

doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM VII.

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC

Bratislava 2025

Biomedicínsky výskum VII.

Editor: doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Vydal: © CEBM Slovakia spol. s r. o., Bratislava, 2025

Recenzenti: RNDr. Dušan Chorvát, PhD.
doc. MUDr. Radoslav Zamborský, PhD.

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľa autorských práv.

Obsah

1.	Sovík, J., Kajánek, D., Hadzima, B.: Vplyv prúdovej hustoty na tvorbu PEO vrstvy pre biodegradovateľné horčíkové zliatiny	4
2.	Gurín, D., Skovajsa, M., Kollár, D.: Koncept digitalizácie testu podľa Petrie	10
3.	Mjartinová, D., Fričová, D.: Metodologická variabilita vo výskume extracelulárnych vezikúl ako prekážka identifikácie spoľahlivých biomarkerov Parkinsonovej choroby.....	15
4.	Záhumenská, R., Kuniaková, M., Danková, Z.: Kvalita vzoriek ako neviditeľný faktor vedeckého úspechu.....	25
5.	Harsányi, S., Milošovičová, L., Šteňo, B., Pastoráková, A.: Limited contribution of copy number variants to developmental dysplasia of the hip: Evidence from MLPA analysis	33
6.	Priscakova, P., Melegova, J., Forro, K., Andova, N., Gergely, L.: Genetics causes of intrauterine fetal death	37
7.	Musil, P., Danišovič L., Varga I.: Technika prípravy organoidových a sferoidových kultúr z primárneho tkaniva karcinómu prsníka a centrálného nervového systému.....	42
8.	Kleinová M., Klein M.: A Protocol for the Isolation and In Vitro Cultivation of Uterine Tube CD34+CD117+ Stromal Cells (Telocytes): A prerequisite for their Complex Characterization.....	47
9.	Kleinová M., Klein M.: Morphology and Function of CD117+/CD34+ Stromal Cells (Telocytes) in the Human Uterine Tube: What Have We Learned So Far?.....	51

Vplyv prúdovej hustoty na tvorbu PEO vrstvy pre biodegradovateľné horčíkové zliatiny

Ján SOVÍK, Daniel KAJÁNEK, Branislav HADZIMA

Žilinská univerzita v Žiline, Výskumné centrum UNIZA, Univerzitná 8215/1, 010 26 Žilina

Abstrakt

Článok sa zaoberá vplyvom prúdovej hustoty na vytvorenie vrstvy prostredníctvom procesu plazmovej elektrolytickej oxidácie (PEO) na biodegradovateľnej horčíkovej zliatine WE43 za účelom zlepšenia jej koróznej odolnosti pri aplikácii do ľudského tela v podobe bioimplantátov. Korózne správanie experimentálneho materiálu bolo analyzované pomocou elektrochemickej impedančnej spektroskopie (EIS) a potenciodynamickej polarizácie (PD) v prostredí simulujúcom podmienky ľudského tela. Mikroštruktúrna analýza použitého materiálu s vytvorenými PEO vrstvami bola vykonaná pomocou rastrovacej elektrónovej mikroskopie (REM).

Kľúčové slová: horčíkové zliatiny, biodegradovateľné implantáty, korózia, plazmová elektrolytická oxidácia

Úvod

Účinnosť biodegradovateľných implantátov sa javí ako sľubná alternatíva, ktorých využitie vďaka veľkému množstvu výhod (nižšie náklady, menšie psychologické zaťaženie pacientov a zníženie potreby ďalších chirurgických zákrokov), postupne nahrádza tradičné permanentné implantáty [1].

Veľmi dôležité postavenie vo výskumnej oblasti materiálov zohrávajú práve horčíkové zliatiny, ktoré majú významné využitie aj v medicínskych aplikáciách. Hlavnou nevýhodou je ich vysoká rýchlosť degradácie v telesných tekutinách, čo znižuje ich životnosť ako biodegradovateľných implantátov. Pomocou rôznych povrchových úprav môžeme toto opotrebenie spomaliť a tým súčasne zlepšiť biokompatibilitu a ochranu implantátu pred koróziou a následných trvalých zmien jeho vlastností [2–5].

V súčasnosti sa ako sľubnou povrchovou úpravou javí plazmová elektrolytická oxidácia (PEO), ktorá je využívaná na tvorbu ochranných povrchových vrstiev na substrátoch horčíka a jeho zliatin. V oblasti biomedicínskych aplikácií je voči iným povrchovým úpravám prevažne používaný práve PEO proces. Značnou nevýhodou PEO vrstiev je ich pórovitosť, ktorá značne ovplyvňuje ich dlhodobú koróznou odolnosť [6–8].

Tento problém sa dá vyriešiť pomocou optimalizácie procesných parametrov, ako sú napätie, prúdová hustota, typ použitého zdroja, čas úpravy alebo chemické zloženie elektrolytu a jednotlivých technologických krokov [8–10]. Kajánek a kol. skúmali vplyv optimalizácie prúdovej hustoty na koróznou odolnosť a morfológiu vytvorených PEO vrstiev na Mg zliatiny AZ31 [11].

Cieľom tejto štúdie je analýza vplyvu optimalizácie prúdovej hustoty na tvorbu PEO vrstiev na vzorkách horčíkovej zliatiny WE43, na koróznou odolnosť zliatiny pomocou potenciodynamickej polarizácie (PD) s vrstvami vystavenými voči agresívnemu prostrediu pozostávajúcemu z 0,9 % NaCl. Vplyv prúdovej hustoty na morfológiu vrstiev bol hodnotený pomocou rastrovacej elektrónovej mikroskopie.

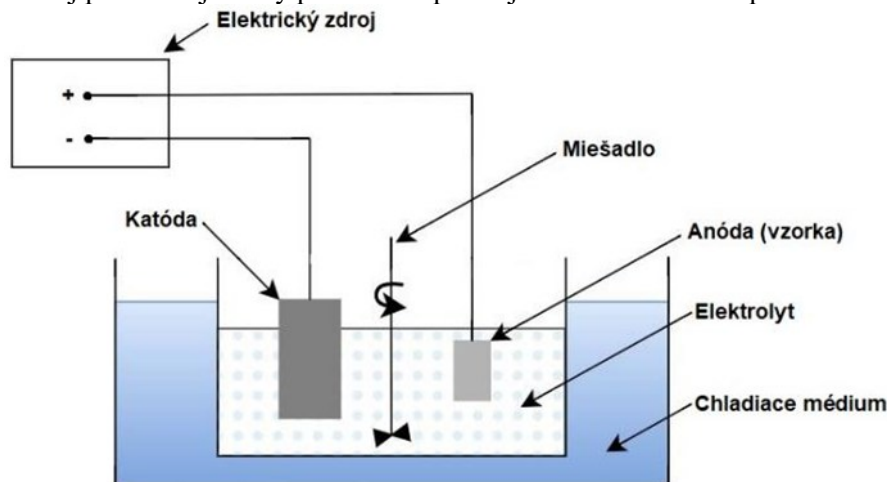
Metodika výskumu

Experimentálny materiál

Experimentálna časť výskumu bola vykonaná za použitia komerčne dostupnej horčíkovej zliatiny Mg-4Y-3RE-0.4Zr (WE43), ktorá bola vyrobená extrudovaním. Za účelom zjemnenia zŕn bola zliatina pred použitím tepelne spracovaná prostredníctvom homogenizačného žihania pri teplote 530 °C po dobu 16 hodín.

Povrchové úpravy

Pred aplikáciou PEO procesu bolo vykonané brúsenie vzoriek na vodou chladených SiC brúsnych papieroch so zrnitosťou p180, p1200 a p4000. V nasledujúcom kroku bola vzorka pripojená ako anóda a nehrdzavejúca oceľ ako katóda na jednosmerný zdroj napätia (KEYSIGHT N8762 A). Obe elektródy boli ponorené do kadičky s ekologickým PEO elektrolytom, do ktorej bolo vložené laboratórne miešadlo na zaistenie miešania elektrolytu počas celého procesu a vzdialenosť medzi elektródami bola 10 cm. Daný systém (Obr. 1) bol následne vložený do plastovej vane s vodou, ktorá udržiavala teplotu elektrolytu na 50 °C a tak jeho prehriatiu vplyvom narastajúceho napätia. Chemické zloženie elektrolytu pozostávalo z 12 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 1 g KOH rozpustených v 1 l destilovanej vody s výslednou zásaditou hodnotou pH. Prostredie bolo zvolené za účelom vytvorenia kompaktnej vrstvy na povrchu Mg zliatiny, ktorá sa pri vytváraní prirodzenej pasivačnej vrstvy prednostne pasivuje v silne zásaditom prostredí.



Obr. 1. Zariadenie na prípravu PEO vrstiev [12]

Proces PEO prebiehal pri konštantnom prúde a rastúcom napätí, ktorý bol určený na základe vzorca (1).

$$I = i \cdot S$$

kde: **I** označuje prúd (A), **i** je označenie pre prúdovú hustotu (A/cm^2) a **S** je plocha (cm^2), na ktorú bol prúd aplikovaný.

Pre testované vzorky boli skúmané tri rôzne prúdové hustoty: 25 mA/cm^2 , 50 mA/cm^2 a 100 mA/cm^2 , pričom pre všetky prúdové hustoty bol stanovený referenčný čas prípravy 10 minút. Cieľom bolo nájsť optimálnu hodnotu prúdovej hustoty, ktorá poskytne najlepšiu a najstabilnejšiu ochranu pred agresívnymi zložkami korózneho prostredia.

Analýza povrchových vlastností

Po vykonaní PEO procesu a následnom vysušení prúdom vzduchu bola vykonaná analýza morfológie povrchu PEO vrstiev (25, 50 a 100 mA/cm^2) prostredníctvom rastrovacieho elektrónového mikroskopu (REM) Thermo Scientific Phenom XL G2.

Hodnotenie elektrochemických vlastností

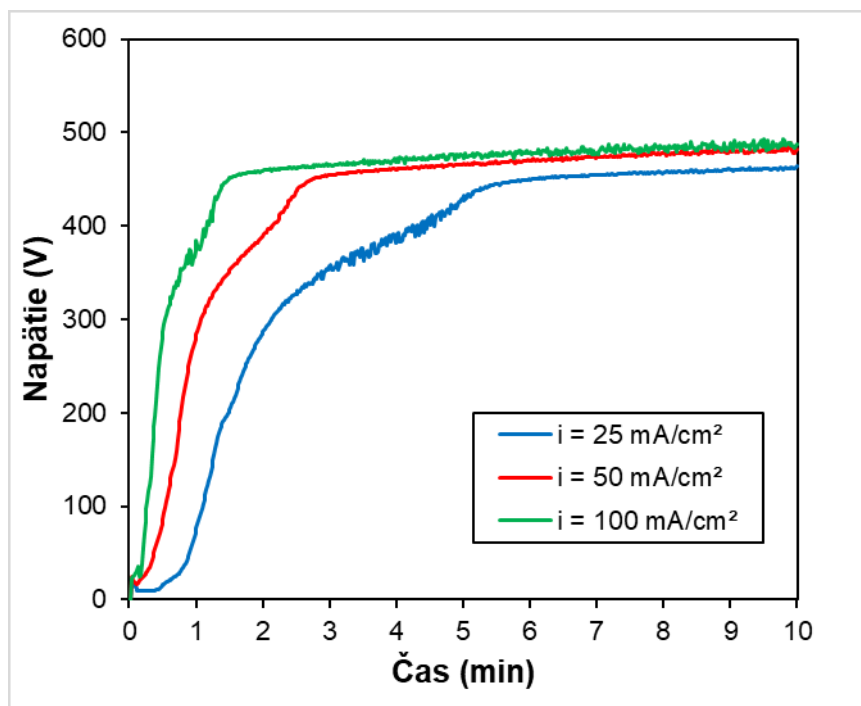
Hodnotenie korózneho správania brúsených povrchov a povrchov s PEO vrstvami bolo vykonané pomocou potenciodynamických skúšok. Na uskutočnenie skúšok bol použitý laboratórny potenciostat Biologic VSP-300. Vzorky boli v priebehu skúšok umiestnené v elektrochemických celách s trojelektrodovým zapojením, kde vzorka bola zapojená ako pracovná elektróda, platínová elektróda plnila funkciu pomocnej elektródy a nasýtená kalamelová elektróda (SCE) ako referenčná elektróda. Merania prebiehali v rozsahu potenciálov od - 200 mV do + 500 mV oproti hodnote voľného potenciálu (OCP),

pričom rýchlosť zmeny potenciálu bola 1 mV.s^{-1} . Pre oba typy povrchov bola doba ustálenia medzi vzorkou a elektrolytom nastavená na 1 hodinu. Pre lepšiu interpretáciu nameraných výsledkov a elektrochemických charakteristík jednotlivých vzoriek boli potenciodynamické krivky vykreslené v semilogaritmických súradniciach. Následne boli merania vyhodnotené Tafelovou analýzou v programe EC-Lab V11.50, pričom boli získané hodnoty koróznej prúdovej hustoty i_{corr} , korózneho potenciálu E_{corr} , koróznej rýchlosti r_{corr} a Tafelových koeficientov β_a a β_c .

Výsledky experimentov

Optimalizácia vplyvu prúdovej hustoty na morfológiu PEO vrstiev

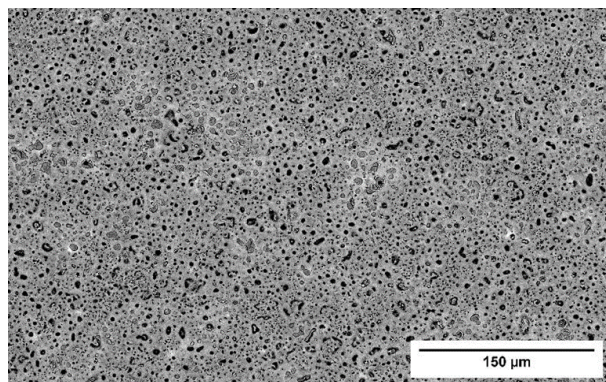
Obr. 2 podáva detailné zobrazenie vývoja napätia v závislosti od času v priebehu tvorby PEO vrstiev na povrchu Mg zliatiny WE43. Na základe grafu je možné vidieť, že najstrmší nárast napätia je pre $i = 100 \text{ mA/cm}^2$, následne pre $i = 50 \text{ mA/cm}^2$, a najmenej strmý pre $i = 25 \text{ mA/cm}^2$. Od hodnoty napätia 180 V začalo vznikať veľké množstvo malých a nejasných výbojov. S narastajúcim napätím sa výboje postupne zväčšovali a ich farba sa postupne menila na žltú až oranžovú (približne pri 300 V). Pre $i = 25 \text{ mA/cm}^2$ bola dosiahnutá maximálna hodnota napätia pri 464 V, pre $i = 50 \text{ mA/cm}^2$ a $i = 100 \text{ mA/cm}^2$ bolo maximálne napätie dosiahnuté približne pri rovnakých hodnotách 491 V. V poslednom štádiu PEO procesu je napäťový záznam pre 100 mA/cm^2 viac zašumený v porovnaní s nižšími prúdovými hustotami.



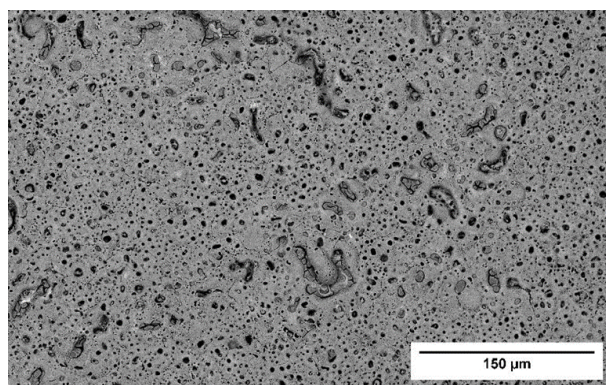
Obr. 2. Záznamy vývoja PEO vrstvy v závislosti času od napätia pre vybrané hodnoty prúdových hustôt

Morfológie povrchov PEO vrstiev získaných pri rôznych prúdových hustotách sú uvedené na Obr. 3-5. Vzorka Mg zliatiny WE43 s PEO vrstvou vytvorenou pri prúdovej hustote 25 mA/cm^2 je zobrazená na Obr. 3. PEO vrstva pozostáva z mikrotrhlín a veľkého množstva malých pórov. Na Obr. 4 je znázornená morfológia PEO vrstvy vytvorenej pri prúdovej hustote 50 mA/cm^2 , ktorá je charakteristická nielen veľkým množstvom malých pórov, ale i lokálnym výskytom pórov s väčšou veľkosťou. V prípade PEO vrstvy vytvorenej pri prúdovej hustote 100 mA/cm^2 (Obr. 4), je povrch danej vrstvy charakteristický prevažne veľkými pórmi a výraznými mikrotrhlinami. Pri porovnaní morfológií (Obr. 3 – 5) je zrejmé, že v dôsledku narastajúcej prúdovej hustoty sa počet pórov v PEO vrstve znižoval, avšak ich veľkosť narastala. Tento jav možno vysvetliť energiou aplikovanou na vzorku počas procesu. Pri použití vyššej prúdovej hustoty došlo k intenzívnejším a väčším výbojom na povrchu materiálu. Prítomnosť veľkých výbojov možno dokumentovať aj napäťovým záznamom (Obr. 2), kde pri najvyššej použitej prúdovej hustote možno pozorovať v zázname napätia šum, ktorý je sprievodným javom. Tento šum v záverečnej fáze PEO súvisí s neustálym rozrušovaním/obnovovaním vrstvy. Výsledkom intenzívnych výbojov bolo tiež roztavenie

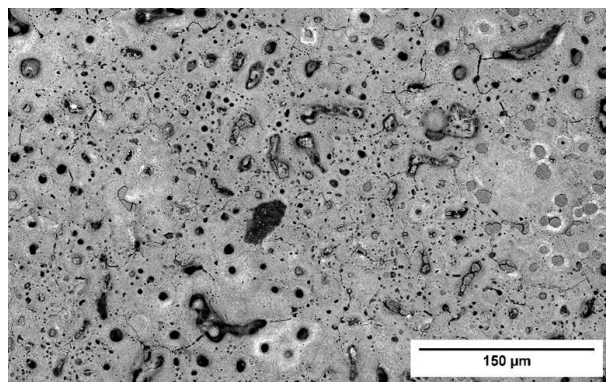
väčšieho množstva materiálu, ktorý sa podieľal na tvorbe vrstvy. Zároveň, väčšie výboje viedli k tvorbe väčších pórov [12–14].



Obr. 3. Morfológia povrchovej vrstvy pri prúdovej hustote 25 mA/cm²



Obr. 4. Morfológia povrchovej vrstvy pri prúdovej hustote 50 mA/cm²

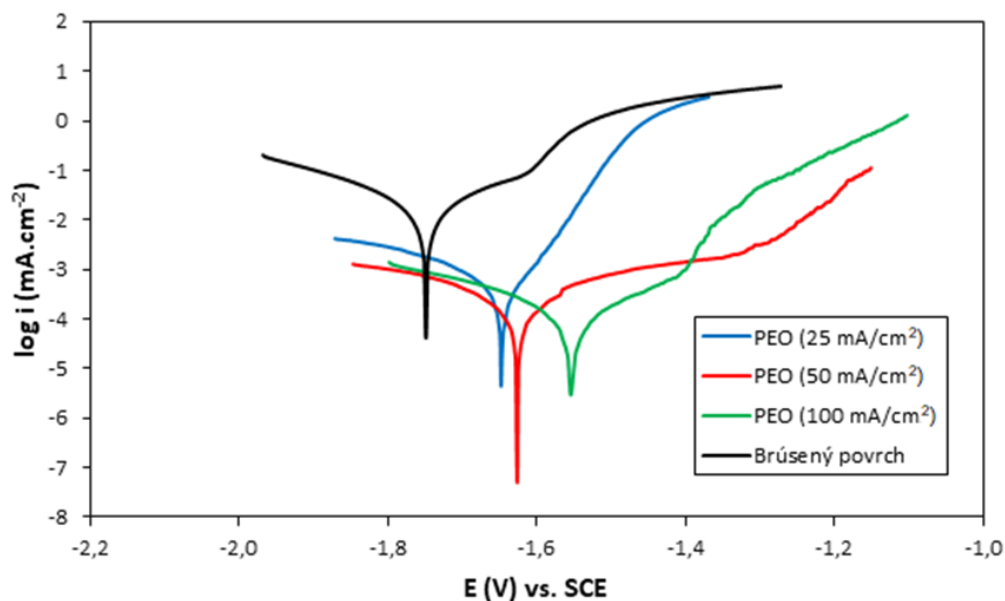


Obr. 5. Morfológia povrchovej vrstvy pri prúdovej hustote 100 mA/cm²

Hodnotenie koróznej odolnosti

Na hodnotenie koróznej odolnosti brúsených a povrchov s PEO vrstvami bola vykonaná analýza prostredníctvom potenciodynamických skúšok v prostredí 0,9 % NaCl. Pre brúsené povrchy, ale aj povrchy s PEO vrstvami boli vykonané 3 merania, z ktorých boli nasledovne vypočítané priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky daných parametrov. Na Obr. 6 sú zobrazené potenciodynamické krivky pre brúsené a povrchy s PEO vrstvami a elektrochemické charakteristiky získané ich analýzou sú zobrazené v Tab. 1. Pri vzájomnom porovnaní povrchov je možné vidieť, že spolu s narastajúcou prúdovou hustotou aplikovanou na vzorku počas PEO procesu hodnota korózneho potenciálu klesá zo záporných hodnôt ($E_{\text{corr}} = -1742$ mV pre brúsený povrch) po najmenej záporné hodnoty ($E_{\text{corr}} = -1565$ mV pre vzorku s PEO vrstvou vytvorenou pri prúdovej hustote 100 mA/cm²). Pri porovnaní hodnoty korózneho prúdového hustoty brúsenej vzorky (16,07 µA.cm⁻²) so vzorkami s vytvorenými PEO vrstvami je viditeľné, že všetky vytvorené PEO vrstvy dosahujú niekoľkonásobne nižšiu koróznou prúdovú hustotu, pričom najnižšia koróznou prúdová

hustota bola dosiahnutá pri vrstve s aplikovanou prúdovou hustotou 50 mA/cm^2 ($i_{\text{corr}} = 0,115 \mu\text{A.cm}^{-2}$). Táto skutočnosť je dôležitá z hľadiska kinetiky korózneho procesu, čo priamo vplýva aj na koróznú rýchlosť. Z toho vyplýva, že čím nižšia je hodnota koróznej prúdovej hustoty, tým nižšia je aj hodnota koróznej rýchlosti. V našej štúdii boli hodnoty najnižšej koróznej prúdovej hustoty a koróznej rýchlosti dosiahnuté pri vzorke s PEO vrstvou vytvorenou pri prúdovej hustote 50 mA/cm^2 (Tab. 1).



