

KATEDRA ZA KLINIČNO BIOKEMIJO IN LABORATORIJSKO MEDICINO



Člani Katedre za klinično biokemijo (od leve proti desni): Petra Ferkov, Majda Sirk, doc. dr. Nika Marija Lovšin, asist. dr. Tijana Markovič, Manja Cedilnik, izr. prof. dr. Barbara Ostanek, prof. dr. Janja Marc, prof. dr. Joško Osredkar, prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, asist. dr. Jasna Omersel, prof. dr. Borut Božič, doc. dr. Nataša Karas Kuželički (predstojnica), doc. dr. Martina Gobec, Matej Godec, doc. dr. Janja Zupan, prof. dr. Darko Černe, dr. Klemen Kodrič, doc. dr. Alenka Šmid. Manjkajo: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, asist. Klemen Čamernik, doc. dr. Mojca Božič Mijovski, izr. prof. dr. Helena Podgornik, asist. dr. Irena Prodan Žitnik, asist. dr. Dunja Urbančič, asist. Taja Zore, Simona Gričar, asist.-raz. dr. Jasna Lojk, Damjan Avsec, asist. Sanja Nabergoj, Lucija Ana Vrščaj.

Poslanstvo Katedre za klinično biokemijo je skrb za izobraževanje in razvoj na področju klinično-biokemijske laboratorijske diagnostike v zdravstvu. Katedra, ki je bila ustanovljena leta 1986, pokriva širok spekter laboratorijske medicine. Zato smo člani Katedre močno vpeti v strokovne organizacije in smo aktivni na različnih znanstvenih področjih. Na raziskovalnem področju je naše delo usmerjeno v razvoj celovite klinično-biokemijske diagnostike s poudarkom na molekularni in celični diagnostiki. Znanstvena vpetost nam omogoča kakovostno pedagoško delo ter delovanje v interdisciplinarnih raziskovalnih skupinah. Smo nosilci in skrbniki prvostopenjskega in magistrskega študijskega programa laboratorijske medicine ter znanstvene smeri Klinična biokemija in laboratorijska medicina na doktorskem študiju Biomedicine, sodelujemo pa tudi pri izvedbi študijskih programov Farmacija in Kozmetologija. Klinično biokemijo so kot samostojni predmet (Analizna farmacevtska biokemija) uvedli v študij farmacije leta 1977, visokošolski študijski program laboratorijske medicine pa so ustanovili leta 1995. Z uvedbo bolonjskega sistema se je leta 2008 le-ta preoblikoval v prvostopenjski univerzitetni študijski program S1 LBM, ki ga je že naslednje leto nadgradila magistrska stopnja in tako povezala z doktorskim programom Podiplomski študij iz klinične biokemije. Slednji poteka na Fakulteti za farmacijo od leta 1987, 1999 pa se je preoblikoval v znanstveno smer na doktorskem študiju Biomedicine.

Pomemben del Katedre predstavlja Laboratorij za molekularno diagnostiko, ki izvaja storitve za potrebe terciarnega zdravstva in predstavlja primer uspešne translacije raziskav v klinično prakso. Več o Katedri najdete na povezavi: <http://www.ffa.uni-lj.si/fakulteta/organiziranost/katedre/katedra-za-klinicno-biokemijo>.

PERSONALIZIRANI PRISTOPI V KLINIČNI BIOKEMIJI IN LABORATORIJSKI MEDICINI: VČERAJ, DANES, JUTRI

PERSONALISED APPROACHES IN CLINICAL BIOCHEMISTRY IN LABORATORY MEDICINE: PAST, PRESENT AND FUTURE

AVTORJI / AUTHORS:

Prof. dr. Janja Marc, mag. farm.
Prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.
Prof. dr. Borut Božič, mag. farm.
Izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.
Doc. dr. Janja Zupan, mag. farm.
Izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.
Doc. dr. Alenka Šmid, mag. farm.
Asist. dr. Dunja Urbančič, mag. farm.
Doc. dr. Nika Marija Lovšin, univ. dipl. kem.
Asist. Klemen Čamernik, mag. farm.
Asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.
Doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: natasa.karas@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Personalizirani pristopi v obravnavi številnih kroničnih bolezni, kot so rak, osteoporoza, avtoimunske in sklepne bolezni, v zadnjem desetletju nezadržno prodirajo iz raziskovalne sfere v klinično prakso. Cilj teh pristopov je, da na osnovi