA. MiR-210 sa preto ukazuje ako potenciálny diagnostický biomarker už v prvotných fázach OA (Xie a kol., 2019). Hladiny šiestich miRNA (miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29c-3p, miR-34a-5p a miR-186-5p) boli v synoviálnej tekutine u pacientov s neskorou OA výrazne vyššie ako u pacientov v skorom štádiu OA nezávisle na veku, pohlaví a BMI. Naopak, niektoré miRNA (miR-27a-5p, 329, 655, 708-3p a 934) sa vyskytovali vo výrazne nižšom zastúpení pri neskoršej v porovnaní so skorou OA (Li a kol., 2016). Zaujímavosťou je aj to, že zmeny v miRNA u pacientov s OA sa vyskytujú aj v závislosti od pohlavia pacienta. Ženy majú výrazne vyššie riziko vzniku a rozvoja OA v porovnaní s mužským pohlavím (Kolhe a kol., 2020). Je známe, že estrogénová signálna dráha sa priamo podieľa na patogenéze OA u žien. Hladiny niektorých exozomálnych miRNA (miR-181d-3p, miR-155-3p, miR-185-5p, miR-3940-3p, miR-4532, miR-7107-5p miR-504-3p, miR-320d, miR-19b-3p a miR-22-3p) boli v synoviálnej tekutine pri pacientkach s OA zvýšené. Po ukončení procesu estrogénovej liečby došlo ku zníženiu hladín týchto miRNA. Na druhej strane, hladiny niektorých miRNA (miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-200a-3p) sa po tejto liečbe zvýšili. Z týchto výsledkov je zrejmé, že hormón estrogén má výrazný vplyv na zloženie exozomálnych miRNA v synoviálnej tekutine. Hladina estrogénu u žien po meno-

paule výrazne klesá, výrazne sa tým ovplyvňuje zloženie miRNA v exozómoch čo zvyšuje šancu vzniku a rozvoja OA (Kolhe a kol., 2017).

Do regulácie expresie, tzv. „downstream“ génov, sa zapája okrem miRNA aj podstatne dlhšia lncRNA. Interakcia medzi týmito dvoma typmi RNA má dôležitú úlohu pri rozvoji OA (Obr. 2). Štúdie potvrdili prítomnosť signifikantne vyššieho množstva exozómov v skorej a neskoršej fáze OA oproti kontrolným skupinám. Zároveň odhalili aj výrazne vyššiu expresiu exozomálnej lncRNA PCGEM1 pri neskoršej fáze OA v porovnaní so skorou OA a taktiež vyššiu expresiu tejto lncRNA u skorej OA oproti kontrolnej skupine (Zhao, Xu, 2018). Práca, ktorá sa pokúšala objasniť funkcie nekódujúcich RNA v patogenéze OA potvrdila vyššiu expresiu 52 lncRNA a nižšiu expresiu 144 lncRNA pochádzajúcich z exozómov zo synoviálnej tekutiny pacientov s OA v porovnaní s kontrolnou vzorkou (Wu a kol., 2022). lncRNA s názvom FOXD2-AS1 podporuje proliferáciu chondrocytov a inhibuje rozvoj OA cez miR-27a/TLR4 dráhu. Wang a kol. potvrdili, že hladina tejto lncRNA bola u pacientov s OA nízka čo naznačuje jej inhibičný efekt v procese OA (Wang a kol., 2019). lncRNA CIR podporuje apoptózu prostredníctvom miR-130a/Bim dráhy a inhibuje expresiu miR-27b, čím dochádza k degradácii extracelulárnej matrix. Regulácia expresie miR-149 je zabezpečená

prostredníctvom lncRNA PVT1. Proces regulácie expzie tejto miRNA má vplyv na degradáciu extracelulárnej matrice, zápalovú odpoveď a v konečnom dôsledku aj na apoptózu (Zhao a kol., 2018). Diagnostický potenciál týchto molekúl je zrejmý, no treba ho overiť množstvom štúdií, ktoré by potvrdili ich schopnosť presne rozlíšiť medzi patologickým stavom a zdravým jedincom.

### Cytokíny prítomné v synoviálnej tekutine

V závislosti od dĺžky trvania a stupňa OA sa mení aj zašúpenie a hladina cytokínov (Vangsness a kol., 2011). Cytokíny vstupujú do anabolických a katabolických procesov obzvlášť v tkanivách, ktoré podliehajú počas života vysokej mechanickej záťaži. V dôsledku narušenia rovnováhy týchto procesov dochádza ku progresívnej degenerácii kĺbovej chrupky, ktorá zohráva kľúčovú úlohu v biomechanike každého kĺbu. To vedie k rozvoju ťažko prerušiteľného chorobného procesu, ktorý zahŕňa zápalové, degradačné a produkčné procesy, ktoré spolu vedú k postupnej strate funkcie kĺbov a bolesti (Wojdasiewicz a kol., 2014). Vzhľadom na účinok aký majú cytokíny v rámci OA ich delíme na prozápalové a protizápalové.

Uvádza sa, že pri zápale dochádza ku aktivácii makrofágov, ktoré regulujú vylučovanie prozápalových cytokínov a enzýmov (Kennedy a kol., 2011). Exozómy izolované zo synoviálnej tekutiny postihnutého kĺbu pacientov s OA sú schopné stimulovať makrofágy k produkcii zápalových cytokínov, chemokínov a metaloproteináz zapríčiňujúcich degradáciu chrupky. Táto schopnosť značí zásadnú regulačnú úlohu exozómov v procese OA. Sú teda potenciálnym nástrojom pri snahe zmeniť zápalové mikroprostredie vyskytujúce sa pri OA.

Fell a Jubb (1977) ako prví potvrdili *in vitro*, že určité metabolity (v tom čase nevedeli presne určiť aké) pravdepodobne pôsobia ako regulátory funkcie chondrocytov. Dokázali to kokultiváciou zdravej synoviálnej membrány s časťami chrupky. Pozorovali rozklad extracelulárnej matrix produktami príslušných chondrocytov a na základe týchto zistení uvažovali, že synoviálna membrána pravdepodobne produkuje faktor, ktorý zapríčiňuje tento rozklad (Fell, Jubb, 1977). Dnes je známe, že zvýšené hladiny cytokínov (hlavne – IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, a i.) narúšajú homeostázu kĺbového prostredia pri OA (Li a kol., 2020).

Dodnes nie je presne známe, ktorý typ buniek je konkrétnym zdrojom cytokínu IL-1 považovaného za jedného z najsilnejších iniciátorov degradácie chrupky v procese

OA. Spolu s inými cytokínmi sa nachádzajú v synoviálnej tekutine pacientov s OA, ako aj v synoviálnej membráne pri skorom štádiu OA. Mechanizmus účinku IL-1 v chondrocytoch spočíva v tom, že jeho prekursor je prenášaný z cytoplazmy do jadra bunky, kde aktivuje transkripciu prozápalových génov. Uvoľnenie intracelulárneho IL-1 do extracelulárneho priestoru nastáva po smrti chondrocytu. IL-1 tak dokáže ovplyvňovať aktivitu toho istého chondrocytu (autokrinne) alebo príľahlých chondrocytov (parakrinne). Ďalším prozápalovým cytokínom podieľajúcim sa na degradácii chrupky pri OA je tumor nekrotizujúci faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Vykazuje podobné účinky na chondrocyty ako IL-1. Stimuluje produkciu proteínáz degradujúcich matrix chrupky a potláča syntézu proteoglykánov a kolagénu druhého typu. Zaujímavosťou je, že kým samostatne je IL-1 v porovnaní s TNF $\alpha$  oveľa účinnejší v iniciácii deštrukcie chrupky, tak synergiou týchto dvoch cytokínov dochádza ku oveľa rozsiahlejšiemu poškodeniu tohto tkaniva (Goldring, Goldring, 2004). TNF $\alpha$  dokáže ovplyvňovať produkciu ďalších cytokínov, akým je napr. interleukín-6 (IL-6). IL-6 je prozápalový cytokín, ktorého hladina sa zvyšuje pri viacerých zápalových ochoreniach. Je produkován viacerými typmi buniek (T a B bunky, monocyty, fibroblasty, osteoblasty a adipocyty z Hoffovho tuku). Stimuluje proliferáciu synoviocytov a aktiváciu osteoklastov čo vedie k produkcii matrixových metaloproteináz zodpovedných za deštrukciu chondrálneho tkaniva (Stannus a kol., 2010).

Cytokíny sa nenachádzajú v synoviálnej tekutine iba ako voľne detekovateľné molekuly, ale sú vo veľkej miere prítomné aj v extracelulárnych vezikulách. Hladiny cytokínov IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-10 a INF- $\gamma$  prítomných v synoviálnej tekutine pacientov v neskoršom štádiu OA boli podstatne vyššie v porovnaní s hladinami cytokínov u pacientov v skorom štádiu OA. Podobný trend hladiny v závislosti od štádia OA mal aj profil exozomálnych cytokínov (Gao a kol., 2020). Exozómy synoviálnej tekutiny majú schopnosť „privolať“ zápalové bunky, majú negatívny vplyv na tvorbu chondrálneho tkaniva, čím priamo prispievajú k degenerácii kĺbovej chrupky.

## ZÁVER

Hoci dnes diagnostika OA – zahrňujúca predovšetkým vizualizačné metódy a subjektívnu evidenciu bolesti sa

motným pacientom – predstavuje štandardný a zaužívaný proces, je potrebné predostrieť pacientovi aj formu viac presnej a hlavne včasnej diagnostiky tohto ochorenia. OA je ochorenie celého kĺbu, ktoré postihuje chrupku, subchondrálnu kosť a synoviu. Mikroprostredie v takomto patologickom kĺbe je plné zápalových buniek, ktoré medzi sebou komunikujú aj prostredníctvom signálnych nanočastíc - exozómov. Tým ovplyvňujú príľahlé tkanivá a bunky a narúšajú integritu kolenného kĺbu. Exozómy izolované zo synoviálnej tekutiny a najmä ich obsah v podobe nukleových kyselín (miRNA, resp. lncRNA) a proteínov (cytokíny, chemokíny, enzýmy) majú podstatné regulačné účinky v patogenéze OA a podieľajú sa na základných mechanizmoch vývoja ochorenia a odrážajú závažnosť ochorenia. Tieto vlastnosti ich predurčujú byť včasnými a spoľahlivými diagnostickými biomarkermi pri monitorovaní progresie OA. Avšak pre lepší manažment pacientov s OA kolena ďalšie výskumné úsilie a klinické štúdie sú potrebné na hlbšie pochopenie funkcie a zloženia biomarkerov synoviálnej tekutiny v rannejších štádiách synovitídy, artritídy resp. osteoartritídy.

## Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPENMED), kód ITMS2014+: 313011V455, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a vďaka Agentúre na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-17-0118.

## REFERENCIE

1. **Berenbaum, F. (2013):** Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), pp. 16–21. doi: 10.1016/j.joca.2012.11.012
2. **Bonnevie, E. D. et al. (2015):** Elastoviscous Transitions of Articular Cartilage Reveal a Mechanism of Synergy between Lubricin and Hyaluronic Acid. *PLOS One*, 10(11), pp. e0143415. doi: 10.1371/journal.pone.0143415
3. **Fell, H. B. and Jubb, R. W. (1977):** EFFECT OF SYNOVIAL TISSUE ON BREAKDOWN OF ARTICULAR-CARTILAGE IN ORGAN-CULTURE. *Arthritis and Rheumatism*, 20(7), pp. 1359–1371. doi: 10.1002/art.1780200710
4. **Gao, K. et al. (2020):** Association between cytokines and exosomes in synovial fluid of individuals with knee osteoarthritis. *Modern Rheumatology*, 30(4), pp. 758–764. doi: 10.1080/14397595.2019.1651445
5. **Goldring, S. R. and Goldring, M. B. (2004):** The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (427), pp. S27–S36. doi: 10.1097/01.blo.0000144854.66565.8f
6. **Chen, P. et al. (2020):** Extraction and identification of synovial tissue-derived exosomes by different separation techniques. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 15(1). doi: 10.1186/s13018-020-01604-x
7. **Kato, T. et al. (2014):** Exosomes from IL-1 beta stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 16(4). doi: 10.1186/ar4679
8. **Kazimierczyk, M. et al. (2020):** Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). doi: 10.3390/ijms21031027
9. **Kennedy, A. et al. (2011):** Macrophages in synovial inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2. doi: 10.3389/fimmu.2011.00052
10. **Kolhe, R. et al. (2017):** Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/s41598-017-01905-y
11. **Kolhe, R. et al. (2020):** Sex-Specific Differences in Extracellular Vesicle Protein Cargo in Synovial Fluid of Patients with Osteoarthritis. *Life-Basel*, 10(12). doi: 10.3390/life10120337
12. **Li, Y. H. et al. (2016):** Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(9), pp. 1577–1586. doi: 10.1016/j.joca.2016.04.019
13. **Li, Z. et al. (2020):** Compositional Variation and Functional Mechanism of Exosomes in the Articular Microenvironment in Knee Osteoarthritis. *Cell Transplantation*, 29. doi: 10.1177/0963689720968495
14. **Malemud, C. J. (2015):** Biologic basis of osteoarthritis: state of the evidence. *Current Opinion in Rheumatology*, 27(3), pp. 289–294. doi: 10.1097/bor.0000000000000162
15. **Mayers, J. R., Audhya, A. (2012):** Vesicle formation within endosomes: An ESCRT marks the spot. *Communicative & Integrative Biology*, 5(1), pp. 50–56. doi: 10.4161/cib.18208

16. **Munjal, A. et al. (2019):** Advances in Molecular biomarker for early diagnosis of Osteoarthritis. *Biomolecular Concepts*, 10(1), pp. 111—119. doi:10.1515/bmc-2019-0014
17. **Ni, Z. H. et al. (2020):** Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Research*, 8(1). doi: 10.1038/s41413-020-0100-9
18. **Stannus, O. et al. (2010):** Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(11), pp. 1441—1447. doi: 10.1016/j.joca.2010.08.016
19. **Thery, C. et al. (2018):** Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). doi: 10.1080/20013078.2018.1535750
20. **Thery, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. (2002):** Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), pp. 569—579. doi: 10.1038/nri855
21. **Vangness, C. T. et al. (2011):** Human Knee Synovial Fluid Cytokines Correlated with Grade of Knee Osteoarthritis A Pilot Study. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases*, 69(2), pp. 122—127. PMID: 22035391
22. **Wang, H. et al. (2018):** Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis: Does synovitis affect cartilage degradation? *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), pp. 1342—1358. doi: 10.1002/jcp.26011
23. **Wang, Y. et al. (2019):** LncRNA FOXD2-AS1 induces chondrocyte proliferation through sponging miR-27a-3p in osteoarthritis. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), pp. 1241—1247. doi: 10.1080/21691401.2019.1596940
24. **Wojdasiewicz, P., Poniatowski, L. A. and Szukiewicz, D. (2014):** The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014. doi: 10.1155/2014/561459
25. **Wu, X. et al. (2022):** Identification of exosomal mRNA, lncRNA and circRNA signatures in an osteoarthritis synovial fluid-exosomal study. *Experimental Cell Research*, 410(1), pp. 112881. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112881
26. **Xie, F. et al. (2020):** Role of MicroRNA, lncRNA, and Exosomes in the Progression of Osteoarthritis: A Review of Recent Literature. *Orthopaedic Surgery*, 12(3), 708—716. doi: 10.1111/os.12690
27. **Xie, W. et al. (2019):** Synovial Fluid MicroRNA-210 as a Potential Biomarker for Early Prediction of Osteoarthritis. *Biomed Research International*, 2019. doi: 10.1155/2019/7165406
28. **Xie, Y. et al. (2022):** Exploration of Exosomal miRNAs from Serum and Synovial Fluid in Arthritis Patients. *Diagnostics*, 12(2), pp. 239. doi: 10.3390/diagnostics12020239
29. **Zhao, Y. and Xu, J. (2018):** Synovial fluid-derived exosomal lncRNA PCGEM1 as biomarker for the different stages of osteoarthritis. *International Orthopaedics*, 42(12), pp. 2865—2872. doi: 10.1007/s00264-018-4093-6
30. **Zhao, Y. X. et al. (2018):** Long non-coding RNA PVT1, a molecular sponge for miR-149, contributes aberrant metabolic dysfunction and inflammation in IL-1 beta-simulated osteoarthritic chondrocytes. *Bioscience Reports*, 38. doi: 10.1042/bsr20180576





Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 74–80

## VYUŽITIE EXOZÓMOV PRI DIAGNOSTIKE NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ USAGE OF EXOSOMES IN THE DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

**Lamancová Petra, Urban Peter**

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta, Slovensko

e-mail: peter.urban@upjs.sk

*prehľadová práca*

### SÚHRN

Medzi najčastejšie sa vyskytujúce neurodegeneratívne poruchy patria napríklad Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba alebo amyotrofická laterálna skleróza. Použitie plnej krvi pri stanovení špecifických proteínových markerov progresie vybraných ochorení je obmedzené hlavne v dôsledku prítomnosti hematoencefalickej bariéry, brániacej voľnému prechodu molekúl medzi centrálnym nervovým systémom a krvou. Exozómy, ako extracelulárne vezikuly, vyskytujúce sa vo veľkom množstve v biologických tekutinách, majú schopnosť prechodu cez hematoencefalickú bariéru, čo poskytuje možnosť získania informácií z internej medzibunkovej komunikácie. Tento prehľadový článok sa zameriava na charakterizáciu, biogénu a popis špecifických funkcií exozómov, ktoré by mohli byť potenciálne využité pri diagnostike progresie a úspešnosti liečby neurodegeneratívnych ochorení.

**Kľúčové slová:** exozómy; demyelinizácia; stanovenie miRNA

### ABSTRACT

The most common neurodegenerative disorders include e. g. Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Hun-

tington's disease or amyotrophic lateral sclerosis. The use of whole blood in the determination of specific protein markers of the progression of these diseases is limited mainly due to the presence of a blood-brain barrier, preventing the free passage of molecules between the central nervous system and the blood. Exosomes such as extracellular vesicles, which are found in large amounts in biological fluids, have the ability to cross the blood-brain barrier, providing the ability to obtain information from internal intercellular communication. This review article focuses on the characterization, biogenesis, and description of specific exosome functions that could potentially be used to diagnose the progression and success of neurodegenerative diseases.

**Key words:** exosomes; demyelination; miRNA determination

### ÚVOD

V posledných rokoch sa vedecký záujem upriamuje na identifikáciu nových diagnostických biomarkerov neurodegeneratívnych ochorení. Rýchlosť progresie a nezvratné poškodenie neurónov, ku ktorému dochádza, si vyžadujú rýchlu intervenciu už v ranných štádiách ochorenia. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce neurodegeneratívne poruchy patria Alzheimerova choroba, Parkinsonova

choroba, Huntingtonova choroba, či amyotrofická laterálna skleróza (Obrocki a kol., 2020).

Identifikácia špecifických biomarkerov neurodegenerácie je v súčasnosti veľmi progresívnou oblasťou výskumu. Existujú rozsiahle proteomické štúdie zaoberajúce sa diagnostikou zo vzoriek plnej krvi, cerebrospinálneho moku (CSF, cerebrospinal fluid), slín alebo z moču (Vieira a kol., 2020). Použitie plnej krvi je obmedzené zníženou koncentráciou proteínových markerov hlavne v dôsledku prítomnosti hematoencefalickej bariéry (HEB), brániacej voľnému prechodu molekúl medzi centrálnym nervovým systémom (CNS) a krvou. Ďalším limitujúcim faktorom je nešpecifická degradácia sledovaných proteínov pôsobením plazmatických proteáz (Khan, Alkon, 2015).

Výsledkom súčasného diagnostického pokroku je častejšie používanie nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR), hmotnostnej spektrometrie a metabolomický prístup v hodnotení telových tekutín. Detekcia exozómov je relatívne nová a rýchlo sa rozvíjajúca oblasť diagnostiky neurodegeneratívnych ochorení. Exozómy sú vezikuly s priemerom 30–150 nm obalené jednoduchou fosfolipidovou dvojvrstvou, o ktorých je známe, že sú vylučované všetkými typmi buniek. Je ich možné izolovať z plazmy, séra, moču, CSF, slín aj materského mlieka. Zloženie jednotlivých typov exozómov koreluje s priebehom ochorení, prípadne s liečbou (Saeedi a kol., 2019). Podieľajú sa na komunikácii medzi bunkami, regulácii synaptickej plasticity a procesu regenerácie nervových buniek (Zhang a kol., 2019). Exozómy odvodené od oligodendrocytov hrajú kľúčovú úlohu v biogenéze myelínového puzdra. Ich úloha spočíva v transporte myelínového proteolipidového proteínu, ktorý je zodpovedný za udržiavanie multilamelárnej štruktúry myelínu. Exozómy dokážu prechádzať hematoencefalickou bariérou, preto môžu slúžiť aj na transport liečiv do CNS (Krämer-Albers a kol., 2007).

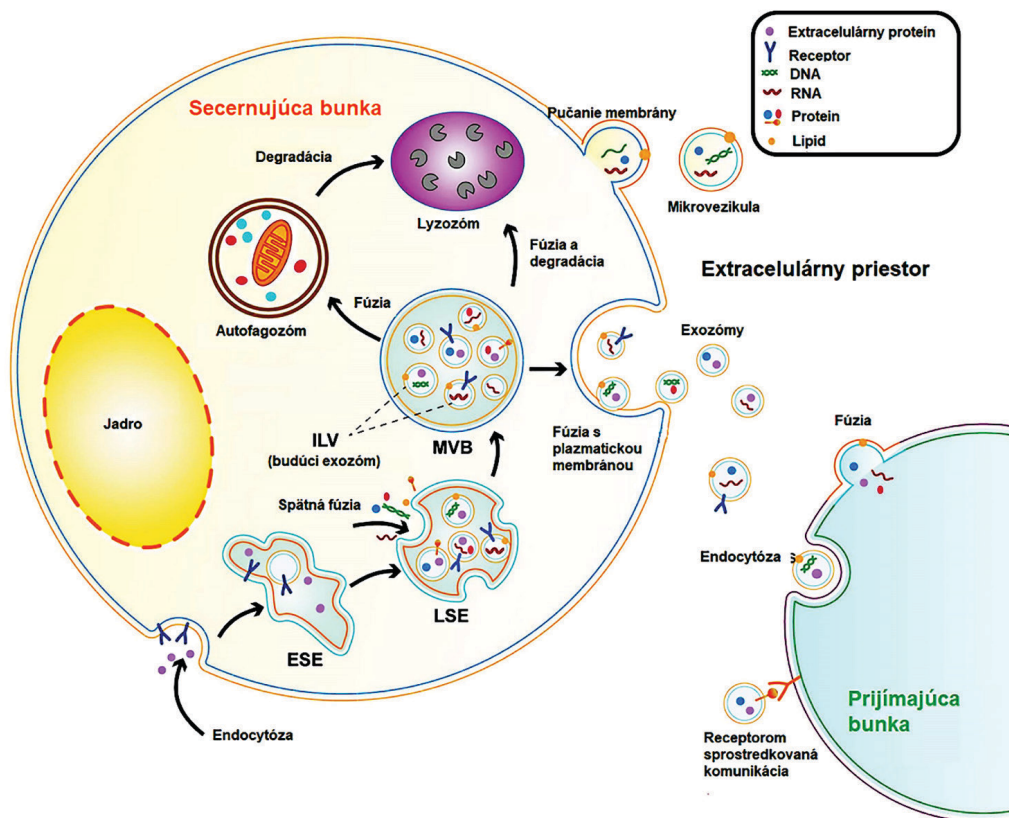
Tento prehľadový článok sa zameriava na charakterizáciu, biogenézu a popis špecifických funkcií exozómov využiteľných pri diagnostike progresie a liečby neurodegeneratívnych ochorení.