Obr. 6. Potenciodynamické krivky brúsených a vzoriek s PEO vrstvami merané v 0,9 % NaCl

Tab.1. Elektrochemické charakteristiky brúsených a vzoriek s PEO vrstvami merané v 0,9 % NaCl

Povrchová úprava	E_{corr} (mV)	i_{corr} ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)	β_a (mV/dek.)	β_c (mV/dek.)	r_{corr} (mm.rok ⁻¹)
PEO (25 mA/cm ²)	-1649 ± 51	$0,434 \pm 0,109$	46 ± 5	210 ± 44	$0,011 \pm 0,002$
PEO (50 mA/cm ²)	-1595 ± 35	$0,115 \pm 0,048$	113 ± 48	161 ± 19	$0,003 \pm 0,0014$
PEO (100 mA/cm ²)	-1565 ± 23	$0,147 \pm 0,047$	176 ± 63	188 ± 34	$0,004 \pm 0,0014$
Brúsený povrch	-1742 ± 24	$16,07 \pm 2,68$	156 ± 9	162 ± 21	$0,464 \pm 0,078$

Záver

Hlavným cieľom nášho výskumu bolo na základe potenciodynamickej polarizácie a rastrovacej elektrónovej mikroskopie určiť vplyv optimalizácie prúdovej hustoty na tvorbu PEO vrstiev na horčíkovej zliatine WE43. Na základe experimentálnej činnosti a následnej analýze výsledkov boli stanovené nasledujúce závery:

- Vplyvom plazmovej elektrolytickej oxidácie sa na povrchu horčíkovej zliatiny WE43 vytvorili vrstvy s pórovitou štruktúrou a mikrotrhlinami. Na kvalitu vrstiev, predovšetkým ich pórovitosť, morfológiu a hrúbku, mala výrazný vplyv hodnota aplikovanej prúdovej hustoty.

- Pri vzorke s PEO vrstvou vytvorenou pri prúdovej hustote 50 mA/cm^2 dosiahla hodnota koróznej prúdovej hustoty i_{corr} najnižšiu hodnotu ($0,115 \mu\text{A.cm}^{-2}$). Z toho vyplýva, že intenzita korózie bude u tejto vzorky najnižšia.

Z daných zistení môžeme konštatovať, že povrchová úprava Mg zliatiny WE43 pomocou PEO procesu pri prúdovej hustote 50 mA/cm^2 sa z korózneho hľadiska javí ako najvhodnejšia pre biomedicínske aplikácie.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu: Systémová verejná výskumná infraštruktúra - biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, II. fáza, 401101B990. Projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko.

Zoznam použitej literatúry

1. Amini, A.R.; Wallace, J.S.; Nukavarapu, S.P. Short-Term and Long-Term Effects of Orthopedic Biodegradable Implants. *J Long Term Eff Med Implants* **2011**, *21*, 93–122, doi:10.1615/JLongTermEffMedImplants.v21.i2.10.
2. Khan, A.R.; Grewal, N.S.; Zhou, C.; Yuan, K.; Zhang, H.-J.; Jun, Z. Recent Advances in Biodegradable Metals for Implant Applications: Exploring in Vivo and in Vitro Responses. *Results in Engineering* **2023**, *20*, 101526, doi:10.1016/j.rineng.2023.101526.
3. Dobatkin, S.; Martynenko, N.; Anisimova, N.; Kiselevskiy, M.; Prosvirnin, D.; Terentiev, V.; Yurchenko, N.; Salishchev, G.; Estrin, Y. Mechanical Properties, Biodegradation, and Biocompatibility of Ultrafine Grained Magnesium Alloy WE43. *Materials* **2019**, *12*, 3627, doi:10.3390/ma12213627.
4. Liu, J.; Liu, B.; Min, S.; Yin, B.; Peng, B.; Yu, Z.; Wang, C.; Ma, X.; Wen, P.; Tian, Y.; et al. Biodegradable Magnesium Alloy WE43 Porous Scaffolds Fabricated by Laser Powder Bed Fusion for Orthopedic Applications: Process Optimization, in Vitro and in Vivo Investigation. *Bioactive Materials* **2022**, *16*, 301–319, doi:10.1016/j.bioactmat.2022.02.020.
5. Tian, P.; Liu, X. Surface Modification of Biodegradable Magnesium and Its Alloys for Biomedical Applications. *Regenerative Biomaterials* **2015**, *2*, 135–151, doi:10.1093/rb/rbu013.
6. Mahto, V.K.; Singh, A.K.; Malik, A. Surface Modification Techniques of Magnesium-Based Alloys for Implant Applications. *J Coat Technol Res* **2023**, *20*, 433–455, doi:10.1007/s11998-022-00716-9.
7. Sikdar, S.; Menezes, P.V.; Maccione, R.; Jacob, T.; Menezes, P.L. Plasma Electrolytic Oxidation (PEO) Process—Processing, Properties, and Applications. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1375, doi:10.3390/nano11061375.
8. Fattah-alhosseini, A.; Chaharmahali, R. Impressive Strides in Amelioration of Corrosion Behavior of Mg-Based Alloys through the PEO Process Combined with Surface Laser Process: A Review. *Journal of Magnesium and Alloys* **2023**, *11*, 4390–4406, doi:10.1016/j.jma.2023.10.005.
9. Sedelnikova, M.; Komarova, E.; Sharkeev, Y.; Tolkacheva, T.; Sheikin, V.; Egorkin, V.; Mashtalyar, D.; Kazakbaeva, A.; Schmidt, J. Characterization of the Micro-Arc Coatings Containing β -Tricalcium Phosphate Particles on Mg-0.8Ca Alloy. *Metals* **2018**, *8*, 238, doi:10.3390/met8040238.
10. Pezzato, L.; Brunelli, K.; Gross, S.; Magrini, M.; Dabalà, M. Effect of Process Parameters of Plasma Electrolytic Oxidation on Microstructure and Corrosion Properties of Magnesium Alloys. *J Appl Electrochem* **2014**, *44*, 867–879, doi:10.1007/s10800-014-0695-x.
11. Kajánek, D.; Pastorek, F.; Hadzima, B.; Bagherifard, S.; Jambor, M.; Belány, P.; Minárik, P. Impact of Shot Peening on Corrosion Performance of AZ31 Magnesium Alloy Coated by PEO: Comparison with Conventional Surface Pre-Treatments. *Surface and Coatings Technology* **2022**, *446*, 128773, doi:10.1016/j.surfcoat.2022.128773.
12. Napadnutia, Š.M.K.; Zliatin, P.U.H. Katedra materiálového inžinierstva. **2019**.
13. Hussein, R.O.; Northwood, D.O.; Nie, X. PLASMA ELECTROLYTIC OXIDATION (PEO) COATINGS ON MAGNESIUM ALLOY AZ91D FOR IMPROVED CORROSION AND WEAR RESISTANCE. **2014**, 38.
14. Esmaeili, M.; Tadayonsaidi, M.; Ghorbanian, B. The Effect of PEO Parameters on the Properties of Biodegradable Mg Alloys: A Review. *Surface Innovations* **2021**, *9*, 184–198, doi:10.1680/jsuin.20.00057.

Koncept digitalizácie testu podľa Petrie

Daniel GURÍN¹, Martin SKOVAJSA², Drahomír KOLLÁR³

¹ Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Fakulta zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Sládkovičova 21, 974 05 Banská Bystrica

² Žilinská univerzita v Žiline, Výskumné centrum UNIZA, Univerzitná 8215/1, 010 26 Žilina

³ Ministerstvo zdravotníctva SR, Limbová 2, 837 52 Bratislava 37, Slovenská republika

Úvod

Gnostické funkcie patria spolu s faktickými a praktickými funkciami medzi vyššie kôrové funkcie. Ide o schopnosti poznávať predmety hmatom, zrakom, sluchom a vnímať postavenie vlastného tela a jeho častí. Základnými predstaviteľmi týchto funkcií sú stereognózia, somatognózia, vizuálna a auditívna gnózia. Stereognózia je schopnosť identifikovať trojrozmerný útvar s pomocou kožných receptorov a hmatu, čiže ide o funkciu interakcie s vonkajším prostredím. Somatognózia je funkciou uvedomovania si a vymedzenia vlastného tela a jeho segmentov v priestore bez zrakovej kontroly (Kolár 2020).

Jedným s používaných vyšetrení gnostických funkcií je test podľa Petrie. Test je používaný pri testovaní schopnosti hodnotiť štandardné senzorické podnety (Kolár 2020). Výsledkom testovania je zaradenie do troch kategórií - reducer, normal a augmentor. Z pohľadu fyzioterapie je zaujímavá aj konkrétna nominálna hodnota odchýlky. Pri Petrie teste sa uplatňuje metóda meraní pomocou sústavy dvoch hranolov - jeden so šírkou 63 mm a druhý s lineárne sa meniacou šírkou od 20 do 100 mm na celkovej dĺžke 70 cm v tvare ihlanu. Pôvodná metodika bola publikovaná v roku 1967 autorkou Asenath Petrie (1967) a používa sa dodnes s tým, že po technickej stránke sa vyšetrovací pomôcka prakticky nezmenila. Upravovala sa len metodika a vznikali modifikácie vyšetrenia (Mishara 1982, Penn 1983).

V súčasnosti je testovanie podľa Petrie používané v psychológii a psychiatrii pre kategorizáciu pacientov z pohľadu ich vnímania a v rehabilitácii pre testovanie gnostických funkcií (Frčová 2021, Beňuš 2020, Kováč 2020). Odčítanie hodnoty sa realizuje vizuálnou kontrolou s približným odčítaním na meracej stupnici, ktorá je nakreslená na objekte meraní, s následným prepočtom na požadovanú výstupnú veličinu. Tento spôsob prináša vyššiu pravdepodobnosť výskytu subjektívnych chýb pri vyhodnocovaní nameraných hodnôt a je časovo náročnejší.

Navrhované technické riešenie, ktoré je predmetom tohto článku, celý proces plne automatizuje a eliminuje tým ľudský faktor, čím sú dosiahnuté objektívne a opakovateľné výsledky. Na rozdiel od doterajších pomôcok používaných pri testovaní sa navrhované riešenie vyznačuje vysokou mierou spoľahlivosti odčítania a automatického prepočítania požadovaného výstupného ukazovateľa.

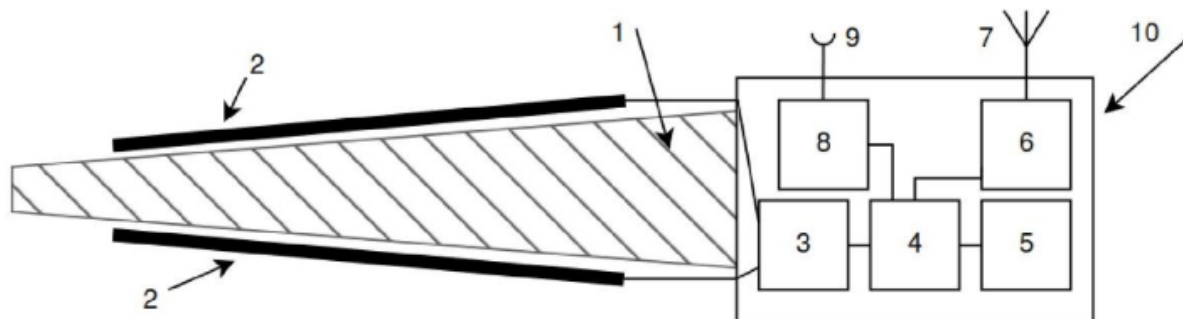
Kľúčové slová: gnostika, stereognózia, somatognózia, test podľa Petrie, elektronické testovanie gnostických funkcií.

Návrh technického riešenia

Podstatou technického riešenia je hardvérové zariadenie na automatizované meranie úrovne gnostických funkcií konštrukčne vychádzajúce z doteraz používaného testu podľa Petrie. Schematicky sú jednotlivé časti riešenia zobrazené na obrázku č.1.

Rovnako ako v teste podľa Petrie sa používa testovací a vzorový hranol (etalón), ktoré sú vyrobené z povrchovo upraveného dreva s hladkou úpravou. Na testovacím hranole (1) sú vyznačené značky pre kalibráciu celého zariadenia pred začiatkom merania. Na bočnej zužujúcej sa strane testovacieho hranola je prilepený senzorický element (2) v tvare pásika s citlivou vrstvou s dĺžkou 400 mm až 600mm a výškou od 5 mm do 15 mm, pričom hrúbka pásika je v rozsahu 0,2 mm až 0,5 mm. Senzorický pásik je prilepený tak, aby po celej jeho dĺžke neboli na povrchu žiadne nerovnosti, ktoré by sa dali zistiť hmatom. Voliteľne je možné použiť dva meracie senzorické elementy (2), po jednom na každej strane testovacieho hranola. Na hrubšom konci testovacieho hranola je ďalej umiestnený elektronický modul pre spracovanie a vyhodnotenie signálu zo senzorického pásika/pásikov (10). Elektronický modul (10) obsahuje snímací modul (3) pripojený zbernicou I2C na centrálnu výpočtovú jednotku (4) na spracovanie nameraných údajov, na ktorú je napojené zbernicou SPI zobrazovacie zariadenie (5) na zobrazovanie nameraných údajov. K centrálnej výpočtovej jednotke (4) je zbernicou SPI ďalej napojený bluetooth modul (6) s

integrovanou anténou (7) na odosielanie dát do nadradeného počítača alebo inej jednotky pre účely archivácie dát alebo ich ďalšieho spracovania. K centrálnej výpočtovej jednotke (4) je taktiež pripojený napájací blok (8) obsahujúci akumulátor a nabíjací/napájací modul, ktorý je realizovaný pomocou univerzálneho konektora USB-C (9). Okrem nabíjania je možné ho použiť aj na komunikáciu s modulom bezdrôtovej komunikácie (6). Jednotlivé elektronické komponenty sú osadené na navrhnutej doske plošného spoja, prípadne sú k nej pripojené pomocou konektorov.



Obr.1. Schematické zobrazenie častí riešenia

Zoznam značiek

1 – testovací hranol	6 – modul bezdrôtovej komunikácie
2 – senzorický element	7 – integrovaná anténa
3 – snímací modul	8 – napájací blok
4 – centrálna výpočtová jednotka	9 – univerzálny konektor
5 – zobrazovacie zariadenie	10 – hardvérový modul

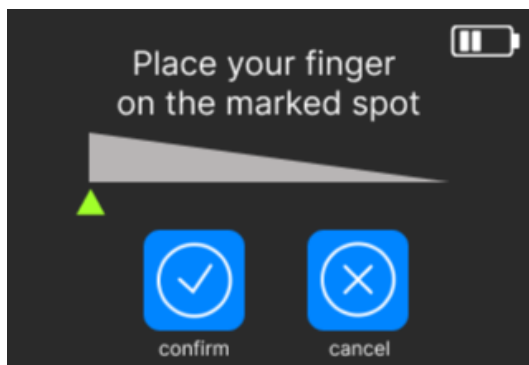
Zariadenie obsahuje obslužný firmware, ktorý zabezpečuje prvotné nastavenie a kalibráciu zariadenia. Taktiež spracúva nasnímané údaje zo senzorov, zabezpečuje ich grafické zobrazenie na displeji a prenos nameraných a spracovaných dát do externého zariadenia (PC, smartphone, tablet atď.). Súčasťou technického riešenia je aj riešenie napájacej časti zariadenia, ktorá zabezpečuje dobíjanie integrovaných napäťových článkov zabezpečujúcich zdroj napájacieho napätia. Technické zariadenie umožňuje pripojenie pomocou bezdrôtovej technológie s nadradeným komunikačným uzlom (PC, smartfón) a odosielanie nameraných údajov.

Proces merania sa uskutočňuje pomocou automatizovaného odčítania polohy prsta testovanej osoby pri dotyku pásika a následného prepočtu meraných hodnôt polohy v rozsahu sledovaného intervalu. Pri použití senzora je dôležité, aby bolo možné detegovať presnú polohu prsta vyšetřovaného v rámci snímacej časti senzora, pričom pri dotyku prsta na element je potrebná iba minimálna úroveň vyvíjaného tlaku. Počet opakovaní meraní je ľubovoľný. Po ukončení merania sú vypočítané štatistické informácie zo série týchto meraní. Tieto informácie sú zobrazené na displeji, ktorý je integrovaný do zariadenia a zároveň sú pripravené na odoslanie nadradenému spracovateľskému zariadeniu prostredníctvom implementovaného bluetooth modulu, kde môžu byť evidované pre účely časového porovnania a progresu vyšetřovanej osoby. Výstup nameraných a spracovaných údajov na displeji je zobrazený na obrázku č. 2.



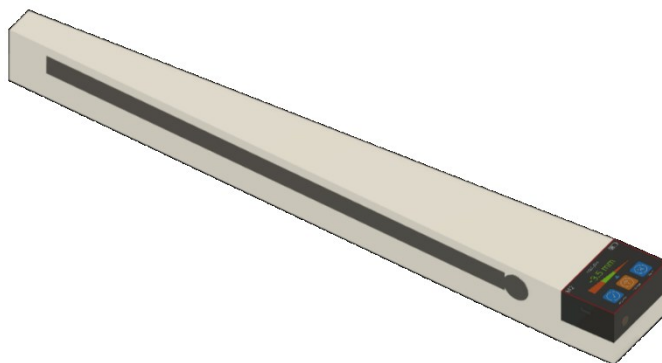
Obr. 2. Grafický výstup nameraných údajov

Zariadenie je schopné správne pracovať aj pri odlišných rozmeroch testovacieho hranola, čo je dosiahnuté prvotnou kalibráciou zariadenia, kedy sa pri prvom spustení na displeji zobrazujú podrobné inštrukcie postupu kalibrácie, pri ktorých je potrebné dotknúť sa senzorického elementu na vyznačených pozíciách. Proces kalibrácie je znázornený na obrázku č. 3.



Obr. 3. Kalibrácia zariadenia.

Pri konštruovaní hardvérovej časti zariadenia boli použité metódy 3D modelovania, kde sa konštrukčne vychádzalo z rozmerov pomôcky pôvodného testu podľa Petrie, ktorá sa následne modifikovala na elektronickú verziu (obrázok č.4). Súčasne sa v 3D softvéri vymodeloval návrh uloženia hardvérového modulu, do ktorého sa umiestnili jednotlivé komponenty elektronickej časti testovacieho hranola (doska plošného spoja, displej, batéria, obvody bluetooth modulu a bezdotykový vypínač). Následne sa návrh uloženia vytlačil na 3D tlačiarňi a skompletoval sa prvý funkčný prototyp zariadenia (obrázok č.5a, 5b), ktorý prešiel fázou testovania na vzorke vyšetrovaných osôb. Požiadavky a pripomienky, ktoré vyplynuli z testovacej fázy, boli následne zapracované a konštrukčne či softvérovo vyriešené v druhej prototypovej verzii testovacieho hranola.



Obr. 4. 3D model prototypu zariadenia



Obr. 5a Prototyp modulu elektroniky



Obr. 5b. Celkový pohľad na funkčný testovací prototyp

Metodika merania

Merací proces spočíva v snahe vyšetrovanej osoby uchopiť testovací hranol v bode, v ktorom je jeho hrúbka rovnaká ako hrúbka vzorového hranolu - etalónu. Vyšetrujúci sedí na stoličke, na jednej strane stola je pred ním položený hranol s rovnakou šírkou (63mm) vo všetkých miestach (vzorový hranol) a na druhej strane testovací hranol v tvare ihlana. Vyšetrovaný dominantnou končatinou ohmatá vzorový hranol a snaží sa zapamätať si jeho šírku. Potom uvoľní končatinu a druhou končatinou sa snaží nájsť šírku zodpovedajúce miesto na testovacom hranole, ktoré si zapamätal zo vzorového hranolu. Testovanie je vykonávané bez zrakovej kontroly pri zavretých alebo zaviazaných/prekrytých očiach. Keď vyšetrovaný drží na testovacom hranole miesto, o ktorom si myslí, že zodpovedá očakávanej šírke vzorového hranolu, dá pokyn vyšetrujúcemu, ktorý pokus potvrdí stlačením tlačidla na displeji. Na displeji sa vyšetrujúcemu zobrazí jednak to, či sa vyšetrovaný nachádza v tolerančnom poli alebo nie a jednak odchýlka od stanovenej šírky etalónu v milimetroch. Vyšetrenie sa opakuje trikrát a po poslednom pokuse označí vyšetrujúci na displeji možnosť „odoslať“, pričom na displeji sa ukáže priemerná hodnota troch testov. Hodnota sa zaznamená a ukáže pozíciu v zelenom poli, ak bol pokus v tolerancii, čo znamená, že vyšetrovaný má dobrú predstavu. Ak sa dostal za hranicu zeleného poľa na užšej strane testovacieho hranola, znamená to, že podhodnocuje. Ak sa dostal mimo tolerancie na širšej strane testovacieho hranola, znamená to, že nadhodnocuje. Na základe výsledku testu sa dá predpokladať, ako bude vnímať ďalšie súčasti vyšetrenia, napríklad interpretovať svoje ťažkosti, bolesť a podobne.

Záver

Navrhované technické riešenie nachádza využitie v medicíne pri meraní úrovne gnostických funkcií, pričom meranie je uskutočňované pomocou automatizovaného odčítania a prepočtu meraných hodnôt polohy v rozsahu sledovaného intervalu a následne je pomocou automatizovaného prepočtu vyjadrený požadovaný výstupný ukazovateľ. Tým je zabezpečená vyššia spoľahlivosť výsledkov vzhľadom na elimináciu možných subjektívnych chýb pri odčítaní a prepočte nameraných údajov vyšetrujúcou osobou. Súčasne je možné elektronicky zaznamenať namerané dáta aj v dlhodobejšom časovom horizonte a tieto následnej zobraziť, čím je možné sledovať progres vyšetrovanej osoby v čase. Okrem spoľahlivosti pri automatizovanom získavaní a spracovaní údajov je prínosom aj časová úspora pri meraniach a zaznamenávaní údajov. Navrhnuté zariadenie na meranie úrovne gnostických funkcií je v súčasnosti chránené úžitkovým vzorom (č.10337) a rovnako aj dizajnom (č.29235), ktoré sú evidované Úradom priemyselného vlastníctva SR.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu: Vytvorenie digitálnej biobanky na podporu systémovej verejnej výskumnej infraštruktúry, II. fáza, 401101B999. Projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko.

Zoznam použitej literatúry

1. Beňuš, P., Gemmel, J., Líška, D., Gurín, D. 2020 Influence of gnostic and stereognostic functions on football activities. In: *Slovak journal of sport science*, vol. 6, no. 1.
2. Frčová, Z., Brachňáková, Z., Gurín, D. 2021 Súvislosť medzi hypermobilitou a propriocepciou. In: *Rehabilitácia*, Vol. 58, No. 2. 2021.
3. Kolář et al. Rehabilitace v klinické praxi. Praha/Galén 2020, 714s.
4. Kováč, J., Líška, D., Gurín, D., Pupiš, M., 2020 Testovanie gnostických funkcií u vrcholových atletických chodcov v porovnaní s bežnou populáciou. In *Rehabilitácia*, Vol. 57, No.2 2020
5. Mishara BL, Baker AH. Bias in Petrie's alternate-form procedure for kinesthetic aftereffect. *Percept Mot Skills*. 1980 Oct;51(2):543-8.
6. Penn NE, Stafford C. The Petrie Block Task: a modification. *Percept Mot Skills*. 1982 Oct;55(2):351-4.
7. Petrie, A. 1967. *Individuality in pain and suffering*. U. Chicago Press.
8. Úžitkový vzor č. 10337, *ÚPV WebRegistre - UV 150-2024*. Available at: <https://wbr.indprop.gov.sk/WebRegistre/UzitkovyVzor/Detail/150-2024?csrt=12657362857180447550> (Accessed: 06 October 2025).
9. Dizajn č. 29235, *ÚPV WebRegistre - D 123-2024*. Available at: <https://wbr.indprop.gov.sk/WebRegistre/Dizajn/Detail/123-2024?csrt=12657362857180447550> (Accessed: 06 October 2025).

