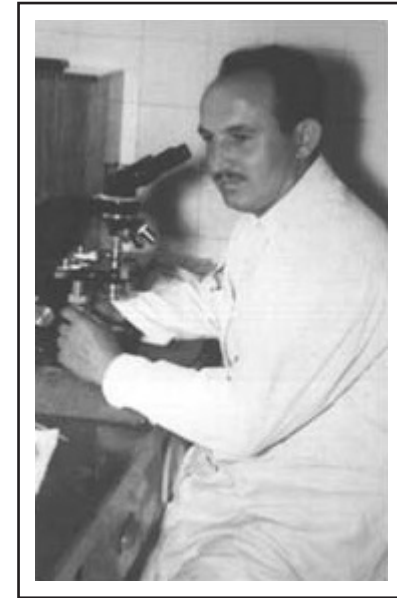


# 9. JESENOVČEVI DNEVI

Raziskovalni dnevi  
laboratorijske biomedicine

Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana  
29. september 2017

**Katedra za klinično biokemijo**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*  
**Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo**, *Univerzitetni klinični center Ljubljana*



## 9. JESENOVČEVI DNEVI

---

*Raziskovalni dnevi  
laboratorijske biomedicine*

*29. september 2017 ~ Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana*

ZBORNIK PREDAVANJ

## 9. JESENOVČEVI DNEVI – RAZISKOVALNI DNEVI LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

29. september 2017 ~ Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana

Organizator srečanja: **Katedra za klinično biokemijo (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani) in Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana)**

Znanstveni in organizacijski odbor: **Mojca Božič Mijovski, Darko Černe, Saša Čučnik, Aleš Jerin, Janja Marc, Adrijana Oblak, Tadej Pajič, Helena Podgornik, Barbka Repič Lampret, Milan Skitek, Katarina Trebusak Podkrajšek.**

Recenzenti: **Helena Podgornik, Barbka Repič Lampret, Alenka France Štiglic**

Urednika: **Milan Skitek in Darko Černe**

Oblikovanje in prelom: **Monika Skitek**

Izdal: **Katedra za klinično biokemijo (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani) in Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana)**

Založnik: **Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani**

Tisk: **Birografika Bori d.o.o., Ljubljana**

Naklada: **150 izvodov**

Cena publikacije: **10€**

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-074:001.891(082)

JESENOVČEVI dnevi (9 ; 2017 ; Ljubljana)  
Raziskovalni dnevi laboratorijske biomedicine : zbornik predavanj / 9. Jesenovčevi dnevi, 29. september 2017, Ljubljana ; [urednika Milan Skitek in Darko Černe]. - Ljubljana : Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center), 2017

ISBN 978-961-6442-79-4  
1. Gl. stv. nasl. 2. Skitek, Milan  
291515904

**KEMOMED**  
BRINGING SOLUTIONS

Looking for Innovative Solutions in the Field of  
Genomics, Biomedicine and Biotechnology?

We Bring Them To You!



- Instruments and Laboratory Equipment
- Reagents for Research and Diagnostic Biomedicine
- Consumables
- Application Support
- Service and Technical Support
- Calibration

**Kemomed**  
Svetovanje, trgovina in  
trženje d.o.o.

Kališka 9  
PE: Stritarjeva 5  
4000 Kranj  
Slovenia

**T** +386 4 2015 050  
**F** +386 4 2015 055  
**E** info@kemomed.si  
**W** www.kemomed.si

## Cell Analysis

Scepter™ 2.0  
Automated Cell Counter



Muse® Cell Analyzer



Guava® easyCyte Flow



Amnis®-Imaging Flow Cytometers



## Cell Culture & Systems

Sterile Filtration Devices



Cell Culture Plates



Millex

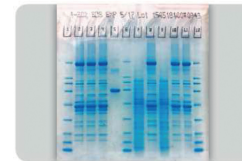


CELLASIC® ONIX2 Microfluidic



## Western Blotting

TruPAGE™ Precast



Immobilon® Membranes



SNAP i.d.® 2.0  
System for WB



Western Blotting  
Reagents

Luminat



## Sample Preparation

ProteoExtract® and  
ProteoEnrich™ Kits



PureProteome™



D-Tube™



Amicon®



Microcon® DNA



Amicon® Pro



## Protein Detection Platforms

Erenna®



Ultrasensitivity  
High performance

Luminex® platform



Multiplex detection  
Flexible platform

ELISA



Gyrolab® workstation



Fully automated  
High precision



## PROGRAM SREČANJA

*Programme of meeting*

08:00 **Registracija**

09:00 **Uvodni nagovor**

*Darko Černe (Univerza v Ljubljani)*

*Milan Skitek (Univerzitetni klinični center Ljubljana)*

---

### Tarčne molekule, tarčne učinkovine in njihovi potencialni označevalci v hematologiji

*Koordinatorica: izr. prof. dr. Helena Podgornik*

09:15 **Tailored therapeutic approaches in CLL: Is it only about genetics?**

*Panagiotis Baliakas (Univerza v Uppsali)*

09:45 **Standardizacija metode kvantitativne PCR za spremljanje zdravljenja bolnikov s kronično mieloično levkemijo**

*Tadej Pajič (UKC Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo)*

10:05 **Nepričakovane metabolne poti tarčnega zdravila As2O3 pri bolnikih z akutno promielocitno levkemijo**

*Ingrid Falnoga (Inštitut Jožef Štefan, Raziskovalni odsek za znanosti o okolju)*

10:25 **Ex-vivo vrednotenje zdravilnih učinkovin**

*Katarina Reberšek (UKC Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za hematologijo)*

---

### Novosti v nacionalnem presejanju vrojenih boleznih presnove v otroški dobi

*Koordinatorica: asist. dr. Barbka Repič Lampret*

11:00 **Current state and future challenges of newborn screening**

*Maximilian Zeyda (Medicinska univerza na Dunaju)*

11:30 **Presejalno testiranje novorojencev- izkušnje v slovenskem prostoru**

*Adrijana Oblak (UKC Ljubljana, Klinika za nuklearno medicino)*

11:45 **Pilotna raziskava razširjenega presejanja novorojencev za vrojene bolezni presnove**

*Andraž Šmon (UKC Ljubljana, Pediatrična klinika)*

12:00 **Sekvenciranje DNA visoke zmogljivosti pri presejalnem testiranju novorojencev za prirojene bolezni presnove**

*Jernej Kovač (UKC Ljubljana, Pediatrična klinika)*

---

### Raziskovalna dejavnost v konsolidirani laboratorijski službi

*Koordinatorica: asist. mag. Alenka France Štiglic*

13:30 **Laboratory consolidation – benefits and pitfalls**

*Dunja Rogič (Univerza v Zagrebu)*

14:00 **Vloga laboratorija pri odkrivanju akutne ledvične okvare**

*Aleš Jerin, Milan Skitek (UKC Ljubljana, KIKKB)*

14:15 **Elementi v sledovih v semenski tekočini neplodnih moških**

*Alenka France Štiglic, Alenka Sešek Briški, Branko Zorn (UKC Ljubljana, KIKKB in Ginekološka klinika)*

14:30 **Določitev prostih lahkih verig kapa in lambda v likvorju - njihova uporabnost**

*Mladen Krsnik (UKC Ljubljana, KIKKB)*

# KAZALO

11	<b>BESEDA ORGANIZATORJA</b>
15	<b>TARČNE MOLEKULE, TARČNE UČINKOVINE IN NJIHOVI POTENCIALNI OZNAČEVALCI V HEMATOLOGIJI</b>
16	Tailored therapeutic approaches in CLL: Is it only about genetics?
18	Nepričakovane metabolne poti tarčnega zdravila As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> pri bolnikih z akutno promielocitno levkemijo
30	Ex-vivo vrednotenje zdravilnih učinkovin
45	<b>NOVOSTI V NACIONALNEM PRESEJANJU VROJENIH BOLEZNI PRESNOVE V OTROŠKI DOBI</b>
46	Current state and future challenges of newborn screening
58	Presejalno testiranje novorojencev- izkušnje v slovenskem prostoru
70	Pilotna raziskava razširjenega presejanja novorojencev za vrojene bolezni presnove
82	Sekvenciranje DNA visoke zmogljivosti pri presejalnem testiranju novorojencev za prirojene bolezni presnove
97	<b>RAZISKOVALNA DEJAVNOST V KONSOLIDIRANI LABORATORIJSKI SLUŽBI</b>
98	Laboratory consolidation – benefits and pitfalls
106	Vloga laboratorija pri odkrivanju akutne ledvične okvare
116	Elementi v sledovih v semenski tekočini neplodnih moških
124	Določitev prostih lahkih verig kapa in lambda v likvorju - njihova uporabnost

## Beseda organizatorja

### **Uvodni nagovor: pomen znanosti za stroko**

**prof. dr. Darko Černe<sup>1</sup>, izr.prof. dr. Milan Skitek<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Katedra za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Njegoševa 4, 1000 Ljubljana

*Spoštovane kolegice in kolegi, spoštovani predavatelji, spoštovani udeleženci kongresa!*

*Prizadevamo si, da bi Jesenovčevi dnevi postali tradicionalni dogodek slovenske medicinske biokemije. Zato se dobivamo zadnji dan septembra vsako leto. Toda s kakšnim namenom? Namen Jesenovčevih dnevov je poudariti in približati pomembnejše znanstvene dosežke stroki medicinske biokemije. Številni raziskovalci (od fizikov do molekularnih biologov) se danes ukvarjajo z iskanjem novih bioloških označevalcev, ki naj bi pripomogli k učinkovitejši diagnostiki in/ali terapiji, kar kaže na veliko aktualnost naše discipline. Vendar Katedra za klinično biokemijo pri Fakulteti za farmacijo in stroka medicinske biokemije, organizirana v mrežo zdravstvenih laboratorijev institucijaliziranih na treh nivojih zdravstvene dejavnosti, ima s tem že desetletne izkušnje. Zato je prav, da to našo družbeno odgovornost na področju medicinske biokemije poudarimo in okrepimo.*

*Znanost ustvarja novo znanje, ki se lahko uporabi pri nadaljnjem razmišljanju ali v vsakdanjem življenju. Razvoj, napredovanje neke discipline je zagotovo odvisen od temeljitega, izčrpnega in natančnega raziskovanja, brez predsodkov in etično utemeljenega. Znanost, ki ne dela za stroko, je samó sama sebi namen in stroka brez znanosti zelo hitro postane samó še obrt. Stroka torej nujno potrebuje znanost (mislím na medicinsko biokemijo), pri tem pa je zanimivo, da znanost preneha biti znanost, ko se uporabi (aplicira) v stroki. Kaj daje znanost stroki danes? Bliskovit napredek translacijske medicí*

ne (pri tem mislim na razvoj omik) danes "kar bruha" potencialne nove biološke označevalce. Pri mnogih novih bioloških označevalcih pravzaprav sploh še ne poznamo njihove prave vloge v etiologiji in patofiziologiji bolezni. Njihovo potencialno uporabnost v vsakdanji klinični praksi je potrebno še preveriti, kar za stroko pomeni zelo veliko dela. Ker živimo v času samooklicane z dokazi podprte medicine, je sposobnost kritičnega razmišljanja ter proučevanja in vrednotenja znanstvene literature nujna kompetenca vsakega zdravstvenega delavca. Znanstveno delo omogoča pridobivanje kompetenc povezanih z kritičnim razmišljanjem, pregledovanjem in interpretacijo literature, načrtovanjem študij, tolmačenjem in objavljanjem podatkov ter novih dognanj, pomembno krepi zavedanje o nujnosti multidisciplinarnih skupin znanstvenikov in strokovnjakov iz prakse za doseganje novega znanja in komunikacije med njimi, pomembno pa krepi tudi zavedanje po nujnosti vseživljenjskega učenja in usposabljanja.

Želim zaključiti s sporočilom, da je za prihodnji obstoj in nadaljnji razvoj slovenske medicinske biokemije nujna popularizacija in širitev znanosti na širši krog specialistov medicinske biokemije. K realizaciji tega cilja želijo prispevati tudi Jesenovčevi dnevi, katerih namen je izboljšati slišnost in prepoznavnost raziskovanja na področju medicinske biokemije. Prvi del letošnjih Jesenovčevih dnevov je posvečen predstavitvi novih označevalcev na področju personalizirane medicine rakavih bolezni krvotvornih celic. S temi boleznimi se vsako leto pri nas na novo sooči čez 1000 oseb, odraslih in vedno več otrok, zato njihovo raziskovanje predstavlja neizčrpen znanstveni izziv. Drugi del Jesenovčevih dnevov je posvečen predstavitvi novosti v nacionalnem presejanju vrojenih bolezni presnove. S temi boleznimi se vsako leto pri nas sooči osem živorojenih otrok. Mnoge od njih lahko zdravimo, zato je njihovo proučevanje smiselno in prav tako predstavlja neizčrpen znanstveni izziv. Zadnji, tretji del Jesenovčevih dnevov pa je namenjen predstavitvi možnih oblik organizacije raziskovalne dejavnosti v konsolidirani laboratorijski službi, s katero se vsi danes neizbežno srečujemo. Pri tem dajemo poudarek na celostni, integrirani in konsolidirani dejavnosti medicinske biokemije znotraj laboratorijske medicine, tako v strokovnem kot organizacijskem smislu. Le tako povezana, visoko strokovna in organizacijsko učinkovita stroka lahko predstavlja realno dodano vrednost na znanstveni podlagi. Pri vseh teh procesih strokovne, vsebinske in organizacijske funkcionalne integracije in konsolidacije v laboratorijski medicini, ki se intenzivirajo v svetu v zadnjih letih, pa je morda najvažnejša konsolidacija kadrov, ki te procese ustvarjajo in izvajajo v korist preiskovancev oz. bolnikov. Samo procesi orientirani na preiskovance lahko zagotavljajo smiselnost naše pomembne dejavnosti. Za primerljivost s svetovnimi trendi tudi v Sloveniji

potrebujemo nacionalno strategijo razvoja laboratorijske medicine, na podlagi katere bomo lahko zagotavljali politike za kadre, izobraževanje, znanstveno dejavnost in za konkretno izvajanje laboratorijske diagnostike v vsakdanji praksi.



# *Tarčne molekule, tarčne učinkovine in njihovi potencialni označevalci v hematologiji*

---

**Tailored therapeutic approaches in CLL: Is it only about genetics?**

*Panagiotis Baliakas*

**Standardizacija metode kvantitativne PCR za spremljanje zdravljenja bolnikov s kronično mieloično levkemijo**

*Tadej Pajč*

**Nepričakovane metabolne poti tarčnega zdravila As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pri bolnikih z akutno promielocitno levkemijo**

*Ingrid Falnoga*

**Ex-vivo vrednotenje zdravilnih učinkovin**

*Katarina Reberšek*

## Tailored therapeutic approaches in CLL: is it only about genetics?

**Panagiotis Baliakas, MD, PhD**

Dept of Laboratory Medicine, Division of Clinical Pharmacology, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

### Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the prototype of the disease where the biological complexity is mirrored in a remarkable clinical heterogeneity. Several efforts have been launched in order to identify groups of patients with distinct clinical behavior and response to specific agents. Similarly to other hematological malignancies the genomic landscape of the clone is considered crucial regarding the therapeutic choice. For many years the therapy algorithm of CLL is guided by the presence of aberrations within the TP53 gene [TP53abs, either deletions (del(17p)) or mutations]. Recently, novel mutations in recurrently mutated genes such as NOTCH1, have displayed in the context of clinical trials their potential predictive significance. More interestingly specific genetic aberrations such as deletion of the p arm of chromosome 8 [del(8p)] have been associated with unfavorable outcome with the advent of novel agents such as B-cell receptor (BcR) signaling inhibitors, whereas mutations at the drug's binding site or downstream of the targeted kinase have been linked to refractoriness.

One the caveats of building a therapeutic algorithm based exclusively on the genomic background is the underestimation of clonal evolution as well as technical limitations related to the sensitivity of each method. For example a number of reports have highlighted the clinical significance of small TP53 clones which can only be detected with the advent of high throughput sequencing. The somatic hypermutation (SHM) status of the immunoglobulin heavy variable (IGHV) gene expressed by the clonotypic BcR is present at the genesis of the clone and remains stable through the history of the disease. Based on the SHM status, CLL is classified into two categories each exhibiting different clinical behavior. More specifically, CLL with a significant SHM load ("mutated" CLL,

M-CLL) generally follow an indolent clinical course, whereas CLL carrying no or few mutations ("unmutated" CLL, U-CLL) generally have an aggressive disease. Moreover, recent studies have shown a strong correlation between IGHV SHM status and the response to immunochemotherapy, with U-CLL cases having a higher likelihood for early progression and resistance. With the use of novel agents namely BcR signaling inhibitors, M-CLL exhibits prolonged lymphocytosis compared to U-CLL whereas according to recent reports M-CLL may exhibit also a specific spectrum of adverse events.

CLL is a disease of mature B cells where a large number of interacting genetic events (cell-intrinsic aberrations) and microenvironmental stimuli (cell-extrinsic triggers) have been implicated in disease ontogeny and evolution. This interplay is extremely variable being translated to high clinicobiological heterogeneity. In order to overcome this remarkable heterogeneity tailored therapeutic approaches based on both the genetic and immunogenetic features of the clone are mandatory.

## Nepričakovane metabolne poti tarčnega zdravila AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

/ Unexpected metabolic pathways of AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> /

doc. dr. Falnoga Ingrid<sup>1</sup>, izr.prof. dr. Helena Podgornik<sup>2</sup>, prof. dr. Peter Černelč<sup>2</sup>, doc. dr. Zdenka Šlejkovec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Odsek za znanosti o okolju, Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

### Povzetek

Članek povzema osnovne zaključke kliničnega in eksperimentalnega spremljanja metabolizma arzenovega trioksida pri zdravljenju akutne promielocitne levkemije in plazmocitoma z arzenovim trioksidom na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani od leta 2003 do 2016. Zaradi hitre presnove arzenovega trioksida (As<sup>III</sup> v raztopini) v manj aktivne metilirane spojine ter nepredvidljivega vpliva številnih dejavnikov na hitrost presnove ter na izločanje zdravila, smo pretvorbe arzena proučevali eksperimentalno (celice kostnega mozga bolnikov s plazmocitomom; glioblastomske celične linije) ter pri bolnikih, z merjenjem arzenovih spojin v urinu med terapijo.

Izsledki so pokazali i) individualno variabilnost, spremenljivost in nepredvidljivost presnove pri bolnikih, ii) interakcije arzenovega trioksida z endogenim selenom (znižanje plazemskega selena in genskega izražanja posameznih selenoproteinov med terapijo) ter iii) možnost neugodnega vpliva sočasnega odmerjanja kortikosteroidov in/ali vitamina C.

**Ključne besede:** arzenov trioksid, arzenovi metaboliti, akutna promielocitna levkemija, plazmocitom, selen

### Abstract

Article is summarizing basic conclusions related to clinical and experimental study of arsenic trioxide metabolism at acute promyelocytic leukemia and multiple myeloma patients treated by arsenic trioxide at University medical Centre Ljubljana between 2003 and 2016. Biotransformation of arsenic trioxide to various arsenic compounds (arsenite, arsenate, monomethyl arsenic acid, dimethylarsenic acid) was studied in experiments with cancer cell lines or isolated bone marrow cells of multiple myeloma patients and at patients where urine arsenic metabolites were measured during treatment. Results pointed out: i) unpredictable individual variability of arsenic biotransformation, ii) interactions of arsenic with endogenous selenium (As triggered selenium decrease in plasma during treatment and gene suppression of some selenoproteins), and iii) possibility that simultaneous co-treatment with corticosteroids and/or ascorbic acid can have unfavorable influence on arsenic treatment.

**Key words:** arsenic trioxide, arsenic compounds, acute promyelocytic leukemia, multiple myeloma, selenium

### 1. Arzenov trioksid (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; ATO; Trisenox®; AsIII kot aktivna oblika)

Kljub njegovi znani toksičnosti se arzenov trioksid uporablja v tradicionalni kitajski medicini (TKM) že tisočletja za zdravljenje različnih bolezni. Njegova antilevkemična aktivnost je bila prvič zabeležena proti koncu devetnajstega stoletja v Bostonski mestni bolnišnici (1). V začetku sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so na Kitajskem pričeli z arzenovim trioksidom zdraviti akutno promielocitno levkemijo (APL) in v devetdesetih je šanghajska skupina raziskovalcev objavila tehtne rezultate o njegovi učinkovitosti in nizki toksičnosti pri zdravljenju te rakave bolezni levkocitov. Podobne študije so potem izvedli v Evropi in Združenih državah Amerike (ZDA) in leta 2000 je bil arzenov trioksid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ATO, Trisenox®) potrjen kot uradno zdravilo za APL pri bolnikih, ki se jim bolezen ponovi in/ali pri bolnikih, pri katerih zdravilo prve izbire (ATRA - alfa trans-retinoična kislina + kemoterapevtik) nima želenega učinka (2). Najprej so ga potrdili v ZDA (FDA, leta 2000) in nekoliko kasneje v Evropi (EMA, leta 2002). Zadnje študije potrjujejo, da je varen in učinkovit tudi kot zdravilo prve

izbire, sam ali v kombinaciji z retinoično kislino (2). Leta 2016 ga je Evropska komisija potrdila kot možno zdravilo prve izbire pri bolnikih z APL z nizkim ali srednjim tveganjem (število levkocitov  $< 10 \cdot 10^9/L$ ) (3). V kliničnih študijah se poskusno uporablja tudi za zdravljenje nekaterih drugih rakavih bolezni vključno s plazmocitomom. Registrirano zdravilo je v obliki raztopine za *iv* infuzijo, raziskovanje varne učinkovitosti oralne oblike arzenovega trioksida in nekaterih drugih spojin pa poteka.

## 2. APL in njeno zdravljenje

APL je bila prvič opisana leta 1957 in bila dolgo povezana s hitro in zelo visoko smrtnostjo. Gre za poseben podtip akutne mieloblastne levkemije, za katero je – pri večini bolnikov (98%) - značilna uravnotežena recipročna translokacija delov kromosomov 15 in 17. Tako nastane hibridni zliti gen *PML-RARA* s spremenjenimi lastnostmi, ki je začetni vzrok blokade diferenciacije mieloidne vrste, ki ji sledi kopičenja promielocitov (4, 5). Leta 1973 so bolezen začeli zdraviti z antraciklini, kasneje pa zelo uspešno z retinoično kislino (provitamin A) v kombinaciji s kemoterapevtikom ter od leta 2000 v posebnih primerih (glej zgoraj) tudi z arzenovim trioksidom. Oba, ATRA in ATO, predstavljata tarčno terapijo in sta klinično zelo uspešna tudi v kombinaciji, ker delujeta sinergistično na razbitje hibridne beljakovine in tako omogočita diferenciacijo celic. ATRA se veže in učinkuje na RARA (alfa-receptor retinoične kisline), arzenov trioksid pa na tiolne skupine PML hibridnega levkemičnega proteina. ATO ima poleg delnega diferenciacijskega učinka v nižjem koncentracijskem območju (0.25-0.5 mmol/L v polni krvi) tudi citotoksičen učinek pri višjih koncentracijah (0.5-2 mmol/L v polni krvi) (4). Zato pri uporabi arzenovega trioksida ni potrebno dodajati kemoterapevtika kot pri ATRI.

Trivalentni arzen ( $As^{III}$ , arzenit), ki predstavlja aktivno spojino raztopljenega arzenovega trioksida v infuzijski raztopini, je strupen ali terapevtsko učinkovit predvsem zaradi delovanja na tiolne (-SH) in selenolne (-SeH) skupine številnih vitalnih celičnih komponent (6, 7). Poleg tarčnega učinkovanja na PML-RARA, deluje zaviralno na več mestih tioredoksinkega in glutationskega sistema in tako preko oksidativnega stresa ter motene redoks regulacije sproži regulirano celično smrt (apoptozo). Glede na celične eksperimente so celice APL precej bolj občutljive na arzenov trioksid kot zdrave celice

ker imajo nizko vsebnost antioksidantov (glutation peroksidaze, katalaze, reduciranega glutaciona) in hkrati nizko vsebnost encima glutation-S-transferaze, ki je odgovoren za izločanje arzena ter povišano izražanje akvaporina-9, ki je pomemben za celični privzem  $As^{III}$  (6).

## 3. Presnova arzenovega trioksida

Na učinkovitost in/ali stranske učinke arzenovega trioksida vpliva predvsem njegova presnova v organizmu. Biološko aktivna oblika arzenovega trioksida, anorganski arzen v njegovi trivalentni obliki ( $As^{III}$  ali arzenit), se pretvori v manj aktivne metabolite že v prvih urah po infuziji: anorganski  $As^V$  (arzenat) in petvalentni organski spojini - MMA (monometil arzenonska kislina) in DMA (dimetilarzinska kislina). Tvorijo se tudi bolj aktivni trivalentni metaboliti,  $MMA^{III}$  in  $DMA^{III}$ , vendar so to kratkoživi intermediati, ki jih v kliničnih vzorcih zaradi njihove kratkoživosti analitsko skoraj ne zasledimo (8). Presnova poteka z oksidoreduktivnimi procesi, dodajanjem metilne skupine S-adenozilmetionina (SAM) ob pomoči metiltransferaz in glutaciona (GSH) ali drugih tiolnih, lahko tudi selenolnih spojin, ki služijo kot reducenti. Metilacija poteka predvsem v jetrih, vendar tudi v drugih organih in celicah. Vse petvalentne oblike so manj učinkovite, slabše prehajajo v celice in se hitro izločajo z urinom, trivalentni intermediati pa ne učinkujejo na PML-RARA, ampak le na celično smrt (celične študije) (6). Zadostna količina arzenita je zato osnovnega pomena za terapevtski učinek arzenovega trioksida pri zdravljenju APL.

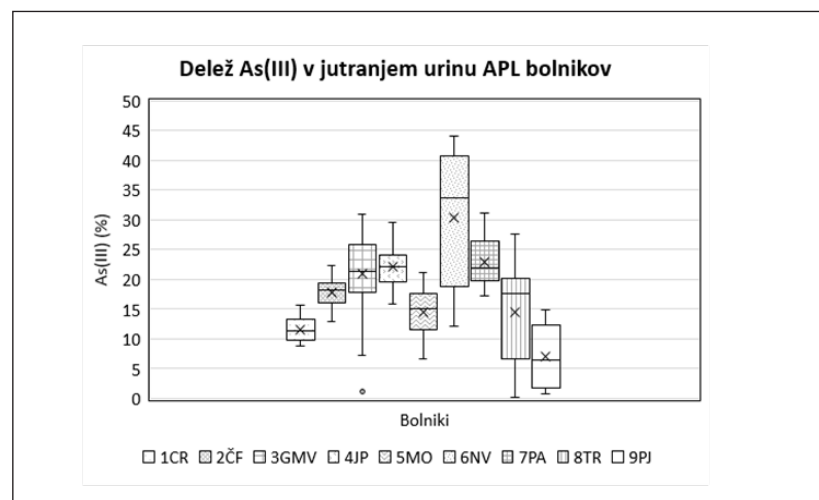
Večina arzena ( $As^{III}$ ,  $As^V$ , DMA in MMA) se izloči z urinom, del pa skupaj s selenom tudi z blatom. Medsebojno antagonistično delovanje arzena in selena ter skupno izločanje je znano že dolgo (9, 10). Eksperimentalno so v žolču živali in v humanem lizatu eritrocitov identificirali kompleks arzena, selena in glutaciona,  $(GS)_2AsSe$  (11). Selen je esencialen element, ki je v obliki selenocisteina (21 beljakovinska aminokislina) sestavni del številnih selenobeljakovinskih encimov pomembnih za normalno delovanje antioksidativnega sistema in ščitničnih hormonov (12, 13). Znan je tudi po splošni zaščitni vlogi pri zastrupitvi s kovinami; delno zaradi tega, ker v obliki selenida lahko tvori z več kovinami biološko neaktivne komplekse (14) in delno zaradi antioksidativnega delovanja selenobeljakovin.



#### 4. Označevalci hitrosti presnove, terapevtske učinkovitosti in sistemske strupenosti arzenovega trioksida

Klasično indukcijsko terapijo pri APL bolnikih predstavljajo dnevne intravenske infuzije (2 h) raztopine arzenovega trioksida (0.15 mg/kg telesne teže) do 60 dni, odvisno od časa remisije. Pri taki terapiji je povprečni dnevni delež osnovnih rezidualnih spojin arzena v jutranjem predinfuzijskem urinu večinoma predvidljiv: 15-25% As<sup>III</sup>, 25-30% MMA in 35-55% DMA; vendar so presenečenja neizogibna (15). Biometilacija je najbolj, če ne izključno, povezana z ekspresijo metiltransferaz, predvsem As(III)-S-adenozilmetiltransferaze (As<sub>3</sub>MT), njena ekspresija in aktivnost pa je lahko povezana s številnimi dejavniki. Nanjo lahko vplivajo debelost, različna zdravila, ki jih bolniki dobivajo zaradi pridruženih težav ali bolezni in ne nazadnje genska variabilnost. Vse to lahko v različnih stopnjah vpliva na hitrost presnove arzenita oziroma na razmerje metabolitov v urinu posameznika ter posledično na učinkovitost in stranske učinke zdravila ter na rezistenco. Pomembno vlogo ima tudi sistemski ali lokalni antioksidativni ali oksidoreduktivni status bolnika, na katerega lahko vplivajo zdravila in bolezenska stanja (vnetostne reakcije). Sistemski oksidativni stres lahko povzroči oksidacijo biološko aktivnega As<sup>III</sup> v neaktiven As<sup>V</sup>, neaktivnost metiltransferaz(e) pa toksičnost zdravila pri enakem dnevnem odmerku. Na sliki 1 je prikazan povprečni rezidualni delež (%) aktivne oblike arzena (As<sup>III</sup>) v jutranjem urinu devetih bolnikov z APL med petim in zadnjim dnem zdravljenja z arzenovim trioksidom (faza indukcije) na kliničnem oddelku za hematologijo (KOH) Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (UKC Lj), med leti 2003 in 2016. Zajeto je različno število vzorcev na posameznika, prvi dnevi pa so izključeni, ker je to čas pred uravnotežnim koncentracijskih vrednosti. Protokol zdravljenja in jemanja vzorcev ter metodološko-analizni opis določanja arzenovih spojin, ki so se merile na Odseku za znanosti o okolju na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani in za trivalentne metilirane spojine preverjale na Karl-Franzens Univerzi v Gradcu (Avstrija), je podan v članku Šlejkovec in soavtorji (15). Dodan je bolnik 9, ki je bil zaradi ledvične okvare na dializi ter zdravljen s polovičnim odmerkom arzenovega trioksida. Vsi razen zadnjega so ob zaključku zdravljenja dosegli stabilno molekularno remisijo, ki je bila redno kontrolirana 5 let po zdravljenju. Pri šestih bolnikih (2,3,4,5,7 in 8) so bili deleži As<sup>III</sup> v pričakovanem območju, 15 – 25%. Izstopali pa so trije bolniki (1, 6 in 8). Bolnica 1 je presnavljala arzen izjemno hitro, podobno kot ljudje izpostavljeni okoljsko povišanim vrednostim arzena v pitni vodi. Povprečen delež aktivne učinkovine je bil

nizek (12%), pod pričakovano najnižjo vrednostjo (15%), vendar to ni bistveno vplivalo na remisijo. Zaradi visoke telesne teže (BMI indeks 46.4 kg/m<sup>2</sup>) smo učinkovitost metilacije pripisali povečani aktivnosti jetrnih encimov, med katere spada tudi metiltransferaza AsIII<sup>MT</sup>. Še nižje so bile vrednosti pri bolniku 9 (8%), ki je prejemal polovičen dnevni odmerek in imel tudi za polovico nižji delež pričakovane najnižje vrednosti in samo zaustavljeno stanje bolezni. Zaradi nedoseganja terapevtskih vrednosti celokupnega arzena v krvi so pri tem bolniku zdravljenje zamenjali z drugim zdravilom. V nasprotju s tema dvema primeroma je primer bolnice 6 z najvišjim povprečnim deležem As<sup>III</sup> (30%) in najvišjo dnevno vrednostjo 44%. Zaradi slabe - in med terapijo nihajoče - metilacije, ter posledično višje izpostavljenosti arzenitu (As<sup>III</sup>), so se pri bolnici po dvajsetih dnevih pokazali nevrološki simptomi (tremor) in po osemindvajsetih dneh so ji terapijo z arzenovim trioksidom ukiniteli. V literaturi obstajajo tudi podatki o možni toksičnosti povečanega deleža MMA, kadar se metilacija MMA v DMA zniža. Kljub temu, da so bili deleži MMA in DMA pri naših bolnikih variabilni, njihovega vpliva na učinkovanje ali stranske učinke nismo opazili. Najvišji povprečni delež MMA je imela bolnica 5, vendar je pri njej zdravljenje potekalo brez posebnosti (15). Zanimiv je bil tudi primer bolnice 8, pri kateri smo v urinih takoj po iv infuziji izmerili nenavadno visoke deleže As<sup>V</sup> in nizke deleže osnovne učinkovine, As<sup>III</sup>. As<sup>V</sup> je skoraj popolnoma nadomestil As<sup>III</sup> (15). V jutranjih urinih je bilo razmerje obeh obrnjeno in povprečni delež As<sup>III</sup> v pričakovanem območju. Bolnica je imela višje vrednosti As<sup>V</sup> tudi v serumu (Šlejkovec in Falnoga, neobjavljeni podatki). Posredno smo sklepali na prisotnost endo- ali eksogenih reducentov v krvi in/ali urinu, kar je lahko povzročilo pretvorbo As<sup>III</sup> v As<sup>V</sup>. Ti primeri potrjujejo literaturne predpostavke, da so presnovne poti arzenovega trioksida lahko nepredvidljive in izražajo potrebo po individualnem pristopu s spremljanjem metabolitov v prvih dveh tednih, kar lahko omogoči pravočasno spremembo odmerkov v izogib stranskim učinkom in normalno izvajanje terapije do konca. Najbolj pomemben signal za možne toksične učinke je prisotnost povišanega deleža As<sup>III</sup> v urinu skupaj z nizkim deležem metiliranih spojin.