### **Biogenéza, zloženie a funkcie exozómov**

Väčšina buniek má evolučne zachovaný mechanizmus tvorby membránových vezikúl, ktoré sú známe ako extracelulárne vezikuly (EV). Aktivácia bunkovo špecifických receptorov a signálne dráhy iniciujúce biogenézu exozómov sú intenzívne regulované. Exozómy vznikajú v procese,

ktorý zahŕňa dvojité invagináciu plazmatickej membrány a tvorbu intracelulárnych multivezikulárnych teliesok (MVB, multivesicular bodies), obsahujúcich intraluminálne vezikuly (ILV). ILV sa nakoniec vylučujú ako exozómy prostredníctvom fúzie MVB s plazmatickou membránou. Prvá invaginácia plazmatickej membrány vytvorí štruktúru v tvare pohára, ktorý obsahuje proteíny bunkového povrchu a proteíny z extracelulárnej oblasti. To vedie k vytvoreniu skorého triediaceho endozómu (ESE, early sorting endosomes) a v niektorých prípadoch sa môže priamo zlúčiť s už existujúcim ESE. K tvorbe a obsahu ESE môže prispieť aj distálna strana Golgiho aparátu a endoplazmatické retikulum (ER) (Hessvik, Llorente, 2018; van Niel a kol., 2018). ESE môže dozrieť na neskorý triediaci endozóm (LSE, late sorting endosome) a nakoniec generovať MVB (Obr. 1). MVB vznikajú preliačením endozomálnej membrány smerom dovnútra (dvojitou invagináciou plazmatickej membrány). Výsledkom tohto procesu sú MVB obsahujúce niekoľko ILV (budúcich exozómov). MVB sa môžu buď spájať s lyzozómami a obsah vnútri endolyzozómu sa degraduje, alebo sa pohybovať pozdĺž cytoskeletu bunky k jej membráne (Kahlert, Kalluri, 2013). V blízkosti bunkovej membrány dochádza k zapojeniu ďalších exkrečných mechanizmov a proteínov, napr. syntaxín, synaptotagmín, synaptobrevín, v prítomnosti ktorých dôjde k fúzii bunkovej membrány a vylúčeniu vezikulárnych teliesok do extracelulárneho prostredia (Mathieu a kol., 2019).

Zloženie EV je veľmi heterogénne v závislosti od typu bunky, z ktorej sú secernované. Proteínový (aj lipidový) profil exozómov väčšinou reflektuje obsah parentálnych buniek, pričom vezikuly sú obohatené aj o niektoré špeciálne molekuly. Ich obsah tvorí komplex rôznych proteínov vrátane receptorov, transkripčných faktorov, enzýmov, proteínov extracelulárneho matrixu, lipidov, nukleových kyselín (DNA, mRNA a miRNA) nachádzajúcich sa vo vnútri a na povrchu exozómov (Pegtel, 2019). Analýza zloženia exozómových proteínov odhalila, že niektoré proteíny pochádzajú z parentálnej bunky/tkaniva a niektoré sú spoločné pre všetky exozómy. Medzi špecifické proteínové zložky exozómov patria adhézne molekuly napr. integríny, tetraspaníny, ako aj bielkoviny hlavného histokompatibilného komplexu triedy I a II prezentované na B-lymfocytoch a dendritických bunkách spolu s transferínovými receptormi nachádzajúcimi sa na povrchu retikulocytov (Segura a kol., 2005). Exozómy tiež obsahujú molekuly, ktoré sa počas ich biogenézy nedegradujú. Medzi takého



**Obr. 1. Vznik a uvoľňovanie exozómov** (upravené podľa Luyao a kol., 2021)  
MVB – intracelulárne multivezikulárne telieska; ILV – intraluminálne vezikuly;  
ESE – skorý triediaci endozóm; LSE – neskorý triediaci endozóm

nešpecifické zložky exozómov patria fúzne a transportné proteíny napr. flotilín a anexín, proteíny tepelného šoku, tetraspaníny, cytoskeletálne proteíny vrátane aktínu, myozínu, tubulínu a proteínov typu Alix (Apoptosis Linked gene 2 Interacting protein X) a TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), ktoré sa zúčastňujú biogenézy MVB (Balaj a kol., 2011). Nemenej dôležitou zložkou exozómov sú lipidy, ktoré majú dôležitú úlohu pri udržiavaní správneho tvaru exozómu, a taktiež sa podieľajú na biogenéze exozómov a regulácii homeostázy v bunkách (Minciacchi a kol., 2015). Vysoká hustota lipidov, napr. kyseliny lyzo-bis-fosfatidovej (LBPA, Lyso(bis)phosphatidic acid) vo vnútornej membráne MVB má za následok tvorbu ILV a tým aj exozómov. Interakcia LBPA s Alix uľahčuje preliačenie membrány MVB (Chu a kol., 2005). Sfingomyelín, fosfatidylcholín a bismonoacylglycerofosfát patria medzi faktory, ktoré pomáhajú rozlišovať medzi mnohými typmi vezikúl. Rôzne typy mikrovezikúl majú podobný obsah sfingomyelínu a fosfatidylcholínu, zatiaľ čo koncentrácia sfingomyelínu je vyššia v exozómoch (Huotari, Helenius, 2011). Zistilo sa, že exozómy by mohli zmeniť lipidové zloženie v cieľových bunkách, najmä obsah cholesteró-

lu a sfingomyelínu, a teda ovplyvniť homeostázu buniek (Skotland a kol., 2017).

Exozómy sú všeobecne zaujímavé pre svoju úlohu v biológii bunky a pre ich potenciálne terapeutické a diagnostické aplikácie. Pôvodne sa predpokladalo, že exozómy sú len bunkovými odpadovými produktmi, no dnes je známe, že ich úloha bola podhodnotená. Exozómy predstavujú nový spôsob bunkovej komunikácie prostredníctvom výmeny rôznych biomolekúl, vrátane nukleových kyselín, lipidov a proteínov, a tiež prispievajú k spektru biologických procesov počas fyziologických a patologických stavov (Pegtel, Gould, 2019). Jedným z hlavných mechanizmov, ktorým sa predpokladá, že exozómy uplatňujú svoje účinky, je prenos exozomálnej RNA do cieľových buniek, kde regulujú syntézu proteínov. Dôkazom je identifikácia nepochybnej a funkčnej exozomálnej RNA v cieľových bunkách (Statello a kol., 2018). MikroRNA a dlhé nekódujúce RNA prenášané exozómami menia génovú expresiu, kým proteíny (napr. proteíny tepelného šoku, cytoskeletálne proteíny, adhézne molekuly, membránový transportér a fúzne proteíny) môžu priamo ovplyvňovať cieľové bunky (Behbahani a kol., 2016).

## Úloha exozómov v neurodegenerácii

Spoločný molekulový a bunkový mechanizmus neurodegeneratívnych ochorení zahŕňa agregáciu proteínov a tvorbu inklúzných teliesok v určitých oblastiach nervového systému. Správne triedenie a degradácia proteínov sú pre fyziologický stav neúroveň veľmi dôležité (Fruhbeis a kol., 2012). V prípade syntézy chybných či nefunkčných proteínov dochádza k ich degradácii prostredníctvom endozomálnej dráhy, alebo degradáciou v lyzozómoch. Alternatívnou dráhou je ich inkorporácia do MVB a uvoľnenie do extracelulárneho priestoru v podobe exozómov. Fevier a kol. (2004) dokázali inkorporáciu priónového proteínu (PrP) a abnormálneho priónového proteínu (PrP<sup>Sc</sup>, Prion Protein Scarpie) do exozómu, čím potvrdili prenos PrP<sup>Sc</sup> proteínu do buniek obsahujúcich PrP. Tuto cestou sa exozómy podieľajú na šírení zmutovaných a chybných skladaných proteínov pri neurodegeneratívnych poruchách a slúžia ako predloha pre tvorbu oligomérov.

## Význam exozómov pri detekcii skorých štádií Alzheimerovej choroby

V súčasnosti sa neustále zvyšuje záujem o využitie exozómov pri štúdiu medzibunkovej komunikácie v patológii Alzheimerovej choroby (AD). Proteínová zložka exozómov obsahujúca amyloidový prekursorový proteín (APP), beta amyloid (A $\beta$ ) a tau (tubulin-associated unit) proteín uľahčujú medzibunkovú komunikáciu, čo vedie k zvýšenej tvorbe A $\beta$  a tau patológii (D'Anca a kol., 2019). Pri AD je strata funkcie endozomálno-lyzozomálneho systému v dôsledku heterozygotného alebo homozygotného genotypu Apolipoproteínu E4 (Apo E4) jedným z hlavných dôvodov zvýšenej produkcie exozómov (Holtzman a kol., 2000). Dysfunkcia proteazomálneho a lyzozomálneho systému je dôvodom, prečo multivezikulárny endozóm (MVE) obsahujúci APP fúzuje s plazmatickou membránou. Vzniknutý endozóm sa môže spájať s lyzozómom, čo vedie k štiepeniu vlastného materiálu prostredníctvom hydroláz, alebo dochádza k fúzii MVE s plazmatickou membránou, čo vedie k tvorbe exozómov (Selwood a kol., 2009). Funkcia exozómov balansuje medzi neuroprotektívnou a neurodegeneratívnou povahou. Pri štúdiu zmien počas progresie AD sa ukázalo, že extracelulárne vezikuly sa podieľajú na dispergovaní A $\beta$  čím prispievajú k patogenéze ochorenia. Tiež sa zistilo, že EV obsahujú C-koncové fragmenty APP a rôzne izoformy A $\beta$  (Joshi a kol., 2015). V prípade AD, kde sa behaviorálne symptómy vyskytujú oveľa ne-

skôr ako patológia progresie ochorenia, je veľmi dôležitá identifikácia markerov včasnej detekcie. V rámci exozómov uvoľňovaných do CSF u pacientov s ťažkou formou AD boli zistené znížené hladiny expresie A $\beta$ . Goetzl a kol. (2016) zistili, že v exozómoch izolovaných z krvnej plazmy bola koncentrácia A $\beta$  vyššia v porovnaní s exozómami získanými z iných telových tekutín. Koncentrácia rozpustného A $\beta$ 42 a iných proteínov bola vyššia v exozómoch odvodených od astrocytov v porovnaní s exozómami derivovanými z neurónov. Pri sledovaní asociácie medzi výskytom špecifických exozomálnych miRNA bola detegovaná významná upregulácia hladín miR-29c, miR-136-3p, miR-16-2, miR-331-5p, miR-132-5p a miR-485-5p z CSF pacientov s AD v porovnaní so zdravými kontrolami (Gui a kol., 2015). miRNA sú stabilné v biologických tekutinách vrátane séra, plazmy a CSF, pretože sú transportované v rámci exozómov a možno ich ľahko detegovať pomocou štandardných techník molekulovej biológie. McKeever a kol. (2018) potvrdili zníženie miR-16-5p, miR-451a a miR-605-5p a zvýšenie miR-125b-5p v CSF u AD pacientov v porovnaní so zdravými kontrolami. Nevýhodou stanovenia významných miRNA je reprodukovateľnosť výsledkov vzhľadom na metódu izolácie a typ biologického materiálu (Manna a kol., 2020).

## Význam exozómov pri štúdiu progresie Parkinsonovej choroby

Druhým najčastejším neurodegeneratívnym ochorením je Parkinsonova choroba (PD). Geneticky podmienená forma PD je spojená s bodovou mutáciou v géne SNCA (synukleín alfa), kódujúcom proteín  $\alpha$ -syn. K patológii pri PD prispievajú chyby v proteostáze a degradácia  $\alpha$ -syn (Ben-goja-Vergniory a kol., 2017). Vo všeobecnosti je  $\alpha$ -syn prítomný v monomérskej forme, ale po získaní neurotoxických vlastností podlieha oligomerizácii a ďalej agreguje za vzniku protofibril. K degradácii  $\alpha$ -syn dochádza lyzozomálnym autofágovým systémom (LAS) a proteazomálnou dráhou (Xilouri a kol., 2013). Úloha exozómov pri PD spočíva aj v intraneuronálnom transporte  $\alpha$ -syn, tzv. priónovým spôsobom. Exozomálny transport teda slúži na rozširovanie skorých molekulových zmien patológie PD do iných buniek (Yu a kol., 2020). Funkcia LAS je ovplyvňovaná aj prostredníctvom mutácií. Mutácia v géne LRRK2 (Leucine-rich Repeat Kinase 2) spôsobuje zhoršenú funkciu dráhy LAS, čím sa potvrdzuje narušená homeostáza  $\alpha$ -syn, ktorá tiež vedie k degradácii dopamínerných neu-

rónov (Ben Gedalya a kol., 2009). Predpokladá sa, že okolité prostredie exozómov podporuje agregáciu  $\alpha$ -syn a pomáha pri šírení patológie PD (Grey a kol., 2015). V posledných rokoch bolo hľadanie biomarkerov z CSF a plazmy pri PD veľmi zaujímavé pre diferenciálnu diagnostiku skorých štádií tohto ochorenia, alebo súvisiacich neuropatologických zmien (Chang a kol., 2020). V práci Cao a kol. (2018) zameranej na proteínové profilovanie exozómov z plazmy a slín u pacientov s PD v rôznych štádiách bolo dokázané, že apolipoproteín A1 môže byť potenciálnym biomarkerom progresie ochorenia. Zároveň dokázali, že hladina  $\alpha$ -syn oligoméru v slinných exozómoch je vyššia u pacientov s PD, ale nekoreluje so závažnosťou ochorenia. Doteraz však existuje len málo štúdií, ktoré skúmali hladiny miRNA v izolovaných exozómoch. Mann a kol. (2021) poukázali na fakt, že kombináciou sérových exozomálnych miRNA je možné rozlíšiť PD od progresívnej supranukleárnej paralýzy (PSP), ktorá sa prejavuje rovnakými symptómami. Kombinácia niekoľkých miRNA (hsa-miR-425-5p, hsa-miR-21-3p a hsa-miR-199a) v sére ukázala signifikantný rozdiel medzi týmito dvoma ochoreniami. Podobne, aj hladiny exozomálnych miR-125, miR-210, miR-450b a miR-669b, ktoré indukujú mitochondriálnu dysfunkciu, poruchu imunitného systému a zápalovú aktiváciu, tiež zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze PD (Harischandra a kol., 2018).

### **Diagnostický význam exozómov pri Huntingtonovej chorobe a ALS**

Medzi ďalšie, avšak menej rozšírené neurodegeneratívne ochorenia patrí aj Huntingtonova choroba. Toto ochorenie je primárne spojené s rozšírenou trinukleotidovou repetíciou CAG v géne huntingtínu (HTT), ktorý je patologickým nosičom – mutantnou formou multifunkčného proteínu huntingtínu (Jeon a kol. 2016). Toto ochorenie spôsobuje motorické, kognitívne a behaviorálne defekty. Mechanizmus, ktorý reguluje produkciu mutovaného huntingtínového proteínu (mHTT), stále nie je dostatočne objasnený. Je publikovaných len málo štúdií, ktoré by poukazovali na úlohu exozómov pri prenose mHTT. Štúdia, ktorá sa zaoberala exozómami izolovanými z plazmy pacientov s HD zistila upreguláciu 13-tich miRNA (Kumar a kol., 2017). Tiež sa zistilo, že hladina celkového proteínu huntingtínu v slinách je vyššia u pacientov s HD v porovnaní so zdravými kohortami (Corey-Bloom a kol., 2018).

Amyotrofická laterálna skleróza je spojená s génovou

mutáciou Cu/Zn superoxid dismutázy 1 (SOD1) a ubikvitináciou takto modifikovaného enzýmu. Ide o ochorenie motorických neurónov, ktoré sa šíri v oblastiach motorickej kôry, mozgového kmeňa a miechy. Progresia ochorenia sa u postihnutých jedincov pohybuje v rozmedzí 3–5 rokov, respektíve u extrémne pomalej progresie viac ako 10 rokov. Medzi hlavné symptómy tohto ochorenia patrí už od skorého začiatku poškodenie miechových neurónov, čo vedie ku svalovej slabosti dolných končatín, dysartrii a dysfágii (Hardiman a kol., 2017). Maruyama a kol. (2010) popísali výskyt viac ako 30 mutácií rôznych génov, z ktorých iba 14 mutácií spôsobuje dané ochorenie. Tieto mutácie sa podieľajú na kontrole zbalovania proteínov, modifikáciách cytoskeletálnych proteínov a maturácii mRNA. Úloha extracelulárnych vezikúl pri prenose patológie ALS priónovým spôsobom začína akumuláciou a transportom mutovaných proteínov do exozómov a následným prenosom medzi neurónmi. Experimentálne pozorovania progresie ALS dokazujú interakciu medzi proteínmi C9orf72 (Non-coding Region of Chromosome 9 Open Reading Frame 72) a Rab7L1 (Ras-Related Protein Rab-7L1), ktoré sú zodpovedné za reguláciu fúzie MVE s plazmatickou membránou (Aoki a kol., 2017). Proteín TDP-43 (Transactive Response DNA Binding Protein 43), jeden z patologických znakov ALS, bol tiež identifikovaný v exozómoch izolovaných z mozgového tkaniva pacientov s ALS (Iguchi a kol., 2016).

### **ZÁVER**

Najčastejšie neurodegeneratívne poruchy sú spôsobené agregáciou nesprávne zložených proteínov a taktiež mnohými genetickými mutáciami. Aby sa minimalizovalo poškodenie spôsobené daným ochorením, je nevyhnutná skorá a čo možno najmenej invazívna diagnostika. Exozómy ako extracelulárne vezikuly, vyskytujúce sa vo veľkom množstve v biologických tekutinách, majú schopnosť prechodu cez hematoencefalickú bariéru. Táto schopnosť priamo poskytuje možnosť získania informácií z internej medzibunkovej komunikácie. Početné štúdie skúmali asociáciu CSF a exozómov získaných z krvi pacientov s neurodegeneratívnymi ochoreniami. Tento prehľadový článok poukazuje na možnosti využitia stanovenia obsahu exozómov derivovaných oligodendrocytmi a astrocytmi (proteínov a miRNA) pri diagnostike skorých štádií, počas prog-

resie, prípadne pri sledovaní účinnosti liečby vybraných neurodegeneratívnych ochorení.

## PodĎakovanie

Práca vznikla pri riešení projektu VEGA 1/0540/2020 a operačného programu Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPEN-MED), ITMS2014+: 313011V455, v rámci aktivity 313V455 00005-H5 (NV95).

## LITERATÚRA

- Balaj, L. et al. (2011):** Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, 2(180), doi: 10.1038/ncomms1180.
- Behbahani, G. D. (2016):** The role of exosomes contents on genetic and epigenetic alterations of recipient cancer cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(10), pp. 1031—1039.
- Ben Gedalya, T. et al. (2009):**  $\alpha$ -Synuclein and Polyunsaturated Fatty Acids Promote Clathrin-Mediated Endocytosis and Synaptic Vesicle Recycling. *Traffic*, 10(2), pp. 218—234. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00853.x.
- Bengoa-Vergniory, N. et al. (2017):** Alpha-synuclein oligomers: A new hope. *Acta Neuropathologica*, 134(6), pp. 819—838. doi: 10.1007/s00401-017-1755-1.
- Cao, Z. et al. (2019):**  $\alpha$ -Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 696, pp. 114—120. doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.030.
- Corey-Bloom, J. et al. (2018):** Salivary levels of total huntingtin are elevated in Huntington's disease patients. *Scientific Reports*, 8(7371), doi: 10.1038/s41598-018-25095-3.
- D'anca, M. et al. (2019):** Exosome determinants of physiological aging and age related neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11 (232), doi: 10.3389/fnagi.2019.00232.
- Fevrier, B. et al. (2004):** Cells release prions in association with exosomes. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 101(26), pp. 9683—9688. doi:10.1073/pnas.0308413101.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Krämer-Albers, EM. (2012):** Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Frontier in Physiology*, 3(119), doi:10.3389/fphys.2012.00119.
- Goetzl, E. J. et al. (2016):** Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 30(11), pp. 3853—3859. doi: 10.1096/fj.201600756R.
- Grey, M. et al. (2015):** Acceleration of  $\alpha$ -synuclein aggregation by exosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 2969—2982. doi: 10.1074/jbc.M114.585703.
- Gui, Y. X. et al. (2015):** Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, 6(35), pp. 37043—37053. doi: 10.18632/oncotarget.6158.
- Harischandra, D. S. et al. (2018):** Environmental neurotoxicant manganese regulates exosome-mediated extracellular miRNAs in cell culture model of Parkinson's disease: relevance to  $\alpha$ -synuclein misfolding in metal neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 64, pp. 267—277.
- Hessvik, N. P., Llorente, A. (2018):** Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), pp. 193—208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9.
- Holtzman, D. M. et al. (2000):** Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97, pp. 2892-2897. doi: 10.1073/pnas.050004797.
- Huo, L. et al. (2021):** The Emerging Role of Neural Cell-Derived Exosomes in Intercellular Communication in Health and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 15, doi: 10.3389/fnins.2021.738442.
- Huotari, J., Helenius, A. (2011):** Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17), pp. 3481—500. doi: 10.1038/emboj.2011.286.
- Chang, C. W. et al. (2020):** Plasma and Serum Alpha-Synuclein as a Biomarker of Diagnosis in Patients with Parkinson's Disease. *Frontiers in neurology*, 10, doi: 10.3389/fneur.2019.01388.
- Chu, Z., Witte, D. P., Qi, X. (2005):** Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Experimental cell research*, 303(2), pp. 300—307. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.09.029.
- Iguchi, Y. et al. (2016):** Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain*, 139, pp. 3187—3201. doi: 10.1093/brain/aww237.
- Jeon, I. et al. (2016):** Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathologica*, 132, pp. 577—592. doi: 10.1007/s00401-016-1582-9.
- Joshi, P. et al. (2015):** Extracellular vesicles in Alzheimer's disease: Friends or foes? Focus on  $\alpha\beta$ -vesicle interaction. *In-*

- ternational Journal of Molecular Sciences*, 16(3), pp. 4800—4813. doi: 10.3390/ijms16034800.
23. **Kahlert, C., Kalluri, R. (2013):** Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*, 91, pp. 431—437. doi: 10.1007/s00109-013-1020-6
  24. **Krämer-Albers, E. (2007):** Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clinical applications*, 1(11), pp. 1446—1461. doi: 10.1002/prca.200700522.
  25. **Kumar, S. et al. (2017):** MicroRNAs as peripheral biomarkers in aging and age-related diseases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 146, pp. 47—94. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.013.
  26. **Manna, I. et al. (2020):** Exosomal miRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(9), doi: 10.3390/ph13090243.
  27. **Manna, I. et al. (2021):** Exosomal miRNA as peripheral biomarkers in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: A pilot study. *Parkinsonism & Related Disorders*, 93, pp. 77—84. doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.11.020.
  28. **Maruyama, H. et al. (2010):** Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465, pp. 223—226. doi: 10.1038/nature08971.
  29. **Mathieu, M. et al. (2019):** Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21, pp. 9—17. doi: 10.1038/s41556-018-0250-9.
  30. **McKeever, P. M. et al. (2018):** MicroRNA expression levels are altered in the cerebrospinal fluid of patients with young-onset Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 55(12), pp. 8826—8841. doi: 10.1007/s12035-018-1032-x.
  31. **Minciacchi, V. R., Freeman, M. R., Di Vizio, D. (2015):** Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. In *Cell & Development Biology*, 40, pp. 41—51. doi: 10.1016/j.semcd.2015.02.010.
  32. **Obrocki, P. et al. (2020):** Perspectives in fluid biomarkers in neurodegeneration from the 2019 biomarkers in neurodegenerative diseases course—a joint PhD student course at University College London and University of Gothenburg. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12(20), doi: 10.1186/s13195-020-00586-6.
  33. **Pegtel, D. M., Gould, S. J. (2019):** Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88, pp. 487—514. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
  34. **Segura, E., Amigorena, S., Théry, C. (2005):** Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood cells, molecules & diseases*, 35(2), pp. 89—93. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.05.003.
  35. **Selwood, S. P. et al. (2009):** Gene expression profile of the PDAPP mouse model for Alzheimer's disease with and without Apolipoprotein E. *Neurobiology of Aging*, 30(4), pp. 574—590. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.006.
  36. **Simonsen, A. H. et al. (2017):** Recommendations for CSF AD biomarkers in the diagnostic evaluation of dementia. *Alzheimer's & Dementia*, 13(3), pp. 274—284. doi: 10.1016/j.jalz.2016.09.008.
  37. **Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A. (2017):** Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, pp. 30—41. doi: 10.1016/j.plipres.2017.03.001.
  38. **Statello, L. et al. (2018):** Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. *PLOS One*, 13(4), doi: 10.1371/journal.pone.0195969.
  39. **van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G. (2018):** Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), pp. 213—228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
  40. **Vieira, S. R. L. (2020):** Biofluid Biomarkers in Parkinson's Disease: Clarity Amid Controversy. *Movement Disorder Society*, 35 (7), pp. 1128—1133. doi: 10.1002/mds.28030.
  41. **Xilouri, M., Brekk, O. R., Stefanis, L. et al. (2013):** Alpha-synuclein and protein degradation systems: A reciprocal relationship. *Molecular Neurobiology*, 47(2), pp. 537—551. doi: 10.1007/s12035-012-8341-2.
  42. **Yu, H. et al. (2020):** Potential Roles of Exosomes in Parkinson's Disease: From Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment to Prognosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(86), doi: 10.3389/fcell.2020.00086.
  43. **Zhang, Y. (2019):** Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9(19), doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 81–86

## C-PEPTID PROINZULÍNU – CHARAKTERISTIKA, FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY A JEHO MOŽNÁ ÚLOHA V PATOGENÉZE CHRONICKÝCH KOMPLIKÁCIÍ *DIABETES MELLITUS*

### C-PEPTIDE OF PROINSULIN—CHARACTERISTICS, PHYSIOLOGICAL EFFECTS AND ITS POSSIBLE ROLE IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC COMPLICATIONS OF *DIABETES MELLITUS*

Šalamonová Blichová Lenka<sup>1</sup>, Fraenkel Emil<sup>2</sup>  
Szabóová Daniela<sup>1</sup>, Beňačka Roman<sup>1</sup>, Rácz Oliver<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologickej fyziológie UPJŠ Lekárska fakulta, Košice

<sup>2</sup>IV. Interná klinika UNLP a UPJŠ Lekárska fakulta, Košice

<sup>3</sup>Miskolci Egyetem, Egészségtudományi Kar, Maďarsko

e-mail: lenka.salamonova.blichova@upjs.sk  
*prehľadová práca*

#### SÚHRN

C-peptid tvorí spolu s reťazcami A a B molekulu proinzulínu. Pôvodne bol považovaný za biologický odpad, ktorý mal za úlohu zaistenie správnej priestorovej štruktúry proinzulínu pred jeho premenou na inzulín. V praktickej diabetológii je využívané stanovenie koncentrácie C-peptidu v plazme ako ukazovateľa endogénnej sekrecie inzulínu. V súčasnosti sú k dispozícii údaje o možných biologických a fyziologických funkciách C-peptidu, ale ich presný mechanizmus doposiaľ nie je známy. Ďalší členovia inzulínovej rodiny, slúžiaci u človeka a u živočíchov na nižšej úrovni fylogénny ako rastové faktory, tiež obsahujú vo svojej molekule časť „C“, ktorá je u niektorých posttranslačne odstránená, u iných nie. Vzniká tak hypotéza, že odstránenie „C“ časti molekuly v priebehu fylogénny malo za následok oslabenie pleiotropnej rastovej a širokej metabolickej funkcie týchto molekúl a vznik hormónu, ktorý špecificky reguluje metabolizmus glukózy. Pre pochopenie integrácie metabolizmu

s ostatnými funkciami organizmu je dôležité objasnenie funkcie členov inzulínovej rodiny v zdraví a chorobe vrátane významu C-peptidu a „C“ podobnej domény týchto bielkovín.