Metodologická variabilita vo výskume extracelulárnych vezikúl ako prekážka identifikácie spoľahlivých biomarkerov Parkinsonovej choroby

Diana MJARTINOVÁ, Dominika FRIČOVÁ

II. neurologická klinika, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava

Abstrakt

Extracelulárne vezikuly (EV) predstavujú heterogénnu populáciu membránových nanočastíc, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v intercelulárnej komunikácii. Tieto vezikuly, sekretované prakticky všetkými typmi buniek, transportujú komplexný obsah zahŕňajúci proteíny, nukleové kyseliny a lipidy. V kontexte neurodegeneratívnych ochorení, ako je Parkinsonova choroba (PD) reprezentujú perspektívny zdroj diagnostických biomarkerov, najmä prostredníctvom analýzy microRNA (miRNA) profilov. Napriek intenzívnemu výskumu čelí táto oblasť kritickým limitáciám, ktoré bránia klinickej implementácii identifikovaných kandidátnych biomarkerov. Systematická analýza publikovaných štúdií odhaľuje výraznú metodologickú heterogenitu zahŕňajúcu variabilitu v protokoloch izolácie EV aj miRNA, typoch biologických vzoriek a charakteristikách patientskych kohort. Táto metodologická nekonzistentnosť vyúsťuje do situácie, kedy jednotlivé štúdie identifikujú odlišné sady dysregulovaných miRNA s minimálnou replikovateľnosťou nálezov naprieč nezávislými výskumnými skupinami. Porovnanie niekoľkých kľúčových štúdií demonštruje, že žiadne dve nezávislé práce nepotvrdzujú identický panel biomarkerov, pričom iba marginálne percento kandidátnych miRNA vykazuje konzistentné zmeny vo viacerých datasetoch. Táto práca hodnotí zdroje variability, analyzuje ich dopad na robustnosť výsledkov a sumarizuje potenciálne prístupy k štandardizácii štúdií, bez ktorých zostáva transformácia sľubných výsledkov základného výskumu do klinickej praxe nedosiahnuteľná.

Kľúčové slová: extracelulárne vezikuly, Parkinsonova choroba, biomarkery, microRNA, metodologická variabilita

Methodological variability in extracellular vesicle research as a barrier to identification of reliable biomarkers for Parkinson's disease

Summary

Extracellular vesicles (EVs) represent a heterogeneous population of membrane-bound nanoparticles that play a key role in intercellular communication. These vesicles, secreted by virtually all cell types, transport complex cargo including proteins, nucleic acids, and lipids. In the context of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD), they represent a promising source of diagnostic biomarkers, particularly through analysis of microRNA (miRNA) profiles. Despite intensive research, this field faces critical limitations that prevent clinical implementation of identified candidate biomarkers. Systematic analysis of published studies reveals substantial methodological heterogeneity encompassing variability in EV and miRNA isolation protocols, types of biological samples, and patient cohort characteristics. This methodological inconsistency results in a situation where individual studies identify different sets of dysregulated miRNAs with minimal replicability of findings across independent research groups. Comparison of six key studies demonstrates that no two independent works confirm an identical panel of biomarkers, with only a marginal percentage of candidate miRNAs showing consistent changes across multiple datasets. This work evaluates sources of variability, analyzes their impact on results robustness, and summarizes potential approaches to study standardization, without which the translation of promising basic research findings into clinical practice remains unattainable.

Keywords: extracellular vesicles, Parkinson's disease, biomarkers, microRNA, methodological variability
Úvod

Parkinsonova choroba (PD) predstavuje druhé najčastejšie neurodegeneratívne ochorenie s progresívnym priebehom charakterizovaným selektívnym odumieraním dopaminergných neurónov v *substantia nigra pars compacta* a akumuláciou patologických proteínových agregátov vo forme Lewyho teliesok. Kľúčovým molekulárnym determinantom patológie je proteín alfa-synukleín (α Syn), ktorého agregované formy vykazujú priónom podobné vlastnosti a schopnosť medzibunkového šírenia. Diagnostika PD sa v súčasnosti opiera takmer výhradne o hodnotenie klinických symptómov, pričom definitívna diagnóza môže byť stanovená až *post mortem*. Táto skutočnosť limituje možnosti skorej terapeutickú intervencie, ktorá by mohla spomaliť progresiu ochorenia (Kalia a Lang, 2015; Postuma a kol., 2015). Extracelulárne vezikuly (EV) predstavujú významný objekt výskumu v kontexte neurodegenerácie z dvoch kľúčových dôvodov. Po prvé, z povahy ich funkcie ako nosičov signálov medzi bunkami, predstavujú elegantný mechanizmus šírenia patológie medzi bunkami, čím prispievajú k progresii ochorenia. Zároveň majú schopnosť prechádzať cez hematoencefalickú bariéru a tým pádom prispievať k šíreniu patológie z centrálného nervového systému do periférie resp. naopak. Po druhé, ich prítomnosť v periférnych telových tekutinách a špecifický molekulárny obsah ich predurčuje na úlohu zdroja diagnostických biomarkerov. Možnosť izolácie EV z minimálne invazívneho odberu materiálu z krvi, moču či slín reprezentuje značnú výhodu oproti invazívnym procedurám, ako je lumbálna punkcia pre získanie cerebrospinálneho moku (Welsh a kol., 2024). V posledných rokoch sa pozornosť výskumu zameriava najmä na analýzu microRNA (miRNA) profilov v EV izolovaných z rôznych telových tekutín. Početné štúdie demonštrovali zmeny v expresii špecifických miRNA u pacientov s PD v porovnaní so zdravými kontrolami. Napriek týmto sľubným výsledkom však systematická analýza publikovanej literatúry odhaľuje problém, žiadna štúdia nepotvrdila nálezy druhej, štúdie identifikujú odlišné sady kandidátnych biomarkerov s minimálnym prekryvom medzi nezávislými datasetami (Cao a kol., 2017; Marques a kol., 2017, Caldi Gomes a kol., 2021, Xie a kol., 2022).

Charakteristika a biogenéza extracelulárnych vezikúl

EV tvoria heterogénnu skupinu nano- až mikroskopických štruktúr ohraničených lipidovou dvojvrstvou. Klasifikácia EV vychádza primárne z ich pôvodu a veľkosti, pričom sa rozlišujú dve hlavné kategórie (Dixon a kol., 2023). Exozómy, s priemerom 50-150 nm, vznikajú prostredníctvom komplexného endozomálneho procesu. Invaginácia membrány zrejúceho endozómu vedie k tvorbe intraluminálnych vezikúl v multivezikulárnom teliesku. Následná fúzia multivezikulárneho telieska s plazmatickou membránou umožňuje uvoľnenie exozómov do extracelulárneho priestoru. Biogenéza exozómov je riadená dvoma paralelne existujúcimi mechanizmami: ESCRT-závislou dráhou, zahŕňajúcou sekvenčné pôsobenie proteínových komplexov ESCRT-0 až ESCRT-III, a ESCRT-nezávislou dráhou, v ktorej kľúčovú úlohu zohráva rodina tetraspanínov, špecifických transmembránových proteínov. Práve tetraspaníny, najmä CD63, CD9 a CD81, slúžia ako charakteristické markery exozomálnej populácie v experimentálnej praxi (Krylova a Feng, 2023). Ektozómy vznikajú priamym pučaním a následným odškrtaním cytoplazmatickej membrány, pričom ich veľkosť variuje od 100 nm do 1 μ m. Tento proces je iniciovaný translokáciou fosfatidylserínu sprostredkovanou flopázou, čo vedie k narušeniu asymetrie lipidovej dvojvrstvy. Následná aktivácia malých GTPáz spúšťa signálnu kaskádu vyúsťujúcu do kontrakcie aktín-myozinového aparátu a oddelenia vezikuly (Dixon a kol., 2023). Populácia ektozómov zahŕňa rôznorodé podskupiny vrátane mikrovezikúl. Okrem týchto hlavných kategórií boli identifikované ďalšie typy nanočastíc, vrátane migrázomov asociovaných s bunkovou migráciou a exomérov, unikátnych nemembránových štruktúr s priemerom približne 35 nm, ktorých biogenéza zatiaľ nie je úplne objasnená (Ma a kol., 2015; Zhang a kol., 2018). Táto heterogenita EV predstavuje prvú úroveň metodologickej výzvy, pretože rôzne izolačné techniky obohacujú odlišné subpopulácie vezikúl s potenciálne odlišným molekulárnym obsahom.

Molekulárny obsah EV a mechanizmy šírenia patológie PD

Obsahová komplexnosť EV reflektuje ich multifunkčnú úlohu v biologických systémoch. Proteínová zložka zahŕňa transmembránové, cytoplazmatické a dokonca jadrové proteíny, pričom selekcia špecifického proteínového obsahu pravdepodobne predstavuje aktívny, selektívny proces nie len náhodné zbaľovanie. Nukleové kyseliny obsiahnuté v EV zahŕňajú genomickú a mitochondriálnu DNA, rôzne typy RNA vrátane mRNA a nekódujúcich RNA, s osobitným dôrazom na miRNA (Kalluri a LeBleu, 2020). Úloha EV v patogenéze PD je duálna, zahŕňajúca tak šírenie patologických molekúl, ako aj potenciálnu protektívnu funkciu prostredníctvom odstraňovania toxických agregátov. α Syn, centrálny proteín v patológii PD, bol detegovaný v rôznych formách v rámci EV, od monomérov cez oligoméry až po fibrilárne štruktúry. Experimentálne štúdie na neuroblastómových bunkových líniiach SH-SY5Y s nadexpresiou α Syn demonštrovali, že takto modifikované bunky sekretujú EV so zvýšeným obsahom α Syn vo všetkých jeho konformačných stavoch. Transfer α Syn prostredníctvom EV predstavuje mechanizmus priónom podobného šírenia patológie medzi bunkami. Recipientné bunky internalizujúce EV obsahujúce agregované formy α Syn môžu podliehať sekundárnej propagácii agregácie, čím sa podporuje šírenie neurodegeneratívneho procesu (Fan a kol., 2019; Guo a kol., 2020). Tento model je konzistentný s pozorovaným šírením Lewyho patológie v mozgu podľa Braakových štádií (Braak a kol., 2004).

MiRNA ako kandidátne biomarkery PD a terapeutický potenciál EV pri neurodegenerácii

MiRNA sú krátke, nekódujúce RNA molekuly približne 22 nukleotidov, ktoré regulujú génovú expresiu na posttranskripčnej úrovni prostredníctvom väzby na 3' neprekľadanú oblasť cieľových mRNA. V rámci RISC komplexu sprostredkovávajú buď translačnú represiu, alebo degradáciu cieľovej mRNA (Saliminejad a kol., 2019). Inkorporácia miRNA do EV ich chráni pred degradáciou extracelulárnymi nukleázami, čím sa zabezpečuje ich stabilita v telových tekutinách. Viacero štúdií dokumentovalo zmenený obsah špecifických miRNA v EV u pacientov s PD. Funkčná charakterizácia jednotlivých miRNA odhalila ich zapojenie do kritických bunkových procesov asociovaných s neurodegeneráciou. Príkladmi potenciálnych miRNA markerov PD sú miR-338-3p, miR-15b-5p, miR-431-5p, miR-138-5p a miR-106b-3p, ktorých expresia bola vo vzorkách EV získaných z krvnej plazmy pacientov znížená, zatiaľ čo hladiny miR-30c-2-3p boli zvýšené (Xie a kol., 2022). Analýza EV cerebrospinálneho moku odhalila dysreguláciu miR-10a-5p, miR-153 a miR-409-3p pri PD (Gui a kol., 2015; Cai a kol., 2021).

Okrem diagnostického využitia sa EV javia ako perspektívne terapeutické nástroje. Ich prirodzený pôvod, nízka imunogenita a schopnosť prekročiť hematoencefalickú bariéru ich predurčujú na úlohu nosičov liečiv cielených do centrálného nervového systému. Pre optimalizáciu ich terapeutického potenciálu sa vyvíjajú stratégie zahŕňajúce inkorporáciu EV do hydrogélových nosičov, čo zabezpečuje prolongovanú prítomnosť v cieľovom tkanive a kontrolované uvoľňovanie (Ju a kol., 2023).

Experimentálne prístupy demonštrovali možnosť využitia EV derivovaných z mezenchymálnych kmeňových buniek pre moduláciu patológie Alzheimerovej choroby prostredníctvom redukovania patologického proteínu amyloid- β (Chen a kol., 2021). V kontexte PD bol vyvinutý systém exo-ASO4, kombinujúci EV s *antisense* oligonukleotidmi cielenými na α Syn mRNA. Tento prístup viedol k zníženiu expresie a agregácie α Syn v myšiacich modeloch, so súčasným spomalením degenerácie dopaminergných neurónov a zlepšením motorických funkcií (Yang a kol., 2021). Ďalšou stratégiou je využitia EV ako nosičov špecifických miRNA s terapeutickým potenciálom. EV obsahujúce miR-188-3p vykazovali protektívne účinky v modeloch PD prostredníctvom modulácie autofágie a zápalovej odpovede (Li a kol., 2021).

Systematická analýza metodologickej variability štúdia EV miRNA vo výskume PD

Analýza publikovaných štúdií odhaľuje diverzitu v prístupoch k izolácii EV, čo predstavuje primárny zdroj sťaženej replikovateľnosti výsledkov. Diferenciálna ultracentrifugácia sa opiera o sedimentačné vlastnosti EV. Tangenciálna prietoková filtrácia (TFF) a *size-exclusion* chromatografia (SEC) separujú EV na základe veľkosti. Afinitné metódy využívajúce špecifické interakcie s povrchovými markermi umožňujú selektívnu izoláciu subpopulácií EV, ale ich výťažnosť a čistota závisia od zvoleného markera. Komerčné

precipitačné kity (*ExoQuick*, *ExoEasy*, *Total Exosome Isolation Reagent*) ponúkajú rýchlosť a jednoduchosť, ale môžu viesť k koizolácii kontaminujúcich proteínov a lipoproteínov (Stam a kol., 2021). Kritickým pozorovaním je, že každá z analyzovaných štúdií (Tab. 1) využila odlišný izolačný protokol. Táto variabilita má priamy dopad na zloženie izolovanej vezikulárnej populácie, pretože rôzne metódy obohacujú odlišné subtypy EV s potenciálne odlišným miRNA obsahom.

Variabilita v metódach izolácie miRNA

Po izolácii EV nasleduje extrakcia RNA, ktorá taktiež vykazuje značnú metodologickú heterogenitu (Tab. 1). Väčšina štúdií využila komerčné kity od firmy *Qiagen* (*miRNeasy Mini Kit*, *miRNeasy Serum/Plasma Kit*), ale Cai a kol. kombinovali *Qiagen kit* s *BIOLOG cfRNA Easy kit*, zatiaľ čo Manna a kol. použili *mirVana Paris extraction kit* od *Thermo Fisher Scientific*. Každý z týchto protokolov optimalizuje iné parametre extrakcie, čo môže viesť k selektívnej strate alebo obohacovaniu špecifických miRNA podskupín. Metódy detekcie a kvantifikácie relatívnej expresie miRNA taktiež prispievajú k variabilite (Cai a kol., 2021; Manna a kol., 2021; Xie a kol., 2022).

Heterogenita biologických vzoriek

Typ biologickej vzorky predstavuje ďalší kritický zdroj variability. Analyzované štúdie (Tab. 1) využili široké spektrum zdrojov od bunkových kultúr (SH-SY5Y, ľudské neuronálne kmeňové bunky), zvieracie tkanivá (potkaní stredný mozog), cerebrospinálny mok, krvné sérum a krvnú plazmu. Každý z týchto zdrojov obsahuje odlišnú populáciu EV s unikátnym molekulárnym obsahom reflektujúcim ich bunkový pôvod. Krvná plazma a sérum sú ľahko dostupné, ale obsahujú EV z mnohých tkanív a orgánov, čo znižuje špecifitu pre neurodegeneratívny proces (Gui a kol., 2015; Cao a kol., 2017; Cai a kol., 2021; Manna a kol., 2021; Xie a kol., 2022; Li a kol., 2023).

Variabilita v charakteristikách patientskych kohort

Štúdie založené na patientských vzorkách sa líšia v mnohých parametroch, ktoré môžu ovplyvniť výsledky. Veľkosť kohort varíruje od malých pilotných štúdií s desiatok pacientov po väčšie multicentrické štúdie. Štádium ochorenia, trvanie symptómov, medikácia, vek, pohlavie a komorbidity pacientov predstavujú dodatočné zdroje heterogenity, ktoré sú často nedostatočne kontrolované alebo hlásené (Welsh a kol., 2024).

Analýza prekryvu identifikovaných biomarkerov

Žiadne dve štúdie (Tab. 1) nepotvrdili identický panel biomarkerov. Iba marginálne percento miRNA vykazuje konzistentné zmeny vo viacerých nezávislých datasetoch. miR-15b-5p (znížená expresia) bola identifikovaná v dvoch štúdiách využívajúcich krvné vzorky (Manna a kol., 2021; Xie a kol., 2022), ale nebola replikovaná v štúdiách využívajúcich CSF alebo tkanivá. miR-138-5p (znížená expresia) sa objavila taktiež v dvoch štúdiách (Manna a kol., 2021; Xie a kol., 2022) s rovnakým zdrojom vzoriek. miR-19b-3p (znížená expresia) bola identifikovaná v troch štúdiách (Gui a kol., 2015; Cao a kol., 2017; Cai a kol., 2021), ale s rozdielnym stupňom dysregulácie. miR-195 varianty (miR-195-3p, miR-195-5p) vykazovali opačné smery regulácie v rôznych štúdiách, Cao a kol. identifikovali zvýšenie, zatiaľ čo Cai a kol. popísal zvýšenie miR-195-3p, ale odlišný profil pre miR-195-5p. miR-153, miR-409-3p a miR-10a-5p (zvýšená expresia) boli identifikované v dvoch nezávislých štúdiách využívajúcich CSF a plazmu (Gui a kol., 2015; Cai a kol., 2021). Väčšina identifikovaných miRNA (viac ako 75 % kandidátov) bola pozorovaná iba v jedinej štúdii bez akejkoľvek nezávislej replikácie. Pozoruhodné je, že niektoré miRNA vykazujú opačné smery regulácie v rôznych štúdiách. Tento fenomén nemožno vysvetliť biologickou variabilitou a poukazuje na fundamentálne metodologické problémy.

Tab. 1. Prehľad diferenciálne exprimovaných miRNA izolovaných z EV získaných z modelov alebo od pacientov s PD. Tabuľka sprehľadňuje reguláciu molekúl miRNA s potenciálom v diagnostike PD. Šípkou hore (↑) sú označené tie, ktoré sú signifikantne nadexprimované pri PD v porovnaní s kontrolou a šípka dole (↓) ilustruje zníženú expresiu týchto miRNA. V tabuľke sú uvedené aj jednotlivé spôsoby izolácie EV a miRNA, keďže vybraný protokol môže mať vplyv na výsledok.

zdroj EV	metóda izolácie EV	metóda izolácie miRNA	miRNA biomarker	expresia
(Xie a kol., 2022)				
bunková línia SH-SY5Y	ExoEasy Maxi Kit (Qiagen)	miRNeasy Mini Kit (Qiagen)	miR-15b-5p	↓
			miR-138-5p	↓
			miR-338-3p	↓
			miR-106b-3p	↓
			miR-146a-5p	↓
			miR-431-5p	↓
			miR-30c-2-3p	↑
			miR-411-5p	↑
krvné sérum od pacientov s PD			miR-30c-2-3p	↑
			miR-15b-5p	↓
			miR-138-5p	↓
			miR-338-3p	↓
			miR-106b-3p	↓
			miR-431-5p	↓
(Li a kol., 2023)				
tkanivo stredného mozgu potkanieho modelu PD indukovaného rotenónom	ultrafiltrácia (UC), size exclusion chromatografia (SEC)	miRNeasy Mini Kit (Qiagen)	miR-103-3p	↑
			miR-107-3p	↑
			miR-219a-2-3p	↑
			miR-379-5p	↑
			miR-328a-3p	↓
			miR-133a-3p	↓
			miR-133b-3p	↓

(Gui a kol., 2015)				
	U C	mi R N ea	miR-153	↑

(cerebrospinálna tekutina) CSF od pacientov s PD			miR-409-3p	↑
			miR-10a-5p	↑
			let-7g-3p	↑
			miR-1	↓
			miR-19b-3p	↓
(Cai a kol., 2021)				
ľudské neuronálne kmeňové bunky	ExoEasy Maxi Kit (Qiagen)	miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen), BIOG cfRNA Easy kit (Bio-generating Biotechnology)	miR-23b-3p	↓
potkaní model PD indukovaný 6-OHDA			miR-30b-5p	↓
			miR-342-3p	↓
			miR-195-3p	↑
			miR-23b-3p	↓
			miR-30b-5p	↓
			miR-195-3p	↑
krvná plazma od pacientov s PD			miR-23b-3p	↓
			miR-30b-5p	↓
			miR-195-3p	↑
			miR-195-5p	↑
			miR-409-3p	↑
miR-10a-5p			↑	
krvná plazma od pacientov s PD	ExoEasy Maxi Kit (Qiagen)	miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen), BIOG cfRNA Easy kit (Bio-generating Biotechnology)	let-7g-3p	↑
			miR-1	↓
			miR-19b-3p	↓
(Manna a kol., 2021)				
	Exo Q ui	mi rV an a	miR-21-3p	↓

krvné sérum od pacientov s PD			miR-22-3p	↑
			miR-223-5p	↑
			miR-15b-5p	↓
			miR-138-5p	↓
			miR-338-3p	↓
			miR-106b-3p	↓
			miR-431-5p	↓
(Cao a kol., 2017)				
krvné sérum od pacientov s PD	<i>Total exosome isolation reagent from body fluids (Invitrogen)</i>	<i>miRNeasy Mini Kit (Qiagen)</i>	miR-19b	↓
			miR-24	↑
			miR-195	↑

Dôsledky analýzy miRNA v EV pre diagnostický a translačný potenciál vo výskume PD

Bez robustnej validácie a konvergenencie nálezov naprieč nezávislými štúdiami je klinická implementácia akéhokoľvek kandidátneho biomarkera predčasná a potenciálne zavádzajúca. Táto situácia sa prejavuje najmä pri vývoji klinicky použiteľných diagnostických testov, ktorý predpokladá tri neoddeliteľné požiadavky (i) analytickú validitu (test musí spoľahlivo a presne merať cieľový biomarker), (ii) klinickú validitu (biomarker musí konzistentne korelovať s prítomnosťou ochorenia) a (iii) klinickú užitočnosť (test musí poskytovať informácie zlepšujúce klinické rozhodovanie) (Hayes, 2015). Súčasný stav výskumu nedosahuje ani prvú z týchto požiadaviek, pretože ak rôzne laboratória izolujúce EV z podobných vzoriek identifikujú kompletne odlišné sady dysregulovaných miRNA, analytická validita zostáva otázná. Preto prvým krokom je etablovanie štandardizovaných protokolov pre všetky fázy experimentálneho postupu zahrňujúce všetky pre-analytické faktory (napríklad typ antikoagulantu pri krvných vzorkách, čas a teplota skladovania). Charakterizácia EV by mala striktne nasledovať odporúčania MISEV (*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* medzinárodného konzorcia *The International Society for Extracellular Vesicles* (Welsh a kol., 2024)). Druhým krokom pri robustnej validácii na klinickej úrovni je analýza nezávislých replikačných kohort s minimálne 100+ pacientov s PD a 100+ vekovo a pohlavím zodpovedajúcich kontrol. Longitudinálny dizajn sledujúci pacientov počas progresie ochorenia je nevyhnutný, rovnako ako stratifikácia podľa štádia, genetického pozadia a medikácie. Kritické je zahrnutie pacientov s inými parkinsonskými syndrómami pre hodnotenie špecificity. Tretím komponentom je paralelne vedená mechanistická validácia v bunkových a zvieracích modeloch s uniformným genetickým pozadím. Tieto systémy eliminujú variabilitu prítomnú v ľudských kohortách a umožňujú napríklad manipuláciu génov asociovaných s PD (SNCA, LRRK2, PINK1, PARK2, VPS35) a kontrolovanú indukciu patológie. Cieľom je identifikovať profily miRNA robustné naprieč modelmi a následne ich validovať v ľudských vzorkách. Až následné experimentálne overenie regulačných vzťahov, testovania v *in vitro* a *in vivo* modeloch spojených so stratégiami ich ovplyvnenia (miRNA *mimics*, či inhibitory) môže preukázať funkčnú relevantnosť kandidátov.