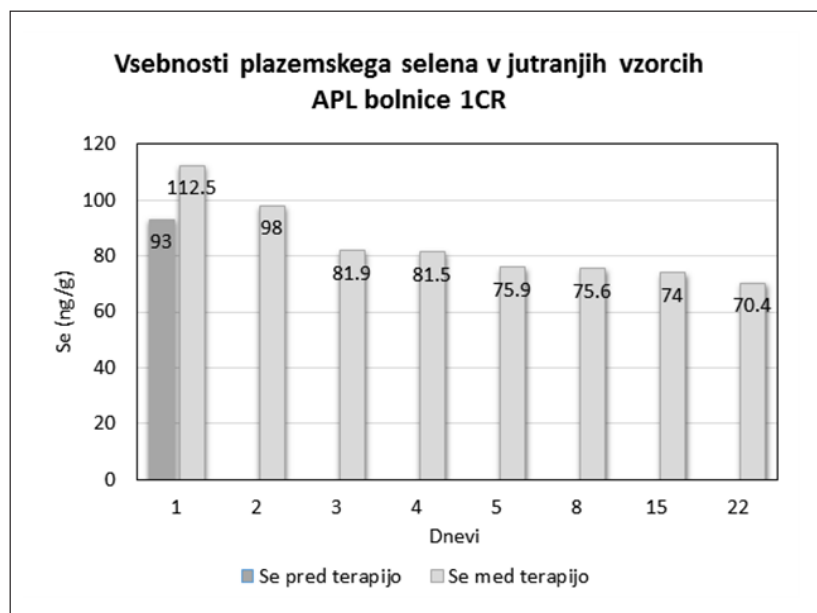
**Slika 1.** Delež celokupnega arzena v obliki AsIII v jutranjih urinih devetih bolnikov z APL med 5. in 50. dnevom zdravljenja.

**Figure 1.** Proportion of total arsenic in AsIII form in nine APL patients morning urines monitored between 5th and 50th day of treatment.

V kliničnih študijah z arzenovim trioksidom zdravijo tudi druge vrste raka, kot je plazmacitom. Pri plazmocitomu je režim odmerkov drugačen, odmerki so sicer višji (0.25 mg/kg), vendar odmerjanje ni kontinuirano, hkrati so dodana še druga zdravila. Znotraj istega obdobja kot zgoraj omenjene bolnike z APL, so na KOH UKC Lj z arzenovim trioksidom zdravili tudi 12 bolnikov s plazmocitomu. Zdravili so jih po dveh različnih shemah: MAC, kjer sta arzenovemu trioksidu dodana melfalan (0.1 mg/g) in askorbinska kislina (1 g) ter DAC z arzenovim trioksidom, askorbinsko kislino (1 g) in deksametazonom (40 mg/kg). Arzenov trioksid z askorbinsko kislino so dobivali štiri zaporedne dni vsake štiri tedne in v vmesnem obdobju dvakrat na teden, melfalan ali dexametazon pa dnevno. Pozitivni rezultati zdravljenja so bili delni (omejeni na bolnike zdravljenega po shemi MAC) (16). Podobno slabe in spremenljive odzive so dobivali tudi pri kliničnih študijah drugje (17). Težav je več. Ti bolniki so v vseh študijah praviloma v veliko slabšem splošnem stanju kot bolniki z APL. Gre za bolnike s ponovljeno boleznijo, ki imajo za sabo že več terapij z drugimi zdravili. Nedvomno tudi ni moč izključiti neugodnega načina odmerjanja in možnega negativnega součinka kombinacije zdravil

pri obeh shemah. Glede na celične študije so plazmocitomske celice manj občutljive za toksične učinke arzenovega trioksida kot celice APL, torej je treba pri terapiji doseči višje plazemske oziroma krvne koncentracije, predvsem arzenita. Pri vseh dvanajstih bolnikih s plazmocitomu smo podobno kot pri bolnikih z APL spremljali arzen v krvi in arzenove spojine ( $As^{III}$ ,  $As^V$ , MMA in DMA) v urinu (8, 16). Pri bolnikih s plazmocitomu so bile jutranje (torej rezidualne) koncentracije plazemskega celokupnega arzena dvakrat nižje kot pri bolnikih z APL. Prav tako so bili nižji tudi povprečni deleži  $As^{III}$  v urinu. Povprečne vrednosti vseh meritev pri vseh bolnikih posamezne skupine so dale vrednosti za plazemski As: 72.3 ( $\pm 16.8$ ) ng/g pri skupini APL in 45.1 ( $\pm 7.0$ ) ng/g pri skupini plazmocitomu; ter za delež  $As^{III}$  v urinu 17.5 ( $\pm 7$ ) % pri APL in 8.6 ( $\pm 4$ ) % pri plazmocitomu. Ti podatki govorijo o neustreznosti odmerjanja arzenovega trioksida. Vprašljiva je tudi souporaba askorbinske kisline, ki ob sočasnem odmerjanju lahko povzroči oksidacijo  $As^{III}$  v  $As^V$  (18, 19) in s tem povečano izločanje arzena. Negativni učinek na vsebnost arzena ima lahko tudi deksametazon. Odziv bolnikov s plazmocitomu zdravljenih po shemi DAC je bil slabši kot pri zdravljenih po shemi MAC. Kortikosteroidi lahko vplivajo na prerazporeditev in/ali izločanje selena (20) in s tem tudi na izločanje arzena. Da se izločata skupaj, potrjujejo tudi meritve vsebnosti selena v serumu bolnikov obeh skupin, (21, 22); pri vseh bolnikih so bile vrednosti selena ob koncu terapije bistveno nižje kot na začetku. Ob tem je pomembno, da so imeli bolniki s plazmocitomu na začetku in na koncu terapije precej nižje vrednosti selena kot bolniki z APL. Končne koncentracije selena pri bolnikih s plazmocitomu (20-35 ng/ml) so bile v območju pomanjkanja selena, ki se ob splošnem slabem stanju povezuje s kompromitiranim imunskim sistemom in antioksidativnim statusom ter zato s povečanim tveganjem za okužbe in druge pridružene bolezni (12, 13). Začetna povprečna vrednost skupine APL je bila 88.4 ( $\pm 18.0$ ) ng/g, kar je znotraj območja vrednosti splošne populacije, vrednost skupine plazmocitomu pa 54.6 ( $\pm 19.0$ ) ng/g. Individualni primer postopnega nižanja plazemskih koncentracij selena v prvih treh tednih zdravljenja z arzenovim trioksidom je prikazan na Sliki 2. Podane so vrednosti za bolnico 1CR z APL, ki je najhitreje presnavljala arzen in imela plazemsko koncentracijo selena pred začetkom terapije v območju povprečnih vrednosti za zdravo slovensko populacijo. Pri tej isti bolnici smo antioksidativne in/ali redoks selenobeljakovine spremljali tudi na ravni genskega izražanja preko mRNA (23). Ob koncu terapije so bile vrednosti izražanja značilno nižje za vse testirane glutationperoksidaze ( $GPX1,3$  in 4), ki so antioksidativni encimi, dve tioredoksin reduktazi ( $TXNRD1$  in 2), ki sta velikokrat zvišani v rakastih

celicah in predstavljata eno izmed tarčnih mest za arzenov trioksid (7) ter za selenoprotein P, ki ima poleg antioksidativne osnovno vlogo pri prenosu selena iz jeter v ostale organe (24), prav tako pa ga povezujejo s prenosom in izločanjem kovin (14).



Slika 2. Vsebnosti selena v jutranjih vzorcih plazme bolnice z APL 1CR.  
Figure 2. Selenium levels in morning plasma samples of APL patient 1CR.

## 5. Sklep

Individualna hitrost metilacije, (splošni) antioksidativni in oksidoreduktivni status, status selena in pridružena zdravila predstavljajo nekaj izmed številnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na presnovne (metabolne) oksidoreduktivne poti arzenovega trioksida pri vsakem bolniku, ki ga zdravimo z arzenovim trioksidom. Zato je v izogib zapletom zaradi stranskih učinkov primerno spremljati arzenove spojine – AsIII, AsV, MMA in DMA predvsem v začetku

zdravljenja, ko se vzpostavlja presnavljanje. Najbolj kritičen je previsok delež AsIII, ki ga lahko znižamo s prilagajanjem dnevnega odmerka učinkovine. Ker arzenov trioksid vstopa tudi v interakcije z esencialnim selenom, ki je preko selenoproteinov tesno vpet v celični antioksidativni in redoks sistem, je poleg ostalih serumskih elementov, pomembno pred terapijo in po njej ter ob zapletih in /ali sočasni terapiji s kortikosteroidi spremljati tudi selen.

## Literatura

1. Antman KH. Introduction: The history of arsenic trioxide in Cancer Therapy. *The Oncologist* 2001; 6 (suppl 2): 1-2.
2. McCulloch D, Brown C, Iland H. Retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: current perspective. *OncoTargets and Therapy* 2017; 10: 1585-1601.
3. Dennis-Beron S. Interview. Trisenox: a paradigm shift in APL therapy, an interview with Francesco Lo-Coco. *Int Hematol Oncol* 2016; 5(3): 101-104.
4. Alimoghaddam K. A review of arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia. *IJHOSCR* 2014; 8(3).
5. Lo-Coco F, Hasan SK. Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best practice Res Clin Hematol* 2014; 27: 3-9.
6. Khairul I, Wang QQ, Jiang YH, Wang C, Naranmandura H. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotargets* 2017; 8(14): 23905-23926.
7. Lu J, Chew E-H, Holmgren A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide PNAS 2007; 104 (30): 12289-12293.
8. Šlejkovec Z, Falnoga I, Van Elteren JT, Goessler W, Raml R, Podgornik H, Černelč P. Analytical artefacts in the speciation of arsenic in clinical samples. *Anal Chim Acta* 2008; 607: 83-91.
9. Zeng H, Uthus EO, Combs GF: Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic. *J Inorg Biochem.* 2005; 99: 1269-1274.
10. George CM, Gamble M, Slavkovich V, et al. A Cross-sectional Study of the Impact of Blood Selenium on Blood and Urinary Arsenic Concentrations in Bangladesh. *Environmental Health* 2013; 12: 52.
11. Gailer J: Chronic toxicity of as (III) in mammals: the role of (GS)(2)AsSe (-). *Biochimie* 2009; 91: 1268-1272.
12. Rayman MP: The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000; 356: 233-241.
13. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet* 2012; 379: 1256-68.
14. Sasakura C, Suzuki KT. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J Inorg Biochem* 1998; 71(3-4): 159-62.
15. Šlejkovec Z, Podgornik H, Černelč P, Falnoga I. Exceptions in patterns of arsenic compounds in urine of acute promyelocytic leukemia patients treated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Biometals* 2016; 29:107-118.
16. Podgornik H, Šlejkovec Z, Zver S, et al. ATO metabolites in APL and MM patients.

- ATO metabolites in APL and MM patients treated according to APL and MAC/DAC schemes. V: Proceedings and exposition, 56th Annual meeting of American Society of Hematology, ASH 2014, Blood 124 (21): 921.
17. He X, Yang K, Chen P, et al. Arsenic trioxide-based therapy in relapsed/refractory multiple myeloma patients: a meta-analysis and systematic review. *OncoTargets Therapy* 2014; 7: 1593-1599.
  18. Zelenik Pevec A, Šlejkovec Z, Van Elteren JT, Falnoga, I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oxidation by vitamin C: cell culture studies. *Biometals* 2012; 26(1): 103-113.
  19. Falnoga I, Šlejkovec Z, Pucer A, et al. Arsenic metabolism in multiple myeloma and astrocytoma cells. *Biol Trace Elem Res* 2007; 116: 5-28.
  20. Peretz AM, Neve JD, Famaey JPP. Selenium in rheumatoid disease. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20 (5): 305-316.
  21. Pernat P. Vpliv arzenovega trioksida na metabolizem selena = Effect of arsenic trioxide on selenium metabolism: diplomska naloga, (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Visokošolski študij laboratorijske biomedicine, 209/2005). Ljubljana: [Pernat, P.], 2005. 55 f., tabele
  22. Falnoga I, Mazej D, Podgornik H, et al. Critical selenium levels in APL and MM patients during ATO-treatment (according to APL and MAC/DAC schemes). V: Proceedings and exposition, 56th Annual meeting of American Society of Hematology, ASH 2014, Blood 2014, iss. 21, vol. 124, 5 str.
  23. Falnoga I, Šlejkovec Z, Stajnko A, et al. TRXR1 and TRXR2 gene expression in arsenic trioxide treated APL patient (case study). V: Abstracts, oral talks and posters, f 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, Berlin, Sept. 14-18. 2013. Berlin: Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2013, str. 92.
  24. Burk RF, Hill C. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu Rev Nutr* 2016; 35:109-134.



## Ex-vivo določanje občutljivosti celic na zdravilne učinkovine

/ Ex-vivo evaluation of cell sensitivity to active ingredients /

dr. Katarina Reberšek, prof. dr. Peter Černelč, izr.prof. dr. Helena Podgornik

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

### Povzetek

Boljše razumevanje patogeneze in razvoj novih terapevtskih pristopov sta pripomogla k daljšemu preživetju bolnikov s krvnimi rakavimi boleznimi. Kljub temu napredku in presaditvi krvotvornih matičnih celic nekateri bolniki doživijo pogoste ponovitve bolezni. Ob postavitvi diagnoze kot tudi ob ponovitvi bolezni tako trenutno razpolagamo z določenim naborom zdravilnih učinkovin. Ob tem se pojavi problem izbire najučinkovitejše kombinacije zdravilnih učinkovin za posameznega bolnika in rezistence na zdravljenje. V Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, določamo občutljivost celic bolnikov s krvnimi rakavimi boleznimi na različne učinkovine ex-vivo preko analize preživetja celic, ki jih gojimo v prisotnosti različnih zdravilnih učinkovin. Pridobljeni podatki bodo služili izbiri najbolj ustrezne terapije.

**Ključne besede:** akutne levkemije, kronična limfatična levkemija, plazmocitom, ex-vivo preskušanje učinkovitosti zdravljenja, personalizirana medicina

### Abstract

Survival of patients with haematologic malignancies has improved due to better understanding of diseases and new therapeutic approaches. Despite

these advances and hematopoietic stem cell transplantation patients often experience relapses. A range of active ingredients is available at diagnosis and at relapse, therefore, the appropriate therapeutic management of a given patient is difficult. Another problematic era in the treatment of patients with haematologic malignancies remains resistance to active ingredients. In Specialized Haematological laboratory, at the Department of Haematology, University Medical Centre Ljubljana (UMC Lj) ex-vivo evaluation of sensitivity of cells obtained from patients with haematologic malignancies to active ingredients was introduced in order to optimise treatment. The ex-vivo sensitivity is established through the system analysing the cell survival that are cultured in the presence of active ingredients.

**Key words:** Acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, myeloma, ex-vivo testing of drug efficiency, personalised medicine

### 1. Uvod

Trenutno je boljše razumevanje same patogeneze krvnih rakavih bolezni, razvoj novih zdravilnih učinkovin in razvoj novih terapevtskih pristopov, zlasti preko optimizacije shem zdravljenja ter prilagajanja intenzivnosti zdravljenja glede na izhodiščno tveganje in začetni odziv na zdravljenje, pripomoglo k daljšemu preživetju bolnikov s krvnimi rakavimi boleznimi. Kljub temu napredku in presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC) nekateri bolniki s krvnimi neoplazmami doživijo pogoste ponovitve bolezni, zato so nujno potrebni novi terapevtski pristopi. Dokler na tržišče ne bodo prišle nove zdravilne učinkovine, novi napovedni biomarkerji in ne bodo na voljo še novejši terapevtski pristopi, razpolagamo za določeno krvno rakavo bolezen z določenim naborom zdravilnih učinkovin tako ob postavitvi diagnoze kot tudi ob ponovitvi bolezni. Ob tem se pojavi problem izbire najučinkovitejše zdravilne učinkovine za posameznega bolnika. Poleg tega pa se srečujemo s problemom rezistence na zdravljenje tako že na začetku zdravljenja, še pogosteje pa ob ponovitvi bolezni. Ugotavljanje specifičnih genetskih sprememb sicer olajša ali celo narekuje izbiro, vendar pa je pri širšem naboru možnih terapij le-ta lahko bolj ali manj primerna. Enega od načinov optimizacije zdravljenja tako predstavlja ex-vivo določanje občutljivosti celic na zdravilne učinkovine, saj postane bolniku prilagojeno (precizna ali

personalizirana medicina– bolniku prilagojena medicina), in lahko služi kot pomoč pri načrtovanju ter sledenju zdravljenja (1, 2, 3).

## 2. Načini določanja učinkovitosti izbranih zdravilnih učinkovin

Poleg bolnikov in ksenografnih modelov tumorjev se za preučevanje celičnega odziva na zdravljenje uporablja celične kulture, ki zajemajo celične linije, primarne celične kulture, sferoide in organoide. Omenjene celične modele poskušajo nenehno optimizirati z namenom, da čim bolj posnemajo izvorni tumor in njegovo mikrookolje. Relativno pogost pristop določanja občutljivosti celic na zdravilne učinkovine je preko uporabe *in-vitro* preskusov, ki zaznajo skupek vseh učinkov na celice, in predstavljajo pomemben del bazičnih raziskav in programov odkrivanja potencialnih zdravilnih učinkovin. Uporabljamo jih tudi v kliniki, da se ugotovi občutljivost oziroma rezistenca tumorskih celic bolnika na zdravilne učinkovine. Primerjava podatkov rezultatov *in-vitro* preskušanj s kliničnimi podatki je pokazala 57–83 % napovedno točnost za občutljivost na zdravilne učinkovine in 90 % napovedno točnost za rezistenco na zdravilne učinkovine. Vendar je bilo zaenkrat izvedenih premalo prospektivnih randomiziranih preskušanj, ki bi preverile učinkovitost in koristi, da bi bilo lahko tako preskušanje vključeno v rutinsko klinično prakso, in je zaenkrat omejeno samo na klinična preskušanja.

Prvi preskusi določanja občutljivosti bolnikovih tumorskih celic so bili osnovani na različnih parametrih, kot so sposobnost tvorjenja kolonij, inhibicija rasti ali celična viabilnost. Med množico preskusov, ki zaznavajo procese, ki označujejo viabilnost celic, se pri določanju občutljivosti tumorskih celic na zdravilne učinkovine najpogosteje uporabljajo preskus MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), preskus FMC (FMC - »fluorometric microculture cytotoxicity assay«), preskus ATP-TCA (TCA - »tumor chemosensitivity assay«) in preskus SRB (SRB - »sulforhodamine B«). Omenjeni preskusi merijo citotoksičnost v obliki upada v metabolni aktivnosti (preskusa MTT in FMC), esencialnih biomolekul (preskus ATP-TCA) in celični masi (preskus SRB). Preskus SRB se med drugim tudi zaradi visoke zmogljivosti najpogosteje uporablja v bazičnih raziskavah in presejanju zdravilnih učinkovin s potencialno protitumorsko učinkovitostjo. Zaradi tega so se *in-vitro* rezultati tega preskusa le redko primerjali s kliničnimi podatki v nasprotju z ostalimi tremi preskusi. Poškodbe in popravljanje DNA se tudi uporabljata za določanje občutljivosti tumorskih celic na zdravilne učinkovine.

Širok spekter protitumorskih učinkovin namreč povzroči poškodbo DNA, ki nato vodi v celično smrt. Kvantitativne poškodbe DNA tako lahko korelirajo s kliničnim izidom pri bolnikih, ki jih zdravimo s protitumorskimi učinkovinami, katerih mehanizem delovanja temelji na poškodbi DNA. Poškodbo DNA lahko merimo z gelsko elektroforezo posamezne celice (preskusom komet), ki za izvedbo ne potrebuje celične delitve in ne zahteva veliko celic. Širok spekter protitumorskih učinkovin pa v celicah sproži proces apoptoze, programirane celične smrti, in sicer po intrinzični in/ali ekstrinzični poti. Obe poti spremljajo značilne morfološke spremembe, kot so skrčenje celice, fragmentacija jedra, kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA, na površini celice pa se pojavijo mehurčkasti izrastki. Večina teh sprememb nastane kot posledica proteolitične cepitve različnih znotrajceličnih peptidov preko kaspaz (družina cisteinskih proteaz). Na osnovi teh sprememb so razvili številne *in-vitro* preskuse za zaznavo apoptoze, in sicer preskus TUNEL (TUNEL – "TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling") za zaznavo fragmentacije DNA, preskus z aneksinom-V za zaznavo sprememb v celični membrani, preskuse, ki zaznajo aktivacijo kaspaz ter preskuse, ki zaznajo permeabilizacijo mitohondrijske membrane (2).

### 2.1 Določanje občutljivosti plazmocitomskih celic na arzenov trioksid

V predhodnih *ex-vivo* preskusih smo v Specializiranem hematološkem laboratoriju, Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana (KOH, UKC Lj), že določali občutljivost tumorskih celic (plazmocitomskih celic bolnikov s plazmocitomom) na arzenov trioksid (ATO), in sicer z uporabo *in-vitro* preskusa, ki zazna proces apoptoze. Uporabili smo za pretočno citometrijo izdelan reagenčni komplet z aneksinom-V, ki zazna fosfatidilserin na zunanji strani celične membrane. Ocenjevanje obsega apoptoze selektivno na plazmocitomskih celicah s pretočno citometrijo je oteženo zaradi različne infiltracije kostnega mozga (KM) s plazmocitomskimi celicami kot tudi zaradi kompleksnega matriksa in morfoloških sprememb, ki spremljajo proces apoptoze in posledično težav z zamejevanjem populacije. Prav zaradi vsega naštetega je bila večina raziskav izvedenih na celičnih linijah (4-10), mi pa smo razvili najprimernejši način ocenjevanja apoptoze z aneksinom-V na plazmocitomskih celicah. Eritrocite smo lizirali z raztopino amonijevega klorida, plazmocitomske celice prepoznali s kombinacijo protiteles, usmerjenih proti antigenoma CD38 in CD138 (11), apoptozo pa ocenjevali

selektivno na plazmocitomskih celicah preko zamejevanja populacije na osnovi njihovih imunoloških lastnosti (CD38/CD138-pozitivne celice) in po izključitvi celičnega debrija. Za primerljivost obsega apoptoze sprožene z induktorjem med različnimi bolniki smo vrednost le-te normalizirali glede na obseg apoptoze v kontroli istega bolnika. Ugotavljali smo, kakšen je učinek ATO na plazmocitomske celice (selektivnost) in tudi na druge hematopoetske celice (toksičnost) preko izračunanega razmerja med številom živih plazmocitomskih celic in številom živih drugih hematopoetskih celic. Glede na oceno časovnega optimuma določanja apoptoze smo pri 34-ih vzorcih kostnega mozga bolnikov ocenjevali obseg apoptoze po 24-urni inkubaciji z ATO. Pri manjši koncentraciji (2  $\mu$ M) ATO učinkovitega delovanja na plazmocitomske celice nismo dokazali. Neznačilno povečanje obsega apoptoze je bilo najverjetneje posledica odvisnosti obsega apoptoze od časa inkubacije z induktorjem in njegove koncentracije (12). V časovnih poskusih se je obseg apoptoze pri 2  $\mu$ M ATO povečal šele po 48-ih urah inkubacije, kar se sklada z literaturnimi podatki (13). Čeprav je toksičnost za druge hematopoetske celice bolj izrazita pri večji koncentraciji ATO (5  $\mu$ M), je njegovo delovanje selektivno za plazmocitomske celice, kar se sklada z literaturnimi podatki (14-16).

## 2.2 Določanje občutljivosti celic bolnikov s krvnimi neoplazmami na različne učinkovine

Poleg zgoraj opisanega načina določanja občutljivosti s pretočno citometrijo in določanjem apoptoze pri plazmocitomu določamo *ex-vivo* občutljivost celic bolnikov z različnimi krvnimi rakavimi boleznimi na različne učinkovine. Sistem, ki ga uporabljamo, določa občutljivost celic na zdravilne učinkovine preko analize preživetja celic, ki jih gojimo v prisotnosti zdravilnih učinkovin, ki so nanešene na dno mikrotitrne ploščice. Pridobljeni podatki so neposredno klinično uporabni pri izbiri najbolj ustrezne terapije. Prednost sistema je v tem, da je možno preskušati zelo širok nabor zdravilnih učinkovin v različnih koncentracijah ob zelo majhni količini vzorca, ki je eden od omejitvenih dejavnikov pri tovrstnih študijah. Preskušanje, ki ga uvajamo, bo dolgoročno postalo pomemben dejavnik pri odločanju o izboru ustrezne terapije pri bolnikih, ki so neodzivni na prvo linijo zdravljenja oziroma pri bolnikih, pri katerih se je razvila rezistenca na zdravilno učinkovino, najverjetneje pa tudi pri izbiri ustreznega odmerka (17).

### 2.2.1 Princip določanja učinkovitosti

Vzorec za preskušanje predstavlja kri oziroma kostni mozeg, lahko pa tudi drugi vzorci, infiltrirani z malignimi celicami. Za preskušanje potrebujemo skupno do  $5 \cdot 10^6$  celic. Odvzete celice je potrebno najprej gojiti v ustreznem gojišču, da se lahko adaptirajo na *ex-vivo* pogoje. Gojimo jih ob prisotnosti različnih zdravilnih učinkovin, ki po različnih mehanizmih delovanja vplivajo na njihovo preživetje. Sistem, ki bi ga želeli vpeljati tudi v redno klinično uporabo, omogoča istočasno preskušanje 30-ih različnih učinkovin. Aparat, ki je skener s priključeno digitalno analizo slike, lahko hkrati posname sliko v 6-ih vdolbinicah na 384-delni mikrotitrski ploščici. V vsaki vdolbinici mikrotitrne ploščice je v določeni količini nanešena izbrana zdravilna učinkovina. Enaka količina izbrane zdravilne učinkovine je nanešena v triplikatu. Na mikrotitrski ploščici so nanešene take količine zdravilne učinkovine, da je končna koncentracija v vdolbinicah enaka tisti, ki se jo doseže *in-vivo* (1x) ter njena 5-, 25- in 125-kratna redčitev. Celice obarvamo s fluorescentnim barvilom, ki različno obarva žive in mrtve celice. Sistem s pomočjo programske opreme slika ploščice po gojenju in analizira podatke. Z uporabo ustreznih matematičnih in statističnih modelov se izračuna občutljivost celic na posamezno zdravilno učinkovino (17).

### 2.2.2 Podajanje rezultatov

Sistem poda rezultat meritev v obliki indeksa učinkovitosti (KE% - "killing efficiency index"). V izračunu KE% so vključene vse meritve za izbrano zdravilno učinkovino, torej za celotno koncentracijsko območje. Bližje ko se vrednost približa 100%, bolj učinkovita je zdravilna učinkovina. Tako vrednost 100% pomeni, da je zdravilna učinkovina uničila vse celice tudi, ko je bila koncentracija le-te najnižja, vrednost 0% pa pomeni, da zdravilna učinkovina na te celice nima vpliva. Vrednost nižja od 0 pomeni, da je več živih celic prisotnih v vdolbinicah z učinkovino kot pa v kontrolnih vdolbinicah. Tak rezultat lahko kaže na to, da ima zdravilna učinkovina antiapoptotične učinke na celice, in jih varuje pred spontano apoptozo. Lahko pa je samo posledica napake pri pipetiranju ali kontaminacije. Na osnovi vrednosti KE% se rezultat za vsako zdravilno učinkovino poda semikvantitativno kot »učinkovito«, »delno učinkovito« ali »neučinkovito« v obliki seznama od najbolj do najmanj učinkovite (17).

Poleg tega sistem poda še grafični prikaz števila živih in mrtvih celic za vsako koncentracijo izbrane zdravilne učinkovine glede na kontrolo. Število predstavlja mediano petih neodvisnih meritev za izbrano koncentracijo zdravilne učinkovine v triplikatu. Poleg tega je za vsako koncentracijo prikazano sipanje meritev v triplikatu tako za žive kot za mrtve celice. V idealnih razmerah pri najvišji koncentraciji zdravilne učinkovine dobimo najnižje število živih celic. Število mrtvih celic nam poda informacijo o celični smrti znotraj dneva izvajanja meritev. Nizko število mrtvih celic in obenem nizko število živih celic nakazuje na to, da je prišlo do celične smrti v zgodnji fazi preskusa. Neenakomerni trend višine stolpcev histograma in število živih ali mrtvih celic, ki presega število v kontrolnem vzorcu, nakazuje na napako pri rokovanju z vzorcem (17).