**Kľúčové slová:** C-peptid; fylogénny; inzulínová rodina; komplikácie; *diabetes mellitus*

#### ABSTRACT

C-peptide together with A and B chains comprises the molecule of proinsulin. Originally, it was considered as a biological waste important only to ensure the proper spatial structure of proinsulin before its transformation to insulin. Its only use in diabetological practice is the assessment of endogenous insulin secretion. Recently, there have been numerous data about the possible biological and physiological effects of C-peptide, but the exact mechanisms of these functions are not yet elucidated.



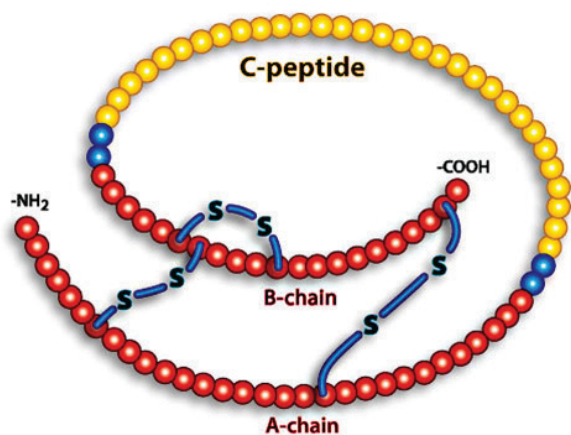
ted. Members of insulin family acting as growth factors in human body and in animal kingdom on lower level of phylogenesis also contain their part "C" in the precursors of these substances. In some of them, the part "C" is removed posttranslationally, in others not. This leads to the hypothesis that removal of part "C" in the course of phylogenesis is responsible for transformation of these substances with broad and pleiotropic functions to a hormone regulating specifically the metabolism of glucose. The study of functions of different members of insulin family, including the biological significance of part "C" or C-peptide could be helpful to understand the principles of metabolic integration in health and disease.

**Key words:** C-peptide; phylogenesis; insulin family; complications; *diabetes mellitus*

## ÚVOD

C-peptid je súčasťou molekuly preproinzulínu produkovaného B bunkami Langerhansových ostrovčiek pankreasu. Preproinzulín po syntéze je štiepený na proinzulín, tvorený A a B reťazcom inzulínu a C-peptidom, ktorý spája reťazce A a B a tak stabilizuje molekulu proinzulínu. Odtiaľ pochádza aj jeho názov (C = connecting – spojovací, Obr. 1).

V dobe, keď ho Steiner v roku 1967 objavil (a vyvrátil myšlienku, že dva peptidové reťazce inzulínu sú kódované na dvoch génoch), vznikol predpoklad, že podobne ako in-



**Obr. 1. Schéma molekuly proinzulínu**

(A-chain – reťazec A; B-chain – reťazec B; zdroj:

[http://www.familyhealthonline.ca/fho/diabetes/\\_images/c\\_peptide.jpg](http://www.familyhealthonline.ca/fho/diabetes/_images/c_peptide.jpg))

zulín, aj C-peptid má priamy účinok na glykémiu a vedie k vychytávaniu glukózy tkanivami (Steiner a kol., 1967). Tento účinok sa však nepotvrdil, a tak bol C-peptid považovaný len za akýsi metabolický odpad a biologicky neúčinnú látku.

C-peptid tvorený beta bunkami pankreasu na rozdiel od inzulínu nepodlieha vychytávaniu a metabolizmu v pečeni, preto je logické jeho využitie ako markera funkcie beta buniek. Fyziologická plazmatická koncentrácia C-peptidu nalačno je 30–60 pmol·L<sup>-1</sup>, postprandiálna hodnota dosahuje 100–300 pmol·L<sup>-1</sup>. Koncentrácia inzulínu v periférnej krvi je 18–173 pmol·L<sup>-1</sup>. Počas poklesu koncentrácie inzulínu je približne 3 minúty, C-peptidu 30 minút.

## Predpokladané fyziologické účinky C-peptidu

Poznatky o C-peptide prešli za posledné desaťročia významným pokrokom. Viaceré štúdie preukázali mnohé biologické funkcie C-peptidu, avšak presný mechanizmus účinku C-peptidu ostáva neobjasnený. Je pravdepodobné, že účinok C-peptidu závisí od cieľového tkaniva, od daných fyziologických podmienok, prítomnosti iných faktorov (napr. inzulínu) a tiež od jeho koncentrácie v tkanive (Richards, 2014; Vejražková a kol., 2020).

Dlho diskutovanou otázkou je identifikácia receptora pre C-peptid. Viaceré štúdie preukázali, že C-peptid sa viaže na rôzne typy buniek, napr. fibroblasty, tubulárne bunky obličiek a endotelové bunky (Pramanik a kol., 2001; Henriksson a kol., 2001; Yosten, Kolar, 2015). C-peptid aktivuje viaceré signálne dráhy, ktorých výsledkom je aktivácia eNOS a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP-ázy a stimulácia viacerých transkripčných faktorov (Kitamura, 2001; Richards, 2015; Bhatt, 2013; Haidet a kol., 2012; Zhong a kol., 2004, 2005). Tieto poznatky vedú k predpokladu, že receptorom pre C-peptid je pravdepodobne receptor spriahnutý s G-proteínom (GPR), konkrétne GPR146 (Yosten a kol., 2013).

Zároveň prichádzajú do úvahy aj mechanizmy signalizácie bez účasti membránového receptora. Štúdie Luppi a kol. (2009) a Li a kol. (2013) preukázali internalizáciu C-peptidu do bunky jadra vo vybraných typoch buniek. Priame interakcie s intracelulárnymi proteínmi a enzýmami ovplyvňujú viaceré procesy ako napr. glykolýzu a bunkový rast (Ishii a kol., 2012; Jagerbrink a kol., 2009).

## Význam C-peptidu vo vzťahu ku chronickým komplikáciám *diabetes mellitus*

Viacere štúdie popísali vplyv hladiny C-peptidu na výskyt mikro- a makrovaskulárnych komplikácií diabetu. Podľa nich je znížená hladina C-peptidu spojená s mikrovaskulárnymi a nervovými komplikáciami. Pri podávaní C-peptidu došlo k zlepšeniu viacerých funkčných abnormalít u pacientov s prvým typom *diabetes mellitus*, u ktorých je syntéza C-peptidu nízka (Wahren, 2017; Ekberg a kol., 2007). Nízke reziduálne hladiny C-peptidu korelovali nepriamo so zvýšeným HbA1c, zvýšenou dennou dávkou inzulínu a so závažnosťou mikrovaskulárnej dysfunkcie, ktorá vedie k neuropatii (Lachin a kol., 2014), ale aj so zvýšenou incidenciou atakov závažnej hypoglykémie. Po transplantácii beta buniek dochádza k obnove sekrécie inzulínu a C-peptidu, a to pomohlo pri obnove periférnych

nervov a obličiek poškodených diabetom (Fiorina a kol., 2003; Navarro a kol., 1997).

Na druhej strane existujú správy o tom, že na rozvoj makroangiopatie má vplyv vysoká hladina C-peptidu. Pacienti so skorou manifestáciou druhého typu *diabetes mellitus* a inzulínovou rezistenciou majú vysoké sérové hladiny C-peptidu a nie je vylúčené, že to u nich prispieva k rozvoju aterosklerózy (Wang a kol., 2015). Podľa Cabreru a kol. (2015) zvýšená hladina C-peptidu je spojená s kardiovaskulárnou morbiditou aj u inzulín-rezistentných nediabetických pacientov. Proti úlohe C-peptidu pri ateroskleróze svedčia práce, ktoré dokazujú jeho účinky na subcelulárnej úrovni. Podľa týchto štúdií C-peptid redukuje oxidačný stres v endotelových bunkách pri hyperglykémii alebo strese, má protizápalovú a antiapoptotickú funkciu (Bhatt a kol., 2013a; Luppi, Drain, 2017) a inhibuje ex-

**Tabuľka 1. Prehľad inzulínov a inzulínu podobných faktorov u človeka a na rôznej úrovni fylogénézy**

<b>Ludské a zvieracie inzulíny</b>
<p>Inzulín človeka a väčšina cicavcov majú veľmi podobnú štruktúru a sekvenciu aminokyselín v A a B reťazcoch. Inzulín ošípanej, psa, kráľika a veľryby sa líši od ľudského len v poslednej aminokyseline B reťazca. Inzulín koňa sa líši od ľudského v dvoch, hovädzí v troch a jahňaci v štyroch aminokyselinách. Je to obrovské šťastie pre ľudskú medicínu, pretože Banting a Best objavili inzulín na základe experimentov na psoch a až do výroby ľudského inzulínu génovou technológiou všetci chorí s <i>diabetes mellitus</i> dostávali čistené zvieracie inzulíny. Gén preproinzulínu u človeka je na 11. chromozóme.</p>
<b>Ludské, inzulínu podobné rastové faktory</b>
<p>Do tejto rodiny patria IGF-1 a 2 (insulin-like growth factors), 3 relaxíny a 4 inzulínu podobné peptidy (INSL3-6). IGF-1 (starší názov somatomedín C) má okrem častí A, B a C, ktoré sa podobajú na ľudský proinzulín, aj doménu D. Gén pre IGF-1 je na 12. chromozóme, bielkovina sa tvorí v pečeni a pozostáva zo 70 aminokyselín. V krvi koluje vo väzbe na IGF väzúce bielkoviny. Sekrécia IGF-1 je riadená rastovým hormónom z hypofýzy a jeho hladina je vysoká v detstve a v puberte. Pri akromegálii a gigantizme je hladina IGF-1 vysoká, pri hypofyzárnom nanizme a pri mutácii génu pre receptor rastového hormónu (Laronov typ trpasličieho rastu) nízka.</p> <p>IGF-2 sa podobá na IGF-1, ale jeho hlavná úloha je v reprodukcii. Okrem pečene sa tvorí v placentе a vo fetálnych tkanivách. Podľa niektorých údajov mimo gravidity má význam aj pri činnosti svalov a kostí a v oblasti kognitívnych funkcií. Gén sa nachádza na 11. chromozóme v blízkosti génu pre proproinzulín a je imprimovaný (exprimuje sa z otcovského chromozómu č. 11). Tvorba IGF-2 nie je závislá od rastového hormónu.</p> <p>Z relaxínov je najviac známa funkcia relaxínu-2. Jeho gén je na 9. chromozóme a bielkovina sa syntetizuje vo forme preprohormónu a posttranslačne je z nej odstránená časť C, podobne ako u inzulínu. Ide o hormón s pleiotrofným účinkom. Počas gravidity sa tvorí najprv v corpus luteum, potom v placentе a u mužov v malom množstve aj v prostate. Počas pôrodu pomáha pri uvoľnení väziva pôrodných ciest. Relaxín-2 sa tvorí aj v iných orgánoch a pravdepodobne má fyziologické účinky pri činnosti väziva v rôznych orgánoch, hojení rán a rovnováhy telesných tekutín. Relaxín-3 je exprimovaný hlavne v mozgu rýb a cicavcov. Relaxín-1 je zvláštny tým, že sa produkuje len u vyšších primátov (asi ako produkt duplikácie iného relaxínového génu neskoro vo fylogénéze).</p> <p>Poznatky o fyziologických funkciách ďalších členov ľudskej inzulínovej rodiny INSL3-6 nie sú zatiaľ dostatočne prebádané, ale pravdepodobne všetky majú rozmanité, pleiotropné účinky.</p>
<b>Inzulínu podobné rastové faktory u nižších živočíchov</b>
<p>Regulácia príjmu živín a energetického metabolizmu je v základných princípoch taká istá u nižších foriem živočíšneho sveta ako u stavovcov, cicavcov a primátov a mnohé regulátory týchto pochodov patria do inzulínovej superrodiny. Ako príklad je možné uviesť inzulínu podobné rastové faktory identifikované u červa <i>Caenorhabditis elegans</i> a mušky <i>Drosophila melanogaster</i>. Červ má až 37 a drozofila 8 takýchto hormónov (ins1-37 a dilp1-7) a receptor týchto hormónov u drozofily má podobnú štruktúru ako ľudský inzulínový receptor. Presná funkcia týchto látok nie ešte objasnená, ale mutácie v ich génoch a/alebo v génoch ich receptorov má za následky poruchy metabolizmu, reprodukcie, neuroendokrinných funkcií a dĺžky života. Na prvý pohľad pleiotropné účinky týchto látok sú v protiklade s vysoko špecifickým účinkom ľudského inzulínu, ale to nie je celkom pravda. Účinky inzulínu z hľadiska fyziológie sú totiž oveľa širšie, ako „znižovanie glykémie“, inzulín tiež zasahuje do metabolizmu bielkovín a lipidov. Svedčí o tom množstvo prvkov signálizačnej kaskády po väzbe inzulínu na receptor v svalových, tukových, pečeneových bunkách, ale aj v nervovom tkanive.</p>

**Tabuľka 2. Argumenty „pre“ a „proti“ existencii biologických a fyziologických účinkov C-peptidu**  
(Landreh, Journval, 2021, modifikované)

	<b>Dôkaz biologickej aktivity</b>	<b>Nedostatočný dôkaz biologickej aktivity</b>
<b>Fylogénéza</b>	Segment C je prítomný v molekule proinzulínu a podobných hormónov u všetkých fylogenetických kmeňov	Málo konzervované segmenty C naprieč fylogénézou
<b>Syntéza inzulínu</b>	C-peptid zabezpečuje správnu priestorovú štruktúru proinzulínu a zabraňuje jeho agregácii <i>in vitro</i>	Mutácie v exóne kódujúceho C-peptid nenašujú biogénzu inzulínu
<b>Membránové interakcie</b>	C-peptid sa viaže na membrány a aktivuje MAP kinázy	Receptor C-peptidu nebol presvedčivo objavený
<b>Účinky na úrovni buniek</b>	C-peptid vyvoláva široké spektrum účinkov v tkanivových kultúrach a zvieracích modeloch	C-peptid vykazuje len limitovanú špecifitu v <i>in vitro</i> pokusoch
	<b>Dôkaz fyziologickej alebo terapeutickkej aktivity</b>	<b>Nedostatočný dôkaz fyziologickej alebo terapeutickkej aktivity</b>
<b>Účinky na nervové tkanivo</b>	C-peptid zlepšuje vedenie vzruchu a redukuje neuropatiu u chorých s prvým typom diabetu	Nepozorovaný významný vplyv v klinických štúdiách
<b>Chronické komplikácie diabetes mellitus</b>	Napriek aplikácii ľudských inzulínov a ich analógov podľa medzinárodných odporúčaní, u väčšiny chorých nie je možné zabrániť rozvoju chronických komplikácií	Dôkazy o účinnosti podávania C-peptidu chorým s <i>diabetes mellitus</i> nie sú jednoznačné

presiu adhezívnych molekúl, ktoré vznikajú pri hyperglykémii (Yosten a kol., 2014).

### **C-peptid majú aj iné hormóny z veľkej rodiny inzulínu podobných rastových faktorov**

Inzulín, kódovaný u ľudí na 11. chromozóme, je v medicíne najviac známym, ale v skutočnosti pomerne mladým členom inzulínovej rodiny a superrodiny (Tab. 1). Ostatní členovia rodiny sú rastové faktory, ktoré u človeka, ale aj na nižších stupňoch fylogénézy, regulujú rast buniek a ich energetický metabolizmus (Hotamisligil, 2017). Mnohé z týchto bielkovín sa podobajú na molekulu proinzulínu v tom, že v molekule majú časť, ktorá sa podobá na C-peptid proinzulínu, ale tá sa neodstráni z molekuly. Vzniká takto hypotéza, že práve odstránenie „C“ časti molekuly niekedy vo fylogénéze malo za následok oslabenie pleiotropnej rastovej a širokej metabolickej funkcie molekuly a vznik látky, ktorá veľmi špecificky reguluje metabolizmus glukózy. Proti tejto hypotéze svedčí nález, že relaxíny majú tiež odstránený stredný peptid, ale nemajú hypoglykemizujúci účinok (Shabanpoor, Separovic, Wade, 2009). Otvorená je aj otázka, prečo gén pre inzulín je exprimovaný len v B bunkách Langerhansových ostrov-

čekov a inzulínu podobné rastové faktory predovšetkým v pečeni a iných orgánoch (placenta, mozog a iné).

Podrobné údaje o fylogénéze inzulínu, inzulínu podobných faktorov, ich receptorov a ich funkciách v zdraví a chorobe je možné nájsť v prácach Saltier, Kahn (2001), Garofalo (2002), Rentiera a kol. (2008), Shabanpoor a kol. (2009) a v databáze Ensembl Genome Browser vytvorenej Európskym Bioinformatickým inštitútom ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Podľa nedávnej analýzy ostáva v súvislosti s C-peptidom viaceré sporných výsledkov štúdií (Tab. 2), ktoré zneumožňujú označiť C-peptid jednoznačne za hormón, alebo aspoň za molekulu s konštantným účinkom na rôzne biologické a fyziologické pochody. Autori analýzy preto navrhujú odlišiť biologické funkcie C-peptidu od fyziologických (Landreh, Journval, 2021).

### **ZÁVER**

Podľa nášho názoru, C-peptid proinzulínu a ostatné formy inzulínovej rodiny si zaslúžia významnú pozornosť z rôznych aspektov:

Pri štúdiu patogenézy rôznych foriem *diabetes mellitus* a inzulínovej rezistencie je potrebné využiť pridanú hodnotu stanovenia C-peptidu ako skutočného ukazovateľa sekrecie inzulínu (Rácz a kol., 2006, Rácz, 2007). Príkladom môže byť návrh novej klasifikácie druhého typu *diabetes mellitus* alebo nami navrhnutý ukazovateľ triacylglycerol/C-peptid (Ahlquist a kol., 2021; Brenišin a kol., 2021).

Je potrebné cieľenými experimentálnymi a klinickými štúdiami objasniť fyziologické a patofyziologické účinky C-peptidu proinzulínu nezávisle od účinku glykémie a hladiny inzulínu v zdraví a chorobe.-

Pre lepšie pochopenie integrácie metabolizmu s ostatnými funkciami organizmu (imunita, reprodukcia a iné) je dôležité objasnenie úlohy ostatných členov inzulínovej rodiny v zdraví a v chorobe vrátane významu C-peptidu a „C“ podobnej domény týchto bielkovín.

## LITERATÚRA

- Ahlqvist, E., Prasad, R. B., Groop L. (2021):** Towards improved precision and a new classification of *diabetes mellitus*. *J. Endocrin.*, 252 (3), pp. R59—R71. doi: 10.1530/JOE-20-0596.
- Bhatt, M. P. et al. (2013a):** C-peptide prevents hyperglycemia-induced endothelial apoptosis through inhibition of reactive oxygen species-mediated transglutaminase 2 activation. *Diabetes*, 62 (1), pp. 243—253. doi: 10.2337/db12-0293.
- Bhatt, M. P. et al. (2013b):** C-peptide activates AMPK $\alpha$  and prevents ROS-mediated mitochondrial fission and endothelial apoptosis in diabetes. *Diabetes*, 62 (11), pp. 3851—3862. doi: 10.2337/db13-0039.
- Brenišin, M. et al. (2021):** Metabolic indices as markers of insulin resistance in gravidity—a pilot study. *Clin. Chem. Labor. Med.*, 2021, 59 (9), pp. eA80—eA81.
- Cabrera, de L. A. et al. (2015):** C-peptide as a risk factor of coronary artery disease in the general population. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 12 (3), pp. 199—207. doi: 10.1177/1479164114564900.
- Ekberg, K. et al. (2007):** C-Peptide replacement therapy and sensory nerve function in type 1 diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, 30 (1), pp. 71—76, 2007. doi: 10.2337/dc06-1274.
- Ensembl Genome Browser, verzia 105** (genomická databáza), [cit.21.03.2022] Dostupné na: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).
- Fiorina, P. et al. (2003):** Islet transplantation is associated with improvement of renal function among uremic patients with type I *diabetes mellitus* and kidney transplants. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14 (8), pp. 2150—2158. doi: 10.1097/01.asn.0000077339.20759.a3.
- Garofalo, R. S. (2002):** Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrin. Metabol.*, 13 (4), pp. 156—162. doi: 10.1016/s1043-2760(01)00548-3.
- Haidet, J. et al. (2012):** C-peptide reduces pro-inflammatory cytokine secretion in LPS-stimulated U937 monocytes in condition of hyperglycemia. *Inflamm. Res.*, 61 (1), pp. 27—35. doi: 10.1007/s00011-011-0384-8.
- Henriksson, M. et al. (2001):** Specific binding of proinsulin C-peptide to intact and to detergent solubilized human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 280 (2), pp. 423—427. doi: 10.1006/bbrc.2000.4135.
- Hotamisligil G. S. (2017):** Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542 (7640), pp. 177—184. doi: 10.1038/nature21363.
- Ishii, T. et al. (2012):** Proinsulin C-peptide activates  $\alpha$ -enolase: implications for C-peptide—cell membrane interaction. *J. Biochem.*, 152 (1), pp. 53—62. doi: 10.1093/jb/mvs052.
- Jägerbrink, T. et al. (2009):** Proinsulin C-peptide interaction with protein tyrosinephosphatase 1B demonstrated with a labeling reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 387 (1), pp. 31—35. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.074.
- Kitamura, T. et al. (2001):** Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem. J.*, 355 (Pt 1), pp. 123—129. doi: 10.1042/bj3550123.
- Lachin, J., McGee, P., Palmer, J. P., DCCT/EdicResearch Group (2014):** Impact of C-peptide preservation on metabolic and clinical outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*, 63 (2), pp. 739—748, doi: 10.2337/db13-0881.
- Landreh, M., Jörnvall, H. (2021):** Biological activity versus physiological function of proinsulin C-peptide. *Cell. Mol. Life Sci.*, 78 (3), pp. 1131—1138. doi: 10.1007/s00018-020-03636-2.
- LeRoith, D. et al. (1993):** Phylogeny of the insulin-like growth factors (IGFs) and receptors: A molecular approach. *Molec. Reprod. & Develop.*, 35 (4), pp. 332—338. doi: 10.1002/mrd.1080350403.
- Li, Y. et al. (2013):** Dynamic localization and functional implications of C-peptide might for suppression of iNOS in high glucose-stimulated rat mesangial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 381 (1—2), pp. 255—260. doi: 10.1016/j.mce.2013.08.007.