Záver

Extracelulárne vezikuly (EV) predstavujú fascinujúcu oblasť výskumu s významným potenciálom pre diagnostiku a terapiu Parkinsonovej choroby (PD). Schopnosť EV reflektovať patologický stav originálnych buniek a ich prítomnosť v periférnych telových tekutinách ich predurčuje na úlohu biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu ochorenia. Molekulárny obsah EV, najmä microRNA (miRNA) profily, vykazujú špecifické zmeny asociované s PD, hoci pretrvávajúca variabilita medzi štúdiami vyžaduje rozsiahlu validáciu vo väčších kohortách. Terapeutické využitie EV, či už ako nosičov liečiv alebo prostriedkov pre moduláciu patologických procesov, otvára nové perspektívy v liečbe neurodegeneratívnych ochorení. Schopnosť prekročiť hematoencefalickú bariéru a cielene dodávať terapeutické molekuly predstavuje značnú výhodu oproti konvenčným prístupom. Pre realizáciu plného potenciálu EV v klinickej praxi je nevyhnutná štandardizácia metodologických postupov a etablovanie konsenzuálnych protokolov. Medzinárodné iniciatívy ako MISEV *guidelines* predstavujú krok správnym smerom, no implementácia jednotných štandardov v rôznych laboratóriách zostáva výzvou. Využitie bunkových modelov s definovaným genetickým pozadím môže prispieť k štandardizácii a identifikácii robustných biomarkerov, ktoré môžu byť následne validované v heterogénnych patientskych populáciách. Budúci výskum by sa mal zamerať na longitudinálne štúdie mapujúce dynamiku biomarkerov počas progresie ochorenia, identifikáciu panelu komplementárnych biomarkerov s vyššou prediktívnou hodnotou a vývoj presných terapeutických stratégií využívajúcich jedinečné vlastnosti EV. Integrácia poznatkov z oblasti biológie EV, neurológie a klinickej medicíny bude kľúčová pre transformáciu sľubných výsledkov základného výskumu do klinickej praxe.

Podakovanie

Táto práca bola financovaná EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00270

Zoznam použitej literatúry

- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* **318**(1): 121–134.
- Caldi Gomes, L., Roser, A. E., Jain, G., Pena Centeno, T., Maass, F., Schilde, L., May, C., Schneider, A., Bähr, M., Marcus, K., Fischer, A., Lingor, P. (2021). MicroRNAs from extracellular vesicles as a signature for Parkinson's disease. *Clin. Transl. Med.* **11**(4): 1–7.
- Cai, Meng, Chai, S., Xiong, T., Wei, J., Mao, W., Zhu, Y., Li, X., Wei, W., Dai, X., Yang, B., Liu, W., Shu, B., Wang, M., Lu, T., Cai, Y., Zheng, Z., Mei, Z., Zhou, Y., Yang, J., Zhao, J., Shen, L., Ho, J. W. K., Chen, J., Xiong, N. (2021). Aberrant Expression of Circulating MicroRNA Leads to the Dysregulation of Alpha-Synuclein and Other Pathogenic Genes in Parkinson's Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**: 1–15.
- Cao, X. Y., Lu, J. M., Zhao, Z. Q., Li, M. C., Lu, T., An, X. S., Xue, L. J. (2017). MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci. Lett.* **644**: 94–99.
- Chen, Y. A., Lu, C. H., Ke, C. C., Chiu, S. J., Jeng, F. S., Chang, C. W., Yang, B. H., Liu, R. S. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate alzheimer's disease pathology and improve cognitive deficits. *Biomedicines* **9**(6): 1–19.
- Dixon, A. C., Dawson, T. R., Di Vizio, D., Weaver, A. M. (2023). Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **24**(7): 454–476.
- Fan, R. Z., Guo, M., Luo, S., Cui, M., Tieu, K. (2019). Exosome release and neuropathology induced by α -synuclein: New insights into protective mechanisms of Drp1 inhibition. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**(1): 1–18.
- Gui, Y. X., Liu, H., Zhang, L. S., Lv, W., Hu, X. Y. (2015). Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget* **6**(35): 37043–37053.

- Guo, M., Wang, J., Zhao, Y., Feng, Y., Han, S., Dong, Q., Cui, M., Tieu, K. (2020). Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain* **143**(5): 1476–1497.
- Hayes D. F. (2015). Biomarker validation and testing. *Molecular oncology*, **9**(5): 960–966.
- Ju, Y., Hu, Y., Yang, P., Xie, X., Fang, B. (2023). Extracellular vesicle-loaded hydrogels for tissue repair and regeneration. *Mater. Today Bio* **18**: 100522.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, **386**(9996): 896–912.
- Kalluri, R., LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **367**(6478).
- Krylova, S. V., Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(2): 1337.
- Li, Q., Wang, Z., Xing, H., Wang, Y., Guo, Y. (2021). Exosomes derived from miR-188-3p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells protect Parkinson's disease. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **23**: 1334–1344.
- Li, Z., Chen, D., Pan, R., Zhong, Y., Zhong, T., Jiao, Z. (2023). microRNAs profiling of small extracellular vesicles from midbrain tissue of Parkinson's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **16**: 1090556.
- Ma, L., Li, Y., Peng, J., Wu, D., Zhao, X., Cui, Y., Chen, L., Yan, X., Du, Y., Yu, L. (2015). Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res.* **25**(1): 24–38.
- Marques, T. M., Kuiperij, H. B., Bruinsma, I. B., van Rumund, A., Aerts, M. B., Esselink, R. A. J., Bloem, B. R., Verbeek, M. M. (2017). MicroRNAs in Cerebrospinal Fluid as Potential Biomarkers for Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Mol. Neurobiol.* **54**(10): 7736–7745.
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **30**(12): 1591–1601.
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J. Cell. Physiol.* **234**(5): 5451–5465.
- Stam, J., Bartel, S., Bischoff, R., Wolters, J. C. (2021). Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1169**: 122604.
- Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, *et al.* (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J. Extracell. Vesicles* **13**(2): e12404.
- Xie, S., Niu, W., Xu, F., Wang, Y., Hu, S., Niu, C. (2022). Differential expression and significance of miRNAs in plasma extracellular vesicles of patients with Parkinson's disease. *Int. J. Neurosci.* **132**(7): 673–688.
- Yang, J., Luo, S., Zhang, J., Yu, T., Fu, Z., Zheng, Y., Xu, X., Liu, C., Fan, M., Zhang, Z. (2021). Exosome-mediated delivery of antisense oligonucleotides targeting α -synuclein ameliorates the pathology in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **148**: 105218.
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M. T., Molina, H., Martin, A. B., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C. M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., Wang, H., Jimenez, J. P., Cohen-Gould, L., Paknejad, N., Brendel, M., Manova-Todorova, K., Magalhães, A., Ferreira, J. A., Osório, H., Silva, A. M., Massey, A., Cubillos-Ruiz, J. R., Galletti, G., Giannakakou, P., Cuervo, A. M., Blenis, J., Schwartz, R., Brady, M. S., Peinado, H., Bromberg, J., Matsui, H., Reis, C. A., Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.* **20**(3): 332–343.

Kvalita vzoriek ako neviditeľný faktor vedeckého úspechu

Romana ZÁHUMENSKÁ¹, Marcela KUNIAKOVÁ², Zuzana DANKOVÁ^{1,3}

¹ Biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, L. Novomeského 11947/7B, 036 01 Martin

² Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky, Limbová 2, 831 01 Bratislava

³ Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4C, 036 01 Martin

Abstrakt

Kvalita biologických vzoriek predstavuje kľúčový, no často prehliadaný aspekt vedeckého výskumu, ktorý zásadne ovplyvňuje validitu výsledkov, reprodukovateľnosť experimentov a dôveryhodnosť získaných dát. V kontexte biobankovania na Slovensku, sa ukazuje, že štandardizovaný zber, spracovanie a uchovávanie vzoriek podľa medzinárodných noriem je nevyhnutný pre excelentný biomedicínsky výskum a rozvoj precíznej medicíny. Preanalytické faktory, ako biologická a environmentálna variabilita, spôsob odberu, transportu či spracovania vzoriek, môžu výrazne narušiť integritu vzorky a tým aj výsledky výskumu. Nedostatočná kontrola týchto faktorov vedie k plytvaniu časom, financiami a k zníženiu efektivity vedeckých výstupov. Biobanky, ako infraštruktúra výskumu, zohrávajú zásadnú úlohu v zvyšovaní kvality dát, podpore medzinárodných projektov a v prepojení výskumu s klinickou praxou. Cieľom publikácie je akcentovať kvalitu vzoriek ako základný predpoklad vedeckého úspechu, identifikovať kritické aspekty preanalytickej fázy a predstaviť úlohu biobánk a európskych harmonizačných rámcov pri štandardizácii postupov naprieč pracoviskami, s dôrazom na systematické riadenie preanalytických procesov ako podmienku spoľahlivého a klinicky relevantného biomedicínskeho výskumu.

Kľúčové slová: kvalita vzoriek, reprodukovateľnosť výskumu, validita výsledkov, biobanka

Sample Quality as an Invisible Factor of Scientific Success

Summary

The quality of biological samples represents a crucial, yet frequently overlooked, component of scientific research, fundamentally influencing the validity of results, the reproducibility of experiments, and the overall reliability of generated data. Within the context of biobanking in Slovakia, it has become evident that standardized procedures for the collection, processing, and storage of samples, aligned with international guidelines, are essential for high-quality biomedical research and the advancement of precision medicine. Pre-analytical factors—including biological and environmental variability, methods of sample collection, transportation conditions, and processing protocols—can significantly compromise sample integrity and, consequently, affect research outcomes. Insufficient control of these parameters leads to excessive time and financial losses and reduces the efficiency of scientific outputs. Biobanks, as key research infrastructures, play an indispensable role in enhancing data quality, supporting international collaboration, and strengthening the interface between research and clinical practice. The aim of this publication is to emphasize sample quality as a fundamental determinant of scientific success, to identify critical aspects of the pre-analytical phase, and to outline the role of biobanks and European harmonization frameworks in standardizing procedures across institutions, with particular attention to systematic pre-analytical process management as a prerequisite for reliable and clinically relevant biomedical research.

Keywords: Sample quality, research reproducibility, validity of results, biobank

Úvod

Kvalita biologických vzoriek predstavuje jeden z najzásadnejších, no zároveň najpodceňovanejších pilierov biomedicínskeho výskumu. Vedecké výsledky, ktoré sú odvodené z molekulárnych analýz, sú vždy len také spoľahlivé, ako je spoľahlivá kvalita vstupného materiálu. V ére genomiky, proteomiky, epigenetiky a multi-omických prístupov sa biologické vzorky stávajú základným zdrojom dát, na ktorých

stojí nielen akademický výskum, ale aj klinická diagnostika, personalizovaná medicína a vývoj nových terapeutík.

Napriek tomu sa kvalita vzoriek často dostáva do úzadia. Výskumníci venujú obrovské úsilie optimalizácii analytických metód, bioinformatických pipeline či štatistických modelov, no predanalytická fáza — teda všetko, čo sa deje so vzorkou pred samotnou analýzou — zostáva prekvapivo zanedbaná. Tento paradox je jedným z hlavných dôvodov, prečo sa vedecké výsledky nedajú reprodukovať, čo potvrdzujú aj viaceré vedecké štúdie.

Moderná a personalizovaná medicína napreduje každým dňom a odhaľuje svoj výrazný potenciál transformovať najnovšie vedecké poznatky do cielenej klinickej praxe. Tento pokrok ale zásadne závisí od dostupnosti vysokokvalitných a spoľahlivo anotovaných biologických vzoriek, ktoré sú v súčasnosti mimoriadne žiadané. Ich dostupnosť je však často limitovaná výraznými rozdielmi v kvalite biomateriálov, ich komplexnosti a zharmonizovaní metadát naprieč jednotlivými pracoviskami, čo predstavuje významnú prekážku pre robustný výskum. Táto naliehavá potreba štandardizovaných a dôveryhodných údajov podčiarkuje kľúčovú úlohu biobáň [1,2].

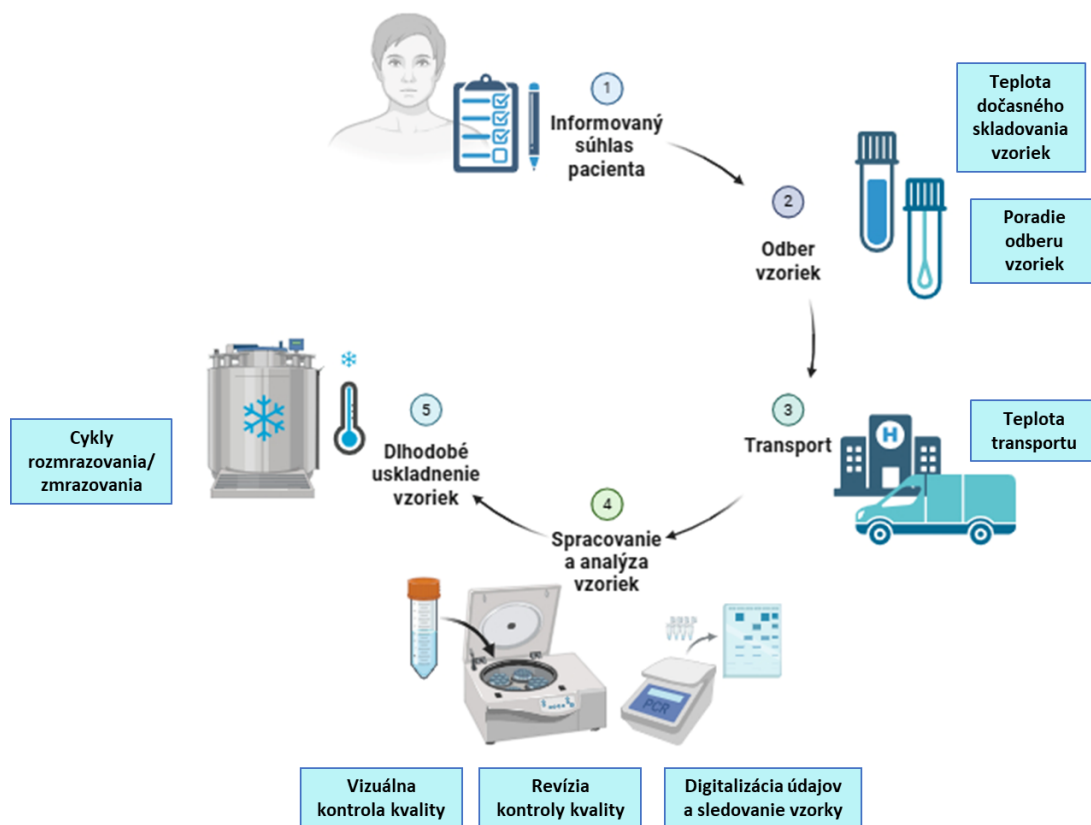
Spracovanie biologických vzoriek a reprodukovateľnosť údajov

Biologické vzorky predstavujú akýkoľvek biologický materiál odobratý na účely vedeckého výskumu alebo klinickej diagnostiky, pričom zahŕňajú široké spektrum vzoriek vrátane tkanív, buniek, krvi, slín, moču a ďalších biologických substrátov. Ich kvalita a spôsob spracovania zásadným spôsobom ovplyvňujú spoľahlivosť následných analýz, a preto je riadenie celého životného cyklu vzorky kľúčové [3,4].

Vysokokvalitná vzorka musí čo najvernejšie zachovávať pôvodný biologický stav organizmu, aby výsledné údaje boli presné, porovnateľné a reprodukovateľné. Práve preto sa vzorka často označuje za „najslabší článok“ experimentálneho reťazca – ak je narušená už v predanalytickej fáze, žiadna následná analytická metóda nedokáže tieto chyby odstrániť [5].

Hoci sa jednotlivé kroky životného cyklu vzorky môžu líšiť v závislosti od typu biologického materiálu a plánovaného použitia, vo všeobecnosti možno rozlíšiť päť základných fáz: odber, spracovanie, dočasné skladovanie, analýza vzoriek a likvidácia alebo opätovné uskladnenie. Existujú však aj ďalšie dôležité časti životného cyklu, ktoré môžu významne ovplyvniť kvalitu, stabilitu a použiteľnosť biologického materiálu v klinickej diagnostike aj biomedicínskom výskume. Tieto kroky sú často podceňované, no ich variabilita zásadným spôsobom prispieva k preanalytickým chybám a ak sú vykonané nesprávne, prispievajú k celkovej nespoľahlivosti výsledkov. Patria medzi ne predovšetkým plánovanie a dokumentácia pred odberom, transport vzorky a monitorovanie teploty, dlhodobé uskladnenie, revízia kvality a spätná kontrola údajov. Tieto dopĺňajúce fázy významne rozširujú tradičný pohľad na životný cyklus vzorky a ukazujú, že biologický materiál neexistuje izolovane, ale v rámci zložitého procesného reťazca (Obrázok 1).

Preanalytická fáza predstavuje náročný a premenlivý proces. Chyby vznikajúce v tomto úseku životného cyklu vzorky často vedú k náhodným odchýlkam, ktoré bežné kontrolné mechanizmy nedokážu spoľahlivo zachytiť [6,7].



Obr. 1. Schéma zobrazuje komplexný životný cyklus biologickej vzorky – od získania informovaného súhlasu pacienta, cez odber, transport, spracovanie a analýzu až po dlhodobé uskladnenie. jednotlivé kroky dopĺňajú kľúčové faktory ovplyvňujúce kvalitu vzorky, ako sú podmienky transportu, teplota skladovania, poradie odberu či kontrolné mechanizmy kvality.

Preanalytická fáza- kritické zdroje chýb a ich dopad

Úroveň preanalytickej fázy predstavuje kľúčový faktor ovplyvňujúci celkovú spoľahlivosť laboratórnej analýzy a tým aj konzistentnosť experimentálnych postupov. Chyby vznikajúce v tejto fáze – od nedostatočnej prípravy pacienta, nesprávneho odberu, nevhodných podmienok transportu, kolísania teploty, opakovania cyklov zmrazovania a rozmrazovania, nedostatočného premiešania, chýb pri aliquotovaní až po nesprávne označenie vzorky [7] – generujú variabilitu, ktorá presahuje prirodzené biologické rozdiely a zásadne narušuje konzistentnosť dát.

Tieto faktory môžu meniť koncentrácie analytov, spôsobovať hemolýzu, degradáciu nukleových kyselín alebo proteínov a tým zásadne ovplyvniť výsledky laboratórnych analýz. K variabilite významne prispievajú aj biologické a environmentálne faktory. Biologická variabilita zahŕňa vek, pohlavie, BMI, hormonálny stav, diétne návyky či užívanie liekov, zatiaľ čo environmentálna variabilita zahŕňa sezónne zmeny, teplotu, vlhkosť či geografické podmienky [8]. Jednotlivé vplyvy, či už pôsobia samostatne alebo v kombinácii, dokážu meniť fyziologické parametre ešte pred samotným odberom, čo zvyšuje potrebu dôslednej štandardizácie predanalytických procesov (Tabuľka 1).

Tab. 1. Kľúčové zdroje chýb v preanalytickej fáze a ich dopad. Upravené podľa Nordi et al., 2024.

Oblasť preanalytickej fázy	Hlavné riziká / zdroje chýb	Dopad
Príprava pacienta	• Nedodržanie pôstu (8–12 h) • Fajčenie, alkohol, káva • Žuvanie žuvačky • Interferencie liekov (DLTI až 43 %)	• Falošne vysoké hodnoty glukózy, triglyceridov, cholesterolu a iné • Lipémia a interferencie v optických metódach
Odber vzoriek	• Nesprávna identifikácia pacienta (16 %) • Chyby v označovaní skúmaviek (56 %) • Nevhodné techniky flebotómie (hemolýza, pseudohyperkaliémia) • Dlhodobé škrtidlo (>3 min) • Nesprávne poradie odberu	• Zámene vzoriek, kritické klinické omyly • Falošná hyperkaliémia/hypokalcémia (EDTA kontaminácia) • 12,4 % zvýšenie proteínov a Ca²⁺ pri venózne stáze
Poloha pacienta a denná variácia	• Zmena polohy pred odberom • Odber mimo odporúčaného času	• Výrazné zmeny analytov • Nezrovnalosti pri interpretácii výsledkov
Manipulácia, preprava a skladovanie vzoriek	• Nedostatočná stabilita analytov • Oneskorená centrifugácia (>2 h) • Nevhodná teplota pri transporte a skladovaní	• Degradácia analytov, falošné výsledky • Potreba opakovaného odberu, oneskorenie diagnostiky

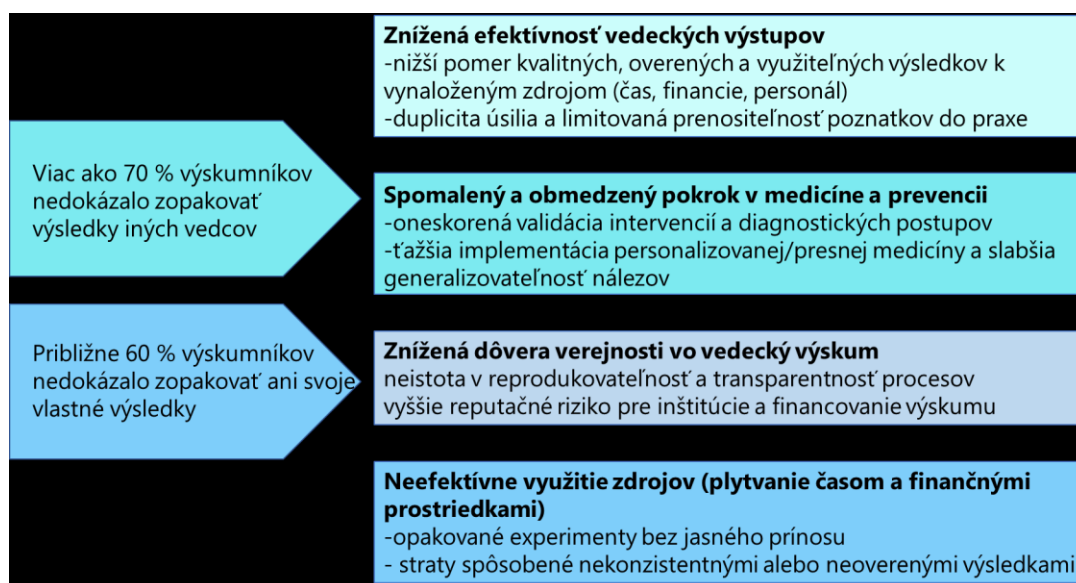
*DLTI- Drug Laboratory Test Interference

Medzinárodné štúdie uvádzajú, že preanalytické chyby tvoria až 70 % všetkých laboratórnych chýb, čo má priamy dopad na neefektívne využívanie času, finančných prostriedkov a kapacít laboratórií pričom praktickým dôsledkom sú opakované odbery, nadbytočné analýzy, oneskorenie diagnostiky a spomalenie výskumu [7,9].