### 2.2.3 Nabor krvnih bolezni

Skupina bolezni, za katere menimo, da lahko tovrstno preskušanje doprinese k izidu zdravljenja, so akutne levkemije (AL). Kljub napredku v shemah zdravljenja, prilagajanju intenzivnosti zdravljenja ter PKMC, bolniki z AL doživijo pogoste ponovitve bolezni. Zatorej so nujno potrebni novi terapevtski pristopi. Novo pridobljeno znanje s področja genetike in biologije AL bi sicer lahko vodilo v razvoj tarčnih učinkovin, ki bi bile na voljo za določeno podskupino bolnikov, in ki bi tako lahko klasično zdravljenje spremenile v zdravljenje prilagojeno posameznemu bolniku. Čeprav je AL mnogo podvrst, je obravnava bolnikov ostala dokaj nespremenjena, brez novejših učinkovin. Izjema je le APL, kjer se doseže dolgoročne ozdravitve z uporabo retinoične kisline in arzenovega trioksida (1, 18, 19).

V skupino AL vključujemo vzorce bolnikov z novoodkrita boleznijo in s ponovitvijo bolezni. Pri novoodkritih bolnikih bomo primerjali rezultate občutljivosti na učinkovine prve linije z učinkovitostjo zdravljenja preko določanja merljivega preostanka bolezni (MPB). MPB bomo določali na ravni citomorfologije, pretočne citometrije oziroma citogenetike ali molekularne genetike (20). Na daljši rok bomo opazovali še pogostost ponovitve bolezni glede na začetno občutljivost celic bolnika. Pri bolnikih ob ponovitvi bolezni pa bomo preverjali njihovo odzivnost na učinkovine, ki jih vsebujejo različne sheme zdravljenja in nato primerjali učinkovitost z rezultati preskusov. Druga pomembna skupina bolezni, ki jih želimo vključiti v preskušanje, so

tiste, kjer je raznovrstnost razpoložljivih učinkovin največja, in ki zaradi dolgotrajnega poteka zahtevajo številne menjave shem zdravljenja. Takšni bolezni sta kronična limfatična levkemija (KLL) in plazmocitom (21, 22). Vključili bomo bolnike s KLL pred začetkom zdravljenja po katerikoli od uveljavljenih shem in v različnih stadijih bolezni. Zanimalo nas bo, če je bil odziv na zdravljenje sorazmeren odzivnosti malignih celic bolnika na ključne učinkovine oziroma povezava med *ex-vivo* odzivom celic na učinkovino ter dejanskim odzivom na izbrano zdravljenje. Vsaj pri nekaterih bolnikih s KLL bomo vzorce gojili s stimulacijo limfocitov B, nato pa na njih preskušali nekatere eksperimentalne učinkovine. Učinkovitost teh snovi bomo nato lahko primerjali z naborom standardnih učinkovin.

V nasprotju s KLL je plazmocitom bolezen, ki zaradi majhne in neenakomerne infiltracije kostnega mozga z malignimi celicami vnaprej ne zagotavlja nujno ustreznega vzorca za preskušanje. Zato bomo poleg samega preskušanja odzivnosti celic vključili tudi preskušanje metod za selekcijo plazmocitomskih celic pred kultivacijo (23).

### 2.2.4 Nabor preskušanih zdravilnih učinkovin

V preskušanje bomo vključili zdravilne učinkovine, ki so glede na ATC klasifikacijo (»Anatomical Therapeutic Chemical - (ATC) Classification System«) prikazane v Preglednici 1. V preglednici so dodatno navedene krvne rakave bolezni, pri katerih se zdravilna učinkovina uporablja kot del nabora zdravljenja na KOH, UKC Lj (24). Prav pri boleznih, ki lahko potekajo dolgotrajno (KLL, plazmocitom), je zlasti v zadnjem obdobju na voljo prava poplava tarčnih zdravil. Vedno bolj se širi tudi uporaba njihovih kombinacij s standardno kemoterapijo ali celo medsebojne kombinacije. Pomemben in ključen sestavni del terapevtskih shem predstavljajo monoklonska protitelesa in njihova kombinacija s kemoterapevtiki. Obstoječe platforme pa ne vključujejo monoklonskih protiteles, saj je njihovo učinkovanje odvisno od delovanja imunskega sistema, ki ga pa v okviru *ex-vivo* preskušanja ne moremo vključiti (18, 19, 21, 22).



### 2.3 Omejitve *ex-vivo* preskusov določanja občutljivosti

Sheme zdravljenja poleg monoterapij pogosto vključujejo dve ali več protitumorskih učinkovin, ki se v določenih primerih aplicirajo simultano, v drugih pa zaporedno, včasih tudi s tedenskim ali večtedenskim premorom. Take situacije z *in-vitro* preskusi težko posnemamo. Poleg tega pa dodatno težavo predstavlja tudi vprašanje časa izpostavitvi učinkovini *in-vitro*. Po enodnevni inkubaciji z zdravilno učinkovino inhibicije rasti ali tvorjenja kolonij ne moremo meriti. Meritve lahko izvajamo šele po izteku časa, v katerem se število celic lahko podvoji, torej po najmanj 2-eh dnevih oziroma nekaj tednih. Dodatno težavo predstavlja tudi gojenje primarnih tumorskih celic v *ex-vivo* pogojih (2).

**Tabela 1.** Seznam v preskušanje vključenih zdravilnih učinkovin. Razdeljene so glede na ATC klasifikacijo (»Anatomical Therapeutic Chemical - (ATC) Classification System«). S polnim poljem so označene krvne rakave bolezni, pri katerih se zdravilna učinkovina uporablja kot del nabora zdravljenja na KOH, UKC Lj (24).

**Table 1:** List of active ingredients to be tested and sorted accordingly to Anatomical Therapeutic Chemical - (ATC) Classification System. Red fields indicate application of the active ingredient in a certain haematologic malignancy at UMC Ljubljana (24).

AT		Krvna rakava bolezen						
		ALL	AML	KLL	DP			
1	ZDRAVILA Z DELOVANJEM NA NOVOTVORBE (CITOSTATIKI)	alkilirajoči citostatiki	analogi dušikovih iperitov	ciklofosamid				
				bendamustin				
				klorambucil				
				melfalan				
			alkilsulfonati	busulfan				
		zaviralci celične presnove (antimetaboliti)	analogi purinskih baz	6-merkaptopurin				
				kladribin				
				klofarabin				
				fludarabin				
			analogi pirimidinskih baz	azacitidin				
	citarabin							
	citotoksični antibiotiki in sorodne učinkovine	antraciklinski antibiotiki in sorodne učinkovine	daunorubicin					
			doksorubicin					
			idarubicin					
			mitoksantron					
			piksantron					
	rastlinski alkaloidi in druge naravne učinkovine (zaviralci mitoze)	alkaloidi rožnatega zimzelena (vinka alkaloidi) in analogi	vinkristin					
			etopozid					
	druga zdravila z delovanjem na novotvorbe (citostatiki)	zaviralci proteinskih kinaz	dasatinib					
ibrutinib								
ruksolitinib								
druga zdravila z delovanjem na novotvorbe (citostatiki)		bortezomib	bortezomib					
			karfilzomib					
			idelalizib					
ZDRAVILA ZA ZAVIRANJE IMUNSKE ODZIVNOSTI	zdravila za zaviranje imunske odzivnosti	druga zdravila za zaviranje imunske odzivnosti	lenalidomid					
			metotreksat					
			pomalidomid					
			talidomid					
2	KORTIKOSTEROIDI ZA SISTEMSKO ZDRAVLJENJE	kortikosteroidi za sistemsko zdravljenje, enokomponentna zdravila	glukokortikoidi	deksametazon				

**Legenda:** 1 - zdravila z delovanjem na novotvorbe in imunomodulatorji; 2 - hormonska zdravila za sistemsko zdravljenje - razen spolnih hormonov in insulinov

### 3. Doprinos preskušanja

Nove sheme zdravljenja so praviloma zelo drage. Njihov učinek pri pretretiranih bolnikih pa pogosto slab ali manjši od pričakovanega. Zato bo uvedba načrtovanega diagnostičnega preskusa zagotovila ustrežnejšo selekcijo bolnikov pri odločanju za specifično zdravljenje (25). Taka selekcija bo imela naslednje pozitivne učinke:

- Omogočila bo izogibanje neučinkovitim shemam zdravljenja, kar neposredno pomeni finančne prihranke.
- Opustitev neučinkovitih shem bo neposredno zmanjšala neželene stranske učinke in obremenitev bolnika z neučinkovito in nepotrebno terapijo.
- Ker želimo imeti pri boleznih, ki potekajo dolgotrajno, čim več razpoložljivih terapij, zmanjšanje uporabe neučinkovitih postopkov zdravljenja zmanjša tudi selekcijski pritisk na maligni klon, kar lahko pomeni boljšo učinkovitost nadaljnjih intenzivnih terapij in uporabljenih shem zdravljenja.
- Preskušanje bo zagotavljalo doseganje boljših rezultatov zdravljenja in večje zadovoljstvo bolnikov.
- Preskušanje bo omogočilo preverjanje učinkovitosti tudi drugih zdravilnih učinkovin, ki praviloma niso vključene v nabor učinkovin pri zdravljenju določene krvne bolezni oziroma za te učinkovine še potekajo klinične raziskave (npr. talidomid in lenalidomid pri zdravljenju KLL).
- Odločanje za najustreznejšo terapijo bo olajšano, s tem pa se lahko dvigne kakovost dela.
- Metoda, ki jo bomo uvedli v klinično prakso bo na voljo ne le pri zdravljenju bolnikov s krvnimi malignimi obolenji, pač pa tudi drugim bolnikom z malignimi boleznimi. Zato menimo, da bo dolgoročno predstavljala za UKC Lj tržno storitev, ki jo lahko ponudi tudi drugim zdravstvenim ustanovam.

### 4. Sklepi

Kljub napredku v pristopu zdravljenja in PKMC nekateri bolniki s krvnimi rakavimi boleznimi doživijo pogoste ponovitve bolezni, zato so nujno

potrebni novi terapevtski pristopi. Izsledki vseh področij raziskav raka, ki vključuje proteomiko in genomiko, optimizacijo celičnih modelov ter preskuse za določitev občutljivosti na zdravilne učinkovine, odkriva vse več plati, ki določajo molekularni odtis občutljivosti posameznega bolnika na zdravilno učinkovino ter končno tudi občutljivost posameznega bolnika na zdravljenje. V prihodnosti pa bo najverjetneje prav napredek iz vseh teh področij pripomogel k odkritju novih (napovednih) biomarkerjev, s tem novih terapevtskih tarč, in hkrati pomagal predvideti posameznikov odgovor na protitumorsko zdravljenje. Z uporabo, kombinacijo in nadaljnjim razvojem teh "state of the art" tehnologij ter z vzpostavitvijo strogih smernic, ki jih priporoča NCI-EORTC ("National Cancer Institute – European Organisation for Research and Treatment of Cancer"), bo klasično zdravljenje prešlo v zdravljenje prilagojeno posameznemu bolniku, ki podaljša preživetje in izboljša kvaliteto življenja bolnikov preko uporabe učinkovitega zdravljenja in izogibanja neučinkovitemu zdravljenju in stranskim učinkom.

Dokler pa ne bodo prišle na tržišče nove zdravilne učinkovine in novi napovedni biomarkerji, ki bodo zanesljivo predvideli odziv na protitumorsko zdravljenje, ex-vivo določanje občutljivosti celic na zdravilne učinkovine predstavlja najboljšo optimizacijo pri zdravljenju, ki na ta način postane personalizirano. Zagotovo bo izbira zdravljenja še vedno odvisna od starosti bolnika, hkratnih pridruženih kroničnih bolezni in bolnikove pripravljenosti sodelovati pri zdravljenju. Predvidevamo pa, da bo preskušanje, ki ga uvajamo, dolgoročno postalo pomemben dejavnik pri odločanju o izboru ustrezne terapije pri bolnikih, ki so neodzivni na prvo linijo zdravljenja oziroma pri bolnikih, pri katerih se je razvila rezistenca na terapevtsko učinkovino (2).

### Literatura

1. Soulier J, Cortes J. Introduction to the review series on acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125: 3965-3966.
2. Unger FT, Witte I, David KA. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:729-757.
3. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood* 2016; 127: 62-70.
4. Smock KJ, Perkins SL, Bahler DW. Quantitation of plasma cells in bone marrow aspirates by flow cytometric analysis compared with morphologic assessment. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(6):951-955.
5. Kajiguchi T, Yamamoto K, Iida S et al. Sustained activation of c-jun-N-terminal kinase

- plays a critical role in arsenic trioxide-induced cell apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Cancer Sci* 2006;97(6):540–545.
6. Zhao F, Chen Y, Li R et al. Triptolide alters histone H<sub>3</sub>K<sub>9</sub> and H<sub>3</sub>K<sub>27</sub> methylation state and induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and caspase-dependent apoptosis in multiple myeloma in vitro. *Toxicology* 2010; 267:70–79.
  7. Rizvi MA, Ghias K, Davies KM et al. Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C beta inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2006;5(7):1783–1789.
  8. Shirato K, Imaizumi K, Miyazawa K et al. Apoptosis induction preceded by mitochondrial depolarization in multiple myeloma cell line U266 by 2-aminophenoxazine-3-one. *Biol Pharm Bull* 2008;31(1):62–67.
  9. Gullo C, Koh LK, Pang WL et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in multiple myeloma cell lines by CD137 ligand signaling. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10845.
  10. Allen P, Davies D. Apoptosis detection by flow cytometry. *Flow Cytom. New Jersey: Humana Press; 2007: 147–163.*
  11. San Miguel JF, Gutiérrez NC, Mateo G et al. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42(11):1510–1519.
  12. Ravandi F. Arsenic trioxide: expanding roles for an ancient drug? *Leukemia* 2004;18(9):1457–1459.
  13. Qu X, Du J, Zhang C et al. Arsenic trioxide exerts antimyeloma effects by inhibiting activity in the cytoplasmic substrates of histone deacetylase 6. *PloS One* 2012;7(2):e32215.
  14. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M et al. Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Mol Cancer Ther* 2002;1(10):851–860.
  15. Grad JM, Bahlis NJ, Reis I et al. Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood* 2001;98(3):805–813.
  16. Rousselot P, Labaume S, Marolleau J-P et al. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res* 1999;59(5):1041–1048.
  17. User Manual/Instructions for Use. Hexascope Haema Automatic Scanner and Analyser.
  18. Kouchkovsky ID, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J* 2016; 6, e441; doi:10.1038/bcj.2016.50.
  19. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2016; 127(1): 53-61.
  20. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125: 3996-4009.
  21. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3:1-18.
  22. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2016; 91(1): 101–119.
  23. Reberšek K, Černelč P, Podgornik H. Evaluation of multiple myeloma cell apoptosis in primary bone marrow samples. *Clin Lab* 2013; 59(3): 389-395.
  24. Černelč P. Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. *Interna medicina*. Ljubljana: Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo; 2011: 1301-1335.
  25. Shanafelt TD, Borah BJ, Finnes HD et al. Impact of ibrutinib and idelalisib on the pharmaceutical cost of treating chronic lymphocytic leukemia at the individual and societal levels. *J Oncol Pract* 2015; 11(3): 252-258.

# KEMOMED

Your partner in:

**Next Generation Sequencing (NGS)**  
with illumina solutions



©2014 Illumina, Inc. All rights reserved.

©2014 Illumina, Inc. All rights reserved.

**Newborn Screening (NBS)**  
with Shimadzu solutions



**Kemomed**

Svetovanje, trgovina in  
trženje d.o.o.

Kališka 9  
PE: Stritarjeva 5  
4000 Kranj  
Slovenia

**T** +386 4 2015 050  
**F** +386 4 2015 055  
**E** info@kemomed.si  
**W** www.kemomed.si

 **SHIMADZU**  
Excellence in Science



*Novosti v nacionalnem  
presejanju vrojenih bolezni  
presnove v otroški dobi*

**Current state and future challenges of newborn screening**

*Maximilian Zeyda*

**Presejalno testiranje novorojencev- izkušnje v slovenskem prostoru**

*Adrijana Oblak*

**Pilotna raziskava razširjenega presejanja novorojencev za vrojene  
bolezni presnove**

*Andraž Šmon*

**Sekvenciranje DNA visoke zmogljivosti pri presejalnem testiranju  
novorojencev za prirojene bolezni presnove**

*Jernej Kovač*

## Current state and future challenges of newborn screening

### Assoc.Prof. Maximilian Zeyda

*Clin. Div. of Pediatric Pulmonology, Allergology and Endocrinology and Newborn Screening Laboratory, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria*

### Summary

*Newborn screening for heritable disorders and congenital diseases may be named a most successful example for preventive medicine saving lives of numerous newborns and improving life quality of affected children and their families. Nonetheless, the rarity and complexity of screened diseases, ethical considerations, technical subjects, economic aspects, and the rising speed of new developments of diagnostics and therapies continuously challenge all newborn screening labs and programs as well as associated care delivery. This review aims at giving an overview on the current state of newborn screening with a focus on Europe and the challenges newborn screening institutions are currently coping with and will have to face in near future*

**Keywords:** *Expanded newborn screening, Wilson and Jungner criteria, Second-tier testing*

### Introduction

Newborn screening aims at early identification of treatable conditions associated with significant morbidity or mortality (1). Newborn screening is based on dried blood spots on filter cards, which facilitate easy blood sampling, high sample stability, and simple and cheap transport of samples to a centralized laboratory. In the 60s of the 20<sup>th</sup> century analysis of dried-blood spots for phenylketonuria (PKU) marked the starting point for population-wide screenings and thus represent one of the longest running

screening initiatives in the world (2). Thereafter, not only more and more countries developed newborn screening programs, but more and more screening technologies and therapeutic interventions have led to expansion of newborn screening in a rapid manner. The inclusion and exclusion of disorders to the screening panels has been dynamic and influenced by increasing understanding of diseases and their pathomechanisms, therapies, and the availability of appropriate diagnostic tests with respect to high sensitivity and specificity, in particular “exploding” with the introduction of mass spectrometric methods, named “expanded newborn screening” in the 1990s and 2000s (3). As a consequence, morbidity and mortality of children with heritable disorders and congenital diseases have dramatically decreased (4). Although newborn screening is internationally recognized as an important health initiative for populations and is adopted in essentially the whole developed world as well as many developing countries, huge differences exist concerning the conditions screened for. Interestingly, most probably there do not exist two countries with identical screening due to different interpretation of the selection criteria of which conditions should be screened as well as different economic and political circumstances (5).

### Which conditions should be screened?

The population screening principles formulated by Wilson and Jungner (6), which have been updated over the years (7), are considered to be the gold standard for selecting conditions to be screened. In essence, these criteria should ascertain that the overall benefits of screening outweigh the harm. They state that it is essential that the screened condition is an important health problem that is well understood and can be diagnosed and treated at early state with beneficial outcome compared to later diagnosis. The screening test has to be acceptable and costs including diagnosis and treatment should be economically balanced. These criteria, however, are defined largely only in soft, qualitative terms like: “important” health problem, “suitable” test, “acceptable to the population”, or “accepted treatment”. Thus, these criteria have no clear quantitative end-points and can only provide a basis for assessment of suitability for screening for diverse conditions. Several aspects besides feasibility of screening and affordability of treatment have to be taken in account. For instance, early diagnosis of conditions that cannot be accurately treated may lead to harm for families



by disrupted parent-infant bonding, stress, anxiety, and parents seeking potentially hazardous treatments for their children. On the other hand, early identification of conditions that may not lead directly to decreases in morbidity or mortality in the affected child, a definite diagnosis may still be an advantage and a relief for affected families (8). Furthermore, early diagnosis may lead to the development of novel therapies if not available yet. Accordingly, studies indicate that public support may be high for screening of conditions not yet treatable (9, 10). In addition, as mentioned before, the question if a treatment is "accurate" or "accepted" is hard to define for many conditions. Therefore, the results of decisions what to screen for differ substantially from country to country. Another factor leading to different decisions is the interpretation of which test is suitable or affordable, as exemplified by the following instance: newborns with tyrosinaemia type I often have relatively low tyrosine levels below cut-off (11). Thus, some laboratories have removed tyrosinaemia type I from their screening programmes, in spite of the availability of an effective treatment for this disorder (12) while other laboratories have included succinylacetone in the panel of detected metabolites (13).

### Which conditions are currently screened?

Pioneering in Newborn screening are the USA, which define conditions to be screened in a common Recommended Uniform Screening Panel (RUSP) (14) edited by the Secretary of the Department of Health and Human Services. RUSP currently (as of June 2017) includes hearing loss and critical congenital heart disease, that are not determined from DBS and 32 core conditions that should be screened in every lab plus 26 secondary conditions. The core conditions analysed from DBS include 9 organic acidurias, 5 fatty acid oxidation disorders, 6 amino acidurias. Notably, screening for all of these disorders is covered by mass spectrometric analysis of amino acids and acyl carnitines. Core endocrine disorders are primary congenital hypothyroidism and congenital adrenal hyperplasia (CAH). Other core conditions are cystic fibrosis (CF), biotinidase deficiency, and classic galactosemia. Notably, RUSP also includes diseases not or rarely screened in Europe like hematopoietic disorders such as sickle cell anemia and beta-thalassemia, X-linked adrenoleukodystrophy, lysosomal storage diseases (LSD) Pompe disease and mucopolysaccharidosis Type 1, and severe combined immunodeficiencies

(SCID). The decision which diseases are screened are made by the individual states, resulting in some differences within the US despite RUSP, but it should be acknowledged that in large parts of the USA screening covers more than 50 conditions (15).

Due to the political situation in Europe, the picture is naturally much more heterogeneous there. Taken EU member states, candidate member states and EFTA countries, in total 40 countries, between 0 and 29 conditions are screened as of 2012 (16). Most consensus exists on congenital hypothyroidism (screened in 37 out of 40 countries), PKU (33/40) followed by congenital adrenal hyperplasia (15/40) (16). It is remarkable, that all other conditions are screened in less than 15 of these countries. The reasons for these differences between the countries that are much greater than may be expected are not entirely obvious. Economic issues and the availability of laboratory and clinical infrastructure as well as historical developments may play a role. As of 2016, there is no screening for SCID or LSD in Europe except for pilot studies (J. Gerard Loeber, oral communication at ISNS2016, The Hague NL).

### Challenges for newborn screening

Beyond the financial aspects as well as the issues raised here so far like selection of the conditions to be screened and providing treatment and follow-up programs for identified patients, keeping a newborn screening program running is perpetually challenging. Issues to be kept in mind are information of parents, midwives, pediatricists and pediatric nurses to ensure maximal acceptance rates. Proper communication between screening lab and parents, attending doctors, diagnostic labs, and specialized centers is of crucial importance for clinical success. Technical equipment and operational procedures as well as available personnel have to be adequate to ensure results within acceptable time and cost-effectiveness of screening programs, providing high-throughput accurate low-cost diagnostic tests, reimbursement and financing of screening centers, logistics and, ethics, data safety, and storage. Finally, even after years of screening we still experience a lack of data regarding the natural history of some of these disorders. Generally, quality management is a basic requirement for every newborn screening lab (17). Quality assurance is supported by international inter-laboratory quality assurance and proficiency testing programs provided by namely

the U.S. Center for Disease Control and Prevention (CDC), or the European Research Network for evaluation and improvement of screening, diagnosis, and treatment of inherited disorders of metabolism (ERNDIM).

On top of these technical issues, the central duty of newborn screening - the correct discrimination between healthy and unhealthy newborns - is made difficult in many cases by the nature of the investigated parameters. The big challenge for every newborn screening lab is to ensure identification of possibly all true positive cases while minimizing the rate of false-positive results. To avoid false-negative results screening tests are designed with maximal sensitivity ("true positive rate"). As a consequence, false-positive findings have to be taken in account. The increase in the number of screening tests has increased the risk for false-positive results (18). False positives can create substantial harm that should not be underestimated by anxiety and stress for families until the suspected diagnosis can be ruled out after recalling for a new DBS and its analysis or further confirmatory diagnostics (18). Effective communication with parents can help reduce anxiety associated with abnormal screening results (19), but the goal to avoid false positives remains.

### Strategies to reduce false-positive rates

A basic strategy is continuous evaluation of cut-off values that may be based on fixed values or percentiles, and the validity of investigated parameters that notably, include various ratios between single analytes. An extremely useful tool for doing so is the Region 4 Stork (R4S) Collaborative Project, which is an international collaborative newborn screening database to examine current protocols, identify improvements, implement changes, and review outcomes across the world (20). By gathering screening data and data of true-positive cases from laboratories all over the world, the R4S database provides unique insight into complex MS/MS profiles for rare conditions (21).

To reduce unnecessary recalls for a second DBS card "second-tier" tests, i.e. secondary tests from the same samples positive for the primary screening biomarker, are used (22). A classical example is determination galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity for detection of galactosemia after moderately elevated results for total galactose in the first test (23). Notably,

galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity is also used as first-tier with total galactose or a galactose dehydrogenase test as second-tier tests (24, 25). In particular screening for cystic fibrosis is associated with a high rate of false positives due to the unreliability of immunoreactive trypsinogen (IRT) as the primary marker. One solution is testing for *CFTR* mutations as a second tier, but this is relatively expensive and legislative and ethical concerns exist on genetic screening, which include the issue of detection of heterozygotes, but also limited coverage of true positive due to ethnic diversity (26). Therefore, an alternative biochemical second-tier test that targets pancreatitis associated protein (PAP) has been developed and has recently been introduced into newborn screening programs in several countries (e.g. Austria and Germany), often in combination with genetic testing (27, 28).

Also newborn screening for CAH is problematic due to a high false positive rate after measuring 17-hydroxyprogesterone (17OHP) of false-positive results in particular in preterm infants (29). Therefore, 21-deoxycortisol and other steroids are being used as second tier biomarkers (29-31).

A pronounced problem in expanded newborn screening are frequently elevated propionylcarnitine (C<sub>3</sub>) values and their ratios to acetylcarnitine (C<sub>2</sub>) and free carnitine (C<sub>0</sub>), which are indicative for organic acidurias but also combined remethylation disorders such as CblC defects (32). Therefore, 3-OH-propionic acid and methylmalonic acid (33, 34) or methylmalonic acid and methylcitric acid (35) have been proposed as second tier tests following elevated C<sub>3</sub>. Notably, remethylation disorders (RD) belong to the group of inherited homocystinurias that can be divided into classical homocystinuria (cystathionine β-synthase (CBS) deficiency,) and isolated and combined remethylation disorders (32). Though all forms of homocystinuria can be detected in newborns by elevated homocysteine (36), in most newborn screening programs methionine is the primary biomarker tested for homocystinuria, because, in contrast to homocysteine, it can be determined within the regular panel of amino acids analyzed for screening of various aminoacidopathies from DBS. Due to extraordinary costs, by now the measurement of total homocysteine as primary newborn screening biomarker has only been used for the screening program of Qatar (37). Notably, elevated methionine is a suitable biomarker only for CBS deficiencies. In RD, methionine levels are not increased, but - in case of isolated RD - decreased (38). Therefore, total homocystein is determined after detection of elevated

and decreased methionine levels in many newborn screening laboratories as a second-tier marker (31, 35).

Further possibilities for second-tier strategies are mass spectrometric determination of branched-chain amino acids for maple sirup disease and succinylacetone for tyrosinemia type I (31).

### Outlook for newborn screening in Europe

Despite some activities towards collaboration in rare diseases, the European Union (EU) generally follows the principle of subsidiarity, meaning that healthcare lies within responsibility of each member state. Therefore EU-wide recommendations or guidelines and recommendations may not be expected (15). Thus, all newborn screening programs individually search for possibilities for extensions of their screening panels to reach or at least get into the direction of the US level. Currently, large efforts are undertaken in many European countries to introduce expanded newborn screening. Thus, Estonia, Finland, Macedonia, Slovakia, the Czech Republic, Croatia and Slovenia have recently expanded or are currently expanding their screening by mass spectrometry (J. Gerard Loeber, oral communication at ISNS2016, The Hague NL; and personal communication). Further emphasis is currently put on cystic fibrosis (e.g., officially introduced in Germany in 2016 (39), also in Denmark, Portugal and part of Serbia [J. Gerard Loeber, oral communication at ISNS2016, The Hague NL]), and SCID (large pilot studies e.g. the UK, Sweden, France, and Spain (40-44)).

In conclusion, newborn screening is complex and numerous new important questions and constellations are even increasing this complexity. These constellations involve the rapid progress in the diagnostic field including biomarkers and techniques and increasing therapeutic possibilities. Particularly in pediatric medicine research is increasing and we can expect a better understanding of diseases leading to a better prevention and patient support. Moreover, new sequencing and array techniques deliver previously unthinkable amounts of data on genetic variations and disorders with enormous ethical and practical implications (45). Accordingly, challenges for newborn screening programs and labs as well as associated

centers will substantially increase with these new possibilities. Therefore, careful evaluation of existing procedures as well as possible extensions of newborn screening panels is of crucial importance to pave way for factual improvements. On whatever level different European countries find themselves at the moment, newborn screening has been a success and will without doubt further improve to even more contribute to the health of populations in future.

### References

1. Elliman, D.A., C. Dezateux, and H.E. Bedford, Newborn and childhood screening programmes: criteria, evidence, and current policy. *Arch Dis Child* 2002; 87(1): 6-9.
2. Guthrie, R. and A. Susi, A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-343.
3. Chace, D.H., T.A. Kalas, and E.W. Naylor, Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49(11): 1797-1817.
4. Wilcken, B., Screening for disease in the newborn: the evidence base for blood-spot screening. *Pathology* 2012; 44(2): 73-79.
5. Jansen, M.E., S.C. Metternick-Jones, and K.J. Lister, International differences in the evaluation of conditions for newborn bloodspot screening: a review of scientific literature and policy documents. *Eur J Hum Genet* 2016; 25(1): 10-16.
6. Wilson, J.M. and Y.G. Jungner, Principles and Practice of Screening for Disease. World Health Organization: Geneva, 1986. Available at: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/84/07-050112bp.pdf?ua=050111>.
7. Andermann, A., B. Blancquaert, S. Beauchamp, and V. Déry, Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bulletin of the World Health Organization* 2008; 86(4): 317-319.
8. Bailey, D.B., Jr., The blurred distinction between treatable and untreatable conditions in newborn screening. *Health Matrix Clevel* 2009; 19(1): 141-153.
9. Etchegary, H., E. Dicks, J. Green, K. Hodgkinson, D. Pullman, and P. Parfrey, Interest in newborn genetic testing: a survey of prospective parents and the general public. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16(5): 353-358.
10. Hasegawa, L.E., K.A. Fergus, N. Ojeda, and S.M. Au, Parental attitudes toward ethical and social issues surrounding the expansion of newborn screening using new technologies. *Public Health Genomics* 2011; 14(4-5): 298-306.
11. Frazier, D.M., D.S. Millington, S.E. McCandless, D.D. Koeberl, S.D. Weavil, S.H. Chaing, and J. Muenzer, The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2006; 29(1): 76-85.
12. Chace, D.H., T.A. Kalas, and E.W. Naylor, Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clinical Chemistry* 2003; 49(11): 1797-1817.
13. Sander, J., N. Janzen, M. Peter, S. Sander, U. Steuerwald, U. Holtkamp, B. Schwahn, E.