20. Luppi, P. et al. (2009): C-peptide is internalised in human endothelial and vascular smooth muscle cells via early endosomes. *Diabetologia*, 52 (10), pp. 2218—2228, doi: 10.1007/s00125-009-1476-7.
21. Luppi, P., Drain, P. (2017): C-peptide antioxidant adaptive pathways in  $\beta$  cells and diabetes. *J. Intern. Med.*, 281 (1), pp. 7—24. doi: 10.1111/joim.12522.
22. Navarro, X., Sutherland, D., Kennedy, W. (1997): Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann. Neurol*, 42 (5), pp. 727—736, doi: 10.1002/ana.410420509.
23. Pramanik, A. et al. (2001): C-peptide binding to human cell membranes: importance of Glu27. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 284 (1), pp. 94—98, doi: 10.1006/bbrc.2001.4917.
24. Rácz, O. et al. (2006): C-peptid—marker inzulinovej rezistencie a fyziologicky významný hormón? *Labor Aktuell 2*, pp. 10—13.
25. Rácz, O. (2007): Perspektívy využitia stanovenia C-peptidu v praktickej diabetológii. *Labor Aktuell 2*, pp. 12—16.
26. Renteira, M. E. et al. (2008): A comparative structural bioinformatics analysis of the insulin receptor family ectodomain based on phylogenetic information. *PLOS One*, 3 (11), e3667, doi: 10.1371/journal.pone.0003667.
27. Richards, J. P. et al. (2014): Low O<sub>2</sub>-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes is restored by physiological ratios of C-peptide and insulin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 307 (7), R862—R868. doi: 10.1152/ajpregu.00206.2014.
28. Richards, J. P. et al. (2015): Mechanisms of C-peptide-mediated rescue of low O<sub>2</sub>-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 308 (5), R411—R418. doi: 10.1152/ajpregu.00420.2014.
29. Saltier, A. L., Kahn R. (2001): Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414 (6865), pp. 799—806. doi: 10.1038/414799a.
30. Shabanpor, F., Separovic, F., Wade, D. J. (2009): The human insulin superfamily of polypeptide hormones. *Vitamins and Hormones*, 80, pp. 1—31. doi: 10.1016/S0083-6729(08)00601-8.
31. Steiner, D. F. et al. (1967): Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, 157 (3789), pp. 697—700. doi: 10.1126/science.157.3789.697.
32. Vejražková, D. et al. (2020): Insights into the physiology of C-peptide. *PhysiolRes*, 69 (Suppl 2), S237—S243. doi: 10.33549/physiolres.934519.
33. Wahren, J. (2017): C-peptide and the pathophysiology of microvascular complications of diabetes. *J. Intern. Med.*, 281(1), pp. 3—6. doi: 10.1111/joim.12541.
34. Wang, L. et al. (2015): C-peptide is independently associated with an increased risk of coronary artery disease in T2DM subjects: a cross-sectional study. *PLOS One*, 10 (6), e0127112. doi: 10.1371/journal.pone.0127112.
35. Yosten, G. et al. (2013): Evidence for an interaction between proinsulin C-peptide and GPR146. *J. Endocrinol.*, 218 (2), B1—B8. doi: 10.1530/JOE-13-0203.
36. Yosten, G. L. et al. (2014): Physiological effects and therapeutic potential of proinsulin C-peptide. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 307 (11), E955—E968. doi: 10.1152/ajpendo.00130.2014.
37. Yosten, G. L., Kolar, G. R. (2015): The physiology of proinsulin C-peptide: unanswered questions and a proposed model. *Physiology (Bethesda)*, 30 (4), pp. 327—332. doi: 10.1152/physiol.00008.2015.
38. Zhong, Z. et al. (2004): C-peptide stimulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinases in human renal tubular cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61 (21), pp. 2782—2790, doi: 10.1007/s00018-004-4258-x.
39. Zhong, Z. et al. (2005): C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells. *Diabetologia*, 48 (1), pp. 187—197. doi: 10.1007/s00125-004-1602-5.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 87–95

## RETROSPEKTÍVNA ŠTÚDIA PRÍTOMNOSTI DNA PATOGÉNOV HPV A UREAPLASMA UREALYTICUM V SÚBORE GYNEKOLOGICKÝCH PACIENTOK RETROSPECTIVE STUDY OF THE PRESENCE OF DNA PATHOGENS HPV AND UREAPLASMA UREALYTICUM IN A GROUP OF GYNECOLOGICAL PATIENTS

Švecová Monika<sup>1</sup>, Lešová Dana<sup>1</sup>, Karabinoš Anton<sup>2</sup>

Dubayová Katarína<sup>1</sup>, Mareková Mária<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

<sup>2</sup>SEMBID, s. r. o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky

e-mail: katarina.dubayova@upjs.sk  
pôvodná práca

### SÚHRN

Vysoká incidencia závažných chronických ochorení, najmä onkologických, je dôležitým a stále aktuálnym problémom vo svete medicíny. Neliečené chronické zápalové ochorenia urogenitálneho traktu žien sú často príčinou neoplázií, či kancerogenézy. Pôvodcom týchto infekcií sú zvyčajne sexuálne prenosné patogény (STD, Sexually Transmitted Diseases) a sexuálne prenosné infekcie (STI, Sexually Transmitted Infections). Najčastejšie sa vyskytujúci bakteriálny patogénom je *Ureaplasma urealyticum*. Vírusovej sexuálne prenosnej infekcii dominuje ľudský papilomavírus (HPV, Human Papilloma-Virus). V posledných rokoch globálny výskyt zápalových ochorení urogenitálneho traktu neustále stúpa, najmä medzi mladými a sexuálne aktívnymi jedincami. Predkladaná práca prezentuje výsledky analýzy DNA vzoriek gynekologických pacientok. Prítomnosť a kvantitatívna nálož vysokorizikových typov vírusu HPV bola hodnotená v súvislosti s diagnózou, vekom, ako aj infekciou *Ureaplasma urealyticum*.

**Kľúčové slová:** HPV; *Ureaplasma urealyticum*; DNA; zápalové ochorenia, urogenitálny trakt

### ABSTRACT

The high incidence of serious chronic diseases, especially oncological diseases, is an important and still current problem in the world of medicine. Untreated chronic inflammatory diseases of the urogenital tract in women are often the cause of neoplasia or carcinogenesis. These infections are usually caused by Sexually Transmitted Diseases (STDs) and Sexually Transmitted Infections (STIs). The most common bacterial pathogen is *Ureaplasma urealyticum*, whereas the dominating sexually transmitted viral infection is Human Papillomavirus (HPV). In recent years, the global incidence of inflammatory diseases of the urogenital tract has been steadily rising, especially among young and sexually active individuals. This paper presents the results of DNA analysis of gynecological patients focused on the presence and quantitative load of high-risk types of HPV virus in connection with their diagnosis, age, and infection of *Ureaplasma urealyticum*.

**Key words:** HPV; *Ureaplasma urealyticum*; DNA; inflammatory diseases, urogenital tract

## ÚVOD

Rakovina krčka maternice zostáva vážnym problémom na celom svete, nielen v zaostalých krajinách. K rozvoju ochorenia prispieva infekcia krčka maternice vysoko rizikovým onkogénnym ľudským papilomavírusom hrHPV (high-risk HPV, vysokorizikové HPV) (Carter, 2011). HPV je DNA vírus, ktorý v súčasnosti predstavuje najčastejšie sexuálne prenosnú infekciu na svete. Epidemiologické štúdie udávajú globálnu prevalenciu HPV 11,7 % (Tolstov a kol., 2014). K dnešnému dňu bolo identifikovaných viac ako 200 typov HPV, z ktorých približne 40 spôsobuje anogenitálne infekcie. HPV vírusy sú klasifikované na základe ich genómovej sekvencie. Ich označenia predstavujú genotypy (nie sérotypy), ktoré sú priradené na základe poradia objavy (Heidegger a kol., 2018). HPV typy s vysokým onkogénnym potenciálom sú 16, 18, 26, 31, 35, 39, 45, 48, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82, pričom nízkorizikové HPV typy (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) sú zodpovedné za benígne lézie najčastejšie typu anogenitálnych bradavíc (Sarier a kol., 2019). Vysoká prevalencia HPV infekcie ako aj blízkosť vírusových lézií k močovým cestám sú hlavnými dôvodmi prečo sa v posledných rokoch stále stáva téma HPV čoraz dôležitejšia v oblasti urológie (Sarier a kol., 2020).

Aj keď už bol zistený aj nesexuálny prenos HPV infekcie, obvykle sa vírus nachádzajúci sa na bazálnej membráne cervikálneho epitelu prenáša pohlavným stykom. Pri prenose je vírus zachytený bazálnymi bunkami a vírusová amplifikácia nastáva pri raste plochého epitelu hostiteľa. Počas tohto procesu samotný vírus zostáva skrýty pred imunitným systémom hostiteľa, a tak v mnohých prípadoch nespôsobuje imunitnú odpoveď. Asi u polovice žien infikovaných HPV sa nevyvinú klinicky merateľné hladiny sérových protilátok, a preto im hrozí riziko reinfekcie rovnakým typom HPV.

HPV vírus je veľmi nákazlivý, pričom približne u 60–66 % partnerov jedincov s genitálnou HPV infekciou sa po približne 3 mesiacoch vyvinú genitálne HPV lézie (Stanley a kol., 2007). Použitie kondómov môže znížiť riziko infekcie HPV.

Na rozdiel od mnohých iných vírusov je imunitná odpoveď na HPV oneskorená. Protilátky proti HPV sa tvoria až 8–18 mesiacov po detekcii HPV-DNA a aj vtedy sú prítomné v nízkych hladinách (Stanley, 2006). Imunitný únik HPV je vysvetľovaný dvoma mechanizmami. Prvým

je, že HPV infekcia nie je lytická, a preto nemá žiadnu viremickú fázu. V dôsledku toho sa nemôže vyvinúť dostatočná imunitná odpoveď. Druhým mechanizmom je neúčinná tvorba protilátok keratinocyty (Sarier a kol., 2020). Napriek tejto nedostatočnej imunitnej odpovedi je vírus imunitným systémom eliminovaný do 2 rokov u 90 % infikovaných žien (Garolla a kol., 2013) a 80 % infikovaných mužov (Liu a kol., 2014). Vírusový klírens je priamo spojený s typom HPV. Eradikácia vírusu môže trvať dlho, obzvlášť u vysoko rizikových typov HPV. Pretrvávajúca infekcia sa vyskytuje u 10 % pacientov a vývoj invazívnej rakoviny v týchto prípadoch trvá 15–20 rokov (Muňoz a kol., 2003).

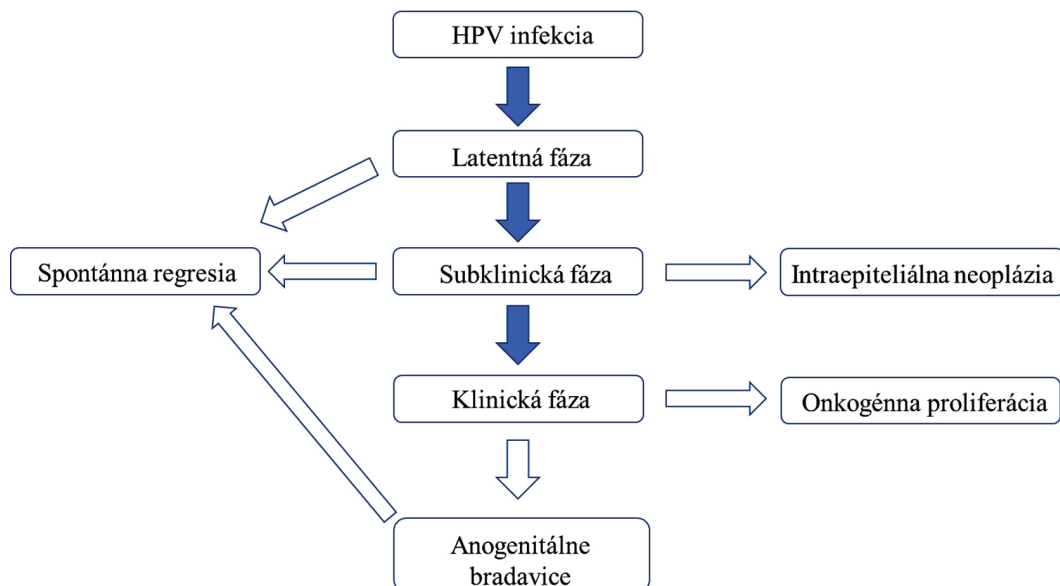
Bunková imunita zohráva kľúčovú úlohu pri regresii lézií spôsobených HPV. To vysvetľuje vyšší výskyt lézií spojených s HPV u pacientov s potlačenou bunkovou imunitou v dôsledku HIV infekcie alebo predošlej transplantácie (Ma a kol., 2018).

Očkovanie proti HPV produkuje trvalé hladiny sérových protilátok a ukázalo sa, že je účinné pri znižovaní chorôb spôsobených typmi HPV obsiahnutých v danej vakcíne.

Klinický obraz aktívnej HPV infekcie je variabilný a závisí od typu vírusu, umiestnenia lézie, imunitného stavu pacienta a charakteru infikovaného epitelu. Všeobecne sa však klinický priebeh genitálnej HPV infekcie rozdeľuje na latentné, subklinické a klinické obdobie (Obr. 1) (Sarier a kol., 2020). V latentnom období choroba nemá žiadne cytologické ani morfológické príznaky.

V subklinickom období je možné cytologické/mikroskopické zmeny alebo HPV lézie vizualizovať pomocou kolposkopie. V tomto období sa spravidla vyvíja intraepiteliálna neoplázia. Klinické obdobie vykazuje viditeľné lézie a symptómy, ako je condyloma acuminatum (CA) alebo invazívna rakovina. Väčšina infekcií HPV je bez klinických prejavov. Deväťdesiat percent infekcií zostáva latentných. Okrem latentného a subklinického obdobia, v klinickom období môže dôjsť aj k spontánnej regresii benígnych lézií. Asi 10% týchto prípadov progreduje do vzniku intraepiteliálnych alebo kondylomatózných lézií, z ktorých 1 % sa môže transformovať na invazívny karcinóm (Sarier a kol., 2020).

Rutinná diagnostika HPV vírusu je založená na detekcii prítomnosti DNA vírusu pomocou polymerázovej reakcie (PCR, Polymerase Chain Reaction) (Münger, 2002). Výsledok kvantitatívnej real time PCR poskytuje obraz o virálnej náloži vysokorizikových typov HPV.



Obr. 1. Štádiá HPV infekcie (upravené podľa Sarier a kol., 2020)

***Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*; *U. u.*)** predstavuje najrozšírenejší bakteriálny, sexuálne prenosný patogén spomedzi mykoplaziem vyvolávajúci infekcie urogenitálneho traktu (Ficik, Liščáková, 2018), často spojených s neplodnosťou (Ye a kol., 2018). Ureaplasma svojim pôsobením v ženskom urogenitálnom trakte môže spôsobiť zápalové ochorenia krčka maternice, cervikálnu dyspláziu, čo následne môže viesť až k rakovine krčka maternice. Ureaplasma bola prvýkrát izolovaná v roku 1954 od mužov s negonokokovou uretritídou. Od mykoplaziem sa líši svojou morfológiou a veľkosťou rastúcich kolónii, vďaka čomu býva označovaná ako T-forma mykoplaziem (z angl. tiny – drobný). Spolu s mykoplazmami je zaraďovaná do triedy *Mollicutes*. Patrí medzi najmenšie a najjednoduchšie mikroorganizmy schopné samostatného života mimo hostiteľskú bunku. Ich spoločnou vlastnosťou je absencia bunkovej steny, čo je príčinou ich rezistencie na beta-laktámové antibiotiká, ale aj ich náchylnosť na vysušenie (Salavec a kol., 2017).

Ureaplazmy vykazujú afinitu k epitelovým bunkám slizníc, a tak sa bežne vyskytujú ako súčasť normálneho mikrobiómu slizníc urogenitálneho traktu. Rozpoznávané sú zriedka, nakoľko nerastú na bežných kultivačných pôdach. Môžu byť lokalizované pericelulárne aj intracelulárne (Ficik, Liščáková, 2018).

*U. urealyticum* sa u žien a mužov vyskytuje v rôznych vekových skupinách. Ženy sú častejšie infikované vo fertillnom veku, v mnohých prípadoch spolu s chlamýdiovou

koinfekciou. Najčastejšia forma prenosu je pohlavný styk, preto je potrebné v prípade infekcie preliečiť všetkých sexuálnych partnerov. Liečba býva mnohokrát komplikovaná z dôvodu častej rezistencie na antibiotiká (Ficik, Liščáková, 2018).

Ureaplasma sa podieľa na rôznych infekčných ochoreniach, ako je negonokoková uretritída, bakteriálna vaginóza, cervicitída a endometritída, môže sa však vyskytovať aj u asymptomatických pacientov. Infekcia u žien sa môže šíriť ascendentným smerom a viesť k rozvoju zápalového ochorenia panvy (PID, Pelvic Inflammatory Disease) a v priebehu gravidity viesť k rozvoju viacerých komplikácií, akými sú napríklad spontánny potrat, predčasný pôrod či chorioamnionitída (Salavec a kol., 2017). Noh a kol. (2019) dospeli k záveru, že infekciou vyvolaný zápal panvy prispieva k iniciácii a progresii endometriózy. Vhodná liečba infekcie urogenitálneho traktu tak môže znížiť jej prevalenciu.

Ženy infikované *U. urealyticum* mali signifikantne zvýšené riziko HPV infekcií či abnormálnej cytopatológie krčka maternice v porovnaní so ženami negatívnymi na *U. urealyticum* (Ye a kol., 2018). Pokiaľ nie je infekcia liečená, môže dôjsť k zápalovým ochoreniam krčka maternice až cervikálnej dysplázii, a to hlavne u žien vo vyššom veku (Lamancová a kol., 2019).

V dôsledku redukovanej veľkosti genetickej informácie má ureaplasma zníženú biochemickú i biosyntetickú aktivitu. Produkuje enzým ureázu, ktorá hydrolyzuje močovi-



nu na amoniak a oxid uhličitý. Touto reakciou ureaplazma získava až 95 % energie vo forme adenosíntrifosfátu, zvyšok získava prostredníctvom fosforylácie (Salavec a kol., 2017).

V klinickej praxi sa ureaplazma deteguje prednostne na základe prítomnosti DNA baktérie, nakoľko jej kultivácia býva sťažená. Real time PCR okrem amplifikácie DNA *U. urealyticum* umožňuje súčasne aj kvantifikovať množstvo produktu. Na dôkaz patogénu u žien sa najčastejšie odoberajú stery z krčka maternice (Salavec a kol., 2017).

Predkladaná práca je zameraná na analýzu prítomnosti DNA monitorovaných patogénov v súvislosti s vekovou skupinou a diagnózou gynekologických pacientok v danom súbore.

## MATERIÁL A METODIKA

### Súbor pacientov

Vyšetrovaný súbor tvorilo 429 pacientok vo veku od 16 do 63 rokov, priemerný vek bol 33 rokov. 140 žien bolo vyšetrených v rámci prevencie Z01 (Iné špeciálne vyšetrenia osôb bez ťažkostí a bez uvedenej diagnózy), zvyšok súboru tvorili pacientky s rôznymi zápalovými a nezápalovými ochoreniami urogenitálneho traktu: N72 (Zápalová choroba krčka maternice), N76 (Iné zápaly pošvy a vulvy), N87 (Dysplázia krčka maternice), N97 (Ženská neplodnosť), N70 (Zápaly vajčkovodov a vaječnikov), N71.9 (Nešpecifikovaná zápalová choroba maternice), N73 (Iné zápalové choroby ženských pohlavných orgánov), N86 (Erózia a ektropium krčka maternice), N94 (Bolesť a iné odchýlky menštruačného cyklu). Všetky pacientky zaradené do štúdie, svojím podpisom súhlasili s anonymným spracovaním výsledkov analýz.

### Biologický materiál a jeho analýza

DNA bola izolovaná zo vzorky cervikálneho výteru automatickým izolátorom QIAcube použitím komerčného izolačného kitu QIAamp® DNA Mini kit (obidva od firmy QIAGEN).

Vyizolovaná DNA bola použitá na dôkaz *U. urealyticum* aj na kvantifikáciu HPV nálože.

*U. urealyticum* bola detegovaná komerčným kitom AmpliSens® Ureaplasma spp. – FRT určeným na kvalitatívnu real time PCR. Pozitivita bola verifikovaná klasickou PCR podľa publikovaného protokolu (Peerayeh, Sat-

tari, 2006). PCR produkt vo veľkosti 429 bp detegovaný po elektroforetickej separácii na agarózovom géli potvrdzoval prítomnosť *U. urealyticum*.

Na stanovenie infekčnej nálože HPV vírusu bol aplikovaný komerčný kit na kvantitatívnu real time PCR AmpliSens® HPV HCR screen-titre-FRT PCR kit. Kvalitatívna aj kvantitatívna real time PCR bola realizovaná cyklérom Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australia).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

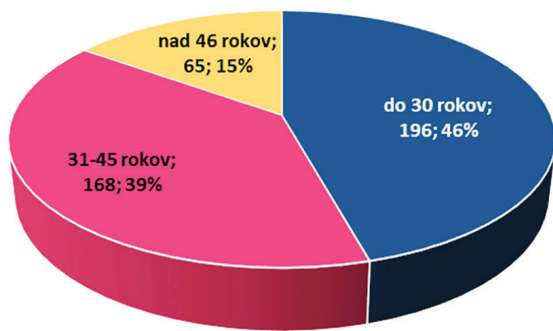
Výsledky práce sú súčasťou štúdie, ktorá bola realizovaná v rokoch 2011 a 2012. Súbor tvorilo 429 vzoriek cervikálnych výterov gynekologických pacientok za účelom monitoringu vybraných sexuálne prenosných patogénov detekciou DNA *U. urealyticum* a HPV.

Vekové rozloženie súboru ilustruje Obr. 2. Vzhľadom na nízky počet pacientok v skupine pod 20 a nad 50 rokov, bol súbor rozdelený do 3 vekových skupín: do 30 rokov, 31–45 a nad 45 rokov.

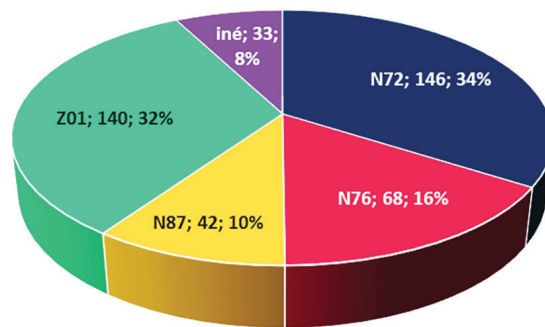
Súbor pacientok bol analyzovaný podľa diagnóz a podľa prítomnosti DNA patogénov (Obr. 3). Tretina žien bola vyšetrená v rámci prevencie (Z01). Najpočetnejšiu skupinu tvorili pacientky so zápalovou chorobou krčka maternice (N72), nasledovali zápaly pošvy a vulvy (N76) a nakoniec dysplázie krčka maternice (N87). Diagnózy, kde počet pacientok v rámci jednej diagnózy bol malý (1–8 pacientok), boli sumárne označené ako „iné“ (N97, N70, N71.9, N73, N86 a N94) a predstavovali 8 % z celého súboru. Súbor bez pacientok vyšetrených v rámci prevencie (Z01), tvorilo 50 % pacientok so zápalovým ochorením krčka maternice (N72), podiel pacientok s dyspláziou krčka maternice (N87) bol 15 %.