Nedostatočná kontrola preanalytických procesov znižuje efektivitu vedeckých výstupov, pretože nekonzistentné alebo degradované vzorky produkujú výsledky, ktoré nie je možné replikovať, ani integrovať do metaanalýz. Tento problém je obzvlášť kritický v kontexte biobankovania, kde kvalita a štandardizácia odberu, spracovania a skladovania vzoriek predstavujú základ pre dlhodobé využitie v epidemiologických, genetických a personalizovaných medicínskych štúdiách. Biobanky sú závislé od vysoko reprodukovateľných protokolov a vysokokvalitných vzoriek; ak je preanalytická fáza nekontrolovaná, vzorky strácajú vedeckú hodnotu a ich využiteľnosť v budúcich projektoch sa výrazne znižuje. Biobanky preto aktívne reagujú dôslednou implementáciou štandardizovaných protokolov v súlade s medzinárodnými usmerneniami, najmä normou ISO 20387 a relevantnými normami (napr. ISO 20166, ISO 20184, ISO 21899 a iné), systematickým monitorovaním kvality a harmonizáciou postupov, aby zabezpečili trvalo vysokú integritu biologického materiálu a zachovali jeho plnú vedeckú využiteľnosť v budúcich výskumných projektoch [10,11].

Dôsledkom preanalytických chýb je aj oslabenie verejnej dôvery vo vedecký výskum, keďže nekonzistentné alebo protichodné výsledky môžu byť mylne interpretované ako zlyhanie vedeckej metódy a komunity, nie ako dôsledok nedostatočnej štandardizácie procesov (Obrázok 2). Navyše, preanalytická variabilita brzdí rozvoj precíznej medicíny a preventívnych stratégií, ktoré sú závislé od presných biomarkerov a robustných dátových súborov. Ak sú vstupné vzorky nekvalitné, algoritmy, klinické rozhodovacie systémy aj populačné štúdie pracujú s chybnými údajmi, čo spomaľuje implementáciu personalizovaných terapeutických prístupov.

Preto je nevyhnutné, aby laboratória, klinické pracoviská a biobanky implementovali harmonizované preanalytické protokoly, kontinuálne vzdelávali personál a monitorovali kvalitu, čím sa minimalizuje variabilita, znižujú sa náklady a posilňuje sa dôvera v laboratórnu medicínu aj vedecký výskum ako celok [13].



Obr. 2. Schéma sumarizuje hlavné dôsledky preanalytických chýb na vedecký výskum, klinickú prax a efektívne využívanie zdrojov. Nedostatočná kontrola preanalytických procesov vedie k nízkej reprodukovateľnosti výsledkov, spomaleniu pokroku v medicíne, zníženiu verejnej dôvery a k významným časovým aj finančným stratám v laboratórnej diagnostike a výskumných projektoch [12].

Opatrenia na zlepšenie preanalytických chýb

Presnosť laboratórnych výsledkov predstavuje kľúčový predpoklad pre kvalifikované klinické rozhodovanie a efektívne poskytovanie zdravotnej starostlivosti. Hoci sa tradične sústreďovala pozornosť najmä na analytickú fázu laboratórneho procesu, v súčasnosti sa čoraz väčší dôraz kladie na optimalizáciu preanalytickej fázy, ktorá významne prispieva k celkovému výskytu laboratórnych chýb. Minimalizácia týchto pochybení si vyžaduje systematické harmonizačné aktivity, cielené vzdelávacie a tréningové programy, využívanie automatizovaných nástrojov na hodnotenie kvality vzoriek a dôsledné monitorovanie kvalitatívnych ukazovateľov. Úzka spolupráca medzi biobankami, vedeckými odborníkmi a klinickými pracovníkmi je nevyhnutná pre úspešnú implementáciu a dlhodobé udržiavanie týchto opatrení, čo vedie k zvýšeniu presnosti a spoľahlivosti diagnostických výsledkov a v konečnom dôsledku k zlepšeniu starostlivosti o pacienta (Obrázok 3) [13].

Nedostatočná štandardizácia preanalytických procesov viedla ku vzniku európskych harmonizačných iniciatív, najmä EFLM WG-PRE (*European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Working Group for the Preanalytical Phase*), ktorá od roku 2013 vytvára odporúčania a vzdelávacie aktivity na zjednotenie preanalytických postupov [13, 14]. Významným partnerom je aj BBMRI-ERIC (*Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure – European Research Infrastructure Consortium*), ktorý predstavuje rozsiahlu paneurópsku výskumnú infraštruktúru, ktorá integruje národné biobankové siete a zabezpečuje koordinovaný prístup k biologickému materiálu a sprievodným dátam s cieľom podporiť vysokokvalitný biomedicínsky výskum. Poskytuje tiež štandardizované preanalytické SOP, podporuje implementáciu noriem CEN/ISO pre biologický materiál a zabezpečuje infraštruktúru pre harmonizované riadenie kvality (napr. SPREC, MIABIS).

Keďže až 82,6 % preanalytických chýb je spôsobených ľudským faktorom [15, 16], systematické vzdelávanie zdravotníckeho personálu je zásadné. Cílený tréning preukázateľne redukuje chybovosť, pričom efektívne sú aj interaktívne modelové situácie [17]. BBMRI-ERIC dopĺňa túto oblasť európskymi tréningovými modulmi a e-learningom zameraným na správnu manipuláciu so vzorkami a dokumentáciu. Automatizované hodnotenie hemolyzovaných, ikterických a lipemických vzoriek (HIL index) umožňuje objektívnu detekciu zhoršenej kvality materiálu. WG-PRE odporúča štandardizované používanie hemolytického indexu a doplnenie komentára pri interpretácii výsledkov [18-20]. BBMRI-ERIC podporuje validáciu preanalytických parametrov a poskytuje štandardy minimalizujúce riziko hemolýzy či interferencií.

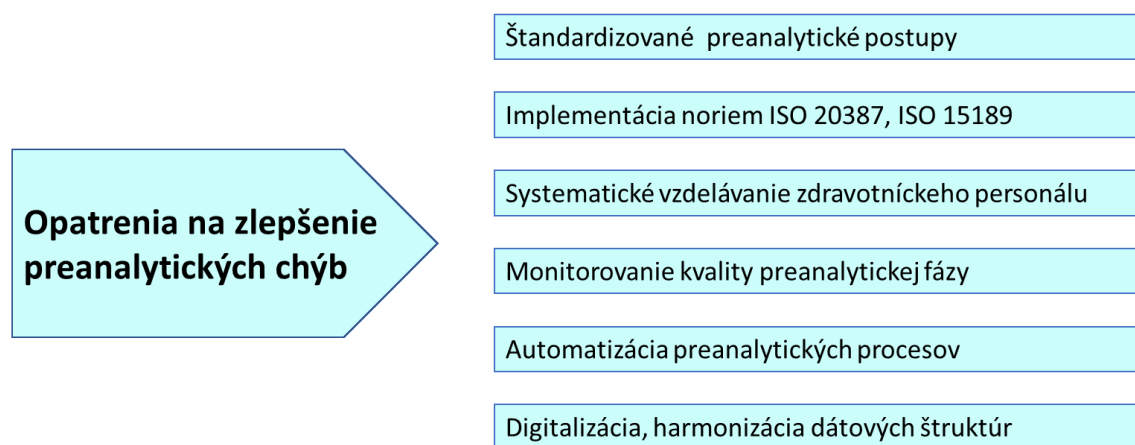
Monitorovanie kvality preanalytickej fázy je súčasťou indikátorov kvality (QI), pričom model IFCC WG-LEPS (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Working Group on*

Laboratory Errors and Patient Safety) poskytuje rámec pre štandardizované sledovanie chýb [17, 18, 21]. Požiadavky na preanalytické monitorovanie sú zakotvené aj v norme ISO 15189 [22]. BBMRI-ERIC prispieva auditovateľnými preanalytickými štandardmi, nástrojmi na hodnotenie rizík a európskymi EQA programami pre biobanky, čím podporuje jednotné monitorovanie kvality.

Automatizácia preanalytických procesov, vrátane elektronického zadávania požiadaviek, generovania čiarových kódov či inteligentných transportných systémov, významne znižuje riziko chýb spojených s manuálnymi úkonmi [23,24]. BBMRI-ERIC podporuje digitalizáciu prostredníctvom harmonizovaných dátových štruktúr (MIABIS) a interoperabilných IT riešení, ktoré uľahčujú trasovanie vzoriek a prepojenie biobankových a klinických systémov [25].

Predanalytickú variabilitu je možné kvantifikovať a kontrolovať. Moderné biobanky využívajú validované protokoly, monitorovanie teploty, elektronické systémy sledovania vzoriek (LIMS), pravidelné audity a interné kontroly kvality a stability, ktoré umožňujú identifikovať kritické body procesu a minimalizovať ich vplyv na výsledky.

Medzinárodné normy predstavujú základný nástroj na zabezpečenie kvality, transparentnosti a porovnateľnosti biomedicínskych údajov. Pre oblasť laboratórnej medicíny a biobankingu sú najrelevantnejšie normy ISO 15189, ISO 20387 a odporúčania OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) [26].



Obr. 3. Schéma sumarizuje hlavné opatrenia na zlepšenie preanalytickej fázy.

Záver

Kvalita biologických vzoriek je fundamentálnym predpokladom presných, reprodukovateľných a klinicky využiteľných výsledkov. Maximálny prínos sa dosahuje systematickým riadením preanalytickej fázy: od plánovania odberu a štandardizácie manipulácie so vzorkou, cez kontrolovaný transport, spracovanie a dokumentáciu, až po priebežné monitorovanie stability a kvality. V uvedenom reťazci zohrávajú biobanky kľúčovú úlohu ako infraštruktúry zabezpečujúce harmonizované SOP, trasovateľnosť a správu metadát, kvalitatívny dohľad, kontinuálne vzdelávanie a pripravenosť materiálu na dlhodobé či sekundárne využitie. Implementácia harmonizovaných postupov a primeranej automatizácie (elektronické žiadanky, čiarové kódy, LIMS, HIL index) preukázateľne redukuje chybovosť, skraca čas do výsledku a znižuje náklady. Európske odporúčania a normy (EFLM WG-PRE, BBMRI-ERIC, ISO 15189, ISO 20387) ponúkajú robustný rámec na zjednotenie praxe naprieč pracoviskami a posilňujú transparentnosť i dôveru v údaje. Odporúča sa pravidelné auditovanie preanalytických procesov, sledovanie indikátorov kvality a rozvážne zavádzanie škálovateľných digitálnych riešení v úzkej spolupráci s biobankami, čo vedie k vyššej presnosti, prenositeľnosti a klinickej relevancii laboratórnych výstupov.

Podakovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu Systémová verejná výskumná infraštruktúra – biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, II. fáza. Projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko, ITMS: 401101B990. Autori ďakujú BBMRI.sk za poskytovanie výskumnej infraštruktúry a kontinuálneho vzdelávania v oblasti biobankovania.

Zoznam použitej literatúry

- (1) Dagher G. Quality matters: International standards for biobanking. *Cell Prolif.* 2022 Aug;55(8):e13282. doi: 10.1111/cpr.13282. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35709534; PMCID: PMC9357355.
- (2) Policiuc L, Nutu A, Zanoaga O, Mehterov N, Braicu C, Berindan-Neagoe I. Current aspects in biobanking for personalized oncology investigations and treatments. *Med Pharm Rep.* 2023 Jul;96(3):235-245. doi: 10.15386/mpr-2647. Epub 2023 Jul 27. PMID: 37577017; PMCID: PMC10419688.
- (3) Annaratone L, De Palma G, Bonizzi G, Sapino A, Botti G, Berrino E, et al. Basic principles of biobanking: from biological samples to precision medicine for patients. *Virchows Arch.* 2021;479:233–246. doi: 10.1007/s00428-021-03151-0.
- (4) Caenazzo L, Tozzo P. The Future of Biobanking: What Is Next? *BioTech (Basel)* 2020;9:23. doi: 10.3390/biotech9040023.
- (5) Lima-Oliveira G, Improving the preanalytical phase in laboratory medicine. *EJIFCC.* 2020 Mar 20;31(1):4-5. PMID: 32256283; PMCID: PMC7109504.
- (6) Ellervik C, Vaught J. Preanalytical variables affecting the integrity of human biospecimens in biobanking. *Clin Chem.* 2015;61:914–934. doi: 10.1373/clinchem.2014.228783.
- (7) Plebani M, Scott S, Simundic AM, et al. New insights in preanalytical quality. *Clin Chem Lab Med.* 2025;63(9):1682-1692. Published 2025 Apr 24. doi:10.1515/cclm-2025-0478
- (8) Karp N. Reproducible preclinical research-Is embracing variability the answer? *PLoS Biol.* 2018 Mar 5;16(3):e2005413. doi: 10.1371/journal.pbio.2005413. PMID: 29505576; PMCID: PMC5837077.
- (9) Lippi G, Banfi G, Church S, et al. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(3):357-370. doi:10.1515/cclm-2014-1051
- (10) ISBER. (2018). ISBER Best Practices: Recommendations for Repositories (4th ed.). International Society for Biological and Environmental Repositories.
- (11) Campbell LD, Astrin JJ, DeSouza Y, Giri J, Patel AA, Rawley-Payne M, Rush A, Sieffert N. (2018). The 2018 Revision of the ISBER Best Practices: Summary of Changes and the Editorial Team's Development Process. *Biopreservation and Biobanking*, 16(1), 3–6. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0001>
- (12) Six factors affecting reproducibility in life science research and how to handle them. *Nature* (2019). doi:10.1038/d42473-019-00004-y
- (13) Nordin N, Ab Rahim SN, Wan Omar WFA, Zulkarnain S, Sinha S, Kumar S, Haque M. Preanalytical Errors in Clinical Laboratory Testing at a Glance: Source and Control Measures. *Cureus.* 2024 Mar 30;16(3):e57243. doi: 10.7759/cureus.57243. PMID: 38559530; PMCID: PMC10981510.
- (14) Cadamuro J, Simundic AM. The preanalytical phase - from an instrument-centred to a patient-centred laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med.* 2022;61(5):732-740. Published 2022 Nov 4. doi:10.1515/cclm-2022-1036
- (15) Delianu C, Hurjui LL, Tărniceriu CC, et al. Medical Staff Training - Quality Initiative to Reduce Errors in the Pre-Preanalytical Phase. *Clin Lab.* 2021;67(1):10.7754/Clin.Lab.2020.200346. doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200346
- (16) Chavan PD, Bhat VG, Poladia PP, Tiwari MR, Naresh C. Reduction in sample rejections at the preanalytical phase - Impact of training in a tertiary care oncology center. *J Lab Physicians.* 2019;11(3):229-233. doi:10.4103/JLP.JLP_4_19
- (17) Mehndiratta M, Pasha EH, Chandra N, Almeida EA. Quality Indicators for Evaluating Errors in the Preanalytical Phase. *J Lab Physicians.* 2021;13(2):169-174. doi:10.1055/s-0041-1729473
- (18) Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, Simundic AM. Blood sample quality. *Diagnosis (Berl).* 2019;6(1):25-31. doi:10.1515/dx-2018-0018
- (19) Simundic AM, Baird G, Cadamuro J, Costelloe SJ, Lippi G. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2020;57(1):1-21. doi:10.1080/10408363.2019.1664391
- (20) Cadamuro J, Lippi G, von Meyer A, et al. European survey on preanalytical sample handling - Part 2: Practices of European laboratories on monitoring and processing haemolytic, icteric and lipemic samples. On behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Biochem Med (Zagreb).* 2019;29(2):020705. doi:10.11613/BM.2019.020705

- (21) Alshaghdali K, Alcantara TY, Rezgui R, et al. Detecting Preanalytical Errors Using Quality Indicators in a Hematology Laboratory. *Qual Manag Health Care*. 2022;31(3):176-183. doi:10.1097/QMH.0000000000000343
- (22) Vermeersch P, Frans G, von Meyer A, Costelloe S, Lippi G, Simundic AM. How to meet ISO15189:2012 pre-analytical requirements in clinical laboratories? A consensus document by the EFLM WG-PRE. *Clin Chem Lab Med*. 2021;59(6):1047-1061. Published 2021 Jan 15. doi:10.1515/cclm-2020-1859
- (23) P, Frans G, von Meyer A, Costelloe S, Lippi G, Simundic AM. How to meet ISO15189:2012 pre-analytical requirements in clinical laboratories? A consensus document by the EFLM WG-PRE. *Clin Chem Lab Med*. 2021;59(6):1047-1061. Published 2021 Jan 15. doi:10.1515/cclm-2020-1859
- (24) Bellini C, Guerranti R, Cinci F, Milletti E, Scapellato C. Defining and Managing the Preanalytical Phase With FMECA: Automation and/or "Human" Control. *Hum Factors*. 2020;62(1):20-36. doi:10.1177/0018720819874906
- (25) BBMri-ERIC. (n.d.). Home – BBMri-ERIC. <https://www.bbmri-eric.eu/>; Accessed 2025 Dec 18.
- (26) BioSample Hub. ISO 20387 Biobanking standard [Internet]. Available from: <https://biosamplehub.org/iso-20387/>. Accessed 2025 Dec 18.

Limited Contribution of Copy Number Variants to Developmental Dysplasia of the Hip: Evidence from MLPA Analysis

Štefan HARSÁNYI¹, Ľubica MILOŠOVIČOVÁ¹, Boris ŠTEŇO², Andrea PASTORÁKOVÁ¹

¹Institute of Medical Biology, Genetics, and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia

²2nd Department of Orthopedics and Traumatology, Faculty of Medicine, Comenius University and University Hospital Bratislava, Antolská 11, 851 07 Bratislava, Slovakia

Summary

Developmental dysplasia of the hip (DDH) is a multifactorial skeletal disorder with contributions from both genetic and environmental factors. In addition to sequence variants, copy number variants (CNVs) in genes involved in connective tissue and skeletal development may contribute to hip instability. In this study, we evaluated CNVs in selected candidate genes using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). The study included 56 individuals, comprising 43 patients with isolated DDH and 13 healthy controls from a Slovak Caucasian population. MLPA analysis targeted selected exons of COL1A1, COL2A1, LRP5, DKK1, FZD4, and NDP. Among the 43 tested patients with DDH, a single duplication of COL1A1 exon 38 was detected. No CNVs were identified in COL2A1, LRP5, DKK1, FZD4, or NDP, and no recurrent or clearly pathogenic rearrangements were found in the analyzed loci. These findings suggest that exon-level CNVs in the investigated genes are rare and are unlikely to represent a major genetic mechanism underlying non-syndromic DDH in this population.

Keywords: developmental dysplasia of the hip, DDH, MLPA, copy number variant, CNV, COL1A1, COL2A1, LRP5

Abstrakt

Vývojová dysplázia bedrového kĺbu (DDH) je multifaktoriálne skeletálne ochorenie ovplyvnené genetickými aj environmentálnymi faktormi. Okrem sekvenčných variantov sa na vzniku nestability bedrového kĺbu môžu podieľať aj copy number varianty (CNV) v génoch zapojených do vývoja spojivového tkaniva a skeletu. V tejto štúdii sme hodnotili CNV vo vybraných kandidátnych génoch pomocou metódy multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Do štúdie bolo zaradených 56 jedincov, z toho 43 pacientov s izolovanou DDH a 13 zdravých kontrol zo slovenskej kaukazskej populácie. MLPA analýza bola zameraná na vybrané exóny génov COL1A1, COL2A1, LRP5, DKK1, FZD4 a NDP. Spomedzi 43 vyšetovaných pacientov s DDH bola zistená jediná duplikácia exónu 38 génu COL1A1. V génoch COL2A1, LRP5, DKK1, FZD4 a NDP sa CNV nepotvrdili a v analyzovaných lokusoch neboli zistené žiadne rekurentné ani jednoznačne patogénne prestavby. Tieto výsledky naznačujú, že CNV na úrovni exónov v skúmaných génoch sú zriedkavé a pravdepodobne nepredstavujú hlavný genetický mechanizmus podmieňujúci nesyndrómovú DDH v tejto populácii.

Kľúčové slová: vývojová dysplázia bedrového kĺbu, DDH, MLPA, copy number variant, CNV, COL1A1, COL2A1, LRP5

Introduction

Developmental dysplasia of the hip (DDH) is a common congenital musculoskeletal disorder that includes a spectrum of abnormalities ranging from acetabular dysplasia and joint instability to subluxation and frank dislocation [1]. Its reported frequency varies substantially across populations and screening systems, and European data also show marked differences between countries and even between centers within the same country. Because untreated DDH may lead to persistent functional impairment and early degenerative joint disease, early recognition remains clinically important [2].

DDH is a multifactorial disorder in which both hereditary and non-genetic influences contribute to disease susceptibility. Among the most consistently reported risk factors are female sex, breech

presentation, positive family history, oligohydramnios, swaddling, and firstborn status [3]. At the same time, genetic studies indicate that DDH has a heritable component, but its molecular background remains incompletely understood, and no clinically established genetic test is currently available. Recent reviews also indicate that much of the published genetic literature consists of relatively small candidate-gene studies, whereas the strongest replicated common-variant signal to date has been identified at the GDF5 locus [4,5].

In addition to single-nucleotide polymorphisms (SNPs), copy number variants (CNVs) represent a biologically relevant class of genetic changes because exon-level deletions or duplications may disrupt genes essential for connective tissue integrity and skeletal development. This is particularly relevant for collagen-related disorders, as arthrochalasia Ehlers-Danlos syndrome is characterized by congenital bilateral hip dislocation and is most often caused by variants leading to partial loss of exon 6 in COL1A1 or COL1A2 [6,7]. These observations provide a syndromic rationale for examining collagen and related skeletal genes in non-syndromic DDH as well. For targeted CNV screening, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is well-suited because it can detect exon-level deletions and duplications across multiple loci in a single reaction [8].