- Mayatepek, F.K. Trefz, and A.M. Das, Newborn Screening for Hepatorenal Tyrosinemia: Tandem Mass Spectrometric Quantification of Succinylacetone. *Clinical Chemistry* 2006; 52(3): 482-487.
14. Recommended Uniform Screening Panel 2016. Available at: <https://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/recommendedpanel/>.
  15. Therrell, B.L., C.D. Padilla, J.G. Loeber, I. Kneisser, A. Saadallah, G.J. Borrajo, and J. Adams, Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol* 2015; 39(3): 171-187.
  16. Loeber, J.G., P. Burgard, M.C. Cornel, T. Rigter, S.S. Weinreich, K. Rupp, G.F. Hoffmann, and L. Vittozzi, Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis* 2012; 35(4): 603-611.
  17. Burgard, P., K. Rupp, M. Lindner, G. Haege, T. Rigter, S.S. Weinreich, J.G. Loeber, D. Taruscio, L. Vittozzi, M.C. Cornel, and G.F. Hoffmann, Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 2. From screening laboratory results to treatment, follow-up and quality assurance. *J Inher Metab Dis* 2012; 35(4): 613-625.
  18. Tarini, B.A., D.A. Christakis, and H.G. Welch, State newborn screening in the tandem mass spectrometry era: more tests, more false-positive results. *Pediatrics* 2006; 118(2): 448-456.
  19. Schmidt, J.L., K. Castellanos-Brown, S. Childress, N. Bonhomme, J.S. Oktay, S.F. Terry, P. Kyler, A. Davidoff, and C. Greene, The impact of false-positive newborn screening results on families: a qualitative study. *Genet Med* 2012; 14(1): 76-80.
  20. Fleischman, A., J.D. Thompson, and M. Glass, Systematic Data Collection to Inform Policy Decisions: Integration of the Region 4 Stork (R4S) Collaborative Newborn Screening Database to Improve MS/MS Newborn Screening in Washington State. *JIMD Rep* 2014; 13: 15-21.
  21. Hall, P.L., G. Marquardt, D.M. McHugh, R.J. Currier, H. Tang, S.D. Stoway, and P. Rinaldo, Postanalytical tools improve performance of newborn screening by tandem mass spectrometry. *Genet Med* 2014; 16(12): 889-895.
  22. Ombrone, D., E. Giocaliere, G. Forni, S. Malvagias, and G. la Marca, Expanded newborn screening by mass spectrometry: New tests, future perspectives. *Mass Spectrom Rev* 2016; 35(1): 71-84.
  23. Item, C., B.P. Hagerty, A. Muhl, S. Greber-Platzer, S. Stockler-Ipsiroglu, and W. Strobl, Mutations at the galactose-1-p-uridylyltransferase gene in infants with a positive galactosemia newborn screening test. *Pediatr Res* 2002; 51(4): 511-516.
  24. Welling, L., A. Boelen, T.G.J. Derks, P.C.J.I. Schielen, M. de Vries, M. Williams, F.A. Wijburg, and A.M. Bosch, Nine years of newborn screening for classical galactosemia in the Netherlands: Effectiveness of screening methods, and identification of patients with previously unreported phenotypes. *Molecular Genetics and Metabolism* 2017; 120(3): 223-228.
  25. Ohlsson, A., C. Guthenberg, and U. von Dobeln, Galactosemia screening with low false-positive recall rate: the Swedish experience. *JIMD Rep* 2012; 2: 113-117.
  26. Ross, L.F., Newborn screening for cystic fibrosis: a lesson in public health disparities. *J Pediatr* 2008; 153(3): 308-313.
  27. Seror, V., C. Cao, M. Roussey, and R. Giorgi, PAP assays in newborn screening for cystic fibrosis: a population-based cost-effectiveness study. *J Med Screen* 2016; 23(2): 62-69.
  28. Weidler, S., K.H. Stopsack, J. Hammermann, O. Sommerburg, M.A. Mall, G.F. Hoffmann,

- D. Kohlmuller, J.G. Okun, M. Macek, Jr., F. Votava, V. Krulisova, M. Balascakova, V. Skalicka, M.A. Lee-Kirsch, and M. Stopsack, A product of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screening. *J Cyst Fibros* 2016; 15(6): 752-758.
29. White, P.C., Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5(9): 490-498.
  30. Janzen, N., S. Sander, M. Terhardt, U. Steuerwald, M. Peter, A.M. Das, and J. Sander, Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* 2011; 76(13): 1437-1442.
  31. Matern, D., S. Tortorelli, D. Oglesbee, D. Gavrillov, and P. Rinaldo, Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: The Mayo Clinic experience (2004-2007). *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2007; 30(4): 585-592.
  32. Schiff, M. and H.J. Blom, Treatment of inherited homocystinurias. *Neuropediatrics* 2012; 43(6): 295-304.
  33. la Marca, G., S. Malvagias, E. Pasquini, M. Innocenti, M.A. Donati, and E. Zammarchi, Rapid 2nd-tier test for measurement of 3-OH-propionic and methylmalonic acids on dried blood spots: reducing the false-positive rate for propionylcarnitine during expanded newborn screening by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007; 53(7): 1364-1369.
  34. Schroder, T.H., A. Mattman, G. Sinclair, H.D. Vallance, and Y. Lamers, Reference interval of methylmalonic acid concentrations in dried blood spots of healthy, term newborns to facilitate neonatal screening of vitamin B12 deficiency. *Clin Biochem* 2016.
  35. Turgeon, C.T., M.J. Magera, C.D. Cuthbert, P.R. Loken, D.K. Gavrillov, S. Tortorelli, K.M. Raymond, D. Oglesbee, P. Rinaldo, and D. Matern, Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1686-1695.
  36. Alodaib, A.N., K. Carpenter, V. Wiley, T. Wotton, J. Christodoulou, and B. Wilcken, Homocysteine measurement in dried blood spot for neonatal detection of homocystinurias. *JIMD Rep* 2012; 5: 1-6.
  37. Gan-Schreier, H., M. Kebbewar, J. Fang-Hoffmann, J. Wilrich, G. Abdoh, T. Ben-Omran, N. Shahbek, A. Bener, H. Al Rifai, A.L. Al Khal, M. Lindner, J. Zschocke, and G.F. Hoffmann, Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr* 2010; 156(3): 427-432.
  38. Huemer, M., V. Kozich, P. Rinaldo, M.R. Baumgartner, B. Merinero, E. Pasquini, A. Ribes, and H.J. Blom, Newborn screening for homocystinurias and methylation disorders: systematic review and proposed guidelines. *J Inher Metab Dis* 2015; 38(6): 1007-1019.
  39. Gramer, G., F. Hauck, S. Lobitz, O. Sommerburg, C. Speckmann, and G.F. Hoffmann, Neugeborenen screening 2020. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2017; 165(3): 216-225.
  40. de Felipe, B., P. Olbrich, J.M. Lucenas, C. Delgado-Pecellin, A. Pavon-Delgado, J. Marquez, C. Salamanca, P. Soler-Palacin, L.I. Gonzalez-Granado, L.F. Antolin, S. Borte, and O. Neth, Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr Allergy Immunol* 2016; 27(1): 70-77.
  41. Barbaro, M., A. Ohlsson, S. Borte, S. Jonsson, R.H. Zetterstrom, J. King, J. Winiarski, U. von Dobeln, and L. Hammarstrom, Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden-a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening

- Study. *J Clin Immunol* 2017; 37(1): 51-60.
42. Olbrich, P., B. de Felipe, C. Delgado-Pecellin, R. Rodero, P. Rojas, J. Aguayo, J. Marquez, J. Casanovas, B. Sánchez, J.M. Lucena, P. Ybot-Gonzalez, S. Borte, and O. Neth, A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T- and B-cell lymphopaenia. *Anales de Pediatría (English Edition)* 2014; 81(5): 310-317.
  43. Adams, S.P., S. Rashid, T. Premachandra, K. Harvey, A. Ifederu, M.C. Wilson, and H.B. Gaspar, Screening of Neonatal UK Dried Blood Spots Using a Duplex TREC Screening Assay. *Journal of Clinical Immunology* 2014; 34(3): 323-330.
  44. Audrain, M., C. Thomas, S. Mirallie, N. Bourgeois, V. Sebillé, H. Rabetrano, I. Durand-Zaleski, R. Boisson, M. Persyn, C. Pierres, N. Mahlaoui, and A. Fischer, Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study. *Clinical Immunology* 2014; 150(2): 137-139.
  45. Lohmann, K. and C. Klein, Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics* 2014; 11(4): 699-707.



## Presejalno testiranje novorojencev – izkušnje v Slovenskem prostoru

/ Neonatal screening testing – experiences in Slovenia /

Adrijana Oblak<sup>1</sup>, doc. dr. Katja Zaletel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

### Povzetek

Presejalno testiranje novorojenčkov je v Slovenskem prostoru zakonsko obvezno testiranje za vsakega novorojenčka. V Sloveniji v sklopu laboratorijske diagnostike presejamo na dve bolezni, fenilketonurijo z določanjem koncentracije fenilalanina (Phe) ter kongenitalno hipotirozo z določanjem tirotropina (TSH) v madežu krvi na filter papirju. Obe sta tudi splošni presejalni testiranj v večjem delu Evrope. Določanje Phe in TSH poteka fluorimetrično. Pomembna je tako časovna komponenta odvzema vzorca kot priprava vzorca ob samem odvzemu, saj najbolj vplivata na končno določitev vrednosti posameznih analitov. Za presejalno testiranje je predvidena razširitev programa z določanjem acilkarnitinov in aminokislin in s širjenjem nabora odkrivanja endokrinih motenj ob rojstvu.

**Ključne besede:** presejalno testiranje, PKU, KH, Slovenija, novorojenčki

### Abstract

In Slovenia, testing for neonatal screening is determined by the law and is mandatory for every newborn. As a part of laboratory diagnostics, we perform neonatal screening for two disorders, phenylketonuria with phenylalanine (Phe) determination, and congenital hypothyroidism with thyrotropine (TSH)

determination in dried blood spots on filter paper. Both tests are common also in other parts of Europe. Determination of Phe and TSH is fluorimetric. Important parts of testing are time of puncture and preparation of sample for testing. They both have an impact on results of testing. In Slovenia, we would like to extend neonatal screening also to acylcarnitines and other amino acids as well as other endocrine disorders.

**Keywords:** neonatal screening, PKU, CH, Slovenia, newborns

### 1. Uvod

Presejalno testiranje novorojenčkov je v Sloveniji zakonsko urejeno in opredeljeno v Pravilniku o spremembah in dopolnitvah pravilnika za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni iz leta 2005 in je tako obvezno za vsakega novorojenčka. Cilj presejalnega testiranja je zgodnje prepoznavanje dejavnikov tveganja bolezni v neonatalnem obdobju in s tem zmanjševanje obolevnosti, umrljivosti in invalidnosti otrok in kasneje odraslih (1). Izvaja se na neonatalnih oddelkih, neonatalnih odsekih ali pediatričnih oddelkih porodnišnic. Zajema različne sklope preiskav, ki jih v različnem časovnem razponu po rojstvu opravimo pri novorojenčku. Mednje sodijo presejalni ultrazvočni pregled kolkov, sluha, neonatalna oftalmija ter laboratorijska diagnostika, ki vključuje laboratorijske preiskave za odkrivanje presnovnih in endokrinih motenj ob rojstvu (1).

Zakonsko določenega števila in vrste laboratorijskih testov na Evropski ravni ni. Posamezna Evropska država se za vsak test odloči sama v okviru svojega zdravstvenega sistema (2). V Sloveniji tako izvajamo dve presejalni testiranj novorojenčkov iz krvnega madeža na filter papirju.: test za odkrivanje fenilketonurije (PKU), pri kateri določamo koncentracijo fenilalanina (Phe), ter test za odkrivanje kongenitalne hipotiroze (KH) z določanjem tirotropina (TSH).

## 2. Slovenija v primerjavi z Evropo

Na svetovni ravni se je presejalno testiranje novorojenčkov pričelo leta 1962 v ZDA z Guthriejevim testom (bakterijska inhibicijska analiza za določitev PKU) ter leta 1972 v Kanadi z določanjem tiroksina ( $T_4$ ) za detekcijo KH. Leta 1976 je določitev  $T_4$  zamenjala meritev koncentracije TSH, saj je omogočila boljšo občutljivost in specifičnost za detekcijo KH (3). V Sloveniji presejalno testiranje novorojenčkov izvajamo od leta 1979, ko smo pričeli s presejalnim testiranjem novorojenčkov na PKU ter leta 1981 razširili testiranje na KH z določitvijo tirotropina (TSH) (4).

Poročilo Evropske unije iz leta 2012 navaja podatke presejalnega testiranja za 40 držav Evrope, iz katerega je razvidna neenotnost med državami izvajalkami neonatalnega presejalnega testiranja. Države se razlikujejo med seboj tako po času odvzema vzorca, kot tudi vrsti preiskav oziroma naboru bolezni, zajetih v presejanje (tabela 1). To število se giblje od 1 (Finska, Makedonija, Črna Gora) pa vse do 29 (Avstrija). Časovni razpon odvzema krvi traja od 24h do 7 dni po rojstvu. Razlike so večinoma povezane z odpustom iz porodnišnice, ki se od države do države razlikuje. Ob tem je potrebno upoštevati, da nimajo vse države uzakonjenega presejalnega testiranja novorojencev. Izvajalci so strokovno usposobljeni ljudje bolnišnic ali privatnih klinik, z izjemo Irske, kjer je odzem odgovornost babic (2). Vse države Evrope presejajo vsaj na KH in PKU, medtem ko Finska, Malta, Makedonija in Črna Gora presejanja na PKU nimajo.

**Tabela 1.** Število bolezni, zajetih v presejanje po posameznih državah ter časi odvzema (v urah po rojstvu) krvi na filter papir (2).

**Table 1.** Number of screened conditions in individual countries and interval between birth and sampling (in hours) (2).

Država	Število bolezni	Čas odvzema (h)
Avstrija	29	36-72
Belgija – Flamski del	11	48-96
Belgija – Francoski del	7	72-120
Bolgarija	3	72-120
Ciper	2	96-168
Češka	12	48-72
Danska	15	48-72

Estonija	2	48-72
Finska	1	popkovnična kri
Francija	5	48-96
Nemčija	15	48-96
Grčija	3	96-168
Madžarska	25	48-72
Irska	5	72-120
Italija	2	48-96
Latvija	2	72-120
Litva	2	48-96
Luksemburg	4	96-168
Malta	3	popkovnična kri
Nizozemska	20	72-168
Poljska	3	48-96
Portugalska	25	48-96
Romunija	2	48-96
Slovaška	4	72-96
Slovenija	2	72-120
Španija	27	48-96
Švedska	5	48-96
Velika Britanija	7	120-192
Hrvaška	2	do 96
Makedonija	1	48-96
Irska	26	48-72
Turčija	3	ni podatka
Albanija	ni podatka	ni podatka
BiH	3	72-120
Kosovo	ni podatka	ni podatka
Črna Gora	1	48-96
Srbija	2	48-96
Norveška	2	48-96
Švica	7	72-120

### 3. Fenilketonurija (PKU)

Fenilketonurija je prirojena metabolna motnja v presnovi fenilalanina. Najbolj pogosta vzroka sta mutacija v genu fenilalanin hidroksilaze (PAH) ali pomanjkanje njenega kofaktorja tetrahidrobiopetrina ( $BH_4$ ), ki pretvarjata fenilalanin v tirozin. Znižana aktivnost PAH ali pomanjkanje  $BH_4$  vodi v kopičenje fenilalanina, ki učinkuje toksično in povzroča hude in ireverzibilne motnje v razvoju. Pojavlja se v vseh etičnih skupinah z različno stopnjo pojavnosti. V Evropi najmanjšo pojavnost beležijo na Finskem, kjer je pojav PKU 1:100.000 rojenih otrok (5). Prevladujoče zdravljenje je preko posebnega sistema prehranjevanja, ki vključuje vnos hrane z nizko vsebnostjo fenilalanina. Dovoljena količina vnosa fenilalanina na dan je 50 mg (5,6).

### 4. Kongenitalna hipotiroza (KH)

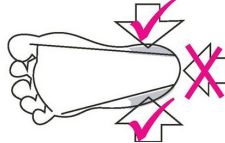
Kongenitalna hipotiroza je motnja, za katero je značilno pomanjkanje ščitničnih hormonov ob rojstvu in nezdravljena vodi v duševno in telesno manjrazvitost. Vzrok pomanjkanja ščitničnih hormonov je lahko moten razvoj ščitnice ali pa motnja v sintezi ščitničnih hormonov. Hipotiroza je lahko trajne ali prehodne narave, zdravljenje pa temelji na nadomeščanju ščitničnih hormonov (3).

### 5. Od vzorca do zaključne opredelitve rezultatov presejalnega testiranja

Odvzem krvi v Sloveniji izvršimo tretji dan po rojstvu. Izvaja se po predpisanih navodilih iz pete iz točno določenega predela (slika 1). Peta mora biti topla in pred odvzemom krvi tudi očiščena in razkužena. S pomočjo lancete izvedemo dovolj globok vbod, ki ne sme biti globlji od 2,0 mm.

**NAVODILA ZA ODVZEM VZORCA KRVI PRI NOVOROJENČKU**

1. Z mehko krpico, omočeno v vodi z 41°C, 5 minut grejte peto.
2. Peto razkužite s sterilno gazo, omočeno v alkoholu.
3. Pustite, da se alkohol posuši. Obrišite s sterilno gazo.
4. S sterilno lanceto vbodite v eno izmed spodaj označenih mest.
5. S sterilno gazo odstranite prvo kapljo krvi.
6. Z lahkim dotikom filter papirja odvezmite naslednjo veliko visečo kapljo krvi.
7. Zeno veliko kapljo je potrebno napolniti cel krog.
8. Napolnite vse ostale kroge in sušite 3 ure.



**Opozorilo:** Krogi na filter papirju morajo biti prepojeni s krvjo v celoti. Na dele filter papirja, ki so že prepojeni s krvjo, ne dodajate novih kapelj krvi.

**Slika 1.** Pravilni odvzem krvi za izvedbo neonatalnega presejalnega testiranja.  
**Figure 1.** Heel puncture for neonatal screening testing

Kapljice krvi, ki se naberejo na peti, odtisnemo na filter papir, kot kažeta sliki 2 in 3 ter izpolnimo pripadajoči obrazec s podatki o otrokovem rojstvu ter podatki matere (slika 3).

Vse dodatne informacije so na voljo tudi na spletni strani Klinike za nuklearno medicino, Oddelek za klinično radiokemijo.

✓ PRAVILNO	✗ NEPRAVILNO
 <p>poln krog, enakomerno razporejena količina krvi</p>	 <p>več nanosov krvi, ki se med seboj prekrivajo</p>
	 <p>več nanosov krvi, premalo vzorca krvi</p>

**Slika 2.** Pravilni in nepravilni nanos kapljic krvi na filter papir (7).  
**Figure 2.** Correct and incorrect applying of blood on filter paper (7).

NAVODILO ZA IZPOLNJEVANJE KARTICE  
ZA ODVZEM VZORCA KRVI PRI NOVOROJENČKU

1 ID številka matere 2 Podatki matere 3 Datum prejema vzorca (laboratorij)

4 Ime matere 5 Datum rojstva matere

6 Priimek matere 8 Podpis (laboratorij)

7 Kontaktni podatki matere

9 Ime naročnika (koda)

10 Telefonska številka naročnika

11 ID številka novorojenčka - št. rojstva 12 Datum rojstva otroka 13 Spol

14 Ime novorojenčka 15 Ura rojstva 16 Zaporedje

17 Priimek novorojenčka 18 Porodna težina 19 Značilna bolezen

20 Naslov

21 Naslov

22 Poštna številka 23 Kraj

24 Datum oddaje vzorca 30

25 Ura oddaje vzorca 31

26 Št. delovnih ur s naklepnimi urami 32

27 Težava s krvjo? 33

28 Datum oddaje vzorca 34

29 Št. delovnih ur s naklepnimi urami 35

NANOS VZORCEV  
KRVI

Zaporedje (16):  
1/1 en novorojenček (enojček)  
2/1 dvojčka/prvi novorojenček 2/2 dvojčka/drugi novorojenček  
3/1 trojčka/prvi novorojenček 3/2 trojčka/drugi novorojenček 3/3 trojčka/tretji novorojenček

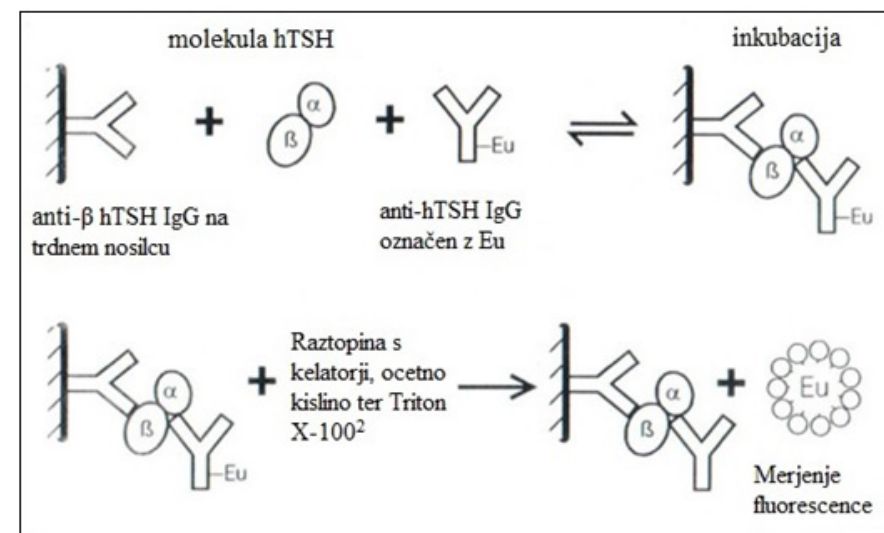
Slika 3. Pravilno izpolnjen filter papir z rojstnimi podatki novorojenčka ter ostali podatki matere in naročnika.

Figure 3. Correct way of filling the data on filter paper of mother and her newborn.

Iz posušene krvi na filter papirju nato v laboratoriju izvedemo analize presejalnega testiranja, pri katerih izmerimo koncentraciji Phe ter TSH v madežu krvi. Edini laboratorij, ki izvaja presejalno testiranje novorojencev za slovenske potrebe, se nahaja v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (UKCL), na Kliniki za nuklearno medicino. V istem laboratoriju poteka tudi potrditveno testiranje na KH, medtem ko potrditveno testiranje na PKU izvaja Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike Ljubljana (UKCL).

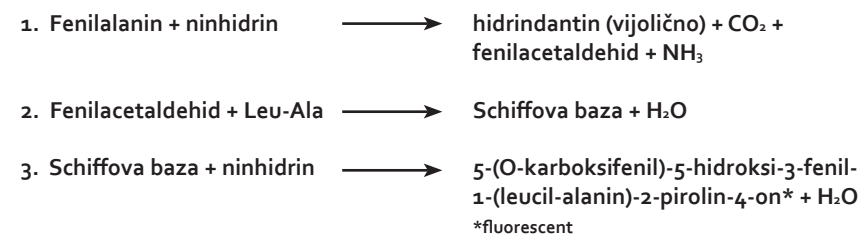
## 6. Metoda in protokol izvedbe

Izvedba testiranja poteka iz 3 mm velikega vzorca prepojenega krvnega madeža v dvojniku. Merjenje koncentracij obeh analitov, TSH in Phe, poteka fluorimetrično (sliki 4 in 5).



Slika 4. Princip določitve TSH iz krvnega madeža na filter papirju.

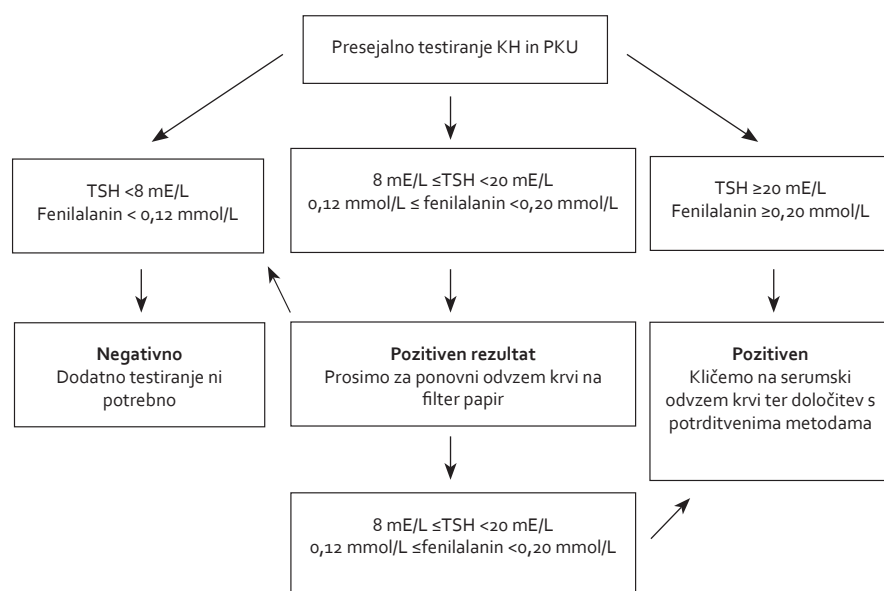
Figure 4. Principle of TSH determination from blood spot on filter paper.



Slika 5. Princip določitve koncentracije fenilalanina iz krvnega madeža na filter papirju.

Figure 5. Principle of phenylalanine determination from blood spot on filter paper.

Nadaljnje ukrepanje je odvisno od izmerjenih vrednosti, kakor predstavlja shema na sliki 6.



Slika 6. Ovrednotenje izmerjenih rezultatov presejalnega testiranja.  
Figure 6. Evaluation of the measured screening results.

Cilj presejalnega testiranja je čim hitrejša obravnava in zdravljenje novorojenčka ob pozitivnem potrditvenem testiranju. Podatki kažejo, da je zdravljenje KH z nadomeščanjem ščitničnih hormonov potrebno pričeti v 2-3 tednih po rojstvu, medtem ko je pri PKU cilj pričeti zdravljenje v najkrajšem možnem času po potrditvi (8,9). V Sloveniji z zdravljenjem pričnemo takoj ob potrjeni bolezni v obdobju dveh tednov po rojstvu, kar je pokazatelj odlične vzpostavitve neonatalnega presejalnega testiranja obravnave novorojenčkov (4).

## 7. Izkušnje

V Sloveniji je po zbranih podatkih od leta 2000 do leta 2012 povprečna pojavnost (število novo odkritih primerov na število rojstev) KH 1:2323, kar nas uvršča med države z večjo pojavnostjo KH v primerjavi z Evropo, kjer je

pojavnost med 1:3000 in 1:13000. V praksi to pomeni v povprečju 8 primerov na leto. Pojavnost PKU je manjša od pojavnosti KH in znaša 1:6769 oziroma v povprečju 3 pozitivne primere na leto. Številke pa so seveda odvisne od pojavnosti znotraj leta ter od števila novorojenčkov, letno število rojstev namreč variira od 17.000 do 22.000 (4).

S tveganji, ki se nanašajo na kakovost rezultatov presejalnega testiranja, se soočamo na različnih ravneh. Vključujejo predanalitične, analitične in poanalitične dejavnike. Kakovost predanalitičnega dela je najbolj odvisna od kakovosti vzorca. Sam odvzem krvi ni enostaven in zahteva izkušeno in spretno zdravstveno osebje. Potrebno je paziti, da vzorca ne pridobimo z močnim iztiskanjem krvi iz pete, saj bi se tako sočasno izločilo več medceličnine. Ta redči kri, kar bi se lahko ob testiranju odrazilo v lažno znižanem rezultatu. Istočasno mora osebje zagotoviti, da je prepojenost vzorca na filter papirju enakomerna na obeh straneh in da pokriva celotno področje označene površine na filter papirju. Neenakomerna prepojenost namreč lahko povzroči lažno znižane rezultate. Po drugi strani se nikakor ne sme izvajati večkratnega nanosa na isto mesto filter papirja, saj bi to lahko povzročilo lažno pozitiven rezultat meritve. Zato na neustrezno odvzete vzorce, ki jih v laboratoriju sprejmemo, sproti opozarjamo napotne institucije. V takšnih primerih je običajno potreben ponovni odvzem krvi na filter papir, kar povzroča stres in strah pri starših. Komunikacija med laboratorijem in naročniki je zato ključnega pomena za zagotavljanje kakovosti vzorca.

V analitskem delu se z lažno pozitivnimi primeri PKU srečujemo pri vseh novorojenčkih, ki jih zdravijo z antibiotiki. V takšnem primeru je s testiranjem na PKU potrebno počakati do konca zdravljenja z antibiotikom. Včasih to ni možno, na primer pri novorojenčku z odstranjeno vranico. Z znanim dalj časa trajajočim zdravljenjem z antibiotično terapijo presejalno testiranje ne bi imelo pomena, saj bi bili rezultati ne glede na čas presejanja lažno zvišani. Ker pa je testiranje obvezno in potrebno, je edina možnost v takšnem primeru odvzem seruma za določanje koncentracije Phe s potrditveno metodo. Krajšanje bolnišnične obravnave novorojenčkov in njihovih mamic ter odpusti novorojenčkov iz bolnic prej kot v treh dneh lahko vodijo v lažno znižane rezultate vrednosti fenilalanina. Rezultati raziskav kažejo, da lahko v prvem dnevu (do 24h) zgrešimo 16,6 % novorojenčkov na račun lažno negativnih vrednosti fenilalanina. Ta odstotek se zmanjša na 2,2 % pri odvzemu po 48-ih urah ter na 0,3 % pri odvzemu po 72 urah (11).



## 8. Prihodnost

Metodologija, s katero izvajamo teste presejalnega testiranja, je dobro občutljiva, prav na ta račun pa daje določeno število lažno pozitivnih rezultatov. Vsak pozitiven rezultat zahteva nov vzorec za novo določitev, kar je za starše največkrat stresno. Prihodnost določevanja aminokislin predstavlja možnost merjenja s tandemsko masno spektrometrijo, ki omogoča presejanje več bolezni hkrati, sočasno pa skrajšuje čas analize ter ima dobro specifičnost in občutljivost (10). Ta metodologija omogoča poleg merjenja številnih aminokislin tudi istočasno določitev acilkarnitinov, ki so pomembni pri diagnostiki metabolnih motenj. Žal pa ista metoda ne omogoča določanja proteinskih molekul, kot so TSH za presejanje KH, imuno reaktivnega tripsinogena (IRT) za presejanje cistične fibroze (CF) ter 17-OH progesteron pri določanju kongenitalne adrenalne hiperplazije (KAH). Metoda določevanja teh analitov je imunokemijska fluorescentna, kar zahteva natančno ročno delo ter izkušene laboratorijske tehnike.

## 9. Sklep

Uvedba novih analitov v sklopu presejalnega testiranja novorojenčkov je v razvitih državah v vzponu in postaja del vsakdanje prakse. Podatki iz literature kažejo, da je prevalenca metabolnih motenj večja, kot je bilo pričakovati iz podatkov pridobljenih pred uvedbo razširjenega presejanja. To kažejo tudi rezultati pilotnega projekta. Razširitev nabora preiskav presejalnega testiranja predstavlja kratkoročen cilj tudi v Sloveniji, kar bo prispevalo h kakovosti presejalnega testiranja in k zgodnjemu odkrivanju večjega števila presnovnih in endokrinih motenj.

## Literatura

1. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika za izvajanje preventivnega zdravstvenega varstva na primarni ravni (2005). Uradni list RS, št. 31 (9.3.2005). Pridobljeno s <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/54784>.
2. EU Tender. Evaluation of population newborn screening practices for rare disorders in member states of the European Union. Eu Network of Experts on Newborn Screening. 6.1.2012.