V celom súbore pacientok bolo 54 % vzoriek negatívnych na prítomnosť DNA *U. urealyticum* a/alebo HPV. Podiel pozitivity *U. urealyticum* a HPV bol približne rovnaký, 11 % malo pozitívne oba patogény (Obr. 3).

Zastúpenie patogénov v jednotlivých vekových skupinách je v Tabuľke 1. Výsledky potvrdzujú zvýšenú prítomnosť sexuálne prenosných patogénov v skupine mladých sexuálne aktívnych jedincov vo veku do 30 rokov (Dubayová a kol., 2018). Skupina pacientok nad 45 rokov je najmenšia (15 %) a má najnižšiu pozitivitu sexuálne prenosných patogénov.



Obr. 2. Vekové zloženie súboru

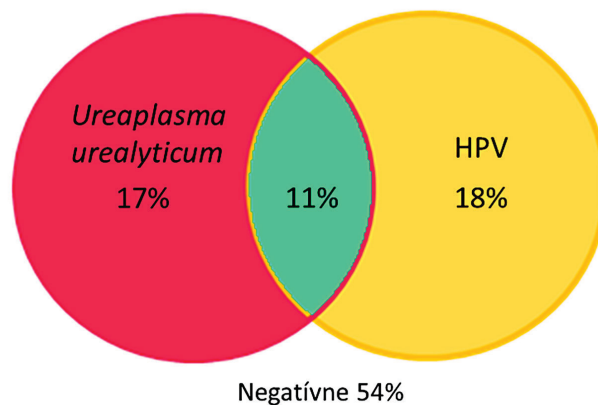


Obr. 3 Rozdelenie pacientok do diagnostických skupín. Diagram vľavo predstavuje zloženie súboru podľa diagnóz, vpravo je zastúpenie sledovaných patogénov v súbore

Zastúpenie patogénov a diagnóz v súbore pacientok bolo analyzované v dvoch rovinách (Tabuľka 2): podiel jednotlivých diagnóz v rámci danej skupiny patogénov a podiel jednotlivých patogénov v rámci danej diagnózy.

Podiel diagnóz na pozitívite daného patogénu bol vyčíslený aj bez súboru pacientok vyšetrených v rámci prevencie (Z01). Tieto výsledky nie sú uvedené v Tabuľke 2. Negativita na prítomnosť DNA monitorovaných patogénov bola najvyššia v diagnostickej skupine N76 (42%). Na pozitívite *U. urealyticum* sa najväčšou mierou podieľala skupina N72 (58%) a skupina „iné“ (18%). Počet pacientok s HPV infekciou zo skupiny Z01 bol malý, preto podiel ostatných diagnóz na HPV pozitívite približne odpovedá údajom v Tabuľke 2.

V druhej rovine bolo analyzované zastúpenie patogénov v rámci konkrétnej diagnózy. V štúdiu bolo analyzované zastúpenie patogénov aj v rámci jednotlivých diagnóz. U pacientok so zápalovou chorobou krčka maternice (N72) bolo percentuálne zastúpenie sledovaných patogénov relatívne rovnomerné. HPV pozitívne pacientky, izolovaná HPV infekcia spolu s koinfekciou bakteriálneho patogénu *U. urealyticum*, tvorili 48% zo súboru N72. Negativita u pacientok so zápalovým ochorením pošvy



Obr. 4. Porovnanie zastúpenia patogénov v súbore pacientok s cervikálnou diagnózou (N72 a N87) a súbore pacientok s inými zápalovými ochoreniami (N76 a „iné“)

a vulvy (N76) bola 65% a 20% pacientok malo pozitívne HPV, z toho len jedna pacientka mala pozitívne obidva patogény. HPV pozitívita bola najvyššia u pacientok s dyspláziou krčka maternice (N87), tvorila 57%, z toho takmer polovica bola pozitívna na obidva patogény. V skupine pacientok vyšetrených v rámci prevencie (Z01) len 10% pacientok bolo infikovaných nami sledovanými patogénmi. Tretina pacientok zo súboru „iné“ bola negatívna, tre-

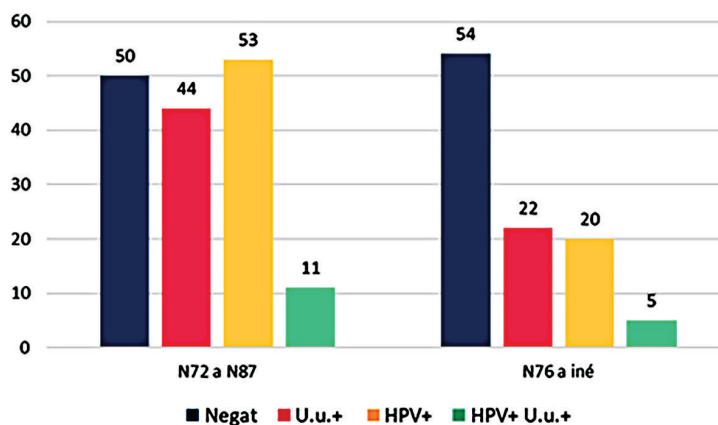
Tabuľka 1. Zastúpenie patogénov v jednotlivých vekových skupinách

Vek	do 30 rokov		30–45 rokov		nad 45 rokov		Priemerný vek
	Počet	%	Počet	%	Počet	%	
Negatívne	77	39%	105	63%	48	74%	35
U. u <sup>+</sup>	38	19%	29	17%	8	12%	33
HPV <sup>+</sup>	47	24%	23	14%	6	9%	30
U. u <sup>+</sup> HPV <sup>+</sup>	34	17%	11	7%	3	5%	29
Σ	196		168		65		33

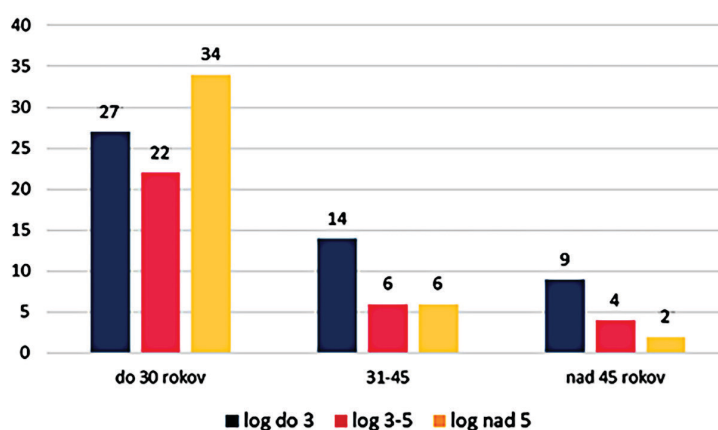
Tabuľka 2. Prehľad zastúpenia patogénov a diagnóz v celom súbore pacientok

Dg	Negatívne			U.u <sup>+</sup>			HPV <sup>+</sup>			U.u <sup>+</sup> HPV <sup>+</sup>			Σ
	Počet	A	B	Počet	A	B	Počet	A	B	Počet	A	B	
N72	38	17%	26%	38	51%	26%	40	53%	27%	30	63%	21%	146
N76	44	19%	65%	10	13%	15%	13	17%	19%	1	2%	1%	68
N87	12	5%	29%	6	8%	14%	13	17%	31%	11	23%	26%	42
Z01	126	55%	90%	9	12%	6%	3	4%	3%	2	4%	1%	140
iné	10	4%	30%	12	16%	36%	7	9%	21%	4	8%	12%	33
Σ	230			75			76			48			429
Vek	35			33			30			29			33

A – podiel jednotlivých diagnóz v rámci danej skupiny patogénov (stĺpec); B – podiel jednotlivých patogénov v rámci danej diagnózy (riadok)



Obr. 4. Porovnanie zastúpenia patogénov v súbore pacientok s cervikálnou diagnózou (N72 a N87) a súbore pacientok s inými zápalovými ochoreniami (N76 a „iné“)



Obr. 5. DNA nálož HPV vírusu v jednotlivých vekových skupinách

Tabuľka 3. Porovnanie HPV nálože v závislosti od veku a diagnózy v súbore.

Vek	HPV+				HPV+ U.u.+			
	log 0-3	log 3-5	log > 5	Σ	log 0-3	log 3-5	log > 5	Σ
do 30 rokov	18 (37%)	12 (24%)	19 (39%)	49	9 (26%)	10 (29%)	15 (46%)	34
31-45	11 (61%)	3 (17%)	4 (22%)	18	3 (38%)	3 (38%)	2 (25%)	8
nad 45 rokov	7 (78%)	2 (22%)	0	9	2 (33%)	2 (33%)	2 (33%)	6
Diagnóza	HPV+				HPV+ U.u.+			
	log 0-3	log 3-5	log > 5	Σ	log 0-3	log 3-5	log > 5	Σ
N72	20 (48%)	9 (21%)	13 (31%)	42	13 (43%)	7 (23%)	10 (33%)	30
N76	9 (69%)	4 (31%)	0	13	0	1	0	1
N87	2 (15%)	2 (15%)	9 (69%)	13	0	4 (36%)	7 (63%)	11
Z01	0	0	1	1	0	0	2	2
iné	5 (71%)	2 (29%)	0	7	1 (25%)	3 (75%)	0	4

tina bola pozitívna len na *U. urealyticum*. Zvyšná tretina bola HPV pozitívna (2/3 izolovaná infekcia a 1/3 koinfekcia *U. urealyticum* a HPV). V skupine „iné“ bolo aj 8 pacientok s diagnózou ženská neplodnosť (N97). Dve boli negatívne na prítomnosť sledovaných patogénov, 4 pacientky (50 % v rámci diagnózy N97) mali pozitívnu *U. urealyticum*, jedna pacientka len HPV a jedna *U. urealyticum* aj HPV. Nález zodpovedá publikovaným dátam (Ye a kol., 2018), kde neplodnosť je spájaná s infekciou *U. urealyticum*. Podrobný prehľad zastúpenia patogénov a diagnóz v súbore pacientok je uvedený v Tabuľke 2.

Porovnávaná bola aj pozitivita patogénov u pacientok s ochorením krčka maternice (N72 a N87) a inými ochoreniami (N76 a „iné“). V súbore ochorenia krčka maternice bolo 68 % pacientok pozitívnych na prítomnosť DNA niektorého z monitorovaných patogénov. Ochorenia krčka maternice sú spájané s HPV infekciou, v danom súbore HPV malo dominanciu (59 %), 49 % pozitívít predstavovala izolovaná infekcia HPV, 10 % koinfekcia HPV a *U. urealyticum*, izolovaná infekcia *U. urealyticum* tvorila 41 %.

V druhom súbore bola pozitivita DNA patogénov 47 %. Izolovaná infekcia *U. urealyticum* bola v 47 %, izolovaná infekcia HPV 41 %. Koinfekcia HPV a *U. urealyticum* tvorila aj v tomto súbore 10 %. Porovnanie pozitívít týchto dvoch súborov prezentuje Obr. 4.

Závažnosť HPV infekcie je definovaná hodnotou logaritmu: log (počet kópií HPV na 100 000 buniek). Na zákla-

de hodnoty logaritmu je posudzovaná virálna nálož a riziko vzniku karcinómu nasledovne:

- log 0-3; nízka virálna nálož HPV, nízke riziko vzniku rakoviny krčka maternice
- log 3-5; zvýšené riziko prekancerózneho stav, nevyhnutný pravidelný monitoring
- log 5 a viac; vysoké riziko vzniku rakoviny.

V súbore pacientok malo nízku virálnu nálož (log < 3) 40 % žien, zvýšené riziko bolo v 22 % a 38 % pacientok malo virálnu nálož definovanú hodnotou viac ako log 5.

HPV nálož bola porovnávaná aj medzi rôznymi vekovými skupinami (Obr. 5). Najmladšia veková skupina tvorila 65 % HPV pozitívít, tu bol aj najvyšší počet pacientok s hodnotou viac ako log 5. Veková skupina nad 46 rokov predstavovala len 7 % HPV pozitívít. Pozitivita viac ako log 5 v tejto vekovej skupine signalizuje pretrvávajúcu infekciu a vysoké riziko vývoja rakoviny krčka maternice. V prípade izolovanej HPV infekcie hodnota log 5 predstavovala pozitivitu 30 % a v prípade koinfekcie *U. urealyticum* bola táto hodnota stanovená u 40 % pacientok. Vysokú HPV nálož malo viac ako 30 % pacientok s diagnózou N72 v prípade izolovanej infekcie aj koinfekcie s *U. urealyticum*.

U pacientok s dyspláziou krčka maternice vysoká HPV nálož (log > 5) bola stanovená u viac ako 60 % pacientok, v prípade súčasnej pozitivity oboch patogénov 1/3 pacientok mala virálnu nálož v rozmedzí log 3-5 a u 2/3 pacientok bola nálož log > 5. Podrobný prehľad analýzy HPV pozitivity je uvedený v Tabuľke 3.

## ZÁVER

Výskyt onkologických ochorení má stúpajúcu tendenciu aj napriek súčasným poznatkom a diagnostickým možnostiam. Vysoká incidencia ochorení s vysokou mortalitou predstavuje závažný a stále aktuálny problém vo svete medicíny. Zápalové ochorenia urogenitálneho traktu, najmä opakované a chronické, môžu indikovať prekancerózný stav.

Slovensko má približne 2,4 milióna žien vo veku 15 rokov a starších, ktorým hrozí rakovina krčka maternice. Aktuálne odhady naznačujú, že každý rok je 692 ženám diagnostikovaná rakovina krčka maternice a 281 žien na túto chorobu ročne zomrie. Rakovina krčka maternice je 6. najčastejším onkologickým ochorením žien na Slovensku a 2. najčastejším onkologickým ochorením žien vo veku 15 až 44 rokov.

Predkladaná štúdia priniesla podrobnú analýzu výskytu bakteriálnej infekcie *U. urealyticum* a vírusovej infekcie HPV u pacientok s rôznymi ochoreniami urogenitálneho traktu. Potvrdila prevažný výskyt sexuálne prenosných patogénov najmä v mladších vekových kategóriách, ako aj zvýšený výskyt týchto patogénov u pacientok s cervikálnym ochorením. Detekcia a kvantitatívne stanovenie DNA sexuálne prenosných patogénov metódou real time PCR je v súčasnosti rutinnou záležitosťou a mala by byť súčasťou pravidelných gynekologických preventívnych prehliadok. Výsledky štúdie poukázali aj na fakt, že ženy nad 45 rokov sa gynekologickým prehliadkam podrobia len v prípade ťažkostí. Vysoká virálna HPV nálož vo vyšších vekových kategóriách je spojená s prekanceróznymi stavmi, prípadne už aj rozvinutým cervikálnym karcinómom.

Rakovine krčka maternice je možné predísť pomocou primárnej prevencie, ktorú predstavuje napríklad HPV vakcína. Sekundárnu prevenciu tvoria práve pravidelné skriningy a gynekologické prehliadky rizikových skupín.

## Podakovanie

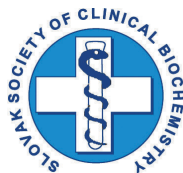
Práca je súčasťou štúdie, ktorá vznikla s podporou Európskeho fondu regionálneho rozvoja OPVaV-2009/2.2/05-SORO, ITMS 26220220143 a grantom VEGA 1/0620/19.

Za spoluprácu na projekte ďakujeme prednostovi Kliniky gynekológie a pôrodnictva, FNŠP J. A. Reimana Prešov, MUDr. Jozefovi Adamovi, PhD. Vďaka patrí aj pracovníčkam Laboratória lekárskej genetiky Sembid, s. r. o., RNDr. Adriane Šprincovej, PhD. a Mgr. Ivete Lučkovej za spracovanie biologického materiálu a PCR analýzu.

## LITERATÚRA

1. Carter, J. R., Ding, Z., Rose, B. R. (2011): HPV infection and cervical disease: A review. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. doi: 10.1111/j.1479-828X.2010.01269.x.
2. Dubayová, K. et al. (2018): Incidence and association of the human papilloma virus (HPV) and four selected bacterial sexually transmitted pathogens with normal, non-neoplastic and neoplastic cervical cytology. *NewsLab: časopis laboratórnej medicíny*, 9(1), p. 12–15. ISSN 1338-9661.
3. Ficik, J., Liščáková, J. (2018): Prevalencia a citlivosť na antibiotiká *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* izolovaných z genitálnych a močových vzoriek vyšetrených v období rokov 2014–2017 v KNsP Čadca. *NewsLab: časopis laboratórnej medicíny*, 9(1), p. 16–20. ISSN 1338-9661.
4. Garolla, A. et al. (2013): Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertility and Sterility*. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.006.
5. Heidegger, I., Borena, W., Pichler, R. (2015): The role of human papilloma virus in urological malignancies. *Anticancer Research*, 35(5), p. 2513–2519.
6. Lamancová, P. et al. (2019): Autofluorescence of body fluids in early diagnostics of cervical inflammatory diseases. *GRANT journal*, 8(2), p. 97–101, ISSN 1805-0638.
7. Liu, M. et al. (2014): Prevalence, incidence, clearance, and associated factors of genital human papillomavirus infection among men: A population-based cohort study in rural China. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0365.
8. Ma, X. et al. (2018): Prevalence of human papillomavirus by geographical regions, sexual orientation and HIV status in China: A systematic review and meta-analysis. *Sexually Transmitted Infections*. doi: 10.1136/sextrans-2017-053412.
9. Muñoz, N. et al. (2003): Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/nejmoa021641.
10. Münger, K. (2002): The role of human papillomaviruses in human cancers. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. doi: 10.2741/a800.
11. Noh, E. J. et al. (2019): *Ureaplasma Urealyticum* Infection Contributes to the Development of Pelvic Endometriosis Through Toll-Like Receptor 2. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2019.02373.

- 12. Peerayeh, S. N. and Sattari, M. (2006):** Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in endocervical specimens from infertile women by polymerase chain reaction. *Middle East Fertility Society Journal*, 11(2), p. 104–108.
- 13. Salavec, M. et al. (2017):** Infections of ureaplasma and mycoplasma in urogenital clinical practice. *Urologie pro praxi*. doi: 10.36290/uro.2017.050.
- 14. Sarier, M. et al. (2020):** Is There any Association between Urothelial Carcinoma of the Bladder and Human Papillomavirus? A Case-Control Study. *Urologia Internationalis*. doi: 10.1159/000500467.
- 15. Sarier, M. et al. (2020):** HPV infection in urology practice. *International Urology and Nephrology*. doi: 10.1007/s11255-019-02302-2.
- 16. Stanley, M. A., Pett, M. R. and Coleman, N. (2007):** HPV: From infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*. doi: 10.1042/BST0351456.
- 17. Stanley, M. (2006):** Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.002.
- 18. Tolstov, Y. et al. (2014):** Human papillomaviruses in urological malignancies: A critical assessment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.06.012.
- 19. Ye, H. et al. (2018):** Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. doi: 10.1007/s00404-018-4733-5.



Laboratórna Diagnostika, XXVII, 1, 2022: 96–106

## IMPLEMENTAČNÉ ÚSKALIA NOVÉHO NARIADENIA EU/2017/746 IN VITRO DIAGNOSTICKÉ ZDRAV OTNÍCKE POMÔCKY IMPLEMENTATION CHALLENGES OF THE NEW EU/2017/746 IN VITRO DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICES REGULATION

**Balla Ján**

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie  
Národný reprezentant

e-mail: jan.ballasr@gmail.com  
*prehľadová práca*

### SÚHRN

V roku 1998 prijala Európska únia smernicu EÚ (98/79/ES), ktorá reguluje diagnostické zdravotnícke pomôcky *in vitro* (IVD). Pri interpretácii smernice sa však objavili problémy, pretože poskytovala nízku úroveň kontroly a preskúmania u potenciálne „vysoko rizikových“ diagnostických prípravkov. Nové IVD technológie si na ochranu a bezpečnosť pacientov vyžiadali jej reformu. Nové európske nariadenie IVDR EU/2017/746 o diagnostických prípravkoch *in vitro* nadobudlo účinnosť 25. mája 2017. Oficiálne prechodné obdobie na úplnú implementáciu je päť rokov. Najväčšími zmenami je rozšírenie rozsahu pôsobnosti a zavedenie prístupu ku klasifikácii založeného na riziku v kombinácii so zvýšeným dohľadom notifikovaného orgánu (NB). Výrobcovia IVD musia pre-registrovať celé svoje portfólio produktov podľa nového nariadenia do konca päťročného prechodného obdobia. Zavedenie IVDR bolo plánované vo všetkých členských štátoch EÚ do 27. mája 2022.

**Kľúčové slová:** IVD, IVDR, Smernica EU/2017/746, prechodné obdobie

### ABSTRACT

In 1998, the European Union adopted the EU Directive (98/79/EC), which regulated *in vitro* diagnostic medical devices (IVD). However, problems arose in interpreting the Directive, as it provided a low level of control and regulation for potentially „high-risk“ diagnostic devices. New IVD technologies require reform to protect and safety of patients. The new European IVDR Regulation EU/2017/746 on *in vitro* diagnostic devices entered into force on 25 May 2017. The official transitional period for full implementation of the Directive is five years. The biggest changes are the extension of the scope and the introduction of a risk-based approach to classification combined with increased oversight by a notified body (NB). IVD manufacturers have to re-register their entire IVD portfolio under the new regulation by the end of the five-year transition period. The implementation of the IVDR was planned in all EU Member States by 27 May 2022.

**Key words:** IVD, IVDR, Directive EU/2017/746, transition period

## ÚVOD

Zdravotnícke pomôcky a diagnostické zdravotnícke pomôcky *in vitro* zohrávajú zásadnú úlohu v oblasti zdravotnej starostlivosti. Vysoká úroveň výdavkov na zdravotníctvo, starnúca populácia, pokles počtu obyvateľov v produktívnom veku, zníženie počtu mladých ľudí, zvýšenie priemernej dĺžky života a prísne zdravotné normy sú hlavné faktory, ktoré sú hnacími silami zaistenia bezpečnosti a kvality diagnostických zdravotníckych pomôcok *in vitro*. Bezpečnosť a účinnosť zdravotníckych pomôcok na európskom trhu legislatívne zakotvuje Európsky regulačný rámec. Aby bolo možné držať krok s pokrokom vo vede a technológiách, boli r. 2017 prijaté dve nové nariadenia:

- **Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/745 o zdravotníckych pomôckach (MDR);**
- **Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro* (IVDR).**

IVDR nahradí súčasnú smernicu EÚ IVDD 98/79/EC o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro*. Účinnosť nadobudne vo všetkých členských štátoch EÚ a štátoch EZVO\* okamžite bez toho, aby musela byť transponovaná do vnútroštátneho práva príslušných štátov, avšak národné zákony môžu byť upravené tak, aby niektoré jej požiadavky podporovali podrobnejšie.