However, CNV data in isolated DDH remain limited. Therefore, in this study, we used MLPA to screen selected exons of COL1A1, COL2A1, LRP5, DKK1, FZD4, and NDP in patients with isolated DDH from a Slovak Caucasian cohort. The aim was to determine whether exon-level deletions or duplications in these candidate genes contribute to DDH susceptibility in this population.

Materials and methods

The study included 43 patients diagnosed with developmental dysplasia of the hip and 13 healthy controls. The DDH group consisted of 37 females (86%) and 6 males (14%), while the control group comprised 7 males (54%) and 6 females (46%). Due to the limited yield of this analysis, no further controls were examined. All participants were examined at the 2nd Department of Orthopedics and Traumatology or the Orthopedic Clinic of the Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, and the National Institute of Children's Diseases in Bratislava between up until December 2025. To ensure a predominantly non-syndromic and osteogenic background, only individuals with isolated DDH were included. Patients with systemic disease, syndromic diagnoses, generalized skeletal dysplasias, or connective tissue disorders were excluded. Detailed personal and family histories were obtained from all participants. Controls were selected on the basis of negative personal and family history for DDH and other musculoskeletal disorders. Participants were recruited from different regions of Slovakia.

The study was conducted in accordance with the 2013 Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the National Institute of Children's Diseases in Bratislava (VEGA 1/0255/17). Written informed consent was obtained from all participants or their legal guardians.

DNA extraction

Peripheral blood samples were collected from all participants. Genomic DNA was isolated using the GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

MLPA analysis

Copy number variant (CNV) analysis was performed using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Three SALSA MLPA probemixes were used according to the manufacturer's protocol (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands): P271-B5 COL1A1, P214-C2 COL2A1, and P285-C3 LRP5.

The analysis targeted selected exons in the COL1A1, COL2A1, LRP5, DKK1, FZD4, and NDP genes. The P271-B5 probemix included 33 probes targeting 33 of the 51 exons of COL1A1. The P214-C2 probemix contained 46 probes covering 43 of the 54 exons of COL2A1. The P285-C3 probemix included 24 probes covering all 23 exons of LRP5, four probes for all four exons of DKK1, three probes targeting the two exons of FZD4, and three probes covering all three exons of NDP.

PCR amplification products were separated and detected using the SeqStudio 8 Flex Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA). Probe signal normalization and CNV

interpretation were performed using Coffalyser.net software, version 220513.1739 (MRC-Holland). The MLPA assay was used to assess exon-level deletions and duplications in the selected candidate genes.

Data evaluation and analysis

MLPA findings were evaluated descriptively, focusing on the presence or absence of exon-level copy-number changes in the genes analyzed. Detected alterations were interpreted in the context of their occurrence in patients with isolated DDH and their potential relevance to disease susceptibility.

Results

The study included 56 subjects, of whom 43 had developmental dysplasia of the hip (DDH), and 13 were healthy controls. Within the DDH group, involvement of the left hip was observed in 33 cases (76.7%), the right hip in 7 (16.3%), and bilateral in 3 (7.0%). A positive family history of DDH was reported in 14 patients (32.6%). No further controls were analyzed based on preliminary results.

Using the MLPA method, we analyzed copy-number variation in selected genes and their exons considered relevant to DDH susceptibility. Among the 43 tested patients with DDH, a copy number variant was identified in only one case, corresponding to a duplication involving exon 38 of the COL1A1 gene. In the remaining patients with DDH and controls, no CNVs were detected in the analyzed regions of COL1A1, COL2A1, or LRP5. These findings suggest that the investigated exon-level CNVs are rare in this cohort and are unlikely to play a major role in the pathogenesis of DDH.

Discussion

In this study, MLPA analysis identified a copy number variant in only one of 43 patients with DDH, namely a duplication involving exon 38 of COL1A1, while no CNVs were detected in the remaining regions analyzed for COL1A1, COL2A1, and LRP5 [1]. Taken together, these findings suggest that recurrent exon-level CNVs in the selected genes are uncommon in this cohort and are unlikely to represent a major genetic mechanism in isolated DDH.

Direct CNV studies in DDH remain limited, but structural variation has been implicated in related hip phenotypes. In acetabular dysplasia, copy-number loss in the ASPN region was reported significantly more often in affected patients than in controls, supporting the idea that CNVs may contribute to hip dysplasia in at least a subset of cases. Our results differ from that pattern, as we did not observe recurrent CNVs in the targeted loci examined here [9].

Comparison with other musculoskeletal disorders is also informative. In arthrochalasia Ehlers-Danlos syndrome, congenital bilateral hip dislocation is a characteristic feature, and the disorder is caused by variants leading to partial or complete loss of exon 6 in COL1A1 or COL1A2. Likewise, in osteogenesis imperfecta, MLPA has identified exon-level or whole-gene deletions in COL1A1/COL1A2, confirming that this method can detect clinically relevant collagen-gene rearrangements in skeletal disease [10]. Against that background, the single COL1A1 exon 38 duplication observed in our cohort does not align with the recurrent collagen defects classically linked to syndromic hip instability, so its clinical relevance to isolated DDH remains uncertain [11].

In conclusion, our data suggest no significant role for the tested CNVs in non-syndromic DDH. Larger studies, ideally combining CNV analysis with sequencing-based approaches, will be needed to determine whether rare structural variants contribute to DDH susceptibility.

Acknowledgments

This research was conducted as part of the project funded by the EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under project No. 09I03-03-V04-00357.

References

1. Jacobsen KK, Laborie LB, Kristiansen H, Schäfer A, Gundersen T, Zayats T, et al. Genetics of hip dysplasia - a systematic literature review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2024;25:762. <https://doi.org/10.1186/s12891-024-07795-2>

2. Laskaratou ED, Eleftheriades A, Sperelakis I, Trygonis N, Panagopoulos P, Tosounidis TH, et al. Epidemiology and Screening of Developmental Dysplasia of the Hip in Europe: A Scoping Review. *Y Rep. MDPI*; 2024;7:10. <https://doi.org/10.3390/reports7010010>
3. Chen X, Liu J, Xue M, Zou C, Lu J, Wang X, et al. Risk factors of developmental dysplasia of the hip in infants: A meta-analysis based on cohort studies. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2024;110:103836. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2024.103836>
4. Harsanyi S, Zamborsky R, Krajciova L, Kokavec M, Danisovic L. Genetic Study of IL6, GDF5 and PAPP2 in Association with Developmental Dysplasia of the Hip. *Genes*. 2021;12:986. <https://doi.org/10.3390/genes12070986>
5. Hatzikotoulas K, Roposch A, Shah KM, Clark MJ, Bratherton S, Limbani V, et al. Genome-wide association study of developmental dysplasia of the hip identifies an association with GDF5. *Commun Biol*. Nature Publishing Group; 2018;1:56. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0052-4>
6. Ayoub S, Ghali N, Angwin C, Baker D, Baffini S, Brady AF, et al. Clinical features, molecular results, and management of 12 individuals with the rare arthrochalasia Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet A*. 2020;182:994–1007. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61523>
7. Martín-Martín M, Cortés-Martín J, Tovar-Gálvez MI, Sánchez-García JC, Díaz-Rodríguez L, Rodríguez-Blanco R. Ehlers–Danlos Syndrome Type Arthrochalasia: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19:1870. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031870>
8. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*. 2012;13:3245–76. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>
9. Sekimoto T, Ishii M, Emi M, Kurogi S, Funamoto T, Yonezawa Y, et al. Copy number loss in the region of the ASPN gene in patients with acetabular dysplasia: ASPN CNV in acetabular dysplasia. *Bone Jt Res*. 2017;6:439–45. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.67.BJR-2016-0094.R1>
10. van Dijk FS, Byers PH, Dagleish R, Malfait F, Maugeri A, Rohrbach M, et al. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet*. 2012;20:11–9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.141>
11. van Dijk FS, Huizer M, Kariminejad A, Marcelis CL, Plomp AS, Terhal PA, et al. Complete COL1A1 allele deletions in osteogenesis imperfecta. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2010;12:736–41. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181f01617>

Genetic Causes of Intrauterine Fetal Death

Petra PRISCAKOVA¹, Jana MELEGOVA^{1,2}, Karol Forro¹, Natalia ANDOVA¹, Lajos GERGELY¹

¹ Institute of Medical Biology, Genetics, and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia

² Central Animal Facility, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Comenius University, Malá Hora 4D, 036 01 Martin, Slovakia

Summary

Intrauterine fetal death (IUFD), defined as fetal death after 20 weeks' gestation, often remains unexplained after thorough evaluation that rules out structural anomalies, infections, placental abnormalities, and maternal conditions. This review examines the spectrum of potential genetic contributors to these unexplained stillbirths, including chromosomal abnormalities and monogenic disorders due to pathogenic single-gene variants. Advanced genomic approaches such as chromosomal microarray analysis and exome sequencing have enabled the identification of previously unrecognized genetic etiologies in these cases, revealing fetal genetic syndromes and metabolic conditions that can lead to demise. Comprehensive genomic investigation is crucial for improving stillbirth diagnostic yield, guiding recurrence risk counseling, and advancing our understanding of stillbirth etiology.

Keywords: Stillbirth, intrauterine fetal death, variants, genomic autopsy

Genetické príčiny vnútromaternicovej smrti plodu

Súhrn

Vnútromaternicová smrť plodu (IUFD), definovaná ako úmrtie plodu po 20. týždni tehotenstva, často zostáva neobjasnené, a to aj po dôkladnom vyšetrení, ktoré vylúči štrukturálne anomálie, infekcie, abnormality placenty a zdravotné problémy matky. Tento krátky prehľadový článok sa zameriava na spektrum potenciálnych genetických faktorov, ako chromozómové abnormality a patogénne varianty v majoritných génoch, ktoré by mohli byť kontribútorom neobjasnených IUFD. Pokročilé genomické prístupy, ako je komparatívna genómová hybridizácia a sekvenovanie exómu, umožnili identifikáciu doteraz nepoznaných genetických príčin v týchto prípadoch, čím sa odhalili fetálne genetické syndrómy a metabolické poruchy, ktoré môžu viesť k úmrtiu plodu. Komplexné genomické vyšetrenie je kľúčové pre zlepšenie diagnostického prínosu vyšetrenia mŕtvonarodených plodov, určenie rizika

Kľúčové slová: Vnútromaternicová smrť plodu, varianty, genomická autopsia

Introduction

Intrauterine fetal death (IUFD) at or after 20 weeks' gestation (often termed stillbirth) remains a devastating obstetric outcome with significant public health and psychosocial impact. Globally, stillbirths account for roughly 60% of perinatal deaths [1,2]. Overall, stillbirth etiology is heterogeneous and often multifactorial, with 25–60% of cases remaining unexplained despite evaluation [3]. Population studies consistently implicate placental pathology as a leading cause of late IUFD, alongside fetal structural or chromosomal anomalies, intrauterine infection, umbilical cord accidents, and acute obstetric complications [4,5]. Placental maternal or fetal vascular malperfusion lesions are over-represented in stillborn infants, supporting impaired placental exchange and progressive fetal hypoxia as a common pathway; fetal growth restriction frequently co-occurs, indicating an important (and potentially preventable) link between placental insufficiency and IUFD [4].

Importantly, these causal categories are not mutually exclusive – multiple contributing factors often coexist in stillbirth. Even when a fetal anomaly is present, up to half of cases have an additional placental pathology sufficient to cause demise on its own [3]. Gaps in our understanding of stillbirth causes hinder prevention and counseling for affected families. Comprehensive postmortem examinations (fetal autopsy,

placental histology, and genetic testing) yield diagnostically significant findings in the majority of cases, with at least one investigation identifying a cause in approximately 66% of stillbirths [6]. However, autopsy uptake remains low in many settings (<50% of cases) due to availability, cost, and parental consent issues. In this context, there is increasing interest in genetic etiologies of stillbirth and the use of genomic autopsy to explain previously unexplained IUFD. This review focuses on the contribution of genetic factors to IUFD after 20 weeks, the diagnostic approaches for identifying genetic causes, and the clinical implications and future directions of this emerging field.

Possible Genetic Causes of Unexplained IUFD

Single-gene mutations causing Mendelian conditions are recognized as contributors to stillbirth, although current evidence remains limited [7]. Recent sequencing studies of IUFD cases demonstrate a wide spectrum of inheritance patterns among candidate genes, including autosomal recessive (biallelic), autosomal dominant (monoallelic), X-linked, and dual-mode (both dominant and recessive) inheritance [2]. Notably, *autosomal recessive* disorders appear to predominate, accounting for nearly half of reported genes implicated in stillbirth, consistent with severe multisystem developmental conditions and metabolic or ciliopathy syndromes often incompatible with survival to birth. *Autosomal dominant* (monoallelic) mutations represent roughly one-third of stillbirth-related genes, typically affecting highly constrained, dosage-sensitive genes (especially those involved in cardiac or neuromuscular development) where a single deleterious allele can lead to lethal fetal phenotypes. A subset of genes (~9%) demonstrates allelic heterogeneity with both dominant and recessive presentations (dual-mode inheritance); in these cases, severe biallelic variants manifest with prenatal lethality, whereas monoallelic variants in the same gene cause later-onset or milder postnatal disease – an example of phenotype expansion in which the clinical spectrum of a disease gene extends to stillbirth [2]. X-linked conditions constitute a smaller proportion (~5%) of stillbirth genes, underscoring sex-specific developmental vulnerabilities (e.g., X-linked recessive metabolic or neuromuscular disorders in male fetuses). A few cases have been linked to somatic mutations (mosaic chromosomal or single-gene mutations arising post-zygotically), but such mosaic contributions to IUFD are exceedingly rare. Overall, these data indicate that portion of unexplained stillbirth is genetically determined and arises from both the classic recessive disorders (often involving multiple organ systems) and dominant mutations in critical developmental genes and both paradigms can result in fetal demise. This concept aligns with the observed enrichment of loss-of-function variants in highly constraint-intolerant genes among stillbirths – genes so crucial that damaging variants are extremely rare in live-born populations. In other words, the genetic architecture of stillbirth seems to preferentially involve variants in genes essential for early human development, many of which have remained hidden from postnatal genetic disease catalogs because mutations cause prenatal lethality. Indeed, genomic analyses suggest our current compendium of Mendelian diseases is biased toward phenotypes compatible with survival, and that systematic study of IUFD can reveal novel lethal gene disruptions [2,8,9].

Several specific genetic pathways have emerged in reported IUFD cases. Cardiac channelopathies (heritable arrhythmia syndromes such as long QT syndrome) have been investigated as potential causes of otherwise unexplained stillbirths. Pathogenic variants in cardiac ion channel genes (and related cardiomyopathy genes) have been found in a small subset (~3%) of IUFD cases in some cohorts, raising the hypothesis that fetal arrhythmia may lead to sudden death *in utero* despite a structurally normal heart [3]. However, interpreting these variants is challenging – incomplete penetrance and variable expression are common, and a triple-risk model (as proposed for SIDS) has been suggested wherein genetic predisposition, developmental timing, and an external stressor coincide to cause fatal arrhythmia [3]. Thus, while channelopathy genes are plausible contributors, they likely account for only a fraction of stillbirths. Emerging genomic studies indicate that certain congenital disorder groups demonstrate a markedly higher diagnostic yield when genetic sequencing is performed in cases of IUFD. Specifically, pathogenic variants have been frequently identified in fetuses affected by skeletal dysplasias, RAS/MAPK pathway disorders (such as the Noonan spectrum), cohesinopathies (including Cornelia de Lange syndrome), ciliopathies, severe renal malformations, and inborn errors of metabolism. Recent investigations into previously unexplained fetal and neonatal deaths further show that single-gene disorders within these categories account for a substantial proportion of cases, underscoring the value of comprehensive genomic testing in elucidating the etiology of unexplained pregnancy losses. Interestingly, most pathogenic variants in that study were *de novo* (new mutations not inherited from the parents), implying a low recurrence risk for future pregnancies, whereas cases due to recessive mutations (e.g., in genes like *TTC21B*, *CPT2*, *PKHD1*) carry a 25% recurrence risk in subsequent pregnancies [10]. These findings illustrate how identifying a

genetic cause of IUFD can immediately inform clinical counseling regarding recurrence risk: truly *de novo* lethal mutations are tragic *stochastic* events with minimal repeat risk, while inherited mutations (especially autosomal recessive or X-linked) confer a predictable risk of recurrence that may warrant prenatal testing in the future.

Diagnostic Approaches to Genetic Testing in Stillbirth

Historically, genetic evaluation of stillbirth centered on karyotyping, which can detect aneuploidies and large chromosomal rearrangements. Conventional karyotype requires live dividing cells and has limited resolution (~5–10 Mb); nevertheless, chromosomal abnormalities (especially trisomies) have long been recognized to account for about 6–12% of stillbirths [2,3]. In recent years, chromosomal microarray analysis (CMA) has largely replaced karyotyping in stillbirth investigations. CMA can detect submicroscopic copy-number variants (CNVs) at much higher resolution (on the order of 100–200 kb) and can be performed on DNA from non-viable or macerated tissue, increasing the test success rate compared to karyotype [11]. Systematic reviews have shown that CMA provides an incremental diagnostic yield over karyotyping – on the order of ~4–6% additional pathogenic CNVs in stillbirths with previously normal karyotype, plus detection of various CNVs of uncertain significance. For example, the 22q11.2 microdeletion (DiGeorge syndrome region) is one recurrent finding uncovered by microarray in otherwise unexplained IUFD [11]. The overall yield of clinically significant cytogenetic findings (aneuploidies or pathogenic CNVs) in stillbirths is around 10–15% when CMA is applied, although this varies with the population studied. It is important to note that many CMA studies of stillbirth include fetuses with structural anomalies, growth restriction, or other known risk factors, so some detected CNVs may be related to those conditions rather than representing novel “unexplained” causes of fetal demise [3]. Nonetheless, CMA has become a recommended first-line genetic test in stillbirth evaluation due to its increased detection rate and ability to use non-dividing cells [12].

More recently, advances in next-generation sequencing (NGS) have enabled the search for monogenic causes of stillbirth. Approaches range from targeted gene panels (focusing on known stillbirth-related genes or specific phenotypic categories) to whole exome sequencing (WES) and even whole genome sequencing. These genomic tests are particularly valuable in cases where standard evaluations (maternal, obstetric, autopsy, and cytogenetics) fail to find an explanation. In a study from 2020, clinical WES was performed on 246 unexplained stillbirths and demonstrated a significant diagnostic yield beyond cytogenetics. Specifically, WES identified likely causal single-gene variants in about 8.5% of cases that had normal CMA results and no other identifiable cause. These variants included both previously known stillbirth genes and novel candidates, as noted earlier. When the WES yield was combined with the yield from cytogenetic testing in that cohort (aneuploidies in ~7% and pathogenic CNVs in ~2.6%), the overall genetic diagnostic rate reached ~18% for unexplained stillbirths [2,9]. Another recent report using WES and genome sequencing in a series of 102 fetal/neonatal losses found an even higher combined diagnostic yield (~52%), though that cohort was enriched for cases with ultrasound anomalies; importantly, the sequencing provided a definitive or candidate genetic diagnosis in 34% of cases that had no diagnosis from standard autopsy and microarray [10].

Despite these successes, there are practical and interpretative challenges in NGS for stillbirth. A key limitation is the lack of parental DNA testing in many cases, since the fetal death is often studied in isolation (singleton sequencing). Without parental genotypes, it can be difficult to determine if a detected variant was inherited versus a *de novo* mutation, and one cannot phase two variants to recognize compound heterozygous (biallelic) mutations. This constraint likely causes some diagnoses to be missed or remain uncertain. Performing trio exome sequencing (including both parents) can substantially increase diagnostic yield by confirming *de novo* variants and identifying compound heterozygotes that might be overlooked with fetal DNA alone. Another challenge is the genetic heterogeneity of stillbirth, pathogenic variants are distributed across many different genes, with no single gene accounting for more than a few cases, underscoring that stillbirth is not like certain postnatal disorders where one gene is mutated in a large fraction of patients. This means very large sample sizes or collaborative meta-analyses will be required to definitively implicate specific genes at a statistical level. Moreover, the interpretation of novel variants (especially missense changes in candidate genes) can be challenging – many variants are initially classified as of uncertain significance, and proving a causal link may require additional functional evidence or recurrence in other cases.

Genetic testing should be viewed as complementary to traditional stillbirth evaluations, not a replacement. Pathogenic variants may coexist with other abnormalities. For instance, if a fetus has a lethal

skeletal dysplasia due to a gene mutation, it may also have placental insufficiency; or a fetus with a genetic arrhythmia predisposition might have had growth restriction. Distinguishing primary cause from contributing factors is not always straightforward. Differences in study inclusion criteria (e.g., whether cases with known anomalies are included) can greatly affect reported yields [4,13]. Thus, while genomic testing is a powerful tool, results must be interpreted in the context of the entire clinical and pathological picture for each case.

Clinical Implications and Future Directions

The growing ability to identify genetic causes of IUFD carries important implications for clinical care and research. From a clinical counseling perspective, discovering a definitive genetic etiology can provide closure to families and refine recurrence risk estimates. In the study by Byrne et al. (2023), at least 5% of families used the genetic diagnosis of their stillborn child to inform reproductive decisions in subsequent pregnancies (e.g., pursuing IVF with preimplantation testing or tailored prenatal screening) [10]. This demonstrates that genomic autopsy findings can directly impact family planning and preventive care.

Incorporating genomics into stillbirth evaluation can improve our understanding of the causes of fetal death and potentially guide preventive strategies. For instance, if a subset of otherwise unexplained late gestation losses are due to fetal arrhythmia syndromes, there may be future potential to identify those pregnancies (through family history or even sequencing in utero) and consider interventions. Currently, routine sequencing for all unexplained stillbirths is not yet standard of care, some experts have proposed a tiered approach: karyotype or CMA for all IUFD cases (to detect chromosomal causes), followed by targeted gene panels or exome sequencing in cases remaining unexplained, especially when autopsy indicates a phenotype suggestive of a genetic disorder [9,14].

Conclusion

Genetic research is rapidly expanding the frontier of stillbirth etiology. Chromosomal abnormalities and single-gene disorders together now appear to explain a substantial fraction of previously unexplained IUFDs, and this fraction will likely grow as our diagnostic techniques improve. The integration of genomic findings with traditional pathology and clinical risk factor assessment holds the promise of more complete answers for bereaved families and more targeted prevention strategies.

Acknowledgements

Funded by the EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under the project No. 09I03-03-V04-00253.