3. Buyukgebiz A. Newborn Screening for Congenital Hypothyroidism. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2013; 5(1): 8-12.
4. Šmon A, Grošelj U, Žerjav Tanšek T. et al. Newborn screening in Slovenia. Zdrav Var 2015; 54(2): 86-90.
5. Hafid NA, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. Transl Pediatr 2015; 4(4): 304-317.
6. MG/NHS T&W CCG Guidance for the appropriate prescribing for phenylketonuria. Based on Presc QIPP Bulletin 77 September 2014. Revizija Januar 2017.
7. Cavanagh C, Coppinger C. Newborn blood spot sampling. Infant 2009; 5(3):168-171.
8. Blau N, Belanger-Quintana A, Dermikol M et al. Management of Phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries. Mol Genet Metab 2010; 99: 109-115.
9. Balhara B, Misra M, Levitsky LL. Clinical Monitoring Guidelines for Congenital Hypothyroidism: laboratory outcome data in first year of life. J Pediatr 2011; 158: 532-537.
10. Chace DH. Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions. J Mass Spectrom 2009; 44: 163-70.
11. New Issues in Newborn Screening for Phenylketonuria and Congenital Hypothyroidism. Pediatrics 1982; 69(1): 104-106.

## Pilotna raziskava razširjenega presejanja novorojencev za vrojene bolezni presnove

/ Pilot research of expanded newborn screening for inborn errors of metabolism /

**Andraž Šmon<sup>1</sup>, asist. dr. Barbka Repič Lampret<sup>1</sup>, doc. dr. Urh Grošelj<sup>2</sup>, doc. dr. Mojca Žerjav Tanšek<sup>2</sup>, dr. Jernej Kovač<sup>1</sup>, prof. dr. Tadej Battelino<sup>2,3</sup>, izr.prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

### Povzetek

V večini držav Evropske unije že poteka razširjeno presejanje novorojencev s pomočjo tandemske masne spektrometrije. V nasprotju z njimi pa večina jugovzhodne Evrope še nima vpeljanega razširjenega presejanja. Z namenom vpeljave razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji smo izpeljali pilotno raziskavo, kjer smo pregledali 10048 filtrirnih kartic s posušeni vzorci krvi. Naša raziskava predstavlja eno prvih raziskav razširjenega presejanja novorojencev na področju jugovzhodne Evrope in omogoča oceno pojavnosti vrojenih bolezni presnove pri nas. V sklopu raziskave smo odkrili 4 bolnike s prirojenimi boleznimi presnove ter postavili ustrezne izključitvene vrednosti za vpeljavo presejanja, s čimer bodo rezultati raziskave ključni za vpeljavo razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji.

**Ključne besede:** vrojene bolezni presnove, presejanje novorojencev, pojavnost

### Abstract

Contrary to many countries in the European Union, most countries in South-Eastern Europe do not have an expanded newborn screening programme using tandem mass spectrometry. With the goal of future implementation of expanded newborn screening in Slovenia we conducted a pilot study of expanded newborn screening for selected inborn errors of metabolism in Slovenia. 10048 filter paper cards with dried blood spots were analysed. Our research represents one of the first expanded newborn screening studies in south-eastern Europe and enables the estimation of the incidences of inborn errors of metabolism in Slovenia. 4 children with inborn errors of metabolism were diagnosed in the study and the study also enabled the determination of cut off values. The results of this study will be instrumental in the routine implementation of expanded newborn screening in Slovenia.

**Keywords:** inborn errors of metabolism, newborn screening, incidence

### 1. Uvod

Vrojene bolezni presnove (VBP) so genetsko pogojene motnje, kjer mutacije v genih povzročijo nedelovanje ali pomanjkanje encimov, ki so pomembni pri različnih kemijskih reakcijah v metabolizmu. VBP so redke bolezni, večina jih ima pojavnost manj kot 1 : 10.000 živorojenih otrok (1). Pravilna in pravočasna diagnoza VBP lahko prepreči hude posledice bolezni ali smrt.

### 2. Presejanje novorojencev na vrojene bolezni presnove

Presejalne metode so zelo pomembne v preventivni medicini. Njihov cilj je detekcija bolezni pred pojavom prvih simptomov ali detekcija v prvih stadijih bolezni. Z ustreznim ukrepanjem se lahko bolezen prepreči ali vsaj zmanjša njene simptome. Uporabljajo se na večji populaciji ljudi brez znakov bolezni, med katerimi se išče posameznike, ki imajo določeno tveganje za specifično bolezen. Presejanje novorojencev (*angl. newborn screening, NBS*) za VBP se je začelo leta 1962 v ameriški zvezni državi Massachusetts s pomočjo

Guthriejevega testa - bakterijskega inhibicijskega testa za fenilketonurijo (PKU), ki je motnja v metabolizmu aminokislin (2). Kmalu se je NBS razširilo z vključitvijo novih bolezni, med prvimi je bil dodan test za kongenitalno hipotirozo (3). Sedaj NBS poteka v številnih državah po svetu (4).

Pomembno vlogo pri presejanju novorojencev ima tandemna masna spektrometrija (MS/MS), saj omogoča presejanje za več bolezni hkrati, kratek čas analize in visoko občutljivost. MS/MS omogoča kvantifikacijo številnih aminokislin in acilkarnitinov iz posušenih vzorcev krvi na filtrirnem papirju (DBS), kar omogoča detekcijo številnih VBP, ki jih povzročijo motnje v metabolizmu aminokislin, organskih kislin ter motnje v oksidaciji maščobnih kislin.

### 3. Izbor VBP za vključitev v program presejanja z MS/MS

Presejanje na vse VBP, ki jih je mogoče detektirati z MS/MS s kvantificiranjem aminokislin in acilkarnitinov, ni smiselna. Veliko od njih namreč ne zadošča osnovnim pogojem za vključitev v programe presejanja, saj ne povzročajo klinične slike, zanje ni razvitega učinkovitega zdravljenja in niso stroškovno učinkoviti (5). Centri za NBS oz. države, v katerih presejanje poteka, imajo različen nabor VBP, za katere presejajo (6).

Razviti so različni kriteriji, po katerih se izberejo VBP, ki so vključene v programe NBS. Kot osnova se navadno uporabljajo kriteriji, ki sta jih postavila Wilson in Jungner leta 1968. Sestavljeni so iz desetih točk (7):

1. Preiskovana bolezen je pomemben zdravstveni problem, pri čimer pogostost bolezni ni glavni kriterij za določitev resnosti problema.
2. Za bolnike s potrjeno boleznijo mora biti sprejet način zdravljenja.
3. Sredstva za diagnozo in zdravljenje morajo biti dostopna.
4. Zgodnja ali latentna simptomatska stopnja mora biti prepoznavna.
5. Obstajati mora primeren test ali klinični pregled za diagnozo bolezni.
6. Test mora biti sprejemljiv za populacijo. Tu gre predvsem za vprašanje invazivnosti odvzema vzorca.
7. Naravni potek bolezni, vključno z razvojem od latentne do klinične faze, mora biti zadovoljivo znan.

8. Priznana morajo biti priporočila, koga obravnavati kot bolnika in ga zdraviti.
9. Program presejanja mora biti stroškovno učinkovit.
10. Iskanje primerov bolezni mora biti kontinuiran proces in se tekom izvajanja izboljšuje. Pomembno je sodelovanje in komunikacija med osebjem v laboratorijih, ki izvajajo teste za detekcijo bolezni, in zdravniki, ki imajo stik z bolniki.

Z razvojem novih metod in tehnik za prepoznavo bolezni je bilo potrebno kriterije spremeniti oz. jih dopoljevati (5). Kriteriji Wilsona in Jungnerja so bili postavljeni v času, ko so z enim testom določali le eno bolezen. Novejše metode genomike in metabolomike omogočajo presejanje za več bolezni hkrati. Na Ameriški akademiji za medicinsko genetiko so razvili in ovrednotili svoje kriterije za izbor presejanih bolezni, s ciljem, da bi lahko izbrali enoten nabor presejanih bolezni v vseh zveznih državah (5). Kriteriji so razdeljeni na tri glavne sklope: klinične karakteristike bolezni, analitične karakteristike presejalnega testa in diagnozo, zdravljenje ter obravnavo bolezni. Iz treh glavnih sklopov je skupno postavljenih 19 kriterijev. Z ovrednotenjem kriterijev so bolezni ločili na primarne bolezni, ki naj bi bile vključene v vseh programih presejanja, sekundarne, ki ne zadostujejo vsem kriterijem, a so del diferencialne diagnoze primarnih bolezni, in bolezni, ki niso primerne za presejanje. Za vključitev med primarne bolezni v presejalnem programu mora obstajati test z ustrezno občutljivostjo in specifičnostjo, ki omogoča detekcijo bolezni pred pojavom kliničnih znakov. Zgodnja detekcija mora zagotavljati pravočasno ukrepanje in s tem učinkovito zdravljenje, ki prepreči ali upočasni razvoj bolezni. Z določanjem acilkarnitinov in aminokislin iz krvnega madeža z MS/MS lahko hkrati določamo 20 primarnih in 22 sekundarnih motenj z enim testom (5).

Pod okriljem Evropske komisije so strokovnjaki kot kriterije za izbiro bolezni v programih presejanja uporabili kar osnovnih 10 kriterijev Wilsona in Jungnerja (8). Bolezni, za katere je smiselno presejanje, je po teh kriterijih manj kot po kriterijih Ameriške akademije za medicinsko genetiko. Bolezni, za katere je presejanje smiselno so razdelili v dve skupini:

- Primarna skupina vključuje bolezni, za katere je najbolj smiselno presejati. Vključene so bolezni z relativno visoko pojavnostjo, test je mogoče brez večjih težav izvajati in dokazano je izboljšanje zdravja zaradi zgodnjega odkritja bolezni;

- V sekundarni skupini so bolezni, ki ne zadostijo vsem kriterijem. To so bolezni z nekoliko nižjo pojavnostjo, test je mogoče brez večjih težav izvajati in dokazano je izboljšanje zdravja zaradi zgodnega odkritja bolezni.

#### 4. Stanje programov presejanja novorojencev za vrojene bolezni presnove po svetu

Ameriška in evropska priporočila za izbor presejanih bolezni se med seboj razlikujeta (7,8). Vsaka ameriška zvezna država ima svoj izbor presejanih bolezni (6), prav tako tudi med evropskimi državami prihaja do velikih razlik v številu in izboru presejanih bolezni (9). V večini evropskih držav (med njimi tudi v Sloveniji (10)), poteka presejanje vsaj za kongenitalno hipotirozo in PKU, saj za njuno detekcijo niso potrebne drage aparature, kot je MS/MS (9). Obstajajo izjeme, saj Albanija in Kosovo nimata obstoječega presejalnega programa (tabela 1)(11).

**Tabela 1.** Stanje presejalnih programov v državah jugo-vzhodne Evrope (11). V Albaniji in Kosovo nimajo postavljenega presejalnega programa, medtem ko v večini držav poteka presejanje za kongenitalno hipotirozo (CH) in fenilketonurijo (PKU). V Bolgariji poleg tega presejajo še na kongenitalno adrenalno hiperplazijo (CAH).

**Table 1.** Current state of newborn screening programmes in south-eastern Europe (11). Albania and Kosovo do not have any screening programme, while most of the other countries congenital hypothyroidism (CH) and phenylketonuria (PKU) are included. Bulgaria also screens for congenital adrenal hyperplasia (CAH).

	Total pop. (Mil.)	GDP per cap. In 2012 (USD)	Screened/all Nb in 2012	No. of screening centers	Diseases mandatory screened (y of introduction)
Albania	2.83	9403	-/35,295	0	None
Bosnia-Federation of Bosnia and Herzegovina (without Sarajevo)	2.07	9392	16,915/nd	1	CH (2005); PKU (2005)
Bosnia-Rep. of Srpska	1.33	9392	9907/9978	1	CH (2007); PKU (2007)

Bosnia-Sarajevo	0.44	9392	5152/nd	1	CH (2000); PKU (2006)
Bulgaria	7.36	16,041	62,496/69121	1	CH (1993); PKU (1979); CAH (2010)
Croatia	4.28	20,961	41,606/41,700	1	CH (1985); PKU (1986)
Kosovo	1.74	8436	-/34,262	0	None
Macedonia	2.06	11,834	nd/23,752	1	CH (2002)
Moldova	3.50	4219	36,654/39,641	1	CH (1989-1993); PKU (1989)
Montenegro	0.63	14,358	-/8156	1	CH (2007)
Romania	18.91	18,063	159,039/201,104	5	CH (1979); PKU (1979; whole country 2011)
Serbia	7.18	11,801	52,094/67,257	2	CH (1983); PKU (1983)
Slovenia	2.05	28,476	21,888/21,938	1	CH (1981); PKU (1979)

V evropskih državah, kjer že imajo vpeljano presejanje VBP z MS/MS, je število vključenih bolezni zelo različno (9). V Veliki Britaniji tako z MS/MS določajo poleg PKU le še pomanjkanje srednjeveržne acil-CoA dehidrogenaze (MCAD) (4). Nemčija in Danska presejata na večje število VBP, vključenih imata 15 bolezni, Avstrija ima vključenih 29 VBP (4,9). V ZDA je lahko v program NBS vključenih 20 primarnih VBP, ki naj bi bile vključene v vseh zveznih državah, in 22 sekundarnih VBP, za presejanje katerih se vsaka zvezna država odloči sama (5,12).

#### 5. Izhodišča za razširitev programa presejanja v Sloveniji

Glede na kumulativno pojavnost VBP med 1/800 in 1/2500 (13), bi v Sloveniji letno pričakovali okrog 10 novih bolnikov z VBP, ki pa so doslej večinoma ostajali neprepoznani. Poleg tega, v nekaterih državah poročajo o višjih izračunanih incidencah oz. o porastu diagnosticiranih bolnikov z VBP po uvedbi razširjenega presejanja (14). Na primer, izračunana pojavnost za

pomanjkanje MCAD v državah z razširjenim presejanjem - katere presejanje sodi med za bolnike najbolj koristne in tudi stroškovno učinkovite -, znaša med 1/8000 in 1/20000 (1,15,16), na podlagi česar bi v Sloveniji pričakovali vsaj 50 otrok in mladostnikov s pomanjkanjem MCAD, ki pa je bila v praksi potrjena le v dveh primerih. To kaže, da so bolezni ostale nediagnosticirane ali so bolniki v presnovnih iztirjenjih umrli s klinično diagnozo septičnega stanja ali drugo diagnozo, brez da bi bila bolezen etiološko opredeljena. Zgodnja prepoznavna glutarične acidurije tip I, pomanjkanja MCAD ali pomanjkanja dolgoverižne 3-hidroksiacyl-CoA dehidrogenaze je ključna za preprečevanje življenje ogrožajočih presnovnih poslabšanj (16–18). Obenem je prava diagnoza pomembna tudi za genetsko svetovanje družini in za kaskadno presejanje sorojencev in drugih svojcev.

## 6. Pilotna raziskava presejanja novorojencev v Sloveniji

Glede na VBP, za katere presejajo v EU ter ZDA in na podlagi naših rezultatov analiz v DBS, smo za našo preiskavo izbrali nabor VBP, primeren za Slovenijo (tabela 2). Z izbrano metodo presejanja lahko detektiramo tudi PKU, ki v pilotno raziskavo ni bila vključena, saj je bolezen vključena v že postavljen program presejanja v Sloveniji. S tandemsko masno spektrometrijo smo analizirali acilkarnitine in aminokislino v posušeni vzorci krvi 10048 novorojenčkov in med njimi izbrali 113 novorojencev z najvišjim tveganjem za izbrane vrojene bolezni presnove. Izbranih 113 preiskovancev smo povabili na potrditvene analize, na vabila se je odzvalo 85 preiskovancev. Pri njih smo opravili metabolne potrditvene analize (analizo organskih kislin v urinu, analizo aminokislin v plazmi ter analizo aminokislin in acilkarnitinov iz posušeni vzorcev krvi na filtrirnem papirju) ter analizo izbranih genov, povezanih z vrojenimi boleznimi presnove, s sekvenciranjem naslednje generacije. S potrditvenimi metodami smo dokončno potrdili 4 bolnike, med njimi enega z glutarično acidemijo tipa 1, enega s pomanjkanjem zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze ter dva s pomanjkanjem 3-metilkrotonil karboksilaze (tabela 2). Pri vseh bolnikih smo našli vzročne genetske spremembe, ki v slovenski populaciji še niso bile opisane, s pomočjo rezultatov smo postavili tudi ustrezne izključitvene vrednosti za slovensko populacijo.

Za določitev pojavnosti vrojenih bolezni presnove v Sloveniji smo upoštevali povprečje rezultatov naše preiskave ter števila klinično potrjenih primerov vrojenih bolezni presnove v Sloveniji med preiskovanci, ki so bili rojeni med 1999 in 2013. Za določitev skupne pojavnosti smo upoštevali tudi pojavnost fenilketonurije v Sloveniji, ki je 1: 6769 (10). Skupna pojavnost vrojenih bolezni presnove v Sloveniji je 1 : 2762, kar je podobno pojavnosti v Avstriji, kjer je 1 : 2855 (1), in nekoliko višje, kot v Nemčiji, kjer je pojavnost 1 : 4100 (15). Pojavnosti posameznih vrojenih bolezni presnove so v Sloveniji primerljive z evropskimi (tabela 2), velika odstopanja so le pri pomanjkanju 3-metilkrotonil-CoA karboksilaze, pomanjkanju zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze ter pri pomanjkanju srednjeveržne acil-CoA dehidrogenaze. Rezultati raziskave kažejo na presenetljivo visoko pojavnost pomanjkanja 3-metilkrotonil-CoA dehidrogenaze v Sloveniji, saj smo našli tudi dokaj veliko pojavnost heterozigotnih prenašalcev bolezni. Ocenjena pojavnost za pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze je verjetno veliko previsoka, saj bi glede na ocenjeno pojavnost pričakovali tudi klinično diagnosticirane bolnike s to boleznijo. Pri MCAD je ocenjena pojavnost prenizka glede na ostale evropske države, verjetno zaradi primerov bolezni, ki niso bili diagnosticirani. Za MCAD je značilna nenadna smrt novorojencev (19), zato je tudi vključena v vse programe presejanja novorojencev s tandemsko masno spektrometrijo.



**Tabela 2.** Ocenjena pojavnost vrojenih bolezni presnove v Sloveniji. Za primerjavo so podane tudi pojavnosti vrojenih bolezni presnove v Evropi, kar smo izračunali iz objavljenih podatkov.

**Table 2.** Estimated incidences of IEM in Slovenia. For comparison average incidences of IEM in Europe are given, calculated from the available published data.

Bolezen	Št. primerov v pilotni raziskavi (pojavnost)	Št. klinično diagnosticiranih primerov med 1999 in 2013 (pojavnost)	Ocenjena pojavnost v Sloveniji	Evropske pojavnosti (1,4,15)
Testirane VBP	4 (1:2512)	9 (1:32655)	1: 4665 (1: 2762 vključno s fenilketonurijo)	1: 6000 (1: 3500 vključno s fenilketonurijo s pojavnostjo 1: 8500)
3-MCC	2 (1:5024)	0 (<1:293897)	1:5024	1: 80000
VLCAD	1 (1:10048)	0 (<1:293897)	1:10048	1: 148000
GA 1	1 (1:10048)	3 (1:97966)	1: 54007	1: 76500
MCAD	0 (<1:10048)	2 (1:146949)	1: 146949	1: 11000
GA 2	0 (<1:10048)	1 (1:293897)	1: 293897	1: 281000
LCHAD	0 (<1:10048)	1 (1:293897)	1: 293897	1: 146000
MMA	0 (<1:10048)	1 (1:293897)	1: 293897	1: 177000
PA	0 (<1:10048)	1 (1:293897)	1: 293897	1: 164000
CPT 1	0 (<1:10048)	0 (<1:293897)	< 1: 293897	1: 171000
CPT 2	0 (<1:10048)	0 (<1:293897)	< 1: 293897	1: 250000
CUD	0 (<1:10048)	0 (<1:293897)	< 1: 293897	1: 221000
IVA	0 (<1:10048)	0 (<1:293897)	< 1: 293897	1: 342000
MSUD	0 (<1:10048)	0 (<1:293897)	< 1: 293897	1: 281000

3-MCC: pomanjkanje 3-metilcrotonil-CoA karboksilaze; CPT 1/2: pomanjkanje karnitin palmitoil transferaze tipa 1/2; CUD: pomanjkanje privzema karnitina; GA 1/2: glutarična acidemija tipa 1/2; IVA: izovalerična acidemija; MCAD: pomanjkanje srednjeveržne acil-CoA dehidrogenaze; LCHAD: pomanjkanje dolgoveržne 3-hidroksi acil-CoA dehidrogenaze; MMA: metilmalonska acidemija; MSUD: bolezen javorjevega sirupa; PA: propionska acidemija, PKU: fenilketonurija, VLCAD: pomanjkanje zelo dolgoveržne acil-CoA dehidrogenaze.

3-MCC: 3-methylcrotonil-CoA carboxylase deficiency; CPT 1/2: carnitine palmitoyltransferase 1/2 deficiency; CUD: carnitine uptake deficiency; GA 1/2: glutaric acidemia type 1/2; IVA: isovaleric acidemia; MCAD: medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; LCHAD: long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency; MMA: methylmalonic acidemia; MSUD: maple syrup urine disease; PA: propionic acidemia; PKU: phenylketonuria; VLCAD: very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.

## 7. Sklep

Za študijo presejanja novorojencev v Sloveniji smo kot smiselne VBP izbrali nabor bolezni, ki so jih kot najbolj smiselne izbrali v Ameriškem združenju za klinično genetiko in so obenem najbolj pogosto prisotne v evropskih državah. S tem je nabor bolezni v slovenskem programu NBS drugačen od nabora v drugih srednjeevropskih državah. V naši raziskavi smo odkrili bolnike pred pojavom kliničnih znakov, kar lahko pomembno pripomore k preprečitvi znakov in najboljšemu ukrepanju proti razvoju bolezni. Želimo, da bi naši rezultati vplivali na vpeljavo novih metod za NBS v Sloveniji in bodo tako vplivali na širitev programa NBS novorojencev z dodatnimi VBP, kot so huda kombinirana imunska pomankljivost, kongenitalna adrenalna hiperplazija in cistična fibroza. S pomočjo presejanja 10048 novorojencev in pojavnostjo klinično diagnosticiranih bolnikov z VBP smo ocenili pojavnost VBP v slovenski populaciji, ki je primerljiva s pojavnostjo VBP v srednji Evropi. S pomočjo podatkov, pridobljenih pri raziskavi, in podatkov drugih presejalnih programov smo postavili ustrezne izključitvene vrednosti za novorojence.

## Literatura

1. Kasper DC, Ratschmann R, Metz TF, et al. The national Austrian newborn screening program - eight years experience with mass spectrometry. past, present, and future goals. Wien Klin Wochenschr. 2010 Nov;122(21-22):607-13.
2. MacCready RA, Hussey MG. Newborn phenylketonuria detection program in Massachusetts. Am J Public Heal Nations Heal. 1964;54(12):2075-81.
3. Therrell BL, Adams J. Newborn screening in North America. J Inherit Metab Dis;2007;30(4):447-65.
4. Burgard P, Cornel M, Filippo F D, et al. Report on the practices of newborn screening for rare disorders implemented in Member States of the European Union, Candidate, Potential Candidate. 2012;(2009).
5. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, et al. Newborn screening panel and system. Genet Med; 2006;8(Suppl 1):12S-25S.
6. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. Semin Perinatol; 2015;39(3):171-87.
7. Wilson J, Jungner Y. Principles and practice of screening for disease. World Heal Organ. 1968;65(4):281-393.
8. Cornel M, Rigter T, Weinreich S, et al. Newborn screening in Europe Expert Opinion document. 2011; 1-49.
9. Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1 - From blood spot to screening result. J Inherit Metab Dis; 2012;35(4):603-11.

10. Smon A, Grosej U, Tansek MZ, et al. Newborn screening in Slovenia. *Zdr Var.* 2015;54(2):86–90.
11. Grosej U, Tansek MZ, Smon A, et al. Newborn screening in southeastern Europe. *Mol Genet Metab.* 2014;113(1–2):42–5.
12. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/recommendedpanel/index.html>. Dostop 5. 8. 2016.
13. Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB, . Incidence of Inborn Errors of Metabolism in British Columbia , 1969 – 1996. *Pediatrics.* 2000;105(1):1–6.
14. Harms E, Olgemöller B. Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders. *Dtsch Arztebl Int;* 2011;108(1–2):11–21.
15. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, et al. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics;* 2003;111(6 Pt 1):1399–406.
16. Derks TGJ, Boer TS, van Assen A, et al. Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in The Netherlands: the importance of enzyme analysis to ascertain true MCAD deficiency. *J Inherit Metab Dis;* 2008;31(1):88–96.
17. Lindner M, Ho S, Fang-Hoffmann J, et al. Neonatal screening for glutaric aciduria type I: strategies to proceed. *J Inherit Metab Dis;* 2006; 29(2–3):378–82.
18. Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inherit Metab Dis;* 2010 ;33(5):521–6.
19. Lovera C, Porta F, Caciotti A, et al. Sudden unexpected infant death (SUDI) in a newborn due to medium chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency with an unusual severe genotype. *Ital J Pediatr;* 2012 Jan; 38(1): 59.

## Sekvenciranje DNA visoke zmogljivosti pri presejalnem testiranju novorojencev za prirojene bolezni presnove

/ High Throughput DNA sequencing and neonatal screening of inborn errors of metabolism /

**dr. Jernej Kovač<sup>1</sup>, Andraž Šmon<sup>1</sup>, izr.prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>2,3</sup>, asist. dr. Barbka Repič Lampret<sup>1</sup>, prof. dr. Tadej Battelino<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

### Povzetek

Skupina vrojene bolezni presnove je relativno pogost zdravstveni zaplet, ki zajema več kot 1000 različnih kliničnih manifestacij v ozadju katerih je patološka genetska sprememba, s kumulativno pojavnostjo med 1:800 do 1:2500 rojenih otrok. 1962. se je v ZDA pričelo prvo presejalno testiranje na fenilketonurijo. V Sloveniji od leta 1979 teče program presejalnega testiranja novorojencev za fenilketonurijo, ki je bil 1981. razširjen na testiranje za prirojeni hipotiroidizem, do danes pa ni bilo več širitev in posodobitev programa, čeprav so drugje v razvitem svetu program razširili tudi na več kot 30 dodatnih bolezni. Z opravljeno retrospektivno študijo na več kot 10.000 vzorcih krvnih madežev, smo želeli oceniti izvedljivost razširjenega presejalnega testiranja in uporabnosti genetskega testiranja s tehnologijo NGS za določitev vzročnih genetskih sprememb za izbrane prirojene bolezni metabolizma. Rezultati kažejo na smiselnost širitve trenutnega programa presejalnega testiranja novorojencev in uporabnost tehnologije NGS kot podporne potrditvene metode za izključevanje lažno pozitivnih rezultatov.

**Ključne besede:** presejalno testiranje novorojencev, vrojene bolezni presnove, NGS, genetsko testiranje

### Abstract

Inborn errors of metabolism (IEM) are cumulatively relatively common group of more than 1000 different metabolic disorders with genetic aetiology and incidence ranging from 1:800 to 1:2500 live born children. The USA introduced first neonatal screening test in 1962 for phenylketonuria. The Slovenian national program of neonatal screening for phenylketonuria began in 1979 and was expanded to congenital hypothyroidism testing in 1981. Since then no program update has been made and thus its expansion is urgently required. The aim of this retrospective study was to evaluate the feasibility of expanded neonatal screening for IEM and determine the applicability of NGS technology to identify causative genetic changes of identified IEM. The results support the efforts to expand current program of neonatal screening for IEM and the application of NGS to confirm the positive results of the screening.

**Keywords:** neonatal screening test, inborn errors of metabolism, NGS, genetic testing

### 1. Uvod

Med vrojene bolezni presnove (ang. *Inborn Errors of Metabolism – IEM*) uvrščamo monogenske bolezni presnove pri katerih genetska sprememba povzroči okvaro encima, encimskega kofaktorja ali transporterja substrata/produkta (1). Genetska okvara tako povzroči kopičenje substrata ali pa pomanjkanje produkta encimske reakcije (1). Najpogosteje so prirojene bolezni presnove avtosomno recesivne genetske bolezni, poznamo pa tudi avtosomno dominantne, X-vezane oblike in IEM povezane s patološkimi genetskimi spremembami v mitohondrijski DNA; skupno zajemajo več kot 1000 različnih kliničnih fenotipov, s celokupno incidenco, ki v določenih državah presega 1:800 (1,2). Klinično gledano poznamo tri različne patološke mehanizme IEM: glavno patologijo povzroča kopičenje substrata,

pomanjkanje produkta ali pa kronično kopičenje metabolitov katabolizma kompleksnih molekul oz. celičnih organelov (1). Združenje za proučevanje prirojene bolezni presnove (*ang. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism – SSIEM*) prirojene bolezni presnove deli v razrede glede na poglavitni substrat, katerega presnova je pri izbrani bolezni okvarjena. Po tej klasifikaciji se IEM deli v 15 razredov: motnje presnove aminokislin in peptidov, motnje presnove ogljikovih hidratov, motnje presnove maščobnih kislin in ketonskih telesc, motnje energijske homeostaze, motnje presnove purinov, pirimidinov in nukleotidov, motnje presnove sterolov, motnje presnove porfirinov in hema, motnje presnove maščob in lipoproteinov, prirojene motnje glikozilacije in ostalih post-translacijskih modifikacij, motnje v delovanju lizosomov, motnje v delovanju peroksisomov, motnje presnove nevrotansmitorjev, motnje presnove vitaminov in kofaktorjev, motnje presnove elementov v sledovih in kovin in motnje presnove ksenobiotikov (3). Zgodnje odkrivanje in ustrezna klinična obravnava bolnikov s prirojenimi boleznimi presnove sta ključni za zagotavljanje ustrezne kvalitete življenja bolnikov in preprečevanje njihove (pre)zgodnje umrljivosti (4). Glede na notranje zakonske ureditve so države vzpostavile različne sisteme odkrivanja, presejalnega testiranja in klinične obravnave prirojene bolezni presnove.

## 2. Presejalno testiranje novorojencev za prirojene bolezni presnove

Trenutno ima večina držav razvitega sveta vzpostavljene sisteme razširjenega presejalnega testiranja na prirojene bolezni presnove. Začetki segajo v 60. leta 20. stoletja, ko sta Guthrie in Susi razvila prvi enostaven in cenovno ugoden presejalni test za fenilketonurijo, ki je temeljil na testiranju inhibicije rasti bakterije *Bacillus subtilis* in vzorcih krvnih madežev (5). To presejalno testiranje se je iz ZDA, kjer so ga najprej uvedli v zvezni državi Massachusetts, v 70. letih 20. stoletja razširilo tudi v Evropo (6). V Sloveniji je bilo presejalno testiranje za fenilketonurijo uvedeno leta 1979 (7). Z razvojem novih tehnologij, še posebej tandemske masne spektrometrije (MS/MS) se je področje presejalnega testiranja za prirojene bolezni presnove razmahnilo in po večini razvitih držav razširilo, tudi na več kot 30 različnih bolezni, specifičnost in občutljivost testiranja pa presega 99% (2). Smernice ameriškega Združenja za medicinsko genetiko za vključevanje novih bolezni na panel presejalnega testiranja novorojencev priporočajo, da je bolezen,

ki je uvrščena na panel, možno identificirati, pri drugače asimptomatskem novorojencu, v 24 do 48 urah po rojstvu, za bolezen obstaja ustrezen test z dovolj visoko stopnjo specifičnosti in občutljivosti, prav tako pa je ključno, da zgodnje odkrivanje bolezni omogoča klinično intervencijo, ki dokazano občutno izboljša potek bolezni in zdravstveno stanje bolnika (8).