[https://sk.wikipedia.org/wiki/Eur%C3%B3pske\\_zdru%C5%BEenie\\_vo%C4%BEn%C3%A9ho\\_obchodu](https://sk.wikipedia.org/wiki/Eur%C3%B3pske_zdru%C5%BEenie_vo%C4%BEn%C3%A9ho_obchodu)

Nové predpisy o zdravotníckych pomôckach (2017/745/EÚ) (MDR) a regulácia diagnostických zdravotníckych pomôcok *in vitro* (2017/746/EÚ) (IVDR) prinášajú právne predpisy EÚ v súlade s technickým pokrokom, zmenami v lekárskej vede a zmenami v oblasti tvorby práva. IVDR nahradí existujúcu smernicu 98/79/ES (IVDD) o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro* (Directive 98/79/EC, 1998). Z porovnania rozsahu legislatívy medzi starou a novou smernicou (Tab. 1) je zrejmé, že nové nariadenia vytvárajú na medzinárodnej úrovni robustný regulačný rámec, ktorý má zlepšiť klinickú bezpečnosť

\* **Európske združenie voľného obchodu (EZVO; anglicky European Free Trade Association—EFTA)** bolo založené 3. mája 1960 ako alternatíva pre európske štáty, ktorým nebolo umožnené alebo nechceli vstúpiť do Európskych spoločenstiev. Na rozdiel od Európskej únie nemalo smerovať k integrácii, cieľom bolo zlepšiť ekonomickú spoluprácu v Európe. [https://sk.wikipedia.org/wiki/Eur%C3%B3pske\\_zdru%C5%BEenie\\_vo%C4%BEn%C3%A9ho\\_obchodu](https://sk.wikipedia.org/wiki/Eur%C3%B3pske_zdru%C5%BEenie_vo%C4%BEn%C3%A9ho_obchodu)

**Tabuľka 1. Porovnanie rozsahu legislatívy pôvodných a nových smerníc (Lysák, L., 2018)**

Zdravotnícke pomôcky (MD)	
93/42/EHS (pôvodné vydanie)	2017/745/EÚ (MDR)
22 ustanovení preambuly	101 ustanovení preambuly
23 článkov	123 článkov
12 Príloh	17 príloh
cca. 43 strán textu	cca. 175 strán textu

Zdravotnícke pomôcky <i>in vitro</i> (IVDR)	
98/79/ES (pôvodné vydanie)	2017/746/EÚ (IVDR)
35 ustanovení preambuly	101 ustanovení preambuly
24 článkov	113 článkov
10 Príloh	15 príloh
cca. 37 strán textu	cca. 157 strán textu

produktov a vytvoriť výrobcovi spravodlivý prístup na trh (Decision no 768/2008/EC, 2008).

Cieľom nariadení je lepšie zaistiť bezpečnosť pacientov zavedením prísnejších postupov posudzovania zhody tak, aby sa nebezpečné či nevyhovujúce pomôcky nedostali na trh. IVDR má priniesť väčšiu transparentnosť, zvýšiť dohľad a vysledovateľnosť (traceability), prísnejšie požiadavky na analytickú výkonnosť testov a vedeckú validitu. Tieto požiadavky prinesú výrazné pracovné zaťaženie v rámci hodnotového reťazca zdravotníckych pomôcok. Komplexný proces vývoja diagnostických zdravotníckych pomôcok *in vitro* v kombinácii s vysokým stupňom nových požiadaviek posudzovania spôsobia, že prechod IVDD na IVDR bude pre väčšinu výrobcov komplikovaný a časovo náročný.

Na trhu EÚ je viac ako 500 000 typov zdravotníckych pomôcok a diagnostických zdravotníckych pomôcok *in vitro*. Dvadsaťpäť tisíc spoločností a firiem zamestnáva 575 000 pracovníkov, z nich 95 % sú malé a stredné podniky. Na diagnostické testovanie *in vitro* je dnes k dispozícii viac ako 40 000 produktov, ktoré pokrývajú širokú škálu použitia. Aj keď sa odhady agentúr globálnych trhov úplne nezhodujú, PriceWaterCooper odhaduje, že veľkosť globálneho trhu *in vitro* diagnostiky vzrastie z 80,2 miliárd Eur v roku 2020 na 104,8 miliárd Eur v roku 2024 (Anzvinho, N., 2021). Patria sem aj tradičné laboratórne testy, pričom je jedno, či sa vzorky posielajú do centrálného laboratória na analýzu alebo sa testovanie vykonáva pri-



mo na mieste starostlivosti o pacienta (POCT), ktoré významne ovplyvňuje rast globálneho trhu IVD. Testovanie v mieste starostlivosti o pacienta môže pomôcť optimalizovať a urýchliť okamžité rozhodovanie o liečbe, vyhnúť sa čakaniu na laboratórne výsledky, zlepšiť efektívnosť starostlivosti a znížiť náklady, najmä v prostredí s obmedzenými zdrojmi, kde je laboratórna infraštruktúra slabá. Na trhu sú dostupné aj voľnopredajné diagnostické produkty, ktorých dôležitosť sa zvýšila najmä počas pandémie COVID-19, hoci tieto mali na celkovú IVD diagnostiku aj mierne negatívny vplyv. Bolo to spôsobené celosvetovými blokádami, ktoré ovplyvnili segment klinickej biochémie, keďže *in vitro* diagnostické prípravky sa všeobecne používajú hlavne na kontrolu základných životných funkcií, ktoré sa počas pandémie nepovažovali za naliehavo potrebné.

### Vymedzenie obsahu pojmov MD a IVD

Zdravotnícke pomôcky (MD) a diagnostické zdravotnícke pomôcky *in vitro* (IVD) majú odlišné charakteristiky a definície. Zdravotnícke pomôcky pokrývajú širokú škálu produktov, od lepiacich náplastí, cez dentálny výplňový materiál až po srdcové chlopne a röntgenové prístroje. Smernica o zdravotníckych pomôckach 93/42/EHS definuje „zdravotnícku pomôcku“ ako akýkoľvek nástroj, prístroj, zariadenie, materiál alebo iný výrobok, či už sa používa samostatne alebo v kombinácii, vrátane softvéru potrebného na jeho správnu aplikáciu, ktorý výrobca zamýšľa použiť pre ľudí na účely:

- diagnostiky, prevencie, monitorovania a liečby alebo zmiernenia choroby,
- diagnostiky, monitorovania a liečbu, zmiernenie alebo kompenzáciu poranenia alebo postihnutia,
- vyšetrenie, náhradu alebo úpravu anatómie alebo na kontrolu fyziologického procesu,
- regulácie počatia alebo antikoncepcie.

Zdravotnícka pomôcka nedosahuje svoj hlavný zamýšľaný účinok v ľudskom tele alebo na ňom **farmakologickými, imunologickými** alebo **metabolickými** prostriedkami.

Smernica 98/79/ES o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro* definuje „diagnostickú zdravotnícku pomôcku *in vitro*“ ako akýkoľvek zdravotnícku pomôcku, ktorá je činidlom, reagenčným produktom, kalibrátorom, kontrolným materiálom, súpravou, nástrojom, prístrojom, zariadením, softvérom alebo systémom, či už sa používa samostatne alebo v kombinácii, zamýšľanej výrobcom na

*in vitro* použitie pri vyšetrení vzoriek vrátane darcovstva krvi a tkanív pochádzajúcich z ľudského tela, výhradne alebo hlavne na účely poskytnutia informácií o jednej alebo viacerých oblastiach týkajúcich sa:

- fyziologického alebo patologického procesu alebo stavu;
- vrodených telesných alebo duševných porúch;
- predispozície na určitý zdravotný stav alebo ochorenia;
- určenia bezpečnosti a kompatibility s potencionálnymi príjemcami;
- predikcie odozvy alebo reakcie na liečbu;
- stanovenia alebo monitorovania liečebných opatrení.

Za diagnostické zdravotnícke pomôcky *in vitro* sa považujú aj nádoby na vzorky. **Nádoby na vzorky** sú pomôcky, či už vákuového alebo iného typu, špecificky určené výrobcami na zber alebo uchovávanie vzoriek pochádzajúcich z ľudského tela na účely diagnostického vyšetrenia *in vitro*, napr. skúmavky na odber krvi, nádoby na vzorky moču, sérologické pipety, pipety na všeobecné použitie (jednoduché alebo mnohokanálové pipety), plastové špičky, plastové pipety, Pasteurove pipety, sedimentačné pipety, doštičky a platničky ELISA, Petriho misky, potiahnuté mikrotitračné platne, atď.

### Registrácia a regulácia IVD

Nariadením Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro* sa zavádza systém **registrácie** pomôcok a výrobcov, dovozcov a splnomocnených zástupcov tak, aby sa zabezpečila **vysledovateľnosť** pomôcok (traceability) v celom dodávateľskom reťazci pomocou systému unikátnej identifikácie pomôcky. V nariadení sa aktualizujú pravidlá týkajúce sa uvádzania diagnostických zdravotníckych pomôcok *in vitro* určených pre ľudí na trh EÚ, ich sprístupňovania a uvádzania do používania. Nové nariadenie **sprísňuje** pravidlá týkajúce sa ustanovovania, organizácie a sledovania nezávislých notifikovaných osôb, ktoré posudzujú zhodu zdravotníckych pomôcok so stredným a vysokým rizikom pred ich uvedením na trh.

### Klasifikácia *in vitro* diagnostických prípravkov

Klasifikačné pravidlá IVD sú založené na rizikovom prístupe k regulácii (IVD Working Group, 2021). IVD prípravky sa klasifikujú podľa zdravotného rizika (buď pre verejnosť

alebo jednotlivca), ktoré mohlo vyplývať z nesprávneho výsledku použitia.

- Čím vyššie potenciálne riziko môže nesprávny výsledok predstavovať, tým vyššia je jeho klasifikácia.
- Čím je trieda rizika prípravku vyššia, tým sa vyžaduje vyššia úroveň hodnotenia a monitorovania na preukázanie počiatočného a priebežného súladu s postupmi posudzovania zhody.

Klasifikácia zdravotníckej pomôcky IVD sa určuje na základe súboru pravidiel odvodených od tých vlastností, ktoré vytvárajú riziko (HSA-GN 14, 2018). Tento prístup postačuje na triedenie všetkých zdravotníckych pomôcok IVD a umožňuje efektívny a definovaný systém posudzovania zhody. Tento systém, ktorý pozostáva zo štyroch rizikových tried:

- zamýšľaný účel a indikácie na použitie špecifikované výrobcom produktu (vrátane, ale nie výlučne, špecifickej poruchy, populácie, stavu alebo rizikového faktora, pre ktorý je test určený),
- technické/vedecké/lekárske odborné znalosti zamýšľaného užívateľa (laik alebo zdravotnícky pracovník),
- dôležitosť informácií pre diagnózu (jediný determinant alebo jeden z viacerých), berúc do úvahy prirodzenú anamnézu ochorenia alebo poruchy, vrátane prejavov a symptómov, ktoré môžu viesť lekára,
- vplyv výsledku (pravdivý alebo nepravdivý) na jednotlivca a/alebo verejné zdravie.

Súbor pravidiel má byť dostatočne jasný, aby výrobcovia mohli ľahko určiť triedu svojej zdravotníckej pomôcky IVD. Pravidlá sa majú prispôbiť všeobecne uznávanému stavu techniky. Ak výrobca požiada orgán na posudzovanie zhody alebo regulačný orgán o rozhodnutie, má mať zdokumentovanú opodstatnenosť zaradenia svojho výrobku do konkrétnej rizikovej triedy vrátane riešenia akýchkoľvek otázok týkajúcich sa výkladu.

Ak sa na zdravotnícku pomôcku IVD vzťahuje viac ako jedno klasifikačné pravidlo, pomôcka by mala byť zaradená do najvyššej triedy. Kalibrátory určené na použitie s činidlom IVD by mali byť zaradené do rovnakej triedy ako činidlo IVD. Samostatné kontrolné materiály s kvantitatívnymi alebo kvalitatívnymi priradenými hodnotami určenými pre jeden špecifický analyt alebo viacero analytov by mali byť zaradené do rovnakej triedy ako činidlo(á) IVD. Samostatné kontrolné materiály bez priradených hodnôt,

ktoré sú určené na použitie s viacerými alebo jednotlivými analytmi, možno zaradiť do rovnakej alebo nižšej triedy, ako je to v prípade zodpovedajúcich reagencií IVD. Softvér ako zdravotnícka pomôcka, ktorý spracováva výstup zo zdravotníckej pomôcky IVD, by sa mal klasifikovať na základe zamýšľaného diagnostického účelu.

Navrhovaný systém všeobecnej klasifikácie pre zdravotnícku pomôcku IVD je štvortriedny (Tab. 2). Na identifikáciu tried založených na riziku zdravotníckych pomôcok IVD sa v tomto dokumente používa abecedný systém.

Uvedené príklady slúžia len na ilustráciu; výrobca musí na každú zdravotnícku pomôcku IVD použiť klasifikačné pravidlá podľa jej účelu použitia.

**Tabuľka 2. Štyri rizikové triedy diagnostických pomôcok IVD**

Trieda	Úroveň rizika	Príklad pomôcky
<b>A</b>	Nízke individuálne riziko a nízke riziko pre verejné zdravie	Nádobky na vzorky
<b>B</b>	Mierne individuálne riziko a/alebo nízke riziko pre verejné zdravie	Vitamín B12, tehotenské samotesty, protilátky proti antigénom jadra (ANA), testovacie prúžky na moč
<b>C</b>	Vysoké individuálne riziko a/alebo stredné riziko pre verejné zdravie	Výšetrenie glukózy v krvi, typizácia HLA, skrining PSA, IgM proti rubeole
<b>D</b>	Vysoké individuálne riziko a Vysoké riziko pre verejné zdravie	Skrining HIV darcov krvi, HIV diagnostická súprava

### Určenie triedy diagnostického prípravku

Pri klasifikácii IVD diagnostického prípravku sa musí výrobca riadiť dokumentáciou z klinických štúdií (dôkazov) špecifikovaného (zamýšľaného) použitia, technické údaje, testovanie produktu pomocou vlastných alebo nezávislých zdrojov, potrebu a frekvenciu nezávislého externého auditu systému kvality a nezávislú externú kontrolu technických údajov výrobcu. Na základe účelu určenia a indikácií na použitie musí výrobca s použitím definície IVD rozhodnúť, či príslušný produkt IVD je zdravotníckou pomôckou. S cieľom správne klasifikovať diagnostický prípravok musí na zdravotnícku pomôcku IVD aplikovať pravidlá klasifikácie podľa účelu, na ktorý je určená. Ak má zdravotnícka pomôcka IVD podľa výrobcu viacero účelov určenia, ktoré zaraďujú pomôcku do viac ako jednej triedy, má byť zaradená vyššej triedy.

Kalibrátory určené na použitie s činidlami sa majú zaradiť do rovnakej triedy ako činidlá. Samostatné kontrolné materiály s kvantitatívnymi alebo kvalitatívnymi priradenými hodnotami určenými pre jeden špecifický analyt alebo viacero analytov by mali byť zaradené do rovnakej triedy ako činidlo(á) IVD. Samostatné kontrolné materiály bez priradených hodnôt určené na použitie s viacerými alebo jednotlivými analytmi sa nemajú zaradiť do rovnakej triedy ako činidlo(á) IVD. Čo sa týka softvéru, väčšina je začlenená do samotnej zdravotníckej pomôcky IVD, napríklad vstavaný softvér na obsluhu analyzátora. Softvér, ktorý nie je začlenený (vložený) do samotnej zdravotníckej pomôcky, napríklad softvér na výpočty alebo posudzovanie výsledkov z analyzátora, sa považuje za samostatný softvér. Samostatný softvér patrí do rozsahu definície „zdravotníckej pomôcky IVD“ a mal by sa klasifikovať podľa toho, či riadi alebo ovplyvňuje zamýšľaný výstup samostatnej IVD zdravotníckej pomôcky (vtedy bude mať rovnakú triedu ako samotná IVD zdravotnícka pomôcka) a ak nie je súčasťou zdravotníckej pomôcky IVD, klasifikuje sa samostatne podľa príslušných klasifikačných pravidiel.

#### Klasifikačné pravidlá diagnostických pomôcok IVD

**PRAVIDLO 1:** Zdravotnícke pomôcky IVD klasifikované ako **trieda D** sú určené na nasledujúce účely:

- pomôcky určené na zisťovanie prítomnosti alebo expozície prenosnému agens v krvi, zložkách krvi, krvných derivátoch, bunkách, tkanivách alebo orgánoch s cieľom posúdiť ich vhodnosť na transfúziu alebo transplantáciu, alebo
- pomôcky určené na zisťovanie prítomnosti alebo expozície prenosnému agens, ktorý spôsobuje život ohrozujúce, často nevyliciteľné ochorenie s vysokým rizikom šírenia.

*Príklady:* Testy na detekciu infekcie HIV, HCV, HBV, HTLV. Toto pravidlo sa vzťahuje na testy prvej línie, konfirmačné testy a doplnkové testy.

**PRAVIDLO 2:** Zdravotnícke pomôcky IVD zamýšľané na určenie krvnej skupiny alebo typizáciu tkaniva na zabezpečenie imunologickej kompatibility krvi, krvných zložiek, buniek, tkaniva alebo orgánov, ktoré sú určené na transfúziu alebo transplantáciu, sú klasifikované ako **trieda C**, okrem ABO systému [A (ABO1), B (ABO2), AB (ABO3)], Rh systému [RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e)], skupinového systému Kell [Kel1 (K)], skupinového Kidd systému [JK1 (Jka), JK2 (Jkb)] a Duffyho antigénov

Fy [FY1 (Fya), FY2 (Fyb)], ktoré sú klasifikované ako trieda D.

*Príklady:* HLA, systém krvných skupín podľa Duffyho (ostatné Duffyho systémy okrem tých, ktoré sú uvedené v pravidle ako trieda D, sú v triede C).

**PRAVIDLO 3:** Zdravotnícke pomôcky IVD sú klasifikované ako **trieda C**, ak sú určené na detekciu prítomnosti alebo expozície pohlavne prenosnému agens (napr. pohlavne prenosné choroby ako *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*); na detekciu infekčného agens s rizikom obmedzeného šírenia v mozgovomiechovom moku alebo krvi (napr. *Neisseria meningitidis* alebo *Cryptococcus neoformans*); na detekciu prítomnosti infekčného agens tam, kde existuje významné riziko, že chybný výsledok spôsobí smrť alebo ťažkú invaliditu vyšetřovaného jedinca alebo plodu (napr. diagnostický test na CMV, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* rezistentný na metycilín); pri prenatálnom skríningu žien s cieľom určiť ich imunitný stav voči prenosným agensom (napr. testy na rubeolu alebo toxoplazmózu); na stanovenie infekčného ochorenia alebo imunitného stavu a tam, kde existuje riziko, že chybný výsledok povedie k rozhodnutiu o manažmente pacienta, ktorého výsledkom bude bezprostredne život ohrozujúca situácia pacienta (napr. enterovírusy, CMV a HSV u pacientov po transplantácii); pri skríningu na výber pacientov na selektívnu liečbu a manažment alebo na určenie štádia ochorenia alebo na diagnostiku rakoviny (napr. personalizovaná medicína); pri genetickom vyšetrení ľudí (napr. Huntingtonova choroba, cystická fibróza); pri monitorovaní hladín liekov, látok alebo biologických zložiek, kde existuje riziko, že chybný výsledok povedie k rozhodnutiu o manažmente pacienta, ktorého výsledkom bude bezprostredne život ohrozujúca situácia (napr. kardiálne markery, cyklosporín, protrombínový čas); pri liečbe pacientov trpiacich život ohrozujúcim infekčným ochorením (napr. vírusová záťaž HCV, vírusová záťaž HIV a genotyp a subtypizácia HIV a HCV); pri skríningu vroděných porúch plodu (napr. rázštep chrbtice alebo Downov syndróm).

**PRAVIDLO 4:** Zdravotnícke pomôcky IVD určené na samodiagnostiku sú klasifikované ako **trieda C**, s výnimkou pomôcok, ktorých výsledok neurčuje medicínsky kritický stav alebo je predbežný a vyžaduje si následnú kontrolu príslušným laboratórnym testom, v takom prípade sú **trieda B**.

Zdravotnícke pomôcky IVD určené na stanovenie krvných plynov a glukózy v krvi na testovanie v mieste pacien-

ta sú zatriedené do **triedy C**. Ostatné zdravotnícke pomôcky IVD, ktoré sú určené na testovanie pacienta v blízkosti pacienta (POC testovanie), by sa mali klasifikovať samostatne podľa pravidiel klasifikácie, napr. monitorovanie glukózy v krvi samodiagnostikou v triede C; tehotenské testy alebo močové testovacie prúžky pre samodiagnostiku v triede B.

**PRAVIDLO 5:** Nasledujúce zdravotnícke pomôcky IVD sú klasifikované ako **trieda A**: činidlá alebo iné predmety, ktoré majú špecifické vlastnosti, určené výrobcom tak, aby boli vhodné na diagnostické postupy *in vitro* súvisiace s konkrétnym vyšetrením; samostatné prístroje (vrátane softvéru) určené vlastníkom produktu špecificky na použitie pri diagnostických postupoch *in vitro*, ktoré nie sú určené na použitie na špecifické medicínske diagnostické účely; nádoby na vzorky.

*Príklady:* Nástroje na prípravu vzoriek, premývacie roztoky, klinicko-chemické analyzátory a odberové nádoby na mikrobiologické vzorky.

**PRAVIDLO 6:** Zdravotnícke pomôcky IVD, na ktoré sa nevzťahujú pravidlá 1 až 5, sú klasifikované ako **trieda B**.

*Príklady:* Krvné plyny, test H. pylori, fyziologické markery, ako sú hormóny, vitamíny a enzýmy, metabolické markery, špecifické testy IgE a markery celiakie a testy na antinukleárne protilátky, globulín viažúci pohlavné hormóny (SHBG), močovina v krvi, aspartátaminotransferáza (AST), alkalická fosfatáza (ALP), kreatinín a HbA1c.

**PRAVIDLO 7:** Zdravotnícke pomôcky IVD, ktoré sú kontrolami bez kvantitatívnej alebo kvalitatívnej priradenej hodnoty, sú klasifikované ako **trieda B**.

*Príklad:* Kontroly analýzy moču a chemické kontroly.

Akýkoľvek produkt na všeobecné laboratórne použitie, ktorý nie je vyrobený, predávaný alebo určený na použitie v špecifikovaných *in vitro* diagnostických aplikáciách, sa nepovažuje za zdravotnícke pomôcky IVD. Sem patria reagencie, nástroje, prístroje, zariadenia alebo systémy, ktoré sú určené na všeobecné laboratórne použitie a nie sú určené výrobcom ako zdravotnícke pomôcky. Príkladom všeobecného laboratórneho vybavenia môže byť inkubátor.

### **Notifikované orgány (Notified Bodies, NB)**

Jedna z hlavných zmien nového usmernenia IVDR sa týka rozsiahlejšieho zapojenia nezávislých (notifikovaných) orgánov do posudzovania zhody. **Notifikovaný orgán (osoba) je organizácia určená krajinou EÚ na posúdenie zhody určitých výrobkov (napr. zdravotníckych pomô-**

**cok – MD a diagnostických prípravkov *in vitro* – IVD) pred ich uvedením na trh.** Európska komisia zverejňuje zoznam takýchto notifikovaných orgánov tu: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/nando/>. Notifikované osoby (orgány) sú nenahraditeľnou súčasťou regulačného systému, pretože udeľujú označenie CE každej medicínskej pomôcke alebo diagnostickému prípravku pred ich uvedením na trh EÚ. Notifikované orgány vykonávajú úlohy súvisiace s postupmi posudzovania zhody stanovenými v platnej legislatíve, ak je potrebná tretia strana. Notifikované orgány (osoby) musia spĺňať rovnaké vysoké normy kvality v celej EÚ. Vymedzenie a všeobecné záväzky notifikovaných orgánov a súbor postupov na posudzovanie zhody stanovuje rozhodnutie Európskeho Parlamentu a Rady č. 768/2008/ES vo forme referenčných ustanovení a zásad v spoločnom rámci na uvádzanie výrobkov na trh. Je nevyhnutné, aby všetky notifikované orgány vykonávali svoju činnosť na rovnakej úrovni a za podmienok spravodlivej hospodárskej súťaže. Je preto potrebné stanoviť záväzné požiadavky pre orgány posudzovania zhody, ktoré si želajú byť notifikované, aby mohli poskytovať služby posudzovania zhody. Séria noriem EN 45000 (ISO/IEC 17000) poskytuje prostriedky na posúdenie zhody so všeobecnými požiadavkami pre všetky sektory. Na preukázanie súladu so základnými požiadavkami možno použiť akreditáciu podľa akýchkoľvek noriem série EN 45000 alebo ISO/IEC 17000. Norma ISO/IEC 17000:2004 špecifikuje všeobecné pojmy a definície týkajúce sa posudzovania zhody vrátane akreditácie orgánov posudzovania zhody. Na druhej strane akreditácia organizácie podľa série noriem EN 45000, alebo ich ekvivalentu, sama o sebe nepostačuje na to, aby oprávňovala organizáciu označiť za notifikovaný orgán. Smernice o zdravotníckych pomôckach ukladajú osobitné požiadavky na notifikované osoby. Tie vyplývajú čiastočne z povahy výrobkov, na ktoré sa vzťahujú a čiastočne z konkrétnych požiadaviek o posudzovaní zhody obsiahnutých v smerniciach. Každá organizácia žiadajúca o označenie NB by mala mať dostatočné znalosti a odborné poznatky na to, aby pokryla produkty a prílohy o posudzovaní zhody v rozsahu označenia, o ktorý žiada. Orgán posudzovania zhody by mal mať vždy a pre každý postup posudzovania zhody a pre každý typ alebo kategóriu výrobku, v súvislosti s ktorými bol notifikovaný, k dispozícii potrebný personál s technickými znalosťami a dostatočnými a primeranými skúsenosťami na vykonanie úloh posudzovania zhody. Mal by mať potrebný opis postupov, v súlade s ktorými

vykonáva posudzovanie zhody s cieľom zaručiť transparentnosť a reprodukovateľnosť týchto postupov. Tieto činnosti môže vykonávať aj na území iných krajín EÚ alebo v krajinách mimo EÚ. Notifikované orgány môžu svoje služby posudzovania zhody slobodne ponúkať akémukoľvek hospodárskemu subjektu v EÚ alebo mimo nej. Musia však fungovať nediskriminačne, transparentne, neutrálne, nezávisle a nestranne. Musia zamestnávať potrebný personál s dostatočnými znalosťami a skúsenosťami na vykonávanie posudzovania zhody v súlade s príslušnými právnymi predpismi. Musia prijať primerané opatrenia na zabezpečenie dôvernosti informácií získanými v priebehu posudzovania zhody. U výrobcov musia vykonávať ohlásené, občasné aj náhodné kontroly.