References

1. Hug L, You D, Blencowe H, et al. Global, regional, and national estimates and trends in stillbirths from 2000 to 2019. *Lancet*. 2021;398(10302):772–785. doi:10.1016/S0140-6736(21)01112-0
2. Stanley KE, Giordano J, Thorsten V, et al. Causal genetic variants in stillbirth. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1107–1116. doi:10.1056/NEJMoa1908753
3. Dolanc Merc M, Peterlin B, Lovrečič L. The genetic approach to stillbirth: a systematic review. *Prenat Diagn*. 2023;43(9):1220–1228. doi:10.1002/pd.6340
4. Goldenberg RL, McClure EM, Saleem S, Reddy UM. Infection-related stillbirths. *Lancet*. 2010;375(9724):1482–1490. doi:10.1016/S0140-6736(09)61755-4
5. Page JM, Silver RM. (If full citation is needed, please confirm—currently referenced but missing in your list)
6. Bukowski R, Carpenter M, Conway D, et al. Causes of death among stillbirths. *JAMA*. 2011;306(22):2459–2468. doi:10.1001/jama.2011.1823
7. Aminu M, Bar-Zeev S, van den Broek N. Cause of and factors associated with stillbirth: a systematic review of classification systems. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(5):519–528. doi:10.1111/aogs.13126
8. Waller JA, Saade G. Stillbirth and the placenta. *Semin Perinatol*. 2024;48(1):151871. doi:10.1016/j.semperi.2023.151871
9. Wojcik MH. Genomic insights into stillbirth. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1184–1186. doi:10.1056/NEJMe2016410

10. Byrne AB, Arts P, Ha TT, et al. Genomic autopsy to identify underlying causes of pregnancy loss and perinatal death. *Nat Med*. 2023;29(1):180–189. doi:10.1038/s41591-022-02142-1
11. Martinez-Portilla RJ, Pauta M, Hawkins-Villarreal A, et al. Added value of chromosomal microarray analysis over conventional karyotyping in stillbirth work-up. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019;53(5):590–597. doi:10.1002/uog.20198
12. Reddy UM, et al. Stillbirth Collaborative Research Network postmortem examination protocol. *Am J Perinatol*. 2012;29(3):187–202. doi:10.1055/s-0031-1295627
13. Narice BF, Byrne V, Labib M, Cohen MC, Anumba DO. Placental lesions in stillbirth following the Amsterdam consensus: a systematic review and meta-analysis. *Placenta*. 2024;158:23–37. doi:10.1016/j.placenta.2024.09.015
14. Silver RM, Reddy UM. Stillbirth: we can do better. *Am J Obstet Gynecol*. 2024;231(2):152–165. doi:10.1016/j.ajog.2024.05.042

Technika prípravy organoidových a sferoidových kultúr z primárneho tkaniva karcinómu prsníka a centrálneho nervového systému

Peter MUSIL, Ľuboš DANIŠOVIČ, Ivan VARGA

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Špitálska 24, 81372 Bratislava

Abstrakt

Vedecké poznatky o technikách prípravy 3D modelov z primárnych tkanív karcinómu prsníka a nádorov centrálneho nervového systému (CNS) v súčasnosti smerujú k tvorbe čoraz komplexnejších systémov. Tie umožňujú nielen samotnú kultiváciu nádorových buniek, ale aj modelovanie ich interakcií s mikroprostredím (TME), čo je kľúčové pre predklinické testovanie liečiv a personalizovanú diagnostiku.

Techniky prípravy 3D modelov z primárnych tkanív

Základom je odber čerstvého nádorového tkaniva, ktoré sa následne spracúva. Hlavné rozdiely medzi organoidmi a sféroidmi a ich špecifické postupy pre jednotlivé typy tkanív sú zhrnuté nižšie:

Typ modelu	Kľúčové vlastnosti	Postup pre karcinóm prsníka	Postup pre nádory CNS
Organoidy	Vysoká vernosť pôvodnému nádoru; zachovávajú genetickú heterogenitu, histológiu a molekulárne fenotypy.	Vyžadujú enzymatické natrávenie tkaniva (napr. kolagenázou) a následné zaliatie izolovaných buniek/zhlukov do extracelulárnej matrix (ECM), najčastejšie Matrigelu alebo BME.	Často sa využíva kultivácia v médiu bez séra s definovanými rastovými faktormi, čo podporuje rast nádorových kmeňových buniek. Z glioblastómu možno organoidy pripraviť rýchlo a spoľahlivo.
Sféroidy	Jednoduchšie a rýchlejšie na prípravu; ide o voľné zhluky buniek, často bez potreby ECM nosiča. Vynikajúco slúžia na selekciu a obohatenie nádorových kmeňových buniek (CSC).	Po disociácii tkaniva sa bunky vysievajú na nepriľnavé povrchy (napr. 96-jamkové doštičky s U/V dnom), kde spontánne vytvárajú sféroidy. Miera úspešnosti kultivácie presahuje 87 %.	Izolované bunky sa kultivujú v bezsérovom médiu, čím sa podporuje tvorba "nádorových gúľ" (tumorspheres) bohatých na kmeňové bunky, ktoré sú kľúčové pre štúdium invázie a rezistencie.

Modely s definovanou architektúrou a interakcie s mikroprostredím

Pre štúdium komplexných interakcií nádorových buniek s ich okolím sa vyvíjajú sofistikovanejšie modely, ktoré umožňujú presne definovať ich architektúru a bunkové zloženie.

Ko-kultivačné modely: Tieto systémy integrujú do 3D kultúry ďalšie bunkové zložky TME, čím umožňujú študovať medzibunkovú komunikáciu.

- **Karcinóm prsníka:** Priama ko-kultivácia nádorových organoidov s fibroblastmi (vrátane CAFs) odhaľuje ich úlohu v podpore invazivity a rezistencie na liečbu. Napríklad, CAFs zdvojnásobujú migračnú vzdialenosť nádorových buniek a môžu potláčať účinnosť protilátok ako trastuzumab. Modely "organoid–fibrosféra" umožňujú kvantifikovať vzájomné ovplyvňovanie epiteliálnych a stromálnych buniek.

- **Nádory CNS (Glioblastóm):** Vytvárajú sa pokročilé ko-kultúry, ako napríklad "GLICO" model, kde sa glioblastómové organoidy integrujú s cerebrálnymi organoidmi, čo umožňuje študovať inváziu nádorových buniek do mozgového tkaniva. Model "iHOTT" zase umožňuje študovať interakcie nádorových buniek s vlastnými imunitnými bunkami pacienta.

Kľúčové komponenty mikroprostredia a metódy ich integrácie

Moderné modely sa zameriavajú na selektívne začlenenie jednotlivých typov buniek a štruktúr, aby bolo možné študovať ich presnú úlohu:

- **Fibroblasty spojené s nádorom (CAFs):** Predstavujú hlavných "architektov" strómy. Výskumy konzistentne ukazujú, že v 3D modeloch karcinómu prsníka indukujú CAFs agresívnejší fenotyp nádorových buniek. V prostredí bohatom na fibronektín zdvojnásobujú migračnú vzdialenosť buniek tvorbou MMP-dependentných tunelov a cez signalizáciu TGF- β /NOX4 spúšťajú program kolektívnej invázie. Dôležité je, že priamo modulujú účinnosť liečby, napríklad na čípe potláčajú účinok trastuzumabu. Preto sú vyvíjané sofistikované ko-kultivačné systémy, vrátane protokolov na simultánnu izoláciu a kultiváciu nádorových organoidov s ich autológnymi CAFs.
- **Mezenchymálne kmeňové bunky (MSC) a indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSC):** Ich úloha je komplexnejšia a niekedy protirečivá – môžu podporovať agresivitu nádorových kmeňových buniek (CSC), ale aj navodzovať ich dormanciu. Tento rozpor zdôrazňuje potrebu štandardizovaných 3D modelov, ktoré umožňujú dlhodobé štúdium tejto dynamiky. Transwell systém je príkladom platformy, ktorá umožňuje študovať vplyv sekretómu MSC/iPSC na migráciu a angiogézu bez priameho bunkového kontaktu.
- **Imunitné bunky:** Nádory sa nevyhýbajú len imunitnému systému, ale aktívne ho formujú. Pokročilé modely to umožňujú sledovať v reálnom čase. Napríklad pri ko-kultivácii organoidov glioblastómu (GBM) s T-bunkami bolo pozorované, že nádorové bunky priamym kontaktom indukujú v T-bunkách zvýšenú expresiu markerov vyčerpania (LAG-3, TIM-3) a zvyšujú podiel regulačných T-lymfocytov (Treg), čím vytvárajú imunosupresívne prostredie.
- **Vaskulatúra:** Vytvorenie funkčnej cievnej siete je kľúčové pre napodobnenie výživy nádoru a prestupu liečiv. Najmodernejšie prístupy používajú fúziu nádorových sféroidov so sféroidmi endotelových buniek (napr. HUVEC), čím sa v čípe indukuje proces angiogenézy riadený hypoxiou, verne napodobňujúci *in vivo* podmienky. Tieto vaskularizované modely umožňujú nielen štúdium angiogenézy, ale aj testovanie anti-angiogénnych liečiv, ako je bevacizumab.

Technológie na vytváranie definovanej architektúry

Na presné priestorové usporiadanie vyššie uvedených komponentov a vytvorenie heterogénneho TME sa využívajú dve hlavné technologické platformy:

- **3D Biotlač:** Táto technológia umožňuje "tlačiť" rôzne typy buniek a biomateriály do presne definovaných pozícií, čím vytvára realistickú nádorovú architektúru. Model karcinómu prsníka vytvorený extrúznou biotlačou tak dokázal napodobniť priestorovú heterogenitu nádoru: vytvoril oblasti bohaté na nádorové bunky, obklopené strómou s mikrocievami, pričom angiogéza a stuhnutie ECM prebiehali len v stromálnej časti, presne ako u pacientov. Tento model odhalil, že nádorové bunky v rôznych častiach

vykazovali rozdielnú citlivosť na chemoterapiu, čo demonštruje environmentálne riadenú liekovú rezistenciu. Podobne sa biotlač používa na vytvorenie vaskularizovaného modelu glioblastómu na štúdium interakcií nádor-bunky a vplyvu rádioterapie.

- **Mikrofluidné "Orgán-na-čipe":** Tieto systémy pridávajú k priestorovej organizácii dynamický prvok – kontrolovaný prietok tekutín, ktorý simuluje krvný obeh a umožňuje vytvárať chemické gradienty. Jednou z najväčších výhod je schopnosť vytvárať vaskularizované nádorové modely s perfúziou, kde je možné priamo pozorovať interakcie nádorových buniek s cievami, prestup liečiv a dokonca aj prvé kroky metastatického šírenia. V oblasti neuroonkológie sa vyvíjajú čipy napodobňujúce hematoencefalickú bariéru (BBB), ktoré umožňujú testovať penetráciu liečiv do mozgu. Pokročilé platformy, ako "flip the chip", dokonca umožňujú vytvárať sféroidy z veľmi malého počtu buniek, čo je kritické pre personalizované testy z tkanivových biopsií.

Využitie v personalizovanej onkológii

Vyššie opísané komplexné modely posúvajú predklinické testovanie na novú úroveň. Schopnosť integrovať viaceré zložky TME umožňuje testovať nielen priame cytotoxické účinky liečiv, ale aj ich vplyv na nádorové mikroprostredie:

- **Testovanie imunoterapií:** Spomínaný GBM organoidový model s ko-kultivovanými T-bunkami bol úspešne použitý na testovanie účinnosti experimentálnej génovej terapie (CIITA-armed adenovirus), pričom umožnil sledovať, ako terapia moduluje imunitnú odpoveď a vedie k zabíjaniu nádorových buniek.
- **Hodnotenie kombinovanej liečby:** Vaskularizované čipy umožňujú simultánne testovať účinok liečiva na nádorové bunky aj na cievnu sieť, čo je nevyhnutné pre vývoj a hodnotenie kombinovaných terapií (napr. chemoterapia + anti-angiogénna liečba).
- **Objavovanie biomarkerov rezistencie:** Analýzou nádorových buniek, ktoré prežili liečbu v rôznych zónach biotlačou vytvoreného heterogénneho modelu, je možné identifikovať nové mechanizmy a biomarkery environmentálne riadenej rezistencie.

Tieto sofistikované "avatarové" modely pacientovho nádoru, ktoré zahŕňajú kľúčové zložky jeho mikroprostredia, predstavujú najpresnejšiu *in vitro* platformu pre personalizovanú onkológiu, ktorá urýchľuje vývoj nových liekov a umožňuje predikovať odpoveď konkrétneho pacienta na liečbu.

Mikrofluidné "orgán-na-čipe" (Organ-on-a-chip): Tieto zariadenia predstavujú vrchol v definovaní architektúry TME, umožňujú presné priestorové usporiadanie buniek, kontrolovaný prietok média a vytváranie chemických gradientov.

- **Karcinóm prsníka:** 3D biotlačou je možné vytvoriť modely s presne definovanými oblasťami nádorových buniek a strómy bohatej na cievy, čo umožňuje študovať angiogézu a vplyv priestorovej organizácie na liekovú rezistenciu.
- **Nádory CNS (Glioblastóm):** Vyvíjajú sa modely vaskularizovaného glioblastómu na čipe, ktoré obsahujú samousporiadanú sieť ciev z endotelových buniek, astrocytov a pericytov. To umožňuje študovať prestup liečiv cez hematoencefalickú bariéru priamo do nádoru. Iné prístupy využívajú hydrogély s gradientom tuhosti na skúmanie vplyvu fyzikálnych vlastností TME na správanie nádorových buniek.

Využitie v predklinickom testovaní liečiv a diagnostike

Opísané 3D modely predstavujú kľúčový nástroj pre personalizovanú onkológiu a vývoj nových terapií:

- **Predklinické testovanie liečiv:** Organoidy odvodené od pacienta (PDO) si zachovávajú genetický profil pôvodného nádoru, a preto sú vysoko relevantnou platformou pre testovanie citlivosti na liečivá. Umožňujú rýchlo identifikovať účinné látky a predikovať odpoveď pacienta na konkrétnu terapiu, čím naplňajú víziu personalizovanej medicíny. Sľubné výsledky prináša aj miniaturizácia a automatizácia testovania, ktorá skracuje čas potrebný na získanie výsledkov a znižuje nároky na množstvo biologického materiálu.
- **Diagnostika a objavovanie biomarkerov:** Kombinácia organoidných kultúr s multi-omickými analýzami predstavuje silný nástroj na identifikáciu nových diagnostických a prediktívnych biomarkerov. Tieto modely taktiež umožňujú študovať mechanizmy vzniku rezistencie na liečbu, čo je nevyhnutné pre vývoj terapií novej generácie, vrátane imunoterapií (napr. CAR-T bunková terapia).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu: Systémová verejná výskumná infraštruktúra - biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, II. fáza, 401101B990. Projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko.

Zoznam použitej literatúry

1. Sachs, N.; de Ligt, J.; Kopper, O.; Gogola, E.; Bounova, G.; Weeber, F.; Balgobind, A.V.; Wind, K.; Gracanin, A.; Begthel, H.; et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 2018, *172*, 373-386.e10, doi:10.1016/j.cell.2017.11.010.
2. Jacob, F.; Salinas, R.D.; Zhang, D.Y.; Nguyen, P.T.T.; Schnoll, J.G.; Wong, S.Z.H.; Thokala, R.; Sheikh, S.; Saxena, D.; Prokop, S.; et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* 2020, *180*, 188-204.e22, doi:10.1016/j.cell.2019.11.036.
3. Hubert, C.G.; Rivera, M.; Spangler, L.C.; Wu, Q.; Mack, S.C.; Prager, B.C.; Couce, M.; McLendon, R.E.; Sloan, A.E.; Rich, J.N. A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res* 2016, *76*, 2465–2477, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.
4. Tiriác, H.; Belleau, P.; Engle, D.D.; Plenker, D.; Deschênes, A.; Somerville, T.D.D.; Froeling, F.E.M.; Burkhart, R.A.; Denroche, R.E.; Jang, G.H.; et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* 2018, *8*, 1112–1129, doi:10.1158/[2159-8290.CD-18-0349](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0349).
5. Linkous, A.; Balamatsias, D.; Snuderl, M.; Edwards, L.; Miyaguchi, K.; Milner, T.; Reich, B.; Cohen-Gould, L.; Storaska, A.; Nakayama, Y.; et al. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell Rep* 2019, *26*, 3203-3211.e5, doi:10.1016/j.celrep.2019.02.063.
6. Dijkstra, K.K.; Cattaneo, C.M.; Weeber, F.; Chalabi, M.; van de Haar, J.; Fanchi, L.F.; Slagter, M.; van der Velden, D.L.; Kaing, S.; Kelderman, S.; et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* 2018, *174*, 1586-1598.e12, doi:10.1016/j.cell.2018.07.009.

7. Neal, J.T.; Li, X.; Zhu, J.; Giangarra, V.; Grzeskowiak, C.L.; Ju, J.; Liu, I.H.; Chiou, S.H.; Salahudeen, A.A.; Smith, A.R.; et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* 2018, *175*, 1972–1988.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.11.021.
8. Vlachogiannis, G.; Hedayat, S.; Vatsiou, A.; Jamin, Y.; Fernández-Mateos, J.; Khan, K.; Lampis, A.; Eason, K.; Huntingford, I.; Burke, R.; et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science* 2018, *359*, 920–926, doi:10.1126/science.aao2774.
9. Wensink, G.E.; Elias, S.G.; Mullenders, J.; Koopman, M.; Boj, S.F.; Kranenburg, O.W.; Roodhart, J.M.L. Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *NPJ Precis Oncol* 2021, *5*, 30, doi:10.1038/s41698-021-00168-1.
10. Huh, D.; Matthews, B.D.; Mammoto, A.; Montoya-Zavala, M.; Hsin, H.Y.; Ingber, D.E. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science* 2010, *328*, 1662–1668, doi:10.1126/science.1188302.

A Protocol for the Isolation and In Vitro Cultivation of Uterine Tube CD34⁺CD117⁺ Stromal Cells (Telocytes): A prerequisite for their Complex Characterization

Mária KLEINOVÁ¹, Martin KLEIN¹

¹Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovakia

Summary

Preparing a standardized protocol for the isolation and in vitro cultivation of any cell type is a prerequisite for further, more complex characterization in subsequent methodological approaches. CD34⁺CD117⁺ stromal cells, also termed telocytes, are a fundamental stromal component of most tissues, including the uterine tube. They have very long cytoplasmic projections called telopodes, which are involved in processes such as cell-to-cell signaling, microenvironmental maintenance of the stromal compartment, and immunomodulatory functions. They have been described as forming a network akin to the neural network at the cellular level. The present study proposes an isolation protocol consisting of five steps: tissue preparation, enzymatic digestion, filtration and centrifugation, differential adherence method, and finally, selective separation. Cells subsequently acquired are cultured, maintained, and comprehensively characterized. Our protocol is the result of an amalgamation of previously published papers on the topics, along with our own expertise in isolation and cell culture.

Keywords: telocytes, CD34⁺CD117⁺ stromal cells, uterine tube, standardization, isolation, in vitro cultivation

Súhrn:

Príprava štandardizovaného protokolu na izoláciu a in vitro kultiváciu akejkoľvek bunkovej populácie je nevyhnutnou podmienkou na jej ďalšiu komplexnú charakterizáciu pomocou následných metodologických prístupov. CD34⁺CD117⁺ stromálne bunky, tiež označované ako telocyty, sú základnou súčasťou strómy väčšiny tkanív, vrátane vajčkovodov. Sú typické svojimi dlhými cytoplazmatickými výbežkami, ktoré označujeme ako telopódy, a prostredníctvom nich sa zúčastňujú medzibunkovej komunikácie, udržiavania stromálneho mikroprostredia a majú tiež imunomodulačnú úlohu. Sú často opisované ako bunky tvoriace sieť, ktoré sa na bunkovej úrovni podobajú neurónovým sieťam. Táto práca predkladá protokol na izoláciu telocytov v piatich krokoch: spracovanie tkaniva, enzymatické natrávenie, filtrácia a centrifugácia, diferenciálna adhérenca a nakoniec selektívna separácia. Následne sú získané bunky kultivované, udržiavané a komplexne charakterizované. Predkladaný protokol je výsledkom analýzy a syntézy už v minulosti publikovaných a osvedčených protokolov s našimi vlastnými skúsenosťami s izoláciou a kultiváciou buniek.

Kľúčové slová: telocyty, CD34⁺CD117⁺ stromálne bunky, vajčkovod, štandardizácia, izolácia, in vitro kultivácia.

Introduction

Telocytes are interstitial cells that were first described in 2005 by a Romanian research team led by Prof. Popescu. Since then, telocytes have been described in most human organs, including the female genital system, such as the uterus (Ciontea et al., 2005) and the uterine tube (Popescu et al., 2005; Aleksandrovych et al., 2021). Their proposed roles are microenvironmental maintenance, cell-to-cell communication, regulation of immune functions, secretion, and overall homeostasis of the stromal compartment. Their presence in

the wall of the uterine tube was demonstrated within the lamina propria and tunica muscularis, where telocytes form a 3D network among smooth muscle cells, nerve endings, and blood vessels (Yang et al., 2016). They have been implicated in both the normal function of the uterine tube and various pathological conditions, including idiopathic infertility (Cretoiu and Cretoiu 2016).. According to Janas et al. (2018), telocytes may play a role as a sex hormone level sensor and are related to pregnancy maintenance.

The proposed protocol aims to isolate telocytes and culture them *in vitro*. Telocytes will then be comprehensively characterized and subsequently co-cultured with spermatozoa to assess their precise impact on fertilization. This study was approved by the ethics committee of L. Derer's hospital in Bratislava.

Procedure

Isolation and culture of human telocytes from the uterine tube

1. Intraoperative sample collection was made under sterile conditions. After collection, the sample was washed in phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma Aldrich, USA) to remove blood and tubal fluid, then quickly rinsed in 70% ethanol for disinfection, and transferred to a 100 mm Petri dish for further processing.
2. Within a laminar flow hood, the excess tissue (epithelium, muscle tissue) was removed with a scalpel, and the remaining connective tissue of the uterine tube was cut into smaller pieces and placed into 50 ml centrifuge tubes containing 45 ml of PBS. Centrifuge tubes containing tissue samples were briefly centrifuged at $250 \times g$ for 1 minute at room temperature, then resuspended in PBS. Subsequently, a dissociation medium was added, and tissue samples were incubated at 37 °C on a shaker at 180 rpm for 40 min. The enzymatic dissociation medium was a cocktail of 1,5 mg/ml collagenase type 2 (Invitrogen, USA) and 1% penicillin-streptomycin (PS) (Sigma Aldrich, USA). The solution was filtered through a 41 μ m nylon mesh (Merck, Darmstadt, Germany). The suspension was centrifuged again at 300 g for 10 min.
3. Obtained cells were seeded into sterile Petri dishes and cultivated in 10 ml of DMEM/F12 (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma Aldrich, USA) and 1% PS.
4. Cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C for one hour, allowing fibroblasts to attach and keep the remaining cells, including telocytes, unattached. Cells were subsequently seeded into new sterile Petri dishes with the same medium. The cultivation medium was replaced every two days.
5. Cells were examined under an inverted microscope after 24, 72, and 96 hours after seeding. After they reached confluency reached 80%, the cells were enzymatically detached using prewarmed 0.05% Trypsin (Invitrogen, USA). After detachment, cells were reseeded onto a new T75 flask at a 1:2 split ratio under the same conditions.
6. In the next step, we used the MACS System (Miltenyi Biotec, USA) to isolate CD34/CD117+ cells. First, we performed sequential negative depletion. We used anti-CD45 MicroBeads, ran them through the MACS Column, and kept the flow-through. Then, we labeled the flow-through with anti-CD31 MicroBeads, passed it through the column, and collected the CD45-/CD31- flow-through. The negative selection separated CD34+ stromal cells from CD45+ leukocytes and CD31+ endothelial cells. To perform positive selection, the CD45-/CD31-

fraction was first labeled with CD34 MicroBeads following these steps: cells were resuspended in 300 µL MACS buffer, then 100 µL of FcR blocking reagent was added, and subsequently 100 µL of CD34 MicroBeads was added. Then, the fraction was incubated for 30 minutes at 5 °C. Then, the cells were centrifuged at 300g for 10 minutes. Subsequently, the MS column was applied, and the retained CD34⁺ fraction was collected. To increase purity, we repeated these steps on a fresh column. Next, the CD34⁺ fraction was labeled with CD117 MicroBeads. Again, 300 µL of MACS buffer was used for resuspension; then 100 µL of FcR blocking reagent was added, followed by 100 µL of CD117 MicroBeads. The fraction was incubated for 15 minutes at 5 °C. The MS column was rinsed with 500 µL of buffer, labeled cells were applied, and the column was then washed with 500 µL of buffer three more times. Cells were then removed from the magnet, and retained cells were eluted. The steps were repeated to increase purity. The target fraction of **CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺/CD117⁺ stromal cells was cultured as described above. After 24 hours, non-adherent cells were gently washed. Cells were examined under an inverted microscope. CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺/CD117⁺ stromal cells were then stored for a complex characterization using immunofluorescence and transmission electron microscopy.**

Conclusion

Isolation and in vitro cultivation of CD34⁺/CD117⁺ stromal cells are vital steps for their coculture with other cell types. Establishing a reliable and standardized protocol improves cell purity, viability, and reproducibility. In human reproduction, these cells can be co-cultured with other cell types, including uterine tube epithelial cells and gametes, providing insights into intercellular signaling and immune regulation during the earliest days of gestation in the uterine tube, possibly providing insights with translational potential in reproductive medicine.