Po pričetku presejalnega testiranja za fenilketonurijo v 70. letih 20. stoletja, je bil program presejalnega testiranja slovenskih novorojencev leta 1981 razširjen na testiranje za prirojeno obliko hipotiroidizma (7). Od takrat se program presejalnega testiranja novorojencev ni več širil, čeprav je bilo v razvitem svetu v tem času v program dodanih več deset novih bolezni. Podobno zaskrbljujoče stanje je tudi drugod po državah jugovzhodne Evrope (9). Kljub temu pa velja poudariti, da je bilo v Sloveniji leta 1995 uvedeno tudi univerzalno presejalno testiranje 5 let starih otrok za družinsko obliko hiperholesterolemije, kar Slovenija trenutno izvaja edina na svetu (10). V želji, da bi se program presejalnega testiranja novorojencev posodobil in približal programom razvitih držav, je v okviru delovanja Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove ter Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrične klinike v Ljubljani, zaživel projekt katerega cilj je ovrednotenje izvedljivosti in potrebnosti širitve programa presejalnega testiranja novorojencev ter dopolnitve omenjenega programa s sekvenciranjem DNA visoke zmogljivosti nove generacije (*ang. next generation DNA sequencing – NGS*) za namene podporne in potrditvene diagnostike, ter ovrednotiti potencial NGS kot samostojnega orodja genetskega presejalnega testiranja novorojencev v prihodnosti.

## 3. Sekvenciranje DNA visoke zmogljivosti nove generacije – NGS

Leta 1990 se je uradno začel projekt človeškega genoma (*ang. Human Genome Project*), katerega cilj je bil določiti celotno nukleotidno zaporedje človeškega genoma in identificirati ter mapirati vse gene, ki ga gradijo. Uradno je bil projekt zaključen aprila 2003, stroški projekta pa so dosegli 3 mrd. USD. Kljub temu jim ni uspelo posekvencirati celotnega humanega genoma, saj v analizo, zaradi tehničnih omejitev ni bilo mogoče vključiti telomernih in centromernih regij genoma. Uspešno pa je bilo določeno zaporedje 99% t.i. evkromatina (regije genoma, ki nosi zapis za večino genov), od tega je

92% sekvenc presegljo natančnost 99,99% (11). Projekt človeškega genoma je temeljil na sekvenciranju DNA po Sangerjevi metodi, ki temelji na in vitro pomnoževanju DNA, ob prisotnosti označenih dideoksinukleotidov, ki ob vezavi prekinajo podaljševanje DNA fragmenta (12). Na ta način dobimo vzorec različno dolgih DNA fragmentov, katerih konci so označeni s fluorescentnim barvilom, ki ustreza zadnjemu komplementarnemu nukleotidu, ki je omogočil vgraditev dideoksinukleotida. Omenjene DNA fragmente nato ločimo po velikosti z metodo kapilarne elektroforeze, sklopljene z laserskim ekscitatorjem in detektorjem fluorescence za zajem signala. Iz dobljenih signalov nato s pomočjo računalniških algoritmov določimo ustrezno nukleotidno sekvenco analiziranega DNA fragmenta. Omenjena metoda je, kljub svoji uspešnosti in natančnosti, bila relativno draga in predvsem počasna. V 90. letih 20. stoletja so pričeli razvijati prve koncepte DNA sekvenciranja visoke zmogljivosti. Prva uspešna tehnologija, ki je prišla na trg, je bilo t.i. pirosekvenciranje, ki je izkoriščala lastnost verižne reakcije s polimerazo, da se ob vezavi nukleotidov v nastajajočo verigo sprošča pirofosfat. Pirofosfat se z encimom ATP-sulfurilazo pretvori v ATP, ki ga kot substrat nato porabi encim luciferaza, pri čemer pride do nastanka fluorescentnega signala (13). Pirosekvenciranje je relativno kmalu izpodrinila tehnologija Solexa, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo na trdnem nosilcu – t.i. premostitveni PCR, s čimer se je kapaciteta in zmogljivost NGS povečala za nekaj velikostnih razredov, hkrati pa se je drastično znižala cena sekvenciranja človeškega genoma (14). Omenjena tehnologija trenutno tudi prevladuje na trgu sekvenciranja DNA visoke zmogljivosti, hkrati pa je povsem spremenila postopke in paradigmo genetske diagnostike ter povzročila revolucijo na področju klinične genetske obravnave bolnikov (15). Trenutno najzmogljivejši sekvenatorji omogočajo sekvenciranje enega človeškega genoma na 3 ure (upoštevajoč ustrezne parametre kvalitete sekvenciranja) za manj kot milijoninko cene projekta človeškega genoma iz začetka 90. let 20. stoletja. V laboratorijih Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko smo NGS-sekvenator pridobili sredi leta 2014 in v manj kot letu dni je postal ključen element genetske diagnostike na Pediatrični kliniki, kjer zaradi svoje fleksibilnosti, zmogljivosti in relativno ugodne cene sekvenciranja omogoča hkratno analizo in diagnostiko tako različnih kliničnih fenotipov kot so gluhost, kardiološke bolezni, razvojni zaostanki, epilepsije, hiperholesterolemije in drugi. Uspešno lahko odkrivamo tudi za slovensko populacijo nepričakovane in nenavadne genetske okvare, kar izboljšuje kvaliteto genetske obravnave in svetovanja bolnikom in njihovim družinam (16). Posledično se je kmalu postavilo vprašanje ali lahko omenjene lastnosti

sekvenciranja DNA visoke zmogljivosti privedejo do tega, da NGS postane samostojno orodje presejalnih testiranj novorojencev.

#### 4. Genetska informacija kot orodje presejalnega testiranja novorojencev za prirojene bolezni presnove

O uvedba NGS analize DNA kot samostojnega orodja pri presejalnem testiranju novorojencev v svetu teče resna debata, ki zajema vsa področja od tehnoloških, analitskih, etičnih in pravnih vprašanj. V okviru omenjene debate je Svetovna zveza za genomiko in zdravje (ang. Global Alliance for Genomics and Health - GAGH), ki združuje več kot 400 zdravstvenih in raziskovalnih inštitucij, ter bolniških združenj in tehnoloških podjetij, v tem letu izdala okvirne smernice uvedbe genetskega presejalnega testiranja za novorojence. Ključni poudarki teh priporočil so sledeči (17):

1. Zaradi narave genetske informacije in interpretacije vpliva genetskih sprememb na zdravje preiskovanca, je ključna **vzpostavitev javne populacijske baze podatkov o pojavnosti specifičnih genetskih variant** in ocene njihove povezave z morebitnimi patološkimi stanji.
2. Javni programi genetskega presejalnega testiranja novorojencev naj vključuje **le testiranje za bolezni za katere je mogoča diagnoza takoj po rojstvu, prav tako pa jih je mogoča tudi učinkovito zdraviti in preprečevati**.
3. **Samostojno genetsko presejalno testiranje novorojencev z metodami NGS trenutno še ni primerno, da nadomesti uveljavljene metode presejalnega testiranja**. Če pa se ga država odloči uvesti, kot dopolnilo trenutno uveljavljenim metodam, je nujno, da se poleg samega genetskega presejalnega testiranja uvede tudi javnozdravstveni program, ki omogoča ustrezne potrditvene analize rezultatov, klinično intervencijo in sledenje napredovanju specifične bolezni, ustrezno genetsko svetovanje bolnikom in njihovim družinam, ustreznim zagotavljanjem kvalitete delovanja presejalnih laboratorijev, ustrežno zagotavljanje izobraževanja splošne in strokovne javnosti ter ustrezen nadzor in pravno podlago delovanja javnozdravstvenega programa.
4. V primeru nadomeščanja uveljavljenih metod presejalnega testiranja novorojencev z metodami genetskega presejalnega testiranja je



potrebno zagotoviti, da ima **genetsko testiranje enakovredno ali boljše specifičnost in občutljivost detekcije izbrane bolezni**, kot uveljavljene metode presejalnega testiranja.

5. Trenutno znanje in razumevanje človeškega genoma in fiziološkega vpliva genetskih sprememb ni zadostno, da bi opravičevalo vpeljavo genetskega presejalnega testiranja novorojencev z analizo celotnega človeškega genoma ali celo z analizo razširjenih, multi-genskih panelov. Napredek je potreben tako na področju klinične uporabnosti in stroškovne učinkovitosti, kot tudi na etičnem in pravnem področju urejenosti sistema presejalnega testiranja novorojencev.

Iz priporočil GAGH je razvidno, da je odprtih vprašanj še veliko, prav tako pa se dotikajo vseh aspektov vpeljave in izvajanja genetskega presejalnega testiranja in zadevajo tako strokovno kot tudi splošno javnost. Kljub padajočim cenam sekvenciranja z metodami NGS je trenutno še vedno težko upravičiti stroške vpeljave samostojnega genetskega presejalnega testiranja novorojencev (18). Preuranjena in preširoka vpeljava takšnega testiranja bi lahko posledično pomenila precejšnje breme za javnozdravstveni sistem, ne da bi se visoki stroški upravičili z učinkovitostjo tako uvedenega testiranja novorojencev. Učinkovitost samega samostojnega genetskega presejalnega testiranja je odvisna predvsem od sposobnosti interpretacije kliničnega pomena identificiranih genetskih sprememb in njihove povezanosti z morebitno (prihodnjo) klinično sliko posameznika.

#### INTERPRETACIJA KLINIČNEGA POMENA GENETSKE SPREMEMBE

Trenutno je interpretacija kliničnega pomena izbrane genetske spremembe omejena na uporabo že znanih podatkov o morebitni patološkosti genetske spremembe (opravljenih funkcionalnih analiz), podatkov o pojavnosti genetskih sprememb v splošni populaciji in bolj ali manj zanesljivih algoritmov za in silico oceno vpliva genetske spremembe na funkcijo gena (17). Ameriško združenje za medicinsko genetiko in genomiko in Združenje za molekularno patologijo (*ang. American College of Medical Genetics and Genomics in Association for Molecular Pathology*) sta leta 2015 izdala priporočila in smernice za interpretacijo kliničnega pomena genetskih sprememb, ki genetske spremembe deli v 6 razredov glede na potencialno patološkost (19). Omenjene smernice tudi ustrezno ovrednotijo težo posameznega dokaza o patološkosti genetske spremembe glede na njegovo ozadje

(dokaz izvira iz funkcionalnih študij, populacijskih analiz, bioinformatičnih analiz, segregacijskih analiz itd.) in s tem postavljajo izhodišče za ustrezno interpretacijo genetskih sprememb v primeru uvajanja genetskega presejalnega testiranja novorojencev. Podatkovne baze o pojavnosti genetskih sprememb v splošni populaciji so nujne za jasno razmejitev med potencialno patološkimi in benignimi genetskimi spremembami. Trenutno najobsežnejši bazi sta t.i. ExAc (Exome Aggregation Consortium) in GnomAD (Genome Aggregation Database), ExAc vsebuje podatke o celotnih eksomih 60.706 nesorodnih, navidezno zdravih posameznikov, medtem ko GnomAD vsebuje podatke o celotnih eksomih 123.136 in celotnih genomih 15.496 nesorodnih, navidezno zdravih posameznikov (20). Obe podatkovni bazi sta v veliko pomoč pri oceni patološkosti variant, ki so v izolirani populaciji redke, kljub temu pa ima največjo vrednost baza podatkov o pojavnosti variant, ki vsebuje nesorodne, zdrave posameznike iz populacije v kateri se izvaja presejalno genetsko testiranje novorojencev, kar pomeni, da je pred uvedbo morebitnega genetskega presejalnega testiranja potrebno tovrstno podatkovno bazo ustrezno vzpostaviti in napolniti z genetskimi podatki tarčne populacije. V dodatno pomoč so podatkovne baze, kjer nadzorovano zbirajo podatke o funkcionalnih in populacijskih analizah ter genetske variante ustrezno razvrščajo po patološkosti, primer take podatkovne baze je HGMD (Human Gene Mutation Database), kjer združujejo objavljene podatke o genetskih spremembah povezanih z različnimi kliničnimi manifestacijami (21). Ključno oviro pred uvedbo genetskega presejalnega testiranja pa predstavljajo t.i. genetske spremembe z neznanim kliničnim pomenom (*ang. Variants of Unknown Clinical Significance – VUS*). O tovrstnih spremembah v podatkovnih bazah ni dovolj podatkov, da bi jih ustrezno klasificirali, poleg tega pa so tudi populacijske in segregacijske analize nejasne in celo dvoumne. Do neke mere si v teh primerih pomagamo z napovednimi algoritmi, ki razvrščajo genetske spremembe, sicer po različnih pravilih, glede na njihov potencialni vpliv na funkcijo gena in/ali proteina. Kljub temu pa ti algoritmi niso povsem zanesljivi in lahko dajejo tudi nasprotujoče si rezultate (22). Posledično lahko prihaja do razlik med diagnostičnimi laboratoriji v interpretaciji kliničnega pomena genetskih sprememb, posledično so, z namenom naslavljanja tega problema pri britanski Organizaciji za zagotavljanje zunanega nadzora kvalitete (*ang. United Kingdom National External Quality Assessment Services – UK NEQAS*), vzpostavili posebno shemo zunanje kvalitete, ki naslavlja problem različne interpretacije vpliva genetskih sprememb na klinični fenotip in v katero se lahko prijavijo tudi laboratoriji zunaj Združenega kraljestva. Del te sheme

je tudi genetski laboratorij Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike. Rezultati omenjene sheme so namenjeni oceni stanja interpretacije genetskih sprememb v kliničnih primerih in bodo podlaga za pripravo prihodnjih dopoljenih smernic.

#### DODATNE ETIČNE IN PRAVNE DILEME GENETSKEGA PRESEJALNEGA TESTIRANJA NOVOROJENCEV

Pri analizi obsežnejše genetske informacije posameznika (analiza večjih genetskih panelov, celotnega eksoma ali genoma) obstaja verjetnost odkritja t.i. slučajnih oz. sekundarnih najdb (*ang. incidental ali secondary finding*), ki predstavljajo potencialno patološke genetske spremembe v genih, ki so nepovezani s trenutno klinično sliko, a nosijo tveganje za razvoj dodatne, druge in nepovezane patologije preiskovanca ali njegovih morebitnih potomcev (19,23). Znotraj Evropske unije še vedno ni konsenza, kako obravnavati in poročati sekundarne najdbe pomembne za preiskovanca (24), kljub temu pa sta organizacija EuroGentest in evropsko Združenje za humano genetiko predstavila nekaj smernic, ki se dotikajo poročanja in obravnave slučajnih najdb (23). Zaradi pomanjkanja ustrezne pravne ureditve na nivoju Evropske unije je vsaka država članica trenutno prepuščena sama sebi in svoji interni regulativi, kar za Slovenijo pomeni, da nima obstoječih, jasnih predpisov o ustreznih postopkih za primere odkritja in poročanja sekundarnih genetskih najdb. V okviru presejalnega genetskega testiranja za prirojene bolezni pri novorojencih to pomeni, da ni jasnih pravil za poročanje t.i. prenašalstva, kar je ena od najverjetnejših slučajnih najdb tovrstnega genetskega testiranja in bo v prihodnje zahtevala konkretno opredelitev etičnih in pravnih okvirjev poročanja in obravnave. Dodatno situacijo zaplete tudi dejstvo, da so lastniki pridobljene genetske informacije preiskovanci oz. njihovi zakoniti zastopniki (starši, skrbniki) sami, ki lahko posledično zahtevajo razkritje celotne genetske informacije pridobljene tekom genetskega presejalnega testiranja (17). Glede na predpise posamezne države pa relativno veliko etično, tehnično in pravno oviro predstavlja tudi dolgoročno varno shranjevanje genetskih podatkov (še posebej podatkov sekvenciranja celotnega eksoma ali genoma). Trenutna interpretacija slovenskih predpisov na tem področju namreč kaže, da je potrebno omenjene podatke hraniti vsaj 100 let od nastanka oz. 10 let od smrti posameznika (interni pravilniki UKC Ljubljana), kar zaradi obsega tovrstnih podatkov predstavlja veliko finančno in tehnološko breme,

morebitna uvedba genetskega presejalnega testiranja pa bi predstavljala skokovit porast podatkovnih in finančnih potreb laboratorija (18).

#### 5. Slovenske izkušnje s širitvijo programa presejalnega testiranja novorojencev za prirojene bolezni presnove

Od leta 1981 se v Sloveniji program presejalnega testiranja novorojencev ni bistveno spreminjal zato je bil zagnan projekt, ki bi ocenil smiselnost širitve programa presejalnega testiranja novorojencev na dodatnih 13 prirojelih boleznih presnove (preglednica 1). V okviru tega projekta je bilo analiziranih več kot 10.000 vzorcev krvnih madežev zbranih in shranjenih v okviru obstoječega presejalnega testiranja novorojencev. V prvem koraku je bila iz vzorca krvnih madežev opravljena analiza aminokislin in acilkarnitinov z metodo tandemske masne kromatografije (MS/MS). Več kot 100 preiskovancev z mejnimi in/ali povišanimi vrednostmi izbranih analitov je bilo povabljenih na ponovni pregled v ambulanto Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, ob čemer se je vabilu odzvalo dobrih 80 preiskovancev. Vsi preiskovanci, ki so se odzvali vabilu so bili vključeni tudi v genetsko testiranje s tehnologijo NGS na panelu 38 genov povezanih z razvojem bolezni, ki so bile uvrščene na seznam razširjenega presejalnega testiranja novorojencev (preglednica 1). Vse identificirane potencialno patološke genetske spremembe so bile potrjene z dodatnim tarčnim sekvenciranjem po Sangerju. Od več kot 100 preiskovancev s povišanimi in mejnimi vrednostmi metabolitov v prvem krogu testiranja s tandemsko masno spektrometrijo je 9 preiskovancev preseglo mejne vrednosti izbranih metabolitov tudi ob ponovni obravnavi na kliniki. Za eno tretjino ostalih preiskovancev (~30) se je izkazalo, da so bili prezgodaj rojeni, kar je bil verjeten vzrok za neobičajne rezultate prvega kroga testiranja. Pri vseh 9 preiskovancih s povišanimi metaboliti ob kontrolnem pregledu, je analiza DNA potrdila prisotnost vzročnih genetskih sprememb povezanih z povišanimi metaboliti. En bolnik je bil sestavljen heterozigot dveh potrjenih patoloških genetskih sprememb v genu *GCDH*, ki povzroča glutarično acidemijo tipa 1. Pri drugem bolniku je bilo potrjeno pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze, pri čemer je bil bolnik sestavljen heterozigot za dve patološki genetski spremembi v genu *ACADVL*, ki kodira omenjeni encim. Dva bolnika s pomanjkanjem 3-metil-krotonil karboksilaze sta bila potrjena nosilca patoloških homozigotnih

sprememb v genu *MCCC1*. Za preostalih 5 bolnikov s povišanimi vrednostmi metabolitov, ki so kazali na pomanjkanje 3-metil-krotonil karboksilaze, se je izkazalo, da so nosilci patoloških heterozigotnih sprememb v genu *MCCC1*, kar pomeni, da nimajo sicer patološkega pomanjkanja 3-metil-krotonil karboksilaze, a se učinek heterozigotne spremembe v genu že odraža v mejno povišanih metabolitih. Analiza kvalitete pridobljenih genetskih podatkov je pokazala, da je potrebno še dodatno optimiziranje korakov priprave vzorcev za sekvenciranje s tehnologijo NGS. V okviru pilotne študije je bila izračunana kumulativna pojavnost prirojnih bolezni presnove, ki za slovensko populacijo znaša 1:2762 in je primerljiva z evropskim povprečjem 1:3500.

**Preglednica 1.** Seznam prirojnih bolezni presnove, ki bodo vključene v razširjeni panel presejalnega testiranja novorojencev poleg testiranja za fenilketonurijo in prirojni hipotiroidizem, skupaj s pripadajočimi geni, ki so vključeni v genetski panel uporabljen za NGS analizo.

**Table 1.** The list of inborn errors of metabolism included into the expanded neonatal screening programme, complementing current testing for phenylketonuria and congenital hypothyroidism. Additionally, the genes included into the NGS panel are listed in the right column

Dodatne prirojene bolezni presnove za presejalno testiranje		Analizirani geni (vključeni v NGS panel)
MCAD	pomanjkanje srednjeveržne acil-CoA dehidrogenaze	ACADM (NG_007045.2)
GA 1	glutarična acidemija tipa 1	GCDH (NG_009292.1)
3-MCC	pomanjkanje 3-metilkrotonil-CoA karboksilaze	MCCC1 (NG_000100.1), MCCC2 (NG_008882.1), HMGCL (NG_000191.2), ACAT1 (NG_009888.1), HSD17B10 (NG_008153.1), AUH (NG_008017.1), BTD (NG_008019.1), HLCS (NG_016193.1)
MSUD	bolezen javorjevega sirupa	BCKDHA (NG_013004), BCKDHB (NG_009775), DBT (NG_011852), DLD (NG_008045)
VLCAD	pomanjkanje zelo dolgoveržne acil-CoA dehidrogenaze	ACADVL (NG_007975.1)
IVA	izovalerična acidemija	IVD (NG_011986.1), ACADSB (NG_008003.1)

GA 2	glutarična acidemija tipa 2	ETFA (NG_007077.2), ETFB (NG_007115.1), ETFDH (NG_007078.2), ETHE1 (NG_008141.1)
LCHAD	pomanjkanje dolgoveržne 3-hidroksi acil-CoA dehidrogenaze	HADHA (NG_007121.1), HADHB (NG_007294.1)
MMA & PA	metilmalonska acidemija & propionska acidemija	SUCLA2 (NG_008241.1), MUT (NG_007100.1), MMAA (NG_007536.1), MMAB (NG_007096.1), MMACHC (NG_013378.1), MMADHC (NG_009189.1), LMBD1 (NG_016012.1), TCN2 (NG_007263.1), PCCA (NG_008768.1), PCCB (NG_008939.1), SUCLG1 (NG_016755.1)
CUD	motja privzema karnitina	SLC22A5 (NG_008982.1)
CPT 1	pomanjkanje karnitinske palmitoiltransferaze 1	CPT1A (NG_011801.1)
CPT 2	pomanjkanje karnitinske palmitoiltransferaze 2	CPT2 (NG_008035.1), SLC25A20 (NG_008171.1)

## 6. Zaključek

Širitev programa presejalnega testiranja novorojencev z uveljavljenimi metodami (MS/MS) je nujna, da Slovenija med prvimi državami jugovzhodne Evrope stopi v korak z razvitim svetom, saj je po ocenjeni incidenci prirojnih bolezni metabolizma z njimi povsem primerljiva. Rezultati analiz po svetu in pri nas kažejo, da znanje in tehnologija za samostojno genetsko presejalno testiranje novorojencev za bolezni presnove trenutno še nista dovolj razvita za uvedbo v nacionalne javno-zdravstvene programe. Kljub temu pa tehnologija NGS sklopljena z uveljavljenimi metodami presejalnega testiranja novorojencev, še posebej tandemska masna spektrometrija, predstavlja ustrezno orodje za potrjevanje genetskega ozadja identificiranih bolnikov in razločevanja med lažno pozitivnimi in mejnimi rezultati presejalnega testiranja. Jasno pa se kaže tudi potreba po etični in pravni ureditvi področja razširjenih genetskih testiranj pred morebitno uvedbo samostojnega genetskega presejalnega testiranja novorojencev.

## Literatura

1. Ezgu F. Inborn errors of metabolism. *Adv Clin Chem.* 2016 Jan 23;73:195–250.
2. Mak CM, Lee H-CH, Chan AY-W, Lam C-W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013 Nov;50(6):142–162.
3. SSIEM :: Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism [Internet]. [cited 2017 Aug 13]. Available from: <http://www.ssiem.org/resources/IEC.asp>
4. Vernon HJ. Inborn errors of metabolism: advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatr.* 2015 Aug;169(8):778–782.
5. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963 Sep;32:338–343.
6. Grošelj U, Tansek MZ, Battelino T. Fifty years of phenylketonuria newborn screening - A great success for many, but what about the rest? *Mol Genet Metab.* 2014 Oct;113(1-2):8–10.
7. Šmon A, Grošelj U, Žerjav Tanšek M, Biček A, Oblak A, Zupančič M, et al. Newborn screening in Slovenia. *Zdr Varst.* 2015 Jun;54(2):86–90.
8. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. *Pediatrics.* 2006 May;117(5 Pt 2):S296–307.
9. Grošelj U, Tansek MZ, Šmon A, Angelkova N, Anton D, Baric I, et al. Newborn screening in southeastern Europe. *Mol Genet Metab.* 2014 Oct;113(1-2):42–45.
10. Klančar G, Grošelj U, Kovač J, Bratanič N, Bratina N, Trebušak Podkrajšek K, et al. Universal screening for familial hypercholesterolemia in children. *J Am Coll Cardiol.* 2015 Sep 15;66(11):1250–1257.
11. Schmutz J, Wheeler J, Grimwood J, Dickson M, Yang J, Caoile C, et al. Quality assessment of the human genome sequence. *Nature.* 2004 May 27;429(6990):365–368.
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463–5467.
13. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016 Jan;107(1):1–8.
14. Bahassi EM, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis.* 2014 Sep;29(5):303–310.
15. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 May 17;17(6):333–351.
16. Kovač J, Klančar G, Trebušak Podkrajšek K, Battelino S. Discovering the Unexpected with the Utilization of NGS in Diagnostics of Non-syndromic Hearing Loss Disorders: The Family Case of ILDR1-Dependent Hearing Loss Disorder. *Front Genet.* 2017 Jun 30;8:95.
17. Friedman JM, Cornel MC, Goldenberg AJ, Lister KJ, Sénécal K, Vears DF, et al. Genomic newborn screening: public health policy considerations and recommendations. *BMC Med Genomics.* 2017 Feb 21;10(1):9.
18. Howard HC, Knoppers BM, Cornel MC, Wright Clayton E, Sénécal K, Borry P, et al. Whole-genome sequencing in newborn screening? A statement on the continued importance of targeted approaches in newborn screening programmes. *Eur J Hum Genet.* 2015 Dec;23(12):1593–1600.
19. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the

- American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405–424.
20. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016 Aug 18;536(7616):285–291.
21. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017 Jun;136(6):665–677.
22. Schulz WL, Tormey CA, Torres R. Computational approach to annotating variants of unknown significance in clinical next generation sequencing. *Lab Med.* 2015;46(4):285–289.
23. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2016 Jan;24(1):2–5.
24. Hehir-Kwa JY, Claustres M, Hastings RJ, van Ravenswaaij-Arts C, Christenhusz G, Genuardi M, et al. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet.* 2015 Dec;23(12):1601–1606.

# *Raziskovalna dejavnost v konsolidirani laboratorijski službi*

---

**Laboratory consolidation – benefits and pitfalls**

*Dunja Rogić*

**Vloga laboratorija pri odkrivanju akutne ledvične okvare**

*Aleš Jerin, Milan Skitek*

**Elementi v sledovih v semenski tekočini neplodnih moških**

*Alenka France Štiglic, Alenka Sešek Briški, Branko Zorn*

**Določitev prostih lahkih verig kapa in lambda v likvorju - njihova  
uporabnost**

*Mladen Krsnik*



## Laboratory consolidation – benefits and pitfalls

**prof. dr. Dunja Rogić**

*Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Zagreb and Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb, Croatia*

### Abstract

*Consolidation, enabled by rapid development of automation, point-of-care testing and information technology, represents nowadays an inevitable driving force in laboratory medicine. Consequently, the pressing cost containment issue needs to be reconciled with the maintaining and improving the quality of service. Consolidation process both within and beyond a single institution requires careful planning and project management in terms of cost-effectiveness and handling of human resources. Cross-training of technologists needs to be done with precaution since it can turn out to be a double-edged sword compromising patient safety. In terms of regional consolidation, the extent of laboratory network within a country needs to be adjusted in a way that ensures smooth operation of urgent services.*

**Key words:** *laboratory consolidation, information technology, automation*

### 1. Introduction

Laboratory medicine or clinical pathology (as it is called in the US and some other countries) has a great influence on clinical decisions – as emphasized in the well-known '70% claim' which states that about 70% of the most important decisions on admission, discharge, and medication are based on laboratory results<sup>1</sup>.

The days when each hospital ward had its own laboratory somewhere at the end of the same corridor are long gone. Nowadays it is not so common

occurrence anymore that laboratory and clinical staff have daily face-to-face contact, which in some instances may predispose both parties to insufficient communication and misunderstandings. Laboratories are becoming more and more centralized, functioning as more or less efficient number factories and need not necessarily be located under the same roof with clinical departments or even at the same hospital grounds. Rapidly developing information technology has filled this geographical gap and by and large replaced direct contact between laboratory and its users with computer-based electronic request forms and paperless report sending.

General trends in clinical medicine worldwide are well known: the ageing population burdened with chronic diseases accompanied by lifelong treatment which requires prompt and regular diagnostic services. New drugs as well as new tests are emerging continuously and together they put an almost unbearable financial burden on any health service. The burden in the field of laboratory medicine is created not only by the emergence of new and expensive tests, but also because of increased availability of many previously labor-intensive tests which are nowadays done on automated platforms. Between 1970 and 1990, with the help of automation, computerization of immunoassay and molecular probe techniques, the number of laboratory tests performed annually in the United States grew at an annual rate of more than 12% and accounted for more than 10% of overall health care expenditures.<sup>2</sup> Both the annual growth in test numbers and laboratory medicine percentage in health care costs are slightly less dramatic today, the second drop being the direct consequence of consolidation and the first could be attributed to demand control and rationalisation efforts initiated by the laboratories and/or hospital management.

### 2. Laboratory consolidation pathways and driving forces

The unstoppable rise in clinical medicine costs is driven mainly by the costs of pharmaceuticals and expensive procedures such as transplantation. However, although it now represents less than 5% of overall healthcare costs, within laboratory medicine there is also a pressing issue of cost containment which (rather paradoxically) has to be combined with the need to assure top quality, usually in the form of internationally acknowledged accreditation mark. Besides those costs, in every university hospital laboratory there has

to be room for educational and research activities, which represents further pressure on an already stretched budget. The situation is made all the more difficult by the realization that, despite the emphasis put on rational use of financial resources, clinical guidelines which reflect continued advances in diagnosis and treatment, demand investment in new and often expensive technologies as well as reagents - for example in the case of diagnostics required prior and during administration of constantly emerging new drugs in hematology and oncology.