Notifikované orgány zohrávajú kľúčovú úlohu pri podpore výrobcov uvádzať na trh EÚ iba bezpečné a vyhovujúce zdravotnícke pomôcky. Vykonávaním postupov posudzovania zhody a udeľovaním certifikátov zhody pomáhajú výrobcovi zdravotníckych pomôcok pred ich uvedením na trh. Výrobci musia pred uvedením testov na trh predložiť štúdie potvrdzujúce presnosť a validitu testu pri diagnostike konkrétneho stavu. Aby boli IVD schválené musia preukázať bezpečnosť a účinnosť prostredníctvom analytickej a klinickej validácie, ktorá predstavuje kľúčový aspekt posudzovania. Výrobci si môžu slobodne vybrať ktorýkoľvek notifikovaný orgán, ktorý bol zákonne určený na vykonávanie postupu posudzovania zhody.

Aby notifikované orgány splnili povinnosti podľa nových nariadení o zdravotníckych pomôckach a *in vitro* diagnostike, prechádzajú v súčasnosti významnou „rekonštrukciou“. Všetky existujúce a nové notifikované orgány musia preukázať svoju spôsobilosť pri posudzovaní výrobkov a systémov kvality podľa zvýšených požiadaviek nových predpisov. Podľa nových nariadení budú musieť dodržiavať prísnejšie požiadavky (napr. o aspektoch klinického a postmarketingového dohľadu). To bude mať ďalší vplyv na časovú dostupnosť preskúmania produktov. Proces autorizácie notifikovaných orgánov zahŕňa štyri kroky. Predpokladá sa, že notifikovaný orgán bude na to potrebovať v priemere 18 mesiacov. Výrobci vyjadrujú oprávnené obavy, že notifikovaných osôb bude málo na to, aby zvládli nápor na re-certifikáciu IVD, ktorá čaká všetky výrobky s označením CE značkou, ktoré už sú na trhu (opätovná certifikácia). Súčasný počet notifikovaných osôb kapacitne nestačí na produkty, ktorých je približne 85 % všetkých IVD a ktoré budú mať po prvýkrát dohľad

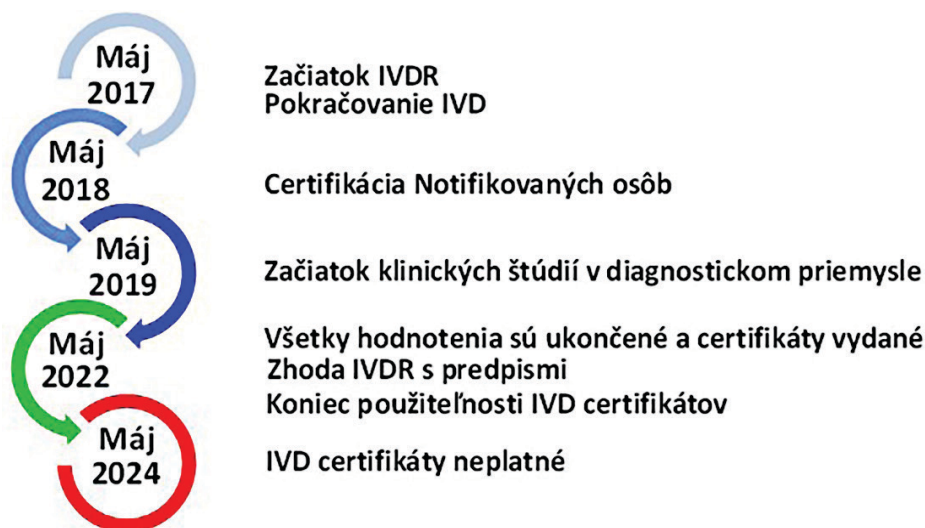
notifikovaných osôb (certifikáciu). Obavy z nedostatku certifikačných kapacít (časových, personálnych, odborných) panujú najmä preto, že:

- v roku 2019 bol pre MD potvrdený iba jeden notifikovaný orgán;
- očakáva sa, že nie všetkých 59 existujúcich notifikovaných osôb (orgánov) uspeje s vymenovaním podľa nových nariadení (ak o to požiadajú);
- nie sú dostatočne dostupné dodatočné odborné poznatky na kontrolu produktov vzhľadom na nové požiadavky;
- interní zamestnanci potrebujú jeden až dva roky (do)vzdelávania, aby boli plne „prevádzkyschopní“.

V súčasnosti podlieha kontrole notifikovaného orgánu podľa smernice 98/79/ES len relatívne malý počet vysokorizikových diagnostických pomôcok, ktoré predstavujú asi 8 % všetkej *in vitro* diagnostiky na trhu. Podľa nového nariadenia IVDR má byť pod kontrolou notifikovaných orgánov približne 80 % *in vitro* diagnostických zdravotníckych pomôcok (radovo 10-násobok), pričom veľká väčšina z nich bude takto posudzovaná po prvýkrát. To znamená, že výrobcovia budú musieť pre tieto diagnostické pomôcky požiadať notifikovaný orgán o postup posudzovania zhody po prvýkrát a po jeho ukončení získať jeden alebo viacero certifikátov skôr, než ich budú môcť uviesť na trh. Postup posudzovania zhody trvá v priemere približne jeden rok, po ktorom je podľa informácií poskytnutých diagnostickým priemyslom potrebný ešte dodatočný čas (približne 6 mesiacov) na výrobu pomôcok a ich prípravu na uvedenie na trh.

### Prechod z IVDD na IVDR

V diagnostickom sektore malo nové nariadenie IVDR znamenať veľké zmeny už na jar 2022. Všetky produkty IVD mali mať pripravené príslušné klinické dôkazy na podporu zamýšľaného účelu použitia do 26. mája 2022, inak by museli byť z trhu stiahnuté (Obr. 1). To zahŕňalo aj testy vyvinuté (zavedené) v klinických laboratóriách (LDT), ktoré sú zo starej smernice vylúčené. Nielenže LDT podliehajú IVDR, ale aj vývojári LDT budú musieť zdôvodniť, že ich testy, interne vyvinuté v klinickom laboratóriu, sú lepšie ako ekvivalentné komerčné testy s označením CE. Od roku 2017 sa upozorňovalo na to, že nebudú platiť **žiadne ustanovenia na ochranu predchádzajúceho stavu ani prechodné ustanovenia** (tzv. princíp „no grandfathering“) okrem tých, ktoré sú vymenované v smernici.



Obr. 1 Plánovaný časový harmonogram podľa nariadenia IVDR 2017

### Účinnosť IVDR a jeho uplatňovanie

S cieľom maximalizovať bezpečnosť pacientov v EÚ nadobudlo 26. mája 2017 účinnosť nové nariadenie o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro* (IVDR 2017/746) pre diagnostické testovanie, ktoré sa s päťročným prechodným obdobím malo uplatniť od 26. mája 2022. Po 26. máji 2022 mohla byť väčšina zavedených komerčných IVD s označením CE naďalej uvádzaná na trh len vtedy, ak bolo možné deklarováť zhodu s IVDR. Iba obmedzený počet testov zahrnutých v prílohe II IVDD, zoznamy A a B, ako aj samotesty s platným certifikátom notifikovaného orgánu, mohli využiť „ochrannú dobu“ (IVDR článok 110 (2) a (3)). Tieto IVD sa mohli naďalej vyrábať a uvádzať na trh počas obmedzeného obdobia a to najdlhšie do 27. mája 2024. Certifikáty vydané notifikovanými osobami v súlade so smernicou 98/79/ES pred 25. májom 2017 mali zostať v platnosti až do konca obdobia uvedeneho na certifikáte, okrem certifikátov vydaných v súlade s prílohou VI k smernici 98/79/ES, ktoré sa mali stať neplatnými najneskôr 27. mája 2024. Certifikáty vydané notifikovanými osobami v súlade so smernicou 98/79/ES po 25. máji 2017 sa stávajú neplatnými najneskôr 27. mája 2024. Niektoré ďalšie špecifické odchýlky/výnimky sú uvedené v Prechodných ustanoveniach v článku 110 Nariadenia. Bez toho, aby boli dotknuté články 110 ods. 3 a 4 tohto nariadenia a bez toho, aby boli dotknuté povinnosti členských štátov a výrobcov, pokiaľ ide o dozor (vigilance) a povinnosti výrobcov, pokiaľ ide o sprístupnenie dokumentácie podľa smernice 98/79/ES, sa uvedená smernica

zrušuje s účinnosťou od 26. mája 2022, a to s výnimkou niektorých ustanovení, resp. výnimiek v článkoch 10, 11 a 12 tohto ustanovenia (presnejšie v Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices).

### Dôsledky pandémie Covid-19 na realizáciu IVDR

Na konci roka 2021 však infraštruktúra pre vysoko rizikové testy (Trieda D) takmer úplne chýbala. Do Triedy D sú zaradené testy, ktoré majú v Európe zásadný význam pre systém zdravotnej starostlivosti. Sú nevyhnutné na skríning transfúznej krvi, krvných prípravkov, erytrocytov a plazmy, kontrolu orgánov na transplantáciu, ale aj na zvládnutie infekčných chorôb, ako je napríklad pandémie ochorenia Covid-19. Zatiaľ je v EÚ určených (autorizovaných) len šesť notifikovaných orgánov, chýbajú spoločné špecifikácie, IVD panel expertov (EXPAMED) a príslušné európske referenčné laboratória (EURL). Z tohto dôvodu umožnila EK hodnotiť notifikovaným orgánom testy Triedy D aj bez vyjadrenia EXPAMED a EURL. Notifikované orgány vedomé si svojej zodpovednosti však zatiaľ z pochopiteľných dôvodov váhajú a odmietajú posudzovať testy Triedy D bez toho, aby boli podložené posudkami EXPAMED a EURL. Hrozilo, že ak EK s IVDR nič neurobí, môžu byť zavedené len testy s najnižším rizikom (napr. prístrojové vybavenie, kultivačné médiá, ap.) s nerovnomerným a neúplným rozšírením reagenčných súprav v iných triedach.

Nepripravenosť regulačnej infraštruktúry EÚ (nedostatočný počet aktívnych notifikovaných osôb, nedostup-

nosť databázy EUDAMED, nefunkčné expertné panely a/alebo referenčné laboratóriá na vyhodnotenie najrizikovejších testov, chýbajúce pohotovostné plány, oneskorené usmernenia, slabé komunikačné štruktúry na efektívne šírenie stratégií) ohrozujú diagnostický sektor EÚ a budú mať nepochybne vážne dôsledky na životy pacientov v celej Európe v mnohých oblastiach, od urgentnej medicíny až po monitorovanie liečby (Tab.3). Hlavné dôsledky, ktoré možno očakávať (Cobbaert, C. et al., 2022; Biomedical Alliance in Europe, 2021), budú nasledovné:

- zavedené základné testy s označením CE nebudú na európskom trhu k dispozícii alebo budú čeliť nedostatku a/alebo zmiznú bez predbežného oznámenia;
- špeciálne testy s označením CE pre genetiku, virológiu, molekulárne diagnostiku, rakovinu budú obzvlášť zraniteľné;
- prestane sa vyvíjať personalizovaná diagnostika a testy na zriedkavé choroby;
- tendencia k monopolizácii testov obmedzí ich portfólio a ohrozí diagnostické inovácie;
- vývoj nových a dynamických riešení pre zriedkavé choroby a akútne zdravotné krízy, ako je napr. COVID-19, bude brzdený (počas pandémie uplynie 9 až 12 mesiacov na certifikáciu testov);
- diagnostické laboratóriá nebudú schopné zmeniť rozpočet a znášať bremeno plnenia požiadaviek na všetky svoje interné zariadenia IVD/ LDT, takže môžu zrušiť časť svojho súčasného portfólia testov.

Špecializované referenčné laboratóriá budú odrádzané od používania špecificky prispôsobených LDT embargom z existujúcich, všeobecnejších testov s označením CE, najmä ak budú zakázané byrokraciou spojenou s odôvodnením použitia.

Je na politikoch a všetkých zainteresovaných, aby sa zaoberali rizikami, ktoré neprimeraná implementácia IVDR predstavuje pre celý sektor terapeutického lekárstva v Európe.

### **Nedostatok notifikovaných orgánov**

Nedostatok kapacity notifikovaného orgánu ovplyvní dostupnosť zariadení IVD so značkou CE. Asi 70 % rozhodnutí lekárov sa zakladá na výsledkoch diagnostických testov, čo vážne obmedzí starostlivosť o pacientov.

Situácia v roku 2021: Podľa IVDR boli určené iba 4 notifikované orgány. 90 % IVD v porovnaní s 10 % podľa pred-

chádzajúcej smernice 98/79/ES2 bude musieť podstúpiť posúdenie zhody notifikovaným orgánom. Situácia je alarmujúca, ak vezmeme do úvahy, že v polovici roku 2021 iba 7 testov z cca. 19 000 testov bolo certifikovaných podľa IVDR a v druhej polovici roka 2021 sa posudzovalo iba ďalších 249 testov. Spracovanie žiadosti o certifikát notifikovaného orgánu trvá v priemere 10 mesiacov a 78 % výrobcov IVD nahlásilo problémy s certifikačným procesom IVD. Prekážky v prístupe k notifikovanému orgánu spolu s nemožnosťou dlhodobého predvídania nútia výrobcov, najmä malé a stredné podniky, aby zastavili výrobu celého radu CE-IVD. To spôsobí ťažkosti poskytovateľom diagnostiky zdravotnej starostlivosti, ktorí sa pri poskytovaní riešení zdravotnej starostlivosti pacientom spoliehajú na testy označené značkou CE.

### **Obrovská neistota okolo používania laboratórnych testov vyvinutých v laboratóriu (LDT)**

Nedostatok vhodných pokynov pre klinické laboratóriá sťažuje ich prípravu na IVDR. Interpretácia požiadaviek IVDR na LDT by mohla brániť ich dostupnosti a vývoju novej diagnostiky a testov na zriedkavé choroby.

Situácia v roku 2021: Diagnostické testy vyvinuté v klinických laboratóriách majú zásadnú úlohu v diagnostike v celej Európe. Prípadová štúdia vo veľkom laboratóriu univerzitnej nemocnice v Belgicku ukázala, že 47 % testov realizovaných v nemocničných laboratóriách sú LDT. V špecializovaných laboratóriách sa tento počet môže zvýšiť až na 80–90 %. Často ide o komplexné testy na zriedkavé choroby a/alebo testy, ktoré sa vykonávajú zriedka. LDT vyplňajú medzeru poskytovaním rýchlo implementovateľných a personalizovaných riešení, keď alternatívy so značkou CE nie sú na trhu k dispozícii (vyššie uvedená prípadová štúdia zistila, že v súčasnosti nie je k dispozícii alternatíva pre 72 % LDT). Napríklad LDT hrali zásadnú úlohu pri poskytovaní rýchlych riešení v raných fázach pandémie COVID-19. LDT budú povolené podľa IVDR za prísnych podmienok: žiadna alternatíva s označením CE, oprávnené použitie, kvalita je zabezpečená splnením všeobecných bezpečnostných a výkonových požiadaviek IVDR, atď. Laboratóriá musia vyčleniť značné prostriedky na pochopenie požiadaviek daných IVDR a na dodržiavanie tohto nového nariadenia. Prevencia vývoja LDT hneď, ako bude k dispozícii jeden test označený značkou CE, podporí monopoly a riziko zlyhania pri optimalizácii diagnostiky variantov, ako je to napr. v prípade SARS-CoV-2.

**Tabuľka 3. Nesúlad medzi regulačnými ustanoveniami EÚ a klinickou potrebou zdravotníckych pomôcok s IVD (stav v r. 2021)**

Medicínske testy so značkou CE	
Laboratórne diagnostické testy nevyhnutné pre klinickú prax a zdravotnú starostlivosť: súčasný stav a regulačné ustanovenia	Stav implementácie (2021) nového nariadenia o diagnostických zdravotníckych pomôckach <i>in vitro</i> (EÚ) 2017/746 (IVDR)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• V medicínskej praxi sa používa viac ako 27 000 laboratórných diagnostických testov (IVD).</li> <li>• Podľa smernice EÚ 98/79/ES (IVDD) o Diagnostických medicínskych pomôckach <i>in vitro</i> mal notifikovaný orgán skontrolovať menej než 10 % laboratórných diagnostických testov.</li> <li>• Na certifikáciu testov IVD podľa IVDD je schválených 18 notifikovaných orgánov.</li> <li>• Proces určenia notifikovaného orgánu podľa predpisov EÚ o zdravotníckych pomôckach trvá asi 700 dní.</li> <li>• Posúdenie žiadosti o certifikát CE pre IVD pomôcku predloženej výrobcom trvá asi 10 mesiacov.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dátum začiatku uplatňovania nového nariadenia IVDR je 26. máj 2022.</li> <li>• 90 % testov IVD (asi 19 000) si bude po prvýkrát vyžadovať posúdenie zhody notifikovaným orgánom podľa IVDR.</li> <li>• Pre IVDR boli doteraz určené iba 4 notifikované orgány.</li> <li>• Očakáva sa, že v priebehu nasledujúcich 6 mesiacov bude menovaný iba 1 ďalší notifikovaný orgán.</li> <li>• Podľa IVDR bolo doteraz schválených iba 7 testov IVD2.</li> <li>• Prebieha preskúmanie ďalších 249 testov.</li> <li>• 78 % výrobcov IVD uviedlo ťažkosti so schválením svojich testov z dôvodu nedostatku kapacity notifikovaného orgánu.</li> <li>• Testy označené CE, ktoré nemôžu podstúpiť hodnotenie notifikovaným orgánom, už nebudú k dispozícii pre pacientov, ktorí ich potrebujú.</li> </ul>
Diagnostické testy vyvinuté v laboratóriu (domáce testy, „in house“)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Typická univerzitná nemocnica vykonáva 922 rôznych laboratórných diagnostických testov.</li> <li>• 47 % sú domáce laboratórne testy; pre 72 % z nich neexistuje komerčne dostupná alternatíva.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulačný dohľad nad testami vyvinutými v laboratóriu bol delegovaný na členské štáty EÚ, ale usmernenie ešte nebolo zverejnené.</li> <li>• Vplyv IVDR na dostupnosť testov vyvinutých v laboratóriu vyžaduje formálne vyhodnotenie.</li> </ul>

### Postupné zavádzanie IVDR 2017/746 prijaté EÚ 25. januára 2022

Vzhľadom na bezprecedentný rozsah súčasných výziev, na dodatočné zdroje, ktoré potrebujú členské štáty, zdravotnícke zariadenia, notifikované osoby, hospodárske subjekty a iné príslušné strany na boj proti pandémie ochorenia COVID-19 a na v súčasnosti obmedzenú kapacitu notifikovaných osôb, a zohľadňujúc zložitosť nariadenia (EÚ) 2017/746, Rada Európskej únie a Európsky parlament prijali 15. decembra 2021 návrh postupného zavádzania nariadenia o diagnostických zdravotníckych pomôckach *in vitro*, ktorým sa stanovujú **nové prechodné obdobia** podľa rizikových tried pomôcok IVD (Regulation (EU) 2022/112, 2022). Aby sa zabezpečila právna istota a zabránilo možnému narušeniu trhu Európsky parlament a Rada Európskej únie predĺžila prechodné obdobia stanovené v nariadení (EÚ) 2017/746 pre pomôcky, na ktoré sa vzťahujú certifikáty vydané notifikovanými osobami v súlade so smernicou 98/79/ES. Z rovnakých dôvodov usúdila, že je takisto potrebné poskytnúť dostatočné prechodné obdobie pre pomôcky, ktoré sa majú po prvýkrát podrobiť posudzovaniu zhody zahŕňajúcemu notifikovanú osobu podľa nariadenia (EÚ) 2017/746. Novela Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2022/112 z 25. januára 2022, ktorým sa mení nariadenie (EÚ) 2017/746, po-

kiaľ ide o prechodné ustanovenia pre určité diagnostické zdravotnícke pomôcky *in vitro* a odklad uplatňovania podmienok na interné pomôcky poskytuje viac času mnohým prevádzkovateľom v diagnostickom priemysle IVD, ale neupravuje dátum stanovený pre začiatok úplného uplatňovania nariadenia, ktorý zostáva 26. máj 2022 počnúc nesterilnými IVD pomôckami triedy A. Zverejnením novely nariadenia (EÚ) 2022/112 Európsky parlament upravil prechodné obdobia pôvodne stanovené v článku 110 IVDR v prvom a druhom pododseku, v ktorých nahradil dátum 27. máj 2024 dátumom 27. máj 2025. Ďalej novela nariadenia IVDR povoľuje v pododseku 2 a 3 článku 5 dátumy pre uvádzanie pomôcok IVD do používania, ak tieto budú naďalej v súlade so smernicou 98/79/ES a za predpokladu, že sa nevykonajú žiadne podstatné zmeny konštrukčného návrhu. Pomôcky s certifikátom, ktorý bol vydaný v súlade so smernicou 98/79/ES a ktorý je platný na základe odseku 2 tohto článku, sa môžu uvádzať na trh alebo uvádzať do používania do 26. mája 2025. Pomôcky uvedené na trh v súlade s právnymi predpismi od 26. mája 2022 podľa odseku 3 tohto článku sa môžu naďalej sprístupňovať na trhu alebo uvádzať do používania až do 26. mája 2026 v prípade pomôcok uvedených v odseku 3 druhom pododseku, alebo v odseku 3 treťom pododseku písm. a); do 26. mája 2027 v prípade pomôcok uvedených v odseku 3 treťom



pododseku písm. b); 26. mája 2028 v prípade pomôcok uvedených v odseku 3, treťom pododseku písm. c) a d). V článku 112 druhom odseku sa dátum „27. mája 2025“ nahrádza dátumom „26. mája 2028“. Článok 5 ods. 5 písm. d) sa uplatňuje od 26. mája 2028.