Funding

This work was supported and funded by the EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under the project No. 09I03-03-V04-00290.

References

1. Ciontea SM, Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Cretoiu D, Gherghiceanu M, Braga RI, Malincenco M, Zagrean L, Hinescu ME, Popescu LM. C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun;9(2):407-20. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00366.x. PMID: 15963260; PMCID: PMC6740058.
2. Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N, Ceausu M, Gherghiceanu M, Braga RI, Vasilescu F, Zagrean L, Ardeleanu C. Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun;9(2):479-523. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00376.x. PMID: 15963270; PMCID: PMC6740321.
3. Aleksandrovych V, Wrona A, Bereza T, Pityński K, Gil K. Oviductal Telocytes in Patients with Uterine Myoma. *Biomedicines*. 2021 Aug 20;9(8):1060. doi: 10.3390/biomedicines9081060. PMID: 34440264; PMCID: PMC8391874.
4. Yang P, Zhu X, Wang L, Ahmed N, Huang Y, Chen H, Zhang Q, Ullah S, Liu T, Guo D, Brohi SA, Chen Q. Cellular Evidence of Telocytes as Novel Interstitial Cells Within the Magnum of Chicken Oviduct. *Cell Transplant*. 2017 Jan 24;26(1):135-143. doi: 10.3727/096368916X692942. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27590447; PMCID: PMC5657692.
5. Janas P, Kucybała I, Radoń-Pokracka M, Huras H. Telocytes in the female reproductive system: An overview of up-to-date knowledge. *Adv Clin Exp Med*. 2018 Apr;27(4):559-565. doi: 10.17219/acem/68845. PMID: 29533546.

6. Cretoiu D, Cretoiu SM. Telocytes in the reproductive organs: Current understanding and future challenges. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Jul;55:40-9. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.03.018. Epub 2016 Mar 25. PMID: 27021165.

Morphology and Function of CD117+/CD34+ Stromal Cells (Telocytes) in the Human Uterine Tube: What Have We Learned So Far?

Mária KLEINOVÁ¹, Martin KLEIN¹

¹Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovakia

Summary

Introduction: Telocytes are a peculiar cell population first described in 2005 by a team of Romanian researchers led by Prof. Popescu. Telocytes are characterized primarily by their features on transmission electron microscopy, but immunohistochemistry (IHC) is also a preferred method for their identification at the light-microscopy level. Many IHC markers have been identified across organs, but in the female reproductive system, the most common are CD117 (c-kit), CD34, PDGFR-alpha, and vimentin. In the female reproductive system, telocytes are also positive for female steroid hormones estrogen and progesterone. **Materials and Methods:** We performed a thorough search of the PubMed/MEDLINE database between 2020-2026, to find relevant articles about uterine tube telocytes. We also harvested ten human uterine tube specimens and processed them via the formalin-fixed paraffin embedded technique. In the next step, we applied CD117 antibody and visualized the samples via Vision™ FLEX Detection system (DAKO, Denmark) and examined them using LEICA DM2500 microscope. Images were captured using the LEICA DFC290HD digital camera. **Results:** In the uterine tube, telocytes are found in the lamina propria of the uterine tube mucosa, around smooth muscle cells of the muscle layer, and around blood vessels. **Discussion:** Telocytes are characterized by their extremely long cytoplasmic projections, called telopodes, which mediate the most commonly described functions of telocytes: cell-to-cell communication, tubal motility by acting as pacemaker cells, and hormone sensing. Telocytes have also been described as releasing extracellular vesicles that carry important signaling molecules. Apart from these functions, telocytes have also been implicated in regulating immune responses in the uterine tube microenvironment, leading to the hypothesis that these cells play a crucial role in normal human reproduction.

Keywords: Telocytes, CD34⁺CD117⁺ stromal cells, uterine tube, immunohistochemistry

Súhrn:

Úvod: Telocyty sú špecifickou bunkovou populáciou, ktorá bola prvýkrát opísaná v roku 2005 výskumným tímom z Rumunska okolo profesora Popesca. Telocyty sú najčastejšie skúmané pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie, avšak imunohistochemia (IHC) je tiež jednou z preferovaných metód znázornenia telocytov na úrovni svetelnej mikroskopie. Od objavu telocytov bolo identifikované veľké množstvo rôznych IHC markerov v rôznych orgánoch, avšak v ženskom reprodukčnom systéme sú najčastejšie používanými CD117 (c-kit), CD34, PDGFR-alfa a vimentin. V ženskom reprodukčnom systéme sú telocyty pozitívne tiež na ženské steroidné hormóny estrogén a progesterón. **Materiál a Metodika:** Podrobne sme vyhľadávali v databáze PubMed/MEDLINE medzi rokmi 2020-2026, aby sme našli všetk relevantné články o telocytoch vo vajíčkovode. Tiež sme spracovali 10 vzoriek ľudských vajíčkovodov a spracovali parafrínovou technikou. V ďalšom kroku sme na vzorky aplikovali protilátku CD117. Na vizualizáciu sme použili Vision™ FLEX Detection system (DAKO, Dánsko) a vzorky sme pozorovali svetelným mikroskopom LEICA DM2500 s kamerou LEICA DFC290HD na zachytenie mikrofotografií. **Výsledky:** Vo vajíčkovode sme telocyty našli najmä vo väzive lamina propria sliznice, medzi hladkými svalovými bunkami svalovej vrstvy a okolo ciev. **Diskusia:** Telocyty sú typické ich dlhými cytoplazmatickými výbežkami (telopódmi), ktoré sprostredkujú najčastejšie opisované funkcie telocytov: medzibunkovú komunikáciu, motilitu vajíčkovodu prostredníctvom ich funkcie udávačov kroku a funkciu hormonálnych senzorov. Telocyty boli tiež opísané ako bunky, ktoré sú zdrojom extracelulárnych vezikúl nesúcich rôzne dôležité signálne molekuly. Okrem týchto

funkcií boli telocyty opísané aj ako bunky regulujúce imunitné funkcie vo vajíčkovode, čím prispievajú k hypotéze, že telocyty sú dôležitou bunkovou populáciou pri normálnej ľudskej reprodukcii.

Kľúčové slová: telocyty, CD34⁺CD117⁺ stromálne bunky, vajíčkovod, imunohistochemia

Introduction

The uterine tube is a highly specialized organ responsible for oocyte capture during ovulation, sperm transport, fertilization, and early embryo transport and development. For a long time, the uterine tubes have been viewed merely as passive tubes with an exclusive transport function. This obsolete notion has been overturned by new discoveries that recognize the uterine tube as a highly dynamic organ involved in sperm capacitation, early crosstalk between the uterine tube wall and the blastocyst, and immune modulation necessary for normal pregnancy (Roy et al., 2026). The uterine tube wall comprises the mucosa with the uterine tube epithelium and the stromal compartment, which features smooth muscle cells, immune cells, blood vessels, nerve fibers, and newly described telocytes (Varga et al., 2024).

Telocytes are distinguished by the extremely long, thin cytoplasmic projections called telopodes, which feature alternating thick and thin segments, termed podomers and podoms, respectively, and contain mitochondria, endoplasmic reticulum, and caveolae. Thanks to this arrangement, telopodes look like a bead string. Telopodes enable telocytes to communicate with other cells over long distances (Rosa et al., 2021).

Research over the past five years has shown that telocytes are distributed throughout all layers of the uterine tube wall, including the lamina propria of the mucosa, the muscle layer, and the subserosal connective tissue. Recent investigations suggest that telocytes may be involved in tubal motility, hormone sensing, immune regulation, fertility, and normal reproduction (Klein et al. 2022).

Materials and Methods

We searched the PubMed/MEDLINE database for papers between 2020 and 2026 using the keywords telocytes AND uterine tube OR Fallopian tube to identify relevant articles published during this period on the topic. We also harvested uterine tube specimens from ten women undergoing salpingectomy for various diagnoses, where removal of the uterine tube was indicated, but the uterine tube itself was intact. Tissues were processed by the standard formalin-fixed paraffin-embedded technique, routinely performed at our workplace. In summary, 24-hour fixation in formalin was followed by paraffin embedding and rotary microtome sectioning into 5 µm thick sections. For immunohistochemistry, we used a primary antibody against CD117 (c-kit). The primary antibody was diluted according to the manufacturer's instructions. The EnVision™ FLEX Detection system (DAKO, Denmark) with diaminobenzidine as the chromogen was used for visualization; specimens were counterstained with Mayer's hematoxylin. The specimens were examined using a LEICA DM2500 microscope, and images were captured using the LEICA DFC290HD digital camera.

Results

Telocytes have been best observed in the ampulla of the uterine tube. Their distribution has been sparse; we observed them mainly in the connective tissue lamina propria (Figure 1) of the mucosa and in the muscle layer among smooth muscle cells (Figure 2), and around blood vessels (Figure 3). Figure 1 shows that telocytes are mostly spindle-shaped, a feature that can distinguish them from mast cells (also CD117-positive). In all figures, black arrows point to telocytes. In Figure 1, the red arrows show the initial portion of the telopode extending from the cell body. The rest of the telopode cannot be seen at the level of light microscopy, since its thickness is generally just under the resolving power of a light microscope, apart from the thicker portion near the cell body.

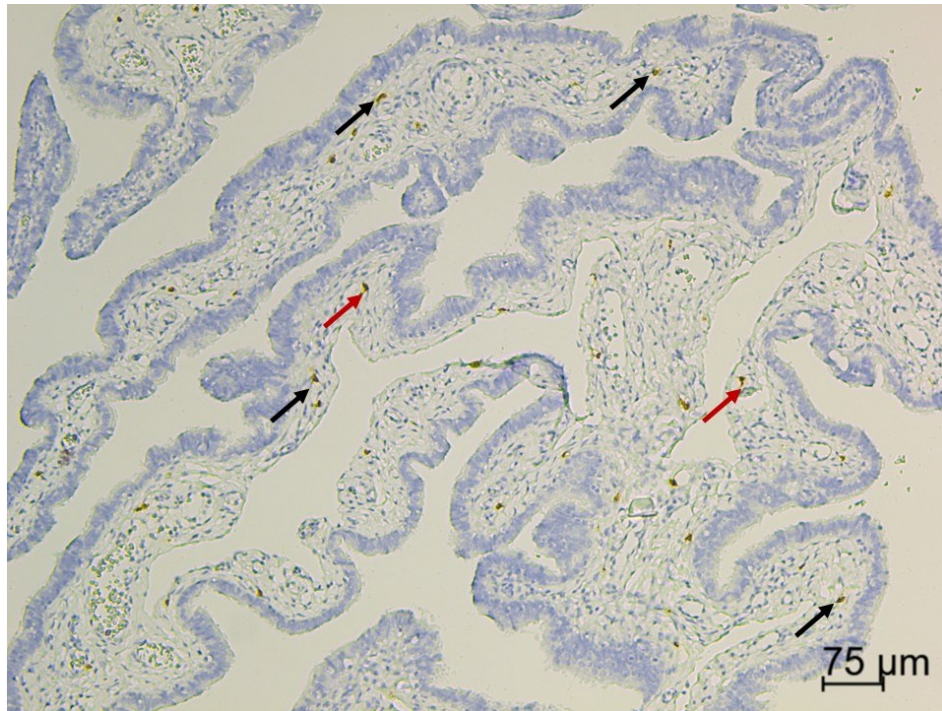


Figure 1. Telocytes in the lamina propria of the mucosa (black arrows). In some, the initial aspect of telopodes can be seen in higher magification (red arrows) (Orig. Magn. 100x).

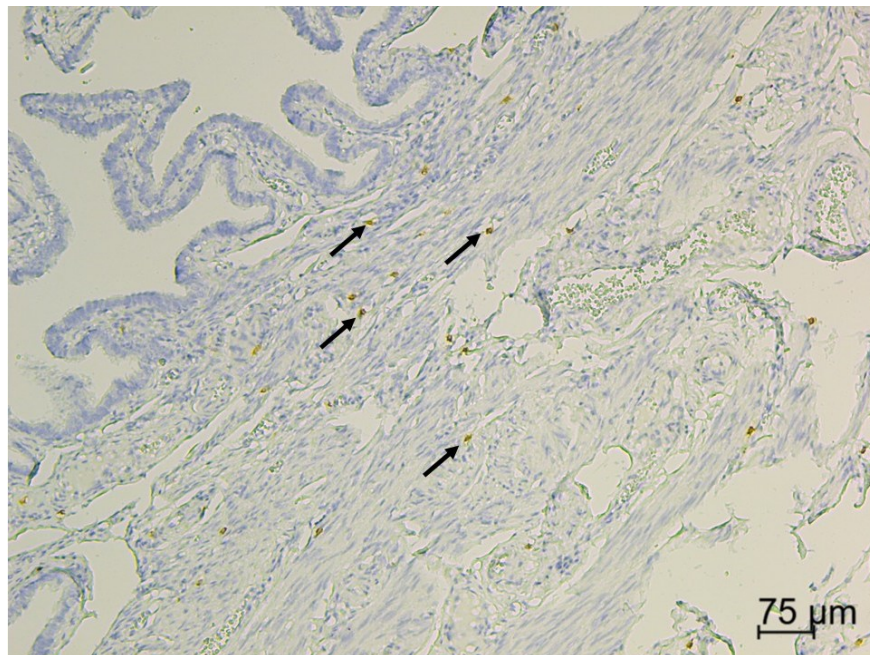


Figure 2. Telocytes between smooth muscle cells in the muscle layer (black arrows) (Orig. Magn. 100x).

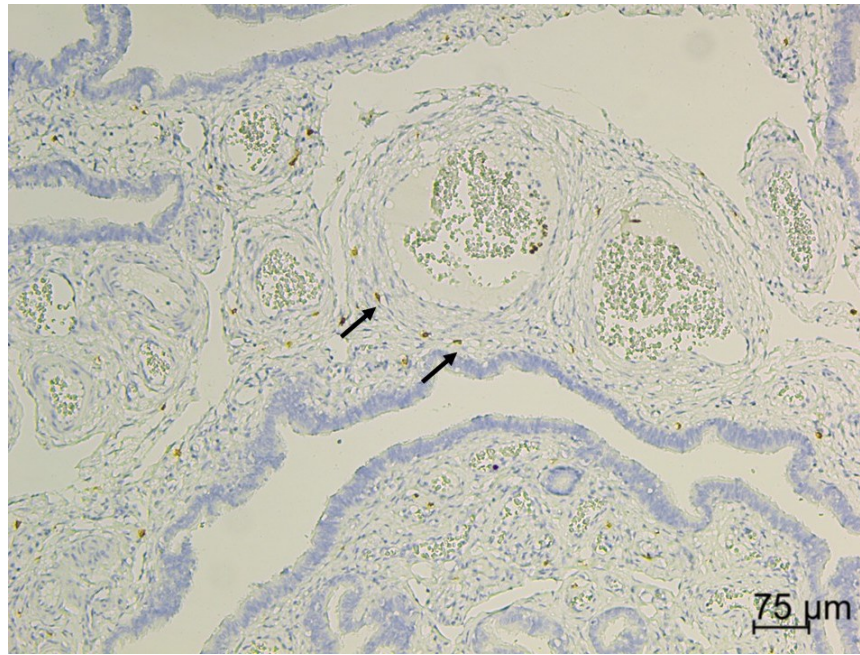


Figure 3. Telocytes around blood vessels (black arrows) (Orig. Magn. 100x)

Discussion

The definitive identification of telocytes via IHC has been challenging, as no single 100% specific telocyte marker has been identified to date. Therefore, transmission electron microscopy is the gold standard for telocyte morphological description (Rosa et al., 2023). The most commonly described features are a small spindle, a triangular or piriform cell body, two to five telopodes extending over tens to hundreds of micrometers, a moniliform appearance (podomere and podomere alternation), and the formation of 3D networks around smooth muscle cells, blood vessels, nerves, and immune cells. Although IHC is not the preferred method for telocyte morphological description, the advantage is that their normal tissue distribution can be easily seen, and this morphological approach is less demanding from a technical perspective (Soliman et al., 2024). Although many potential telocyte markers have been identified, CD117 is among the most reliable markers in the female reproductive system (Varga et al., 2017). Our photomicrographs focus mostly on the uterine tube ampulla, but telocytes have been observed in all layers of the uterine tube wall. Their close contact with smooth muscle cells in the muscle layer suggests their role in tubal motility. Telocytes have also been identified near blood vessels and nerve fibers. For instance, Aleksandrovykh et al. (2021) showed close anatomical proximity with nerve fibers, indicating a role in neuromuscular signaling. Telocytes have also been demonstrated to express estrogen and progesterone receptors, suggesting their role in hormone sensing (Aleksandrovykh et al. 2020). Importantly, telocytes have been implicated in tubal immune homeostasis and intercellular communication. Although the body of evidence is limited, telocytes are possible critical players in normal reproduction, supporting a favorable microenvironment for fertilization and embryo transport (Marca et al., 2025). Interestingly, recent papers suggest that telopodes running over long distances are not absolutely necessary for telocytes to function properly, as cells in the uterine tube, including telocytes, produce extracellular vesicles containing microRNAs, proteins, and other signaling molecules that mediate cell-to-cell communication, immunomodulation, and other functions (Kováčová Ilijew et al. 2026).

Conclusion

Taken together, telocytes are possibly very important in normal tubal function. However, there are still several limitations that have to be addressed in future research, mainly standardization of

criteria for telocyte identification, characterizing telocyte-specific molecular signatures using single-cell transcriptomics, investigating their electrophysiological properties, exploring more precisely their role in infertility, ectopic pregnancy, and chronic inflammatory disorders, and finally, yet importantly, evaluating their potential applications in regenerative medicine (Sanches et al., 2024).

Funding

This work was supported and funded by the EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under the project No. 09I03-03-V04-00290.

References

1. Roy O, Kumari S, Adiga SK, Joshi MB, Kumar A, Venkatraman G, Kannan N, Kalthur G. Functional Changes in the Fallopian Tube: Environmental Factors, Lifestyle, Pathological Conditions and Pharmacological Agents. *Cells*. 2026 Jan 31;15(3):269. doi: 10.3390/cells15030269. PMID: 41677632; PMCID: PMC12897476.
2. Varga I. New Views on the Functional Histology of the Human Uterine Tube – New Possible Mechanisms of Tubal Infertility? *Timisoara Medical Journal*. 2024; 2024(3):10. DOI: 10.35995/tmj20240210.
3. Rosa I, Marini M, Manetti M. Telocytes: An Emerging Component of Stem Cell Niche Microenvironment. *J Histochem Cytochem*. 2021 Dec;69(12):795-818. doi: 10.1369/00221554211025489. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34165348; PMCID: PMC8647634.
4. Klein M, Csöbönyeiová M, Danišovič Ľ, Lapides L, Varga I. Telocytes in the Female Reproductive System: Up-to-Date Knowledge, Challenges and Possible Clinical Applications. *Life (Basel)*. 2022 Feb 10;12(2):267. doi: 10.3390/life12020267. PMID: 35207554; PMCID: PMC8874826.
5. Rosa I, Nardini P, Fioretto BS, Guasti D, Romano E, Sgambati E, Marini M, Manetti M. Immunohistochemical and ultrastructural identification of telocytes in the lamina propria of human vaginal mucosa. *Acta Histochem*. 2023 Oct;125(7):152094. doi: 10.1016/j.acthis.2023.152094. Epub 2023 Sep 25. PMID: 37757515.
6. Soliman SA. Immunohistochemical properties of embryonic telocytes in a myogenic microenvironment. *Sci Rep*. 2024 May 27;14(1):12034. doi: 10.1038/s41598-024-62103-1. PMID: 38802438; PMCID: PMC11130138.
7. Varga I, Klein M, Urban L, Danihel L Jr, Polak S, Danihel L Sr. Recently discovered interstitial cells "telocytes" as players in the pathogenesis of uterine leiomyomas. *Med Hypotheses*. 2018 Jan;110:64-67. doi: 10.1016/j.mehy.2017.11.003. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29317071.
8. Aleksandrovych V, Wrona A, Bereza T, Pityński K, Gil K. Oviductal Telocytes in Patients with Uterine Myoma. *Biomedicines*. 2021 Aug 20;9(8):1060. doi: 10.3390/biomedicines9081060. PMID: 34440264; PMCID: PMC8391874.
9. Aleksandrovych V, Gil A, Wrona A. Sex steroid hormone receptors of telocytes - potential key role in leiomyoma development. *Folia Med Cracov*. 2020 Sep 28;60(2):81-95. doi: 10.24425/fmc.2020.135015. PMID: 33252597.
10. Marca, A.L., Lecis, S., Botticelli, L. *et al*. Telocytes, the New Kids on the Block. What Role do They Play in Female Reproductive System and Function? (A Review). *Cell Tiss. Biol*. 19, 495–503 (2025). <https://doi.org/10.1134/S1990519X25600589>
11. Kováčová Ilijew H, Kleinová M, Briešková Z, Valent M, Klein M. The roles of extracellular vesicles including "oviductosomes" in normal reproduction and related pathological conditions. *Life Sci*. 2026 Jan 1;384:124106. doi: 10.1016/j.lfs.2025.124106. Epub 2025 Nov 21. PMID: 41276212.
12. Sanches, B. D. A., Teófilo, F. B. S., Brunet, M. Y., Villapun, V. M., Man, K., Rocha, L. C., Neto, J. P., Matsumoto, M. R., Maldarine, J. S., Ciena, A. P., Cox, S. C., & Carvalho,

H. F. (2024). Telocytes: current methods of research, challenges and future perspectives. *Cell and Tissue Research*, 396(2), 141-155. <https://doi.org/10.1007/s00441-024-03888-5>