Traditionally, hospital laboratories have been organized on a departmental basis, belonging to certain hospital wards (internal medicine, pediatrics, oncology, etc.) and subsequently centralizing but with separate divisions, such as hematology, coagulation, chemistry, urines, hormones, proteins, immunology, etc. It is still common in the larger institutions situated in our country not to have any cross-training between laboratory departments, i.e. the technologists are never subjected to rotation from one working area to the other. In the view of modern consolidated laboratory, this creates inevitable inefficiencies in productivity. The goal of a successful centralization or consolidation must be to change the way in which work is done in the laboratory and this involves changing not only the analytical instruments and processes, but also the job structure and description, which ultimately means changing the way people think about their work. This is not a process that can be achieved overnight and without considerable difficulties. In the United Kingdom, the Audit Commission review done more than 20 years ago, when those trends were becoming unavoidable, pointed out that pathology staff was slow to change working practices and staff skill mix in response to changes in technology<sup>3</sup>. However, this transition towards staff trained in multitasking is not necessarily a clear-cut improvement and leaves room for questions since laboratory services by definition are not and cannot be regarded as pure production. There is always a fine balance between increasing productivity and maintaining the same quality of service, with quality being of prime importance in our field of work which has a direct and therefore potentially detrimental impact on patient safety. Is the same technologist really able to equally deal with a tricky hematology, coagulation, chemistry, immunochemistry or urine sample? If the laboratory becomes a faceless number factory where technologists are on constant rotation, how can errors be prevented? Autovalidation and close monitoring of remaining reports by laboratory specialists is one of the solutions, where dedicated specialists can deal with interpretation, point at the preanalytical issues and

generally steer clinician's reaction in the right direction by putting comments on laboratory reports. Recent IFCC position paper on assuring quality of interpretative comments in clinical chemistry sheds new light on possible benefits and pitfalls of this approach<sup>4</sup>.

In spite of these considerations, laboratory medicine cost savings everywhere in the world invariably ask for consolidation of separate laboratory departments with subsequent creation of central core laboratories. Further savings within the core laboratory are achieved by introducing automatic preanalytical solutions. This issue also needs to be considered carefully since preanalytical equipment inevitably comes with additional costs which must be offset by diminished staff number required in specimen handling as well as better quality and standardization.

Consolidation and potential technologist cross-training happen as a consequence of automation. Although, as mentioned above, there is an inherent potential danger in these trends, there are also unquestionable benefits included, and not only in terms of budget management. Particularly in clinical chemistry, tiring and monotonous preanalytical, analytical and postanalytical manual tasks such as endless loading and unloading of centrifuges and analyzers as well as making aliquot tubes and dilutions all represent the operations now amenable to automation. Immunochemistry automation and particularly automation of previously isotopic assays have immensely improved staff safety while the availability of tests has thus become widespread with greatly diminished test turnaround times.

Laboratory consolidation and centralization has another inevitable consequence – the rise in the demand and need for point-of-care testing (POCT)<sup>5</sup>. Indeed, the spread and development of reliable point-of-care testing instrumentation have been spectacular in the last decade since, with 11% annual growth, POCT doubles the numbers predicted for growth of central laboratory testing<sup>6</sup>. It has enabled decentralization of testing well beyond the traditional boundaries of the hospital setting, yet it has also firmly established its role within the hospital wards, adding another cost item to laboratory testing budgets. The underlying theory is that such testing, although much more expensive when regarded as unit cost per test, decreases the overall costs of patient care. Although this view is often taken for granted as an unquestionable fact, as yet there has not been much hard evidence which supports it, as shown by the systematic survey done recently<sup>7</sup>.

Rough analysis of POCT costs in our hospital shows that it now amounts to between 5-10% of overall laboratory testing budget, in addition to the cost of maintaining dedicated laboratory technologist and POCT supervisor.

### 3. Regional consolidation

Further cost containment approaches include regionalization of laboratory services with the creation of core laboratories serving more than one hospital or health care center<sup>8</sup>. In Croatia, this process has begun at the primary care level, largely due to severe lack of professional staff needed to maintain the current laboratory network. Whether the country hospital network will follow the same path remains to be seen. The process of merging laboratories is a very complex one, entails careful planning and cannot be done easily, which can be testified by anyone who has ever attempted it. Economics and common sense are often confronted with strong forces such as habit, fear of change, and individual feelings of worth and self-importance. The additional factor is the security of jobs and positions in public sector, so careful planning must be done with regard to current workforce job descriptions and future hiring policies. When consolidating laboratories, urgent services must be considered first, their needs fulfilled and taken into account. Other non-urgent tests covered by automated core laboratories need to be located in a place within easy reach of all parties involved. The best location that may be carefully chosen for the core laboratory will fail if transport issue is not solved properly. The prerequisite for such consolidated labs to be cost-effective is to process at least 1000-1500 patients per day, which often means acquiring the samples from several hospitals. As an example, University Hospital Zagreb which is the largest hospital in Croatia, deals with about 1200 patients (and about three times as many samples) on a daily basis. In consolidated laboratory services, the price per test becomes lower through avoiding the costly duplication of both services and equipment across different hospitals. The capacity of consolidated laboratories depends on the requirements and configuration, but it starts from about 10 000 tests per day up to any number needed. This pertains to all laboratory tests which are not urgent (around 80% of all requests) and for which the results are expected within the time frame of more than one hour, usually during working hours or on the next day. As already said, all urgent laboratory

tests remain to be done on site in order to reach the desired turnaround time, usually 60 minutes. However, they should represent not more than 20% of the laboratory workload as a whole. All the other samples can be transported to the regional core laboratories which process the samples with considerable speed and efficiency in terms of staff and consumables. Of course, the prerequisite for such an organization is to establish a functioning and reliable *on-line* connection of all the participating hospitals in order to send the results electronically. Also, the transport of samples must be organized accordingly and without interruption, preferably on a daily basis (365 days/year).

Highly differentiated and specialized laboratory tests (molecular tests, flow cytometry, HPLC, inherited metabolic disorders, newborn screening, specialized immunology, etc.) should be focused within one or several university hospital laboratories, but without unnecessary duplication.

### 4. Conclusion

Advances in medical science and technology, together with emerging new drugs that require laboratory support will ensure indispensability and further need for adequate and timely laboratory services within the practice of medicine in the coming decades of the 21st century. It is not entirely clear how two seemingly opposing trends in laboratory medicine will be reconciled— on one hand there is academic laboratory medicine with its emphasis on teaching and research, careful quality control, individual results consideration and specialist counselling, while on the other hand there is pragmatic and business approach with emphasis on effective production<sup>9</sup>. The predominance in such an environment depends on the ability to add value, which means to prove itself as an indispensable step in clinical care. In reality, the solution will be found somewhere halfway – laboratory specialists need to strive at remaining both productive and cost-effective, while at the same time attentive to detail and supportive when needed<sup>10</sup>. It can only be achieved with full use and expertise in all the achievements of laboratory science and information technology.

## References

1. Hallworth MJ. The 70% claim – what is the evidence base? *Ann Clin Biochem* 2011; 48: 487-488.
2. Burke MD. Laboratory medicine in the 21st century. *Am J Clin Pathol* 2000; 114(6): 841-846.
3. Price CP, Barnes IC. Laboratory medicine in the United Kingdom: 1948-1998 and beyond. *Clin Chem Acta* 1999; 290(1): 5-36.
4. Vasikaran S, Sikaris K, Kilpatrick E, French J, Badrick T, Osypiw J, Plebani M. Assuring the quality of interpretative comments in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(12): 1901-1911.
5. Rogić D. Point of care testing management in a teaching hospital. *Int Hosp* 2011; 37: 26-28.
6. Bowman C, Hamili T. Assuring quality in point of care testing. *Arch Path Lab Med* 2012; 136: 472-473.
7. Pecoraro V, Germagnoli L, Banfi G. Point-of-care testing: where is the evidence? A systematic survey. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 313-324.
8. Streitberg GS, Bwititi PT, Angel L, Sikaris K. Automation and expert systems in a core clinical chemistry laboratory. *JALA* 2009; 14: 94-105.
9. Plebani M. Clinical laboratories: production industry or medical services? *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(7): 995-1004.
10. Mussap M. An alternative perspective on how laboratory medicine can contribute to solve the health care crisis: a model to save costs by acquiring excellence in diagnostic systems. *Clin Chim Acta* 2014; 427: 202-204.

## Vloga laboratorija pri odkrivanju akutne ledvične okvare

/ The role of laboratory in detection of acute kidney injury /

doc. dr. Aleš Jerin<sup>1</sup>, dr. Osama Mosa<sup>2</sup>, doc. dr. Jurij Matija Kališnik<sup>3</sup>, prof. dr. Janez Žibert<sup>4</sup>, izr.prof. dr. Milan Skitek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana;

<sup>2</sup> Department of Public Health, Health Science College at Lieth, Umm Al Qura University, KSA;

<sup>3</sup> Klinični oddelek za kirurgijo srca in ožilja, Univerzitetni klinični center Ljubljana;

<sup>4</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani.

### Povzetek

Akutna ledvična okvara (AKI) je pogost zaplet, ki lahko pomembno poslabša preživetje pacientov predvsem na intenzivnih oddelkih. Odkrivanje AKI in opredelitev stopnje okvare še vedno temelji predvsem na meritvah kreatinina v serumu. V zadnjem času so bili ovrednoteni še drugi serumski označevalci: cistatin C kot označevalec glomerulne funkcije in lipokalin povezan z nevtrofilno gelatinazo (NGAL) kot označevalec okvare tubulov.

Med pomembnimi vzroki za nastanek AKI so srčne operacije z zunajtelesnim krvnim obtokom (ZTO), odkrivanje nastajanja okvare že v zgodnji fazi je zato velikega pomena za optimalno obravnavo. V okviru našega raziskovalnega dela smo se osredotočili na dva manj raziskana potencialna serumska označevalca AKI pri operacijah: s cisteinom bogato beljakovino 61 (CYR61) in klotho, v pilotni študiji smo ugotovili spremembe serumske koncentracije že dve uri po operaciji. Oba označevalca bi lahko bila uporabna za odkrivanje pacientov z višjim tveganjem.

**Ključne besede:** akutna ledvična okvara, biooznačevalci, s cisteinom bogata beljakovina 61 (CYR61), klotho.

### Abstract

Acute kidney injury (AKI) is a frequent complication that can significantly increase mortality, especially in intensive care units. The diagnosis and classification of AKI is still based on the measurement of creatinine in serum. Recently, other serum biomarkers of AKI have been evaluated like cystatin C as a marker of glomerular function and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of tubular damage.

One of the important causes of AKI is cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB), therefore detecting of AKI in early phase is essential for optimal treatment. In our research work, we focused on two serum markers of AKI in surgery, which had been less frequently studied: cystein-rich protein 61 (CYR61) and klotho. In the pilot study we found changes of serum concentration as early as two hours after the surgery. Both markers might be useful to identify high-risk patients after cardiac surgery.

**Key words:** acute kidney injury, biomarkers, cystein-rich protein 61 (CYR61), klotho.

### 1. Uvod

Akutna ledvična okvara (AKI) predstavlja veliko težavo predvsem na intenzivnih oddelkih, kjer lahko pomembno poslabša preživetje pacientov (1). Nastane kot posledica različnih vzrokov, npr. ob dehidraciji, krvavitvah, znižanju efektivnega volumna obtoka, sepsi, vplivih zdravil. Večje operacije, kot so operacije srca z zunajtelesnim krvnim obtokom (ZTO), predstavljajo pomembno tveganje za nastanek AKI (2), odkrivanje nastajanja okvare že v zgodnji fazi je pri takšnih zapletih velikega pomena za pravočasno obravnavo.

#### 1.1 Odkrivanje AKI

Odkrivanje AKI in opredelitev stopnje okvare temelji predvsem na meritvah kreatinina v serumu, ki še vedno predstavlja zlati standard in je kot tak vključen tudi v najnovejših KDIGO kriterijih za klasifikacijo AKI (3). Zaradi zadržkov, ki so povezani s specifičnostjo kreatinina in predvsem z njegovimi



omejitvami pri zgodnjem odkrivanju AKI, se kreatininu v zadnjem času pridružujejo tudi drugi serumski označevalci, npr. cistatin C, ki je označevalec glomerulne funkcije in tudi lipokalin povezan z nevtrofilno gelatinazo (NGAL) kot označevalec okvare tubulov (4).

Cistatin C je inhibitor cisteinskih proteinaz, nastaja v jedrnih celicah in se izloča v krvni obtok. Pri prehodu skozi ledvice se v glomerulih filtrira, zatem pa se skoraj popolnoma razgradi v tubulih. Kot označevalec glomerulne funkcije je priporočen pri oceni kronične ledvične okvare (3). NGAL je glikoprotein iz družine lipokalinov, ki se izloča predvsem iz nevtrofilcev, nastaja pa tudi v ledvičnih tubulih. V serumu se pojavlja kot 25 kDa velik monomer, kot homodimer in tudi kot heterodimer, kjer je vezan z gelatinazo-B (5). Oba omenjena označevalca smo preučevali tudi v naših raziskavah in potrdili njuno vlogo pri zgodnjem odkrivanju AKI pri operacijah srca z ZTO (6, 7, 8). Za klinično uporabnost pa še vedno ostaja odprtih nekaj vprašanj, kot je postavitve mejnih vrednosti za interpretacijo izmerjenih koncentracij in postavitve optimalnega časovnega okvira za meritve. Na te izzive želimo odgovoriti v nadaljevanju naše raziskave, kjer bo pri operacijah srca z ZTO vključena večja skupina pacientov. Pri NGAL se pojavlja še problem specifičnosti: v plazmi na zvišanje poleg okvare tubulov vplivajo tudi dejavniki, ki zvišajo izločanje iz nevtrofilcev in drugih celic. Alternativno predstavlja meritev koncentracije NGAL v urinu (9), kjer pa je potrebno upoštevati težave pri pridobivanju reprezentativnega vzorca.

## 1.2 Novejši označevalci AKI

Na področju novejših označevalcev AKI je bilo v zadnjem času opravljenega ogromno raziskovalnega dela. V ospredju je iskanje zgodnjih pokazateljev AKI, poleg tega pa so zanimivi tudi označevalci, ki bi napovedali stopnjo okvare ter dodali informacije o vzrokih in intenzivnosti patofizioloških procesov. Dodatno izboljšavo bi lahko prinesle kombinacije več označevalcev. Med bolj raziskovanimi kandidati novejših označevalcev AKI so npr. tkivni inhibitor metaloproteinaz 2 (angl. tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2), vezalna beljakovina 7 inzulinskega rastnega faktorja (angl. Insulin-like growth factor-binding protein 7, IGFBP-7), molekula za odkrivanje ledvičnih okvar 1 (angl. kidney injury molecule-1, KIM-1), Interlevkin 18, jetrna oblika vezalne beljakovina za maščobne kisline (angl. liver type-fatty acid binding

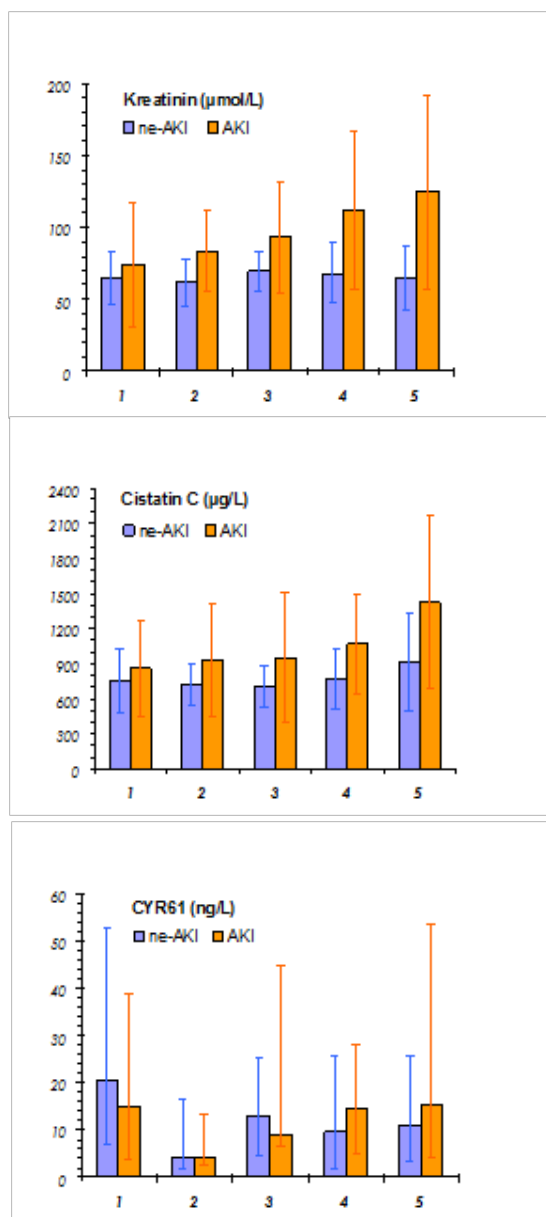
protein, L-FABP), proenkefalin (10). V okviru našega raziskovalnega dela smo se osredotočili na dva manj raziskana potencialna serumska označevalca AKI pri operacijah: s cisteinom bogato beljakovino 61 (angl. cystein-rich protein 61, CYR61) in klotho.

CYR61 je izvenselična molekula, ki se izloča pri mnogih fizioloških procesih (11), zvečano izločanje je povezano tudi z vnetjem in poškodbami tkiva (12, 13) ter hipoksičnimi stanji (14). Pri miših so ugotovili, da se posledice vnetja po ishemični AKI zmanjšajo pri znižanju nivoja CYR61 (15). Po ledvičnih okvarah so pri ljudeh koncentracijo CYR61 merili v urinu, kjer so zvišanje zasledili že v prvih urah po okvari (16), medtem ko serumski CYR61 v povezavi z AKI še ni raziskan.

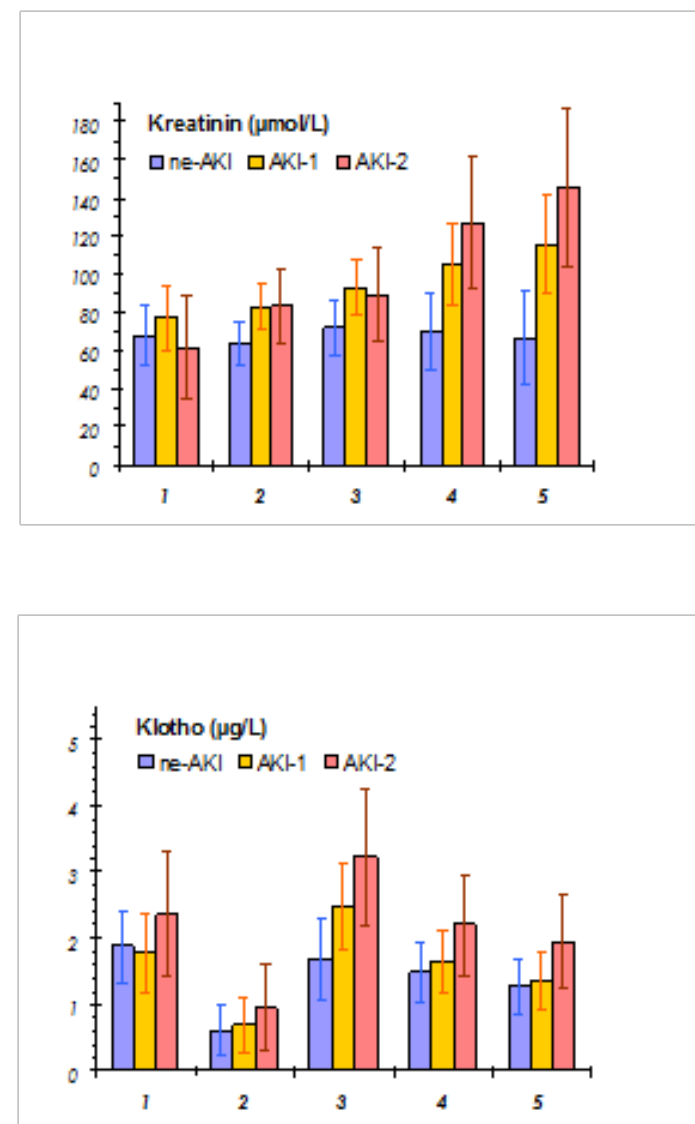
Klotho je prisoten predvsem v ledvičnih tubulih, nahaja pa se tudi v možganih, obščitnični žlezi srcu in številnih drugih tkivih. Po strukturi je transmembranska beljakovina, ki deluje kot receptor za fibroblastni rastni faktor 32. V krvnem obtoku je prisotna topna oblika klotho, ki nastane z odcepom izvenseličnega dela molekule (17). Vloga klotho pri patofiziologiji AKI še ni dokončno pojasnjena. Akutna ishemija, oksidativni stres in nekateri drugi dejavniki povzročijo znižanje nivoja klotho, kar naj bi povečalo izpostavljenost za okvaro (18). Nekateri menijo, da klotho deluje zaščitno (19), saj zmanjša oksidativni stres in preprečuje apoptozo (20). Pri živalih so po okvari ledvičnih tubulov ugotovili prehodno znižanje nivoja klotho, ki se je po regeneraciji ledvic normaliziralo (21, 19). Pri ljudeh se izražanje klotho ob AKI zmanjša, zmanjšanje pa je povezano s stopnjo okvare (22).

## 2. Metode in rezultati

Pomen serumskih koncentracij CYR61 in klotho kot potencialnih zgodnjih označevalcev AKI pri operacijah srca z ZTO smo ugotavljali v naši raziskavi, kjer smo spremljali koncentracijo obeh parametrov z ELISA tehnologijo pred, med in po operaciji (23, 24). V prvi fazi smo vključili 50 pacientov, ki so bili na osnovi KDIGO kriterija razdeljeni na skupini z AKI in brez AKI. V nadaljevanju pa smo pri klotho podrobneje opredelili razdelitev v več skupin po stopnjah AKI (25). Poleg CYR61 in klotho smo izmerili tudi serumsko koncentracijo kreatinina in cistatina C pred operacijo in ob štirih časih po operaciji do vključno drugega dne po operaciji. Dobljeni rezultati so prikazani na slikah 1–5.



**Slike 1–3:** Kreatinin, cistatin C in CYR61 v serumu. 1: pred operacijo; 2: ob zaključku ZTO; 3: dve uri po zaključku ZTO; 4: prvi dan po operaciji; 5: 48 drugi dan po operaciji.



**Sliki 4 in 5:** Kreatinin in klotho v serumu. 1: pred operacijo; 2: ob zaključku ZTO; 3: dve uri po zaključku ZTO; 4: prvi dan po operaciji; 5: 48 drugi dan po operaciji.

### 3. Razprava in sklep

Pri kreatininu in cistatinu C so rezultati skladni z uveljavljenimi spoznanji, gre za zanesljiva označevalca AKI, ki pa se odzoveta z zamikom. Značilno zvišanje koncentracije smo pri obeh izmerili šele prvi dan po operaciji. Serumska koncentracija CYR61 je bila pred operacijo višja v skupini brez okvare, po operaciji je bila višja v skupini z ledvično okvaro. Vendar pa razlike med skupinama niso bile značilne zaradi majhnega števila pacientov in velike razpršenosti rezultatov v skupinah. Med možnimi vzroki za precejšnjo variabilnost vrednosti CYR61 so mnogi dejavniki, ki vplivajo na njegovo nastajanje, npr. poškodba tkiva pri operaciji (13), zmanjšana prekrvavitev ledvic (26) ter vnetni dejavniki (27).

Rezultati meritev serumske koncentracije klotho niso pokazali značilnih razlik med bolniki z in brez AKI. Ob upoštevanju stopnje AKI pa smo že dve uri po operaciji ugotovili značilno razliko pri pacientih z višjo stopnjo okvare (AKI-2), medtem ko se pri blagih oblikah (AKI-1) koncentracija v tem času ni značilno razlikovala od skupine brez okvare (25). Značilne razlike pri koncentraciji kreatinina so se med skupinami pričakovano pojavile šele prvi dan po operaciji. Zaradi majhnega števila pacientov v posameznih skupinah so te ugotovitve le pilotne, raziskava se nadaljuje z vključitvijo večjega števila pacientov. Vlogo klotho pri operacijah srca z ZTO so opisali le še v eni raziskavi, kjer so potrdili razlike med pacienti z AKI in brez AKI (28). Direktno primerjave z našimi rezultati ni možno opraviti, ker raziskovalci pri oblikovanju skupin niso upoštevali stopnje AKI in zato ni znano, koliko pacientov s težjo okvaro je bilo vključenih.

Meritev kreatinina je še vedno osnova za odkrivanje AKI in za opredelitev stopnje okvare. V zadnjem času je bilo ovrednotenih več potencialnih označevalcev, ki bi lahko sami ali v kombinaciji s kreatininom omogočili zgodnejše odkrivanje AKI. Nastajanje posameznih označevalcev sprožijo različne patofiziološke okoliščine, zato bi bilo potrebno mejne vrednosti za uporabo teh označevalcev pri zgodnjem odkrivanju AKI določiti specifično za različne vzroke nastanka AKI. Pri operacijah srca z ZTO je NGAL najbližje rutinski uporabi za zgodnje odkrivanje AKI, medtem ko je pri večini ostalih kandidatov še precej odprtih vprašanj. Cistatin C, ki je priporočen kot označevalec glomerulne funkcije pri oceni kronične ledvične okvare, pri zgodnjem odkrivanju AKI po operacijah ni našel svojega mesta. Za zgodnje

odkrivanje bolnikov, pri katerih bi se po operaciji lahko razvila težja oblika AKI, imata velik potencial CYR61 in predvsem klotho, njuno vrednost pa bo potrebno potrditi v večjih študijah.

Dodatni označevalci prinašajo tudi dodatne stroške, med bodočimi izzivi je zato tudi ocena stroškovne upravičenosti v primerjavi z dosedanjo prakso in ob upoštevanju dodatnih koristi za paciente.

### Literatura

1. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10: 193–207.
2. Pickering JW, James MT, Palmer SC. Acute kidney injury and prognosis after cardiopulmonary bypass: a meta-analysis of cohort studies. *Am J Kidney Dis* 2015; 65: 283–93.
3. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney inter* 2012; 2: (Suppl. 1).
4. Ho J, Tangri N, Komenda P, et al. Urinary, Plasma, and Serum Biomarkers' Utility for Predicting Acute Kidney Injury Associated With Cardiac Surgery in Adults: A Meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2015; 66: 993–1005.
5. Makris K, Rzos D, Kafkas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a new biomarker in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 1519–32.
6. Kališnik JM, Hrovat E, Hrastovec A, et al. Creatinine, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, and Cystatin C in Determining Acute Kidney Injury After Heart Operations Using Cardiopulmonary Bypass. *Artif Organs* 2017; 41: 481–489.
7. Kališnik JM, Jerin A, Žibert J, et al. Determination of Acute Kidney Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Cystatin C Offers Precise and Prompt Identification of Patients at Risk of Prolonged Manifest Kidney Dysfunction after Heart Operations Using Cardiopulmonary Bypass. *Thorac Cardiovasc Surg* 2017; 65(S 01): DOI: 10.1055.
8. Jerin A, Kališnik JM, Snoj N, et al. NGAL as diagnostic marker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2014; 52: S1052.
9. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem* 2014; 51: 335–51.
10. Ostermann M, Joannidis M. Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup. *Crit Care* 2016; 20: 299. DOI: 10.1186.
11. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 2004; 363: 62–4.
12. Jun JI, Lau LF. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 945–63.
13. Hviid BVC, Pripp HA, Aasen OA, et al. Postoperative Accumulation of CYR61/CCN1 in Surgical Wound Fluid Precedes Cytokine Activation and is Disparate from Systemic Alterations. *J Infect Dis Ther* 2014; 2: 6. DOI: 10.4172.
14. Quan T, He T, Shao Y, et al. Elevated Cysteine-Rich Mediates Aberrant Collagen

- Homeostasis in Chronologically Aged and Photoaged Human Skin. *Am J Pathol* 2006; 169: 482–90.
15. Lai CF, Lin SL, Chiang WC, et al. Blockade of Cysteine-rich Protein 61 Attenuates Renal Inflammation and Fibrosis after Ischemic Kidney Injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014; 307: 581–92.
  16. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, et al. Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 2002; 62: 1601–10.
  17. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev* 2015; 36: 174–93.
  18. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2650–7.
  19. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia–reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int* 2010; 78: 1240–51.
  20. Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 60–8.
  21. Hu MC, Moe OW. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 423–9.
  22. Seo MY, Yang J, Lee JY, et al. Renal Klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury. *Korean J Intern Med* 2015; 30: 489–95.
  23. Mosa OF, Skitek M, Kalisnik JM, et al. Evaluation of serum cysteine-rich protein 61 and cystatin C levels for assessment of acute kidney injury after cardiac surgery. *Ren Fail.* 2016; 38: 699–705.
  24. Mosa OF. The role of Klotho and CYR61 proteins in early diagnosis of acute kidney injury after cardiac surgery. Doctoral thesis. Ljubljana, 2016.
  25. Jerin A, Mosa OF, Kalisnik JM, et al. Klotho in serum - a potential marker of acute kidney injury after surgery. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(Suppl.): S790.
  26. Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem* 2015; 52: 193–205.
  27. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, et al. The CCN family: a new class of inflammation modulators. *Biochimie* 2011; 93: 377–88.
  28. Liu YJ, Sun HD, Chen J, et al. Klotho: a novel and early biomarker of acute kidney injury after cardiac valve replacement surgery in adults. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 7351–8.

## Elementi v sledovih v semenski tekočini neplodnih moških

/ Trace elements in seminal plasma of infertile men /

asist. mag. Alenka France-Štiglic<sup>1</sup>, mag. Alenka Sešek Briški<sup>2</sup>,  
Jure Klanjšček<sup>2</sup>, izr.prof. dr. Branko Zorn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Njogoševa 4, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Štajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

### Povzetek

Neplodnost prizadene približno vsak sedmi par, pri približno polovici neplodnih parov je vzrok neplodnost pri moškem. Raziskave kažejo, da se je kakovost semena v zadnjih letih poslabšala. Moška neplodnost je kompleksna bolezen, v njeno patogenezo so vpleteni številni faktorji tveganja, med katere sodijo tudi okoljski dejavniki. Številne študije kažejo, da izpostavljenost organizma težkim kovinam pri moškem povzroča neplodnost ali slabšo plodnost. Namen raziskave je bil v semenski tekočini 80 moških z oligoastenoteratozoospermijo (OAT) ali z nepojasnjeno neplodnostjo določiti 26 esencialnih in toksičnih elementov v sledovih in ugotoviti njihove povezave s spremembami skupne gibljivosti, koncentracije in morfologije semenčic.

**Ključne besede:** neplodnost, elementi v sledovih, toksični elementi, esencialni elementi, induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo, semenska tekočina

### Abstract

Infertility affects approximately every seventh couple and in about half of the cases men contribute to couple's infertility. Male infertility is a multifactorial

complex disease with many possible risk factors among which are also environmental factors. Exposure to toxic trace elements may result in the decline of semen quality and male infertility or limited fertility potential. In our study we observed 26 essential and toxic elements in seminal plasma of 80 men with oligoasthenoteratozoospermia or unexplained infertility with normal semen and their correlation with total sperm motility, concentration and with morphological changes.

### 1. Uvod

Neplodnost se pojavlja pri 10-14 % parov. Pri 50-60 % neplodnih parov je vzrok za neplodnost pri moškem, od tega je pri 30 % parov vzrok samo pri moškem, pri 20-30 % parov pri moškem in ženski. Dve slovenski študiji sta podobno kot drugod po svetu pokazali, da se je v obdobjih 1983-1996 (1) in 2001-2010 (2) kakovost semena poslabšala. Diagnostika moške neplodnosti poleg anamneze in telesnega pregleda obsega tudi pregled semenske tekočine. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je leta 2010 izdala kriterije s katerimi na osnovi pregleda semenske tekočine lahko moške opredelimo kot plodne ali neplodne (3). Glavne patologije, ki vodijo do neplodnosti so: slabo spuščeno modo, varikokela, vnetje, kromosomske napake in okoljski dejavniki.