## ZÁVER

Dnešný nedostatok kapacít notifikovaných osôb podľa nových predpisov výrobcami nielen sťažuje, ale dokonca znemožňuje prihlásiť produkty na certifikáciu. To sa stáva ešte kritickejšim, keď sa existujúce notifikované orgány považujú za „nespôsobilé“ na určenie podľa nových pravidiel. Kvôli nejasnostiam sa zhoršuje aj obchodná predvídateľnosť toho, ktorá notifikovaná osoba bude mať kapacitu a v akom časovom horizonte a na ktoré kategórie produktov. Na získanie označenia CE značky narastajú čakacie doby a hrozí narušenie dodávateľského reťazca. Zvyšuje sa zraniteľnosť a neistota predovšetkým u malých a stredných podnikov, ktoré predstavujú 95% sektora. EÚ ako celku hrozí potenciálna strata konkurencieschopnosti voči iným globálnym hráčom (USA, Čína, atď.). Vysoké riziko oneskorenia alebo prerušenia prístupu k produktom medicínskych technológií môže mať vážne dôsledky pre pacientov, zdravotníkov, nemocnice a laboratóriá.

MedTech Europe nalieha vyzýva Európsku komisiu a členské štáty, aby v prechodných obdobiach včas zabezpečili dostupnosť notifikovaných orgánov určených podľa nariadenia o zdravotníckych pomôckach *in vitro* (IVD) a nariadenia o zdravotníckych pomôckach (MD). Cieľom je zabrániť akémukoľvek narušeniu dostupnosti potrebných medicínskych prípravkov pre pacientov a systémy zdravotnej starostlivosti v čase regulačného prechodu.

## LITERATÚRA

1. **Anzivilho, N.:** *In Vitro Diagnostics (IVD) Market trends—Overview.* (2021) PricewaterhouseCoopers. [pwc-IVD-market-trends-overview.pdf](#)
2. **Biomedical Alliance in Europe (2021):** *Implementation of the new EU Regulation for In vitro Diagnostic Medical Devices: a Ticking Time Bomb for the Diagnostic Sector.* Urgent actions are needed now to prevent a collapse of diagnostic testing.

3. **Cobbaert, C., Capoluongo, E., D., Vanstapel, F., J., L., A. et al. (2022):** Implementation of the new EU IVD regulation—urgent initiatives are needed to avert impending crisis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2022; 60(1): 33—43. [doi.org/10.1515/cclm-2021-0975](#).
4. **Decision no 768/2008/EC** of the European Parliament and of the Council of 9 July 2008 on a common framework for the marketing of products, and repealing Council Decision 93/465/EEC. *Official Journal of the European Union*, L 218/82 EN (2008).
5. **Directive 98/79/EC** of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. *Official Journal of the European Communities* ISSN 0378-6988 L 331 Volume 41 7 December 1998 English edition Legislation. *Official Journal of the European Communities*, L 331/1 (1998).
6. **Health Sciences Authority—Health Products Regulation Group (HSA):** GN-14: *Guidance on the Risk Classification of In vitro Diagnostic Medical Devices.* Regulatory Device Guidance. June 2018. Revision 2. [www.hsa.gov.sg](#)
7. **ISO/IEC 17000: 2004** *Conformity assessment.*
8. **IVD Working Group. Principles of In vitro Diagnostic (IVD):** Medical Devices. *Classification.* 21 January 2021. [https://www.gov.uk/](#)
9. **Lysák, L.:** *Nariadenie EPaR (EÚ) 2017/745 o zdravotníckych pomôckach a Nariadenie EPaR (EÚ) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro.* 3EC International a. s. (2018). [https://www.unms.sk/source/2018/osaez/den\\_skusobnictva/4.%20Prezentacia%20MDR%20a%20IVDR.pdf](#)
10. **Regulation (EU) 2017/745** of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices, amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC. *Official Journal of the European Union*, L 117/1 (2017).
11. **Regulation (EU) 2017/746** of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU. *Official Journal of the European Union*, L 117/176 (2017).
12. **Regulation (EU) 2022/112** of the European Parliament and of the Council of 25 January 2022 amending Regulation (EU) 2017/746 as regards transitional provisions for certain *in vitro* diagnostic medical devices and the deferred application of conditions for in-house device. *Official Journal of the European Union*, L 19/3 (2022).

## ANOTÁCIA ODBORNEJ LITERATÚRY

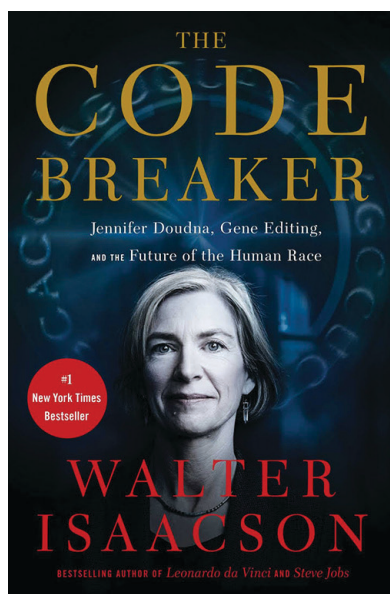
**Isaacson, W. (2021): *Prolomený kód života. Jennifer Doudnaová, genetické inžénrství a budoucnost lidstva.***

1. vydanie. Praha: Práh, ISBN 978-80-7252-909-4, pred-slov Martin Jínek

Anglický originál:

**Isaacson, W. (2021): *The code breaker: Jennifer Doudna, Gene Editing, and the Future of the Human Race.***

1st edn. New York: Simon & Schuster, ISBN 978-1-9821-1585-2.



**Walter Isaacson** je profesorom dejepisu na Tulaneovej univerzite, bol šéfredaktorom časopisu Time a generálnym riaditeľom televízie CNN. V minulosti napísal životopis Leonarda da Vinci, Benjamína Franklina, Alberta Einsteina a mnohých iných významných osobností.

Kniha o nositeľke Nobelovej ceny z chémie z roku 2020, ktorú dostala spolu s Emmanuelle Charpentierovou je oveľa viac ako životopis. V 9 častiach a 56 kapitolách je analýza skoro všetkého, čo sa udialo v genetike od Men-

dela po súčasnosť. Kniha vznikla na základe opakovaných rozhovorov skoro každého účastníka objavu systému CRISPR a stovky odkazov na pôvodnú vedeckú literatúru. Jedna dimenzia príbehu (Prvá časť – Začiatok života) je cesta výnimočne nadanej ženy, ktorá z malého mestečka Hilo na Havajských ostrovoch sa dostala do centra genetického výskumu a nakoniec na samotný vrchol vedy. Jennifer chodila do šiestej triedy, keď čítala fantastickú ale zároveň škandalóznou knihu Jamesa Watsona o objave štruktúry DNA a pravdepodobne tento príbeh ju motivoval k tomu, že sa rozhodla venovať výskumu v oblasti genetiky. Bola presvedčená, že veda je vzrušujúca a na názor pedagogického poradcu pred nástupom na vysokú školu (dievčatá vedy nerobia) odpovedala, že „Ja ti ukážem! Ak chcem robiť vedy, budem robiť vedy“. Prvé vysokoškolské roky na Pomona College neboli ľahké, ale nakoniec sa dostala na Harvard, potom na Berkeley a tam sa začala jej vedecká kariéra. Zoznámila sa s poprednými osobnosťami výskumu, už nebola „dievča, ktoré nepatrí do vedy“. V roku 1987 prezentovala svoje prvé výsledky o RNA na konferencii usporiadanej Jamesom Watsonom. Po prednáške jej gratuloval Tom Cech, ďalší nositeľ Nobelovej ceny a zoznámila sa aj s Barbarou McClintockovou (Nobelova cena jej bola udelená po 40 rokoch výskumu transpozónov). Ďalšie roky boli pre mladú výskumníčku ťažké, ale úspešné a postupne sa dostala k problematike, z ktorej sa narodila myšlienka vedúca k metóde CRISPR.

Ďalšie dimenzie zodpovedajú názvom jednotlivých častí knihy:

**2. ČASŤ: CRISPR.** Cesta objavu k metóde CRISPR (Clustered regular interspaced short palindromic repeats – segmenty pravidelne rozmiestnených krátkych palindrómových repetícií). Podľa manželky autora knihy by bol výraz „Crispr“ vhodným menom pre psa, keďže samotná skratka v preklade znamená niečo ako „chrumkavé“. Pre baktérie je CRISPR starodávnym veľmi účinným obranným

systémom proti bakteriofágom. Jedna časť systému rozozná gény vtreľca a druhá ich rozreže na malé kusy. Tento princíp tvoril základnú myšlienku využitia metódy CRISPR pre modifikácie génov vyšších organizmov.

**3. ČASŤ: EDITOVANIE GÉNOV.** Súťaž o prvenstvo využitia novej technológie pri editovaní génov vyšších organizmov. Jennifer Doudnaová zvíťazila v tomto boji proti konkurentom Fengovi Zhangovi, Emmanuelle Charpentierovej a Georgeovi Churchovi v roku 2012 len o vlások. Následne sa začalo komerčné využitie technológie (všetci účastníci súťaže zakladali vlastné firmy) a vznikali aj nekonečné patentové spory medzi spomenutými vedcami.

**4. ČASŤ: CRISPR V AKCII.** Prvé pokusy a úspechy v editovaní somatických génov v medicíne. Zapnutie génu pre fetálny hemoglobín u chorých s kosáčikovou anémiou, liečba jednej vrodenej formy slepoty a využitie metódy v liečbe rakoviny. Táto časť obsahuje dve veľmi zaujímavé krátke kapitoly o neregulovanom editovaní génov „biohackermi“ a vývoj metód na blokovanie CRISPR pre obavy z bioterorizmu (DARPA a antiCRISPR.)

**5. ČASŤ: VEREJNÁ VEDA.** Návrat k prvým diskusiám o bezpečnosti a etických problémoch genetického inžinierstva (konferencia Asilomar, 1975) a uskutočnenie ďalších diskusných fór o etických aspektoch editovania gametických génov. Je zaujímavé, že najviac liberálny postoj v tejto otázke zastával a dodnes zastáva James Watson.

**6. ČASŤ: CRISPROVÉ DETI.** Podrobný rozbor škandálu editovania zárodočných buniek čínskym biológom He Jiankui (v knihe pod menom Che Tien-kchuej). V oplodnených vajíčkach upravil gén CCR5, kódujúci receptor pre vírus HIV (otec detí mal AIDS). Dvojčatá Nana a Lulu sa narodili v roku 2018. Tento krajne nezodpovedný krok bol odsúdený vedcami celého sveta. He Jiankui bol vyhodnený z univerzity a odsúdený na 3 roky väzenia. Deti žijú a nikto nevie, aký bude ich osud. Daný receptor totiž má úlohu aj v imunitnom systéme a nosiči prirodzene mutovaného génu CCR5 majú podľa zatiaľ nepotvrdených údajov skrátenú dobu života.

## **7. a 8. ČASŤ: MORÁLNE OTÁZKY, SPRÁVY Z FRONTU.**

Pokračovanie diskusie o etických a morálnych otázkach genetického inžinierstva a editovaní génov v zárodočných bunkách. Odpovede nie sú úplne jednoznačné, pretože napríklad oprava génu, ktorý má za následok neliečiteľnú a autozómovo dedičnú Huntingtonovu chorobu by mohla byť užitočná. V tom prípade editovanie génu by bolo eticky v poriadku. Na druhej strane veľká väčšina ľudských vlastností a chorôb nie je výsledkom mutácie jedného génu, ale komplexnej interakcie veľkého počtu génov a epigenetických pochodov. Okrem toho, napriek obrovskému technologickému pokroku, nie je možné vylúčiť „off target“ modifikácie a iné nečakané komplikácie, ktoré pri editácii somatických génov nie sú veľmi nebezpečné, ale zmeny génov zárodočných buniek sa prenášajú do ďalších generácií. Vedci na základe mnohých diskusií na rôznych sympóziách neodporúčajú moratórium (červené svetlo) a ani neregulované pokusy s neistými výsledkami (zelené svetlo), ale opatrné a rozumné pokračovanie vo výskume editácie génov (oranžové svetlo).

**9. ČASŤ: KORONAVÍRUS.** Počas písania knihy a počas opakovaných rozhovorov s vedcami pracujúcimi na danej téme udrela pandémia COVID-19. Americká administratíva na čele s prezidentom Trumpom na začiatku pandémie zlyhala na celej čiare. Na rozdiel od nich, Jennifer Doudnaová ako aj jej konkurenti, odložili staré spory a okamžite sa všetkými silami pustili do vývoja testov na detekciu vírusu SARS-CoV-2 a ich využitia pre celú populáciu. Spolupracovali aj na vývoji vakcín a začali pracovať na možnostiach boja proti vírusom tou istou metódou, ktorú využívajú baktérie proti fágom už mnoho miliónov rokov.

Podľa autora knihy, práve tá nečakaná pandémia a boj proti COVIDu-19 je jednoznačným dôkazom nie len toho, že vedecký výskum o pochopení fungovania je vzrušujúci príbeh, ale aj toho, že objavy je možné využiť pre boj s chorobami a pre dobro ľudstva.

*Oliver Rácz*  
odborný redaktor časopisu



## ETICKÝ KÓDEX IFCC



### PREAMBULA

Etický kódex Medzinárodnej federácie klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC) stanovuje etické princípy a normy, podľa ktorých by odborníci v laboratórnej medicíne mali vykonávať svoju profesiu.

Všetci pracovníci klinických laboratórií sú na všetkých úrovniach odbornosti a pracovných skúseností vyzývaní, aby sa správali podľa najvyšších dosiahnuteľných etických štandardov.

Tento kódex sa zameriava na tri ciele a je štruktúrálné založený na princípoch vymedzených v **Belmontovej správe** vydanej v roku 1979 vtedajšou Národnou komisiou USA na ochranu ľudí v biomedicínskom výskume a behaviorálnej medicíne; jej princípy sú rovnako platné aj pre diagnostickú medicínsku laboratórnu prácu, a to vtedy aj dnes.

### 1. Správanie sa k pacientovi

- a) Všetci klinickí laboratórni pracovníci sú zodpovední za kvalitu a integritu laboratórnych služieb, ktoré poskytujú.
  - Táto povinnosť zahŕňa udržiavanie individuálnej kompetencie v úsudku a výkone a snahu chrániť pacienta pred nekompetentnými, neetickými alebo nezákonnými praktikami iných.
- b) Dodržiavajú vysoké štandardy praxe.
  - Pri vykonávaní laboratórnych testov a pri ich neustálom vyhodnocovaní musia uplatňovať zdravý úsudok.

- c) Zachovávajú prísnu dôvernosť informácií o pacientoch a výsledkoch testov, a tým chránia dôstojnosť a súkromie pacientov a akýchkoľvek vzoriek získaných od nich.
  - Vydávajú správne výsledkové listy a vhodnú interpretáciu výsledkov pacientov objednávajúcim lekárom a iným príslušným zdravotníckym pracovníkom.

### 2. Konanie voči kolegom a profesii

- a) Pracovníci v klinických laboratóriách musia zachovávať dôstojnosť a rešpekt svojej profesie a snažiť sa udržať si povesť čestnosti, integrity a spoľahlivosti vo všetkých prostrediach, vrátane online.
- b) Musia prispievať k napredovaniu profesie zlepšovaním súboru vedomostí, osvojovaním si vedecských pokrokov, ktoré sú prospešné pre pacienta, udržiavaním vysokých štandardov praxe a vzdelávania a hľadaním bezpečných a spravodlivých sociálno-ekonomických pracovných podmienok pre všetkých členov profesie.
- v) Musia sa snažiť o aktívnu spoluprácu a vzájomný rešpekt v pracovných vzťahoch s ostatnými zdravotníckymi pracovníkmi s prvoradým cieľom zabezpečiť bezproblémovo vysoký štandard starostlivosti o pacientov, ktorým slúžia.
- d) V obchodnom styku s výrobcami, dodávateľmi, konkurentmi a klientmi, klinickými lekármi aj pacientmi musia preukázať čestnosť a integritu.
- e) Mali by skúsené radiť a snažiť sa pomáhať mladým výskumníkom a odborníkom na začiatku kariéry,

najmä tým, ktorí sú pod ich vedením v ich profesionálnom rozvoji a raste.

### 3. Závazky voči spoločnosti

- a) Ako predstavitelia autonómnej profesie majú laboratórni odborníci tiež zodpovednosť prispievať zo svojej sféry odbornej spôsobilosti k všeobecnému blahu spoločnosti.
- b) Musia dodržiavať príslušné zákony a predpisy týkajúce sa praxe klinickej laboratórnej lekárskej vedy. Musia sa aktívne snažiť, v rámci svojho vnútorného presvedčenia, svedomia a schopností, zmeniť tých, ktorí nespĺňajú vysoké štandardy starostlivosti a praxe, ku ktorým je profesia zaviazaná.

- c) Musia zabezpečiť vedecky vhodné, presné a nákladovo efektívne využitie financovania služieb klinických laboratórií, chrániť pred ich plytvaním, najmä klinicky zbytočnými, neefektívnymi a nepotrebnými duplicitnými vyšetreniami.

Tým, že sa každý laboratórny pracovník zaviazuje aktívne preukazovať oddanosť týmto zásadám a tým, že sa nimi bude riadiť po celý svoj profesijný život, prispeje svojím dielom k zaisteniu požadovanej kvality a integrity služieb, ktoré jeho laboratórium poskytuje svojim lekárom a pacientom.

IFCC Taskforce on Ethics/Pracovná skupina IFCC pre etiku  
Schválené Výkonnou radou IFCC, 28. 7. 2021

*preložil*  
*Ján Balla, 4. 3. 2022*



## IFCC CODE OF ETHICS 2021



### PREAMBLE

The Code of Ethics of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) sets forth the ethical principles and standards by which clinical laboratorians practice their profession. The requirement to practice to the highest achievable ethical standards equally challenges practitioners at all levels of expertise and work experience.

This Code focusses on three targets of duty and is structurally based on the principles delineated in the Belmont Report created in 1978 by the then U.S.A. National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioural Research; its principles also being equally valid for diagnostic medical laboratory work for humans, both then and now.

#### 1. Duty to the Patient

1. Clinical laboratorians are all accountable for the quality and integrity of the laboratory services they provide.
  - a. This obligation includes maintaining individual competence in judgement and performance and striving to safeguard the patient from incompetent, unethical or illegal practice by others.
2. They shall maintain high standards of practice.
  - a. They shall exercise sound judgment in establishing and performing laboratory testing and in its ever-ongoing evaluation.

3. They shall maintain strict confidentiality of patient information and test results and thereby safeguard the dignity and privacy of patients and any samples derived from them.
  - a. They shall provide accurate reports and appropriate interpretation about patients' results to ordering physicians and other appropriate health care practitioners.

#### 2. Duty to Colleagues and the Profession

1. Clinical laboratorians shall uphold and maintain the dignity and respect of their profession and strive to maintain a reputation of honesty, integrity and reliability in all environments, including online.
2. They shall contribute to the advancement of the profession by improving the body of knowledge, adopting scientific advances that benefit the patient, maintaining high standards of practice and education, and seeking safe and fair socio-economic working conditions for all members of the profession.
3. They shall actively strive to establish cooperative and respectful working relationships with other health care practitioners with the primary objective of ensuring a seamlessly high standard of care for the patients they both serve.
4. They shall demonstrate honesty and integrity in business dealings with manufacturers, suppliers, competitors and clients, both clinicians and pa-

tients.

5. They should mentor and endeavour to aid young investigators and early career professionals, especially those under their supervision, in their professional development and advancement.

### **3. Duty to Society**

1. As practitioners of an autonomous profession, clinical laboratorians also have a responsibility to contribute from their sphere of professional competence to the general well-being of the community.
2. They shall comply with relevant laws and regulations pertaining to the practice of clinical laboratory medical science. They shall actively seek, within the dictates of their consciences and ability, to change those that do not meet the high stan-

dards of care and practice to which the profession is committed.

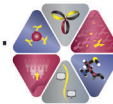
3. They shall ensure scientifically appropriate, accurate and cost-effective application of clinical laboratory service funding, guarding against waste, particularly clinical futility, inefficiency and needless investigative duplication.

By pledging to actively demonstrate commitment to these principles, and by being led by them, throughout one's professional life, each laboratorian will do their part in guaranteeing the required quality and integrity of the services one's laboratory provides its clinician and patient clients.

Authored by: IFCC Taskforce on Ethics

Reviewed & Approved by:

IFCC Executive Board, July 28, 2021



# Freelite® zachytí viac pacientov s monoklonálnymi gamapatiami



The  
Specialist  
Protein Company

Freelite® na meranie voľných ľahkých reťazcov kappa / lambda na analyzátore Optilite®. Diagnostická zdravotnícka pomôcka *in vitro*.

**Kód výrobku: LK016.OPT** na meranie voľných ľahkých reťazcov kappa  
**Kód výrobku: LK018.OPT** na meranie voľných ľahkých reťazcov lambda  
**Len pre diagnostické účely *in-vitro*.**

**Skrátená informácia o zdravotníckej pomôcke. Upozornenie:** Výsledky merania voľných ľahkých reťazcov kappa/lambda sa môžu pre konkrétnu vzorku líšiť v prípade použitia analytických súprav iných výrobcov alebo iných systémov z dôvodu odlišnej metódy testovania a inej špecificite reagensii. **Použitie:** Súprava Freelite je určená na kvantitatívne meranie voľných ľahkých reťazcov kappa / lambda *in vitro* v ľudskom sére alebo plazme (lithium-heparin, EDTA) na analyzátore Optilite od spoločnosti The Binding Site. Spolu s ďalšími laboratórnymi a klinickými nálezmi pomáha meranie voľných ľahkých reťazcov pri diagnostike a monitorovaní mnohopočetného myelómu, lymfocytárnych novotvarov, Waldenströmovej makroglobulinémie, AL amyloidózy, chorôb spojených s ukladaním ľahkých reťazcov a chorôb spojivového tkaniva, ako je systémový lupus erythematosus (SLE). **Materiály dodávané v súprave:** 1 x 100 testov Optilite Kappa / Lambda Free Reagent (Reagencie na meranie voľných ľahkých reťazcov kappa / lambda), 1 x 2,7 ml Optilite Kappa / Lambda Free Calibrator (Kalibrátor na meranie voľných ľahkých reťazcov kappa/lambda), 1 x 1,6 ml Optilite Kappa / Lambda Free High Control (Kontrolná vzorka s vysokou koncentráciou voľných ľahkých reťazcov kappa / lambda), 1 x 1,6 ml Optilite Kappa/ Lambda Free Low Control (Kontrolná vzorka s nízkou koncentráciou voľných ľahkých reťazcov kappa/ lambda). **Skladovanie a stabilita:** Neotvorené súpravy je potrebné skladovať pri teplote 2–8 °C a sú použiteľné do dátumu expirácie, uvedeného na označení balenia súpravy. **CHRÁŇTE PRED MRAZOM.** **Interpretácia výsledkov:** Výsledky tejto analýzy je potrebné vždy posúdiť spolu s anamnézou pacienta, klinickými vyšetreniami a ďalšími nálezmi vrátane predchádzajúcich výsledkov merania Freelite, ak sú k dispozícii. **Rozsah meraní:** Freelite kappa 0,60 – 127000, senzitivita 0,6 (mg/l), Freelite lambda 1,30 – 139000, senzitivita 1,3 (mg/l). Rozsahy normálnych hodnôt v sére dospelých: voľné kappa 3,30 - 19,40 mg/l, voľné lambda 5,71 - 26,30 mg/l. **Limit kvantifikácie:** Limit kvantifikácie (LoQ) pre meranie voľných ľahkých reťazcov kappa je definovaný ako dolná hranica rozsahu merania, teda 0,6 mg/l, pre meranie voľných ľahkých reťazcov lambda je definovaný ako dolná hranica rozsahu merania, teda 1,3 mg/l. Uvedené hodnoty LoQ boli validované v súlade so smernicou CLSI EP17-A. **Linearita:** Štúdia linearity bola zrealizovaná na základe smernice CLSI EP6-A. Linearita merania voľných ľahkých reťazcov kappa bola potvrdená pre rozmedzie koncentrácií analytu od 2,60 do 140,34 mg/l s odchýlkou od linearity <10 %. Linearita merania voľných ľahkých reťazcov lambda bola potvrdená pre rozmedzie koncentrácií analytu od 4,127 do 155,45 mg/l s odchýlkou od linearity <10 %.

**Výrobca:** The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK

**Distribútor v ČR a SR:** The Binding Site s.r.o., Pujmanové 1753/10a, 140 00 Praha 4, tel.:+421 223 013 988, www.bindingsite.com/cs-cz, info@binding-site.cz

**Dátum revízie textu:** 8. 12. 2021