Številne eksperimentalne in epidemiološke študije so pokazale, da izpostavljenost organizma težkim kovinam vpliva na reprodukcijske sposobnosti in pri moškem povzroča neplodnost ali slabšo plodnost, zmanjšano količino in kakovost semenske tekočine. Vpliv je odvisen od številnih dejavnikov kot so fizikalno-kemična oblika elementa, ki mu je organizem izpostavljen, njegove doze, trajanja in poti izpostavljenosti, distribucije, akumulacije in podobno (4).

Zaradi široke razširjenosti v okolju je splošna populacija izpostavljena nizkim koncentracijam toksičnih elementov, ki jih v telo vnaša z hrano, vodo in zrakom. Izpostavljenosti toksičnim elementom v zgodnjem obdobju spermatogeneze ima lahko dolgotrajne posledice na kakovost semena, v času nastajanja semena pa so učinki bolj prehodni. Za elemente v sledovih kot so svinec, kadmij, baker in cink je znano, da vplivajo na kakovost semena (5). Prisotnost svinca, kadmija, molibdena v semenski tekočini povezujejo z negativnimi spremembami gibljivosti, koncentracije in morfologije semenčic (6, 7). Z zmanjšano gibljivostjo semenčic povezujemo tudi arzen in živo



srebro. Zaradi velike razširjenosti v okolju se v zadnjem času na področju neplodnosti posveča pozornost tudi drugim elementom kot so antimon, vanadij, antimon, litij in uran. Med esencialne elemente v sledovih, ki imajo največji vpliv na plodnost, sodijo cink, baker, selen, krom in kobalt, ki pozitivno vplivajo bodisi na gibljivost, morfologijo ali koncentracijo spermijev (5). Kljub esencialnosti imajo lahko ti elementi v visokih koncentracijah negativne učinke na nastajanje semena (4).

Vendar nekatere raziskovalne skupine niso potrdile povezav med elementi in kakovostjo semenčic (8, 9).

## 2. Materiali in metode

Namen študije je bil določiti vrednosti 26 elementov v sledovih (litij, berilij, magnezij, vanadij krom, mangan, železo, kobalt, baker, cink, galij, arzen, selen, rubidij, stroncij, molibden, kadmij, kositer, antimon, cezij, barij, zlato, živo srebro, talij, svinec in uran) v semenski plazmi z metodo induktivno sklopljene plazme z masno spektrometrijo (ICP-MS) in ugotoviti, ali se razlikujejo med plodnimi in neplodnimi moškimi in so lahko vzrok za slabšo kakovost semena v Sloveniji.

### 2.1. Preiskovanci

Analizirali smo semensko tekočino 80 moških (med 22 in 44 let) z oligoastenoteratozoospermijo (OAT) ali z nepojasnjeno neplodnostjo z normalnim semenom in brez vzroka za moško neplodnost (brez slabo spuščene moda, varikokele ali vnetja), ki obiskujejo Oddelek za andrologijo Kliničnega oddelka za reprodukcijo Ginekološke klinike in ne jemljejo snovi za izboljšanje kakovosti semena, obenem pa pri njihovih partnericah mlajših od 38 let ni vzroka za neplodnost.

### 2.2. Klasična analiza semena (spermiogram) in priprava semena

Po standardnih postopkih smo po priporočilih SZO določili v semenu koncentracijo, število, skupno gibljivost in morfologijo semenčic z uporabo strogih kriterijev.

### 2.3. Določitev elementov v sledovih v semenski plazmi

Semensko tekočino smo 10 minut centrifugirali pri 3000 x g in odpipetirali supernatant. Vzorce semenske plazme smo do analize hranili na -20°C.

Pred analizo smo vzorce odmrznili za sobni temperaturi in jih v razmerju 1:10 razredčili z 0,26% raztopino amonijevega hidroksida z dodatkom butanola, Tritona X in EDTA. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na aparatu ICP-MS (Agilent 7700x, Japonska). Umeritveno krivuljo smo naredili s 14 standardi v območju od 0,125 do 7500 µg/L, ki smo jih pripravili z razredčitvami iz multielementnih standardnih raztopin: IV-STOCK-27, IV-STOCK-57, MSAU-10PPM (Inorganic Ventures) in Hg calibration standard (Merck). Razredčene standarde smo pred analizo pripravili z raztopino amonijevega hidroksida na enak način kot semensko plazmo.

Za kontrolo kakovosti smo uporabljali kontrolni material Seronorm Trace Elements (serum L-1, whole blood L-1, whole blood L-2 in urine L-2) proizvajalca SERO (Norveška), ki smo ga pred analizo pripravili na enak način kot vzorce semenske plazme. Kontrolni material smo analizirali na začetku serije (po kalibraciji), med serijo na vsakih 10 vzorcev in na koncu serije.

### 2.4. Statistika

Za statistično analizo smo uporabili program IBM SPSS Statistics version 21. Za ugotavljanje razlik v koncentraciji elementov med plodnimi in neplodnimi preiskovanci ter preiskovanci z oligozoospermijo in normozoospermijo smo uporabili Mann-Whitney U test. Za ugotavljanje vpliva elementov v sledovih na koncentracijo, število, skupno gibljivost in morfologijo semenčic ter volumen semenske tekočine smo uporabili metodo regresije in analizo z multiplo regresijo.

## 3. Rezultati in diskusija

V skupini preiskovancev smo iskali korelacije med koncentracijami elementov v sledovih in:

1. značilnostmi semenčic: posebej s številom, s skupno gibljivostjo, normalno morfologijo
2. podskupinama plodnih in neplodnih moških, ki smo jih v podskupini

razvrstili glede na število, skupno gibljivost in normalno morfologijo semenčic.

V skupino plodnih je bilo razvrščenih 56 preiskovancev, v skupino neplodnih pa 24. Povprečna starost v skupini plodnih je bila 32,5 let (SD = 4,9), v skupini neplodnih pa 33,5 let (SD = 5,2). Skupini se po starosti nista pomembno razlikovali ( $p = 0,411$ ).

Statistična obdelava podatkov je pokazala, da se skupini glede na koncentracije določenih elementov v sledovih v semenski plazmi ne razlikujeta (**Preglednica 1**). To lahko pripišemo dejstvu, da preiskovanci toksičnim elementom niso bili zelo izpostavljeni kar lahko sklepamo iz nizkih koncentracij toksičnih elementov v semenski plazmi.

**Tabela 1.** Koncentracije elementov v sledovih v semenski plazmi neplodnih in plodnih moških.

element	NEPLODNI		PLODNI		p*
	mediana (µg/L)	25. - 75. percentil (µg/L)	mediana (µg/L)	25. - 75. percentil (µg/L)	
litij	3,41	1,14 - 4,93	2,26	0,538 - 4,22	0,221
berilij	0,009	0,005 - 0,017	0,011	0,007 - 0,021	0,334
magnezij	66891	43798 - 115306	74971	56005 - 113290	0,578
vanadij	0,021	0,006 - 0,045	0,025	0,009 - 0,039	0,0652
krom	0,397	0,200 - 0,72	0,358	0,093 - 0,608	0,437
mangan	3,89	2,70 - 5,86	3,84	3,08 - 6,33	0,644
železo	99,4	76,8 - 129,2	112,4	84,8 - 141,5	0,101
kobalt	0,192	0,11 - 0,295	0,163	0,11 - 0,22	0,698
baker	56,9	43,2 - 78,2	55,1	44,0 - 76,7	0,867
cink	119621	57694 - 175163	134189	88209 - 185648	0,413
galij	0,018	0,009 - 0,030	0,017	0,002 - 0,028	0,556
arzen	0,332	0,182 - 0,931	0,477	0,274 - 1,04	0,367
selen	35,5	25,2 - 55,8	43,3	32,9 - 52,4	0,197
rubidij	1346	1145 - 1593	1455	1134 - 1771	0,384
stroncij	50,6	32,8 - 59,9	46,7	34,6 - 59,1	0,667
molibden	1,29	0,95 - 1,59	1,32	1,08 - 1,65	0,413
kadmij	0,166	0,097 - 0,214	0,109	0,077 - 0,194	0,142
kositer	0,062	0,013 - 0,156	0,072	0,038 - 0,118	0,611
antimon	0,046	0,015 - 0,074	0,033	0,017 - 0,057	0,361

cezij	1,76	1,34 - 2,57	2,10	1,56 - 2,58	0,227
barij	1,07	0,79 - 1,62	0,928	0,77 - 1,54	0,522
zlato	0,005	0,003 - 0,01	0,004	0,003 - 0,007	0,163
živo srebro	0,075	0,04 - 0,137	0,072	0,035 - 0,116	0,858
talij	0,113	0,082 - 0,147	0,105	0,086 - 0,151	0,950
svinec	0,087	0,027 - 0,180	0,158	0,059 - 0,217	0,219
uran	0,004	0,002 - 0,006	0,004	0,002 - 0,008	0,536

\* $p < 0,05$

Ob razdelitvi preiskovancev na tiste z oligozoospermijo in normozoospermijo glede na koncentracijo spermijev smo našli povezave med arzenom, selenom in cezijem. Skupina preiskovancev z normozoospermijo je imela koncentracije teh treh elementov višje kot preiskovanci v skupini z oligozoospermijo (arzen:  $U=267$ ,  $p=0,014$ ; selen:  $U=269$ ,  $p=0,015$ ; cezij:  $U=278$ ,  $p=0,020$ ).

Z metodo regresije nismo našli vpliva svinca, kadmija ali živega srebra tako na skupno gibljivost in koncentracijo semenčic, njihovo skupno število in morfologijo ter volumnom semenske tekočine, kar se sklada z nekaterimi prej objavljenimi študijami (10) in je v nasprotju z drugimi avtorji (11). Zaradi znanega medsebojnega sinergističnega in antagonističnega vpliva elementov, ki se v literaturi pojavljajo kot elementi, ki vplivajo na morfologijo semenčic smo izvedli multiplo regresijo, da bi ovrednotili doprinos svinca, kroma in vanadija k morfološkim spremembam semenčic. Ugotovili smo, da te spremenljivke napovedujejo število semenčic z normalno morfologijo,  $F(3,76)=3,685$ ,  $p=0,016$ ,  $R^2=0,127$ . Doprinos vseh treh spremenljivk je statistično pomemben ( $p < 0,05$ ). Preiskovali smo tudi vpliv arzena, kroma, živega srebra, svinca, vanadija, cinka in magnezija na skupno gibljivost semenčic. Te spremenljivke ne vplivajo signifikantno na skupno gibljivost ( $F(7,71)=0,297$ ,  $p=0,953$ ,  $R^2=0,028$ ). Prav tako nam ni uspelo dokazati skupnega vpliva arzena, kroma, živega srebra, cinka in magnezija na koncentracijo semenčic ( $F(5,74)=0,577$ ,  $p=0,717$ ,  $R^2=0,038$ ).

Nekonsistentnost rezultatov med različnimi študijami lahko pripišemo določitvi elementov pri enem samem odvzemu, saj vemo, da je vpliv okolja na trenutno koncentracijo elementov v sledovih v organizmu zelo velik in nam enkratna določitev daje oceno trenutne izpostavljenosti in ne izpostavljenosti v preteklosti, ki tudi pomembno vpliva na plodnost in kakovost semena. Končni toksični učinek na organski sistem je odvisen tudi od medsebojnega vpliva več elementov, kar smo uspeli dokazati pri skupnem vplivu svinca,

kroma in vanadija na morfološke spremembe semenčic. Zanimivo bi bilo nadaljevat študijo z rekrutiranjem večjega števila pacientov in meritvijo drugih parametrov ocenjevanja kakovosti semena (12).

Vse več je dokazov, da so v semenski tekočini prisotne reaktivne kisikove spojine, ki lahko vplivajo na kakovost in funkcionalnost semenske tekočine. Znano je, da nekateri elementi v sledovih kot so krom, kadmij, baker, vanadij, arzen povzročajo oksidativni stres, nekateri elementi kot sta cink in selen pa imajo antioksidantne aktivnosti. Nivo oksidativnega stresa ni odvisen samo od koncentracije elementov v sledovih ampak tudi od učinkovitosti obrambnega sistema, ki vključuje tako encime (superoksidne dismutaze, peroksidaze, katalaze) kot tudi majhne molekule (npr. glutation in vitamini). Zato v nadaljevanju raziskave nameravamo z oceno prisotnega oksidativnega stresa, antioksidantne kapacitete in določanjem aktivnosti antioksidantnih encimov ovrednotiti vpliv oksidativnega stresa in antioksidantne kapacitete na plodnost in kakovost semena v povezavi z elementi v sledovih.

#### 4. Sklep

V naši raziskavi smo uspeli dokazati vpliv svinca, kroma in vanadija na morfološke spremembe semenčic. Vpliva elementov v sledovih na plodnost in druge parametre s katerimi ovrednotimo kakovost semena nismo zaznali. To lahko pripišemo nizkim koncentracijam toksičnih elementov in relativno majhnemu številu vključenih preiskovancev, zato bi bilo za natančnejše ovrednotenje vpliva nizkih koncentracij toksičnih elementov na plodnost in kakovost semena v nadaljevanju raziskave smiselno vključiti večje število preiskovancev ter ugotoviti skupni učinek koncentracije elementov in antioksidantne sposobnosti posameznikov na plodnost moških.

#### Literatura

1. Zorn B, Virant-Klun I, Verdenik I, Meden-Vrtovec H. Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. *Int J Androl* 1999; 22: 178-83.
2. Malić S, Verdenik I, Kolbezen Simoniti M, Zorn B. Velika retrospektivna študija kakovosti semena med 8.500 slovenskimi moškimi, napotenimi na Ginekološko kliniko v Ljubljani,

- zaradi neplodnosti med letoma 2001 in 2010. *Med Razgl* 2013; 52:53: 307-8. 5. Kongres ginekologov in porodničarjev Slovenije z mednarodno udeležbo. 6.-8. junij 2013, Cankarjev dom, Ljubljana.
3. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed., 2010.
  4. Apostoli P and Catalani M. Effects of Metallic Elements on Reproduction and Development. In: Nordberg et al. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier 2015: 399-423.
  5. Katayama M, Kaneko S, Takamatsu K et al. Determination of trace metals in human seminal plasma using inductively coupled plasma mass spectrometry and multivariate statistical analyses for sperm parameters. *J Mol Biomark Diagn* 2013;4 (3):147.
  6. Telisman S, Colak B, Pizent A et al. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res* 2007;105(2):256-66.
  7. Meeker JD, Rossano MG, Protas B et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: Human evidence formolybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 2008; 116 (11): 1473-1479.
  8. Telisman S, Cvitković P, Jurasović J et al. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000;108(1):45-53.
  9. Jeng AH, Huang YL, Pan CH et al. Role of low exposure to metals as male reproductive toxicants. *Int J Environ Health Res* 2015; 25(4): 405-417.
  10. Mocevic E, Specht IO, Marott JL et al. Environmental mercury exposure, semen quality and reproductive hormones in Greenlandic Inuit and European men: a cross-sectional study *Asian J Androl* 2013 Jan;15(1):97-104.
  11. Noack-Fuller G, De Beer C, Seibert H. Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. *Andrologia* 1993; 25(1): 7-12.
  12. Wang YX, Wang P, Feng W et al. Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity. *Environ Pollut* 2017;224:224-234.

## Določanje prostih lahkih verig kapa v likvorju – njihova uporabnost

/ Determination of Free Light Chain Kappa in Cerebrospinal Fluid – Their Usefulness /

Mladen Krsnik<sup>1</sup>, Vanesa Anadolli<sup>2</sup>, Andreja Emeršič<sup>3</sup>, doc. dr.

Uroš Rotž

<sup>1</sup>UKC Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

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

<sup>3</sup>UKC Ljubljana, Nevrološka klinika, Klinični oddelek za bolezni živčevja

### Povzetek

Laboratorijska diagnostika multiple skleroze je zapletena, saj zaenkrat ne obstaja zanesljiv označevalec v laboratorijski diagnostiki, ki bi lahko specifično opredelil nastalo bolezensko stanje. Zaenkrat se na področju laboratorijske diagnostike MS največ uporablja intratekalna sinteza IgG v likvorju, ki jo lahko opredelimo na različne načine. Zlati standard pri obravnavi bolnikov z MS je še vedno kvalitativno določanje IgG oligoklonlanih trakov s pomočjo izoelektričnega fokusiranja. Obstaja tudi nekaj sklopov preiskav, kjer kvantitativno opredelimo intratekalno sintezo IgG v likvorju, npr. IgG indeks in Reibergram. Poleg sledenja intratekalne sinteze IgG so v razvoju t.i. ne-IgG intratekalne sinteze: IgA, IgM in trenutno najbolj obetajoče, določitev prostih lahkih verig kapa.

Z rutinsko metodo oligoklonlanih trakov in nefelometričnim določanjem prostih lahkih verig kapa v likvorju in serumu (testna metoda) smo primerjali bolnike z multiplo sklerozo in bolnike z nevnetnimi nevrolškimi boleznimi. Testna metoda je pokazala zadovoljivo ujemanje v občutljivosti in specifičnosti v primerjavi z rutinsko metodo.

**Ključne besede:** multipla skleroza, oligoklonlani trakovi, proste lahke verige kapa, likvor, izoelektrično fokusiranje

### Abstract

Laboratory diagnostics of multiple sclerosis is known in its complexity because there is currently no reliable marker in laboratory diagnostics that could specifically identify the disease. For the time being, in the field of laboratory diagnostics of the MS, the intrathecal synthesis of IgG in a cerebrospinal fluid is most often used, which can be defined in different ways. The gold standard in MS diagnostics is still qualitative determination of IgG oligoclonal bands by isoelectric focusing. There are also a number of assays where the intrathecal IgG synthesis in a cerebrospinal fluid is quantified, e.g. IgG index, and Reibergram. In addition to tracing intrathecal IgG synthesis, they are developing, i.e. non-IgG intrathecal synthesis: IgA, IgM and currently the most promising, determination of free light chains kappa.

The routine method of oligoclonal bands and the nephelometric determination of the free light chains kappa in the cerebrospinal fluid and serum (test method) were used in patients with multiple sclerosis and patients with non-inflammatory neurological diseases. The test method showed a satisfactory match in sensitivity and specificity compared to the routine method.

**Key words:** multiple sclerosis, oligoclonal bands, free light chains kappa, cerebrospinal fluid, isoelectric focusing

### 1. Uvod

Multipla skleroza (MS) je kronična avtoimuna vnetna bolezen centralnega živčnega sistema (CŽS) (1). Ob procesu propadajo predvsem ovojnice živčnih vlaken zaradi poškodb in izgube mielina (demielinizacija). V razvitem svetu bolezen prizadene približno 150 bolnikov na 100.000 prebivalcev bele kavkaške rase (2). V Sloveniji je prevalenca ocenjena na približno 100 bolnikov na 100.000 prebivalcev (1, 3).

Limfociti B in imunoglobulini igrajo precejšnje vlogo pri patogenezi multiple skleroze (1). Sodelujejo namreč tako v fazi akutne demielinizacije kot tudi pri napredovanju bolezni (4). Aktivirani limfociti B se namnožijo, del nastalih celic se diferencira v plazmatke, ki izločajo imunoglobuline. V likvorju takrat najpogosteje najdemo imunoglobuline G (IgG) in so zato zelo uporabni v diagnostiki MS (5). Določamo jih lahko kvalitativno ali kvantitativno. Zaenkrat

diagnoza MS temelji na kombinaciji kliničnih simptomov (McDonaldovi diagnostični kriteriji) in rezultatov diagnostičnih preiskav likvorja v klinični kemiji (6).

Skozi pretekla obdobja se je pojavilo kar nekaj kvalitativnih ali kvantitativnih metod za določanje IgG v likvorju. Kljub vsemu tehnološkemu napredku, zlati standard diagnostike MS še vedno ostaja kvalitativna določitev oligoklonalnih trakov IgG v likvorju s pomočjo izoelektričnega fokusiranja (1). Čeprav metoda ni harmonizirana, je dolgotrajna, tehnično zahtevna, nima kvantitativne ocene, je še vedno najbolj razširjena laboratorijska preiskava v diagnostiki MS. V raznih obdobjih so se pojavljale razne kvantitativne metode, ki so v glavnem imele nizko občutljivost in s tem niso bistveno pripomogle k izboljšavi diagnostike obolenja, predvsem v njeni zgodnji fazi. Pri zdravih ljudeh je koncentracija IgG v likvorju nizka. IgG iz seruma v likvor prehaja s pasivno difuzijo. Zvišana koncentracija IgG je lahko zaradi upočasnjene pretoka likvorja oziroma disfunkcije krvno-možganske pregrade ali intratekalne sinteze (prisotnosti limfocitov v likvorju). Da lahko opredelimo vir nastanka IgG oziroma izmerimo količino intratekalne sinteze, obstaja kar nekaj matematičnih pristopov, ki pa poleg likvorskega obvezno potrebujejo tudi serumski vzorec. Omenimo naj dva najbolj uporabna izračuna na slovenskem področju:

- IgG indeks predstavlja linearni pristop in ponazarja razmerje med IgG in albuminskim količnikom, a ima nizko občutljivost. Zvišan (nad 0,7) je v približno 60 – 70 % bolnikov z MS.
- Reibergram predstavlja prehajanje beljakovin s hiperbolično funkcijo in ne samo za IgG, temveč velja za vse beljakovine, katerih fiziološka sinteza poteka izven, v primeru obolenj pa tudi znotraj likvorskih prostorov (IgA, IgM, CEA itd.). Občutljivost v primeru diagnostike MS je nekaj večja, od 66 do 73 % (7).

Novejši pristopi vrednotenja intratekalne aktivnosti limfocitov B lahko najdemo tudi ob določanju prostih lahkih veriga kapa (PLVK) v likvorju in serumu. PLVK nastajajo v presežku ob sintezi imunoglobulinov in niso vezane kovalentno na težke verige. Z bolj občutljivimi analiznimi metodami jih lahko sedaj tudi kvantitativno določimo. Ob PLVK nastajajo tudi proste lahke verige lambda, vendar jih v likvorju najdemo v nižjih koncentracijah, saj nastajajo približno dvakrat manj od PLVK in zaradi njihove dimerne oblike jih preide iz seruma v likvor s pasivno difuzijo malo (8).

Namen primerjave je bil ugotoviti uporabnost nefelometrične določitve PLVK v likvorju in serumu z dozdajšnjo rutinsko metodo določanja IgG oligoklonalnih trakov v likvorju v diagnostiki MS. Preverjali smo diagnostično občutljivost in specifičnost metode.

## 2. Metoda

V retrospektivno analizo so bili zajeti bolnikov z MS in bolnikov z nevnetnimi nevrološkimi boleznimi (NVNB). Vsi bolniki so imeli že določene IgG oligoklonalne trakove in Reibergram (IgG, IgA, IgM in albumin v likvorju in serumu). Vsem smo še dodatno določili PLVK v likvorju in serumu.

### 2.1 Določanje IgG oligoklonalnih trakov – rutinska metoda

Določanje IgG oligoklonalnih trakov v likvorju je zlati standard za ovrednotenje intratekalne sinteze IgG. Referenčna metoda določanja IgG oligoklonalnih trakov je izoelektrično fokusiranje z naknadno imunofiksacijo z encimi označenimi protitelesi. Na trgu obstaja nekaj reagenčnih kitov za njihovo določanje, kjer poteka izoelektrična fokusacija na agaroznem gelu s kasnejšo detekcijo precipitativ IgG na samem gelu ali s pomočjo dodatnih protiteles po prenosu na membrano in kasnejšo encimsko detekcijo. Obstajajo pa tudi t.i. in-house metode, kjer so razni laboratoriji skušali povečati občutljivost in specifičnost z različnimi protitelesi, ali celo dvojnimi protitelesi po izoelektričnem fokusiranju. Laboratorij za likvorsko diagnostiko na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja na Nevrološki kliniki v Ljubljani uporablja ultraobčutljivo modificirano metodo, ki so jo razvili v Madridu leta 2008 z enojnimi protitelesi in encimsko detekcijo, z alkalno fosfatazo (8). Metoda je občutljivejša in nič manj specifična od referenčne metode za določanje oligoklonalnih trakov, kjer po izoelektričnem fokusiranju, detektiramo IgG s pomočjo protiteles, na katerih je vezana hrenova peroksidaza (9).

Diagnostična občutljivost metode IgG oligoklonalnih trakov je ocenjena v diagnostiki MS med 88 in 93 %. Diagnostična specifičnost pa na 94 %, a se znatno zniža, kadar upoštevamo še druge vnetne bolezni (61 %) (5, 10). Izvedba metode je zahtevna, dolgotrajna, težave so z medlaboratorijsko primerljivostjo in na rezultat vpliva še subjektivna interpretacija.



## 2.2 Nefelometrično določanje prostih lahkih verig kapa – testna metoda

Določanje prostih lahkih verig kapa v likvorju in serumu je potekalo popolnoma avtomatizirano z reagenčnim kitom »N Latex FLC kappa« proizvajalca Siemens na nefelometru BN II (Siemens, Nemčija). Meja detekcije metode je znašala 0,035 mg/L, ponovljivost metode za določanje PLVK v likvorju je znašala pod 5,5 %, v serumu pa pod 4,2 %. Kontrolo kakovosti smo preverjali s kontrolnim materialom proizvajalca (11).

Metoda je hitra, popolnoma avtomatizirana, rezultati se podajajo v kvantitativni obliki.

Različni načini vrednotenja intratekalne sinteze PLVK:

- Najenostavnejši način je podajanje absolutne koncentracije PLVK v likvorju (8).
- PLVK indeks je definiran kot razmerje med količnikom PLVK in količnikom albumina. Vrednost indeksa nad 5,9 kaže na lokalno sintezo PLVK znotraj osrednjega živčevja (8, 11).
- Izračun intratekalne sinteze PLVK v odstotkih, ki je definiran kot razmerje med vrednostjo PLVK v likvorju in celokupnimi proteini v likvorju.
- S pomočjo različnih (matematičnih) pristopov so na voljo še dodatni rezultati, ki lahko opredelijo intratekalno sintezo PLVK (8).

## 3. Sklep

Limfociti B izločajo poleg imunoglobulinov, v presežku še proste lahke verige – kapa in lambda. Kaj je natančna funkcija teh verig v 'presežku', še ni znano. Zaenkrat je njihova uporabnost v medicini omejena na določena obolenja – diagnostika plazmocitoma, obolenja ledvic itd. Že dolgo je znano, da so proste lahke verige v likvorju prisotne tudi pri bolnikih z MS, uporabne za diagnostiko pa so predvsem PLVK. Šele s pripravo reagentov s specifičnimi protitelesi samo za proste lahke verige, so se lahko posledično razvile dovolj občutljive metode za kvantitativno določanje le-teh v nizkih koncentracijah, npr. v likvorju.

V naši raziskavi smo potrdili uporabnost določanja PLVK v diagnostiki MS. Diagnostična občutljivost in specifičnost nefelometrične metode je zadovoljiva in primerljiva z obstoječo rutinsko metodo – oligoklonalnimi trakovi IgG in se rahlo spreminja odvisno od načina podajanja rezultatov PLVK (absolutna koncentracija PLVK v likvorju, delež PLVK, PLVK indeks in sinteza PLVK). Kadar podajamo rezultate PLVK v obliki absolutnih koncentracij, ne moremo vedeti ali je celotna koncentracija PLVK v likvorju zaradi intratekalne sinteze ali delež prispeva tudi njihova pasivna difuzija iz seruma, zato bolj zahtevni pristopi podajanja rezultatov PLVK, npr. PLVK indeks oz. PLVK delež, kjer za rezultat potrebujemo meritve PLVK in albumina v likvorju in serumu oz. PLVK in celokupne proteine samo v likvorju, pripomorejo k večji specifičnosti, saj dobimo še dodatne informacije o disfunkciji krvno-možganske pregrade (8, 12).

Da bi se lahko rezultati določanja PLVK uporabili v diagnostiki MS, bo potrebno opraviti dodatne raziskave še na večjem številu bolnikov, a zaradi težavnega pridobivanja vzorca, poteka bolj počasi. Prav tako so tu še bolniki, ki imajo poleg osnovne bolezni – MS, še kakšno dodatno obolenje, npr. prisotnost meningitisa. Prihodnje raziskave bodo pokazale ali bi lahko rezultati določanja PLVK pripomogli k diagnostiki MS v že zelo njeni zgodnji fazi oz. tudi pri bolnikih s klinično izoliranim sindromom (CIS), kot tudi pri konverziji iz CIS oblike v MS (13). Zaradi svoje narave bo določanje PLVK dobilo mesto tudi v diagnostiki še drugih vnetnih in nevnetnih nevroloških obolenjih (8, 14).

Omenjena primerjava obeh metod je pokazala, da bi nefelometrično določanje PLVK v likvorju lahko sčasoma nadomestilo, vsaj v nekaterih segmentih, metodo določanja IgG oligoklonalnih trakov v diagnostiki MS. Novejša metoda je enostavna, ponovljiva, avtomatizirana, relativno poceni, ni subjektivnega prispevka pri interpretaciji rezultata in rezultati analize se podajajo v kvantitativni obliki.

## Literatura

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372 (9648): 1502-17.
2. Ramsden DB. Multiple Sclerosis: assay of free immunoglobulin light chains. *Ann Clin Biochem*. 2017; 54: 5-13.
3. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2002; 104 (3): 182-91.
4. Wootla B, Denic A, Keegan BM, Winters JL, Astapenko D, Warrington AE, et al. Evidence

- for the role of B cells and immunoglobulins in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurol Res Int.* 2011; 2011: 780712.
5. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013; 262 (1-2): 1-10.
  6. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69 (2): 292-302.
  7. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *Journal of the Neurological Sciences.* 2001; 184 (2) :101-22.
  8. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Aboulenein-Djamshidian F, Krugluger W, Deisenhammer F, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. *Mult Scler.* 2016; 22(4): 502-10.
  9. Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods.* 2004; 284 (1-2): 141-5.
  10. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2013; 84 (8): 909-14.
  11. Anadolli V. Diagnostična uporabnost določanja prostih lahkih verig kapa v likvorju v diagnostiki multiple skleroze. Prešernova nagrada 2016, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta.
  12. Emeršič A, Anadolli V, Krsnik M, Rot U. Core CSF findings to support the diagnosis of MS: oligoclonal bands or kappa free light chains?. *Multiple Sclerosis Journal.* 2016; 22: (S3) 88-399.
  13. Andlovic A, Babič M, Accetto S, Rot U. Comparison of two methods for the detection of oligoclonal bands in a large number of clinically isolated syndrome and multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012; 114 (6): 659-62 .
  14. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)-a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1994; 122 (2): 189-203.

**Katedra za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani**  
**Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana**

## **Zbornik predavanj raziskovalnega srečanja**

### **9. JESENOVČEVI DNEVI - Raziskovalni dnevi laboratorijske biomedicine**

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-074:001.891(082)

JESENOVČEVI dnevi (9 ; 2017 ; Ljubljana)

Raziskovalni dnevi laboratorijske biomedicine : zbornik predavanj / 9. Jesenovčevi dnevi, 29. september 2017, Ljubljana ; [urednika Milan Skitek in Darko Černe]. - Ljubljana : Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center), 2017

ISBN 978-961-6442-79-4

1. Gl. stv. nasl. 2. Skitek, Milan  
291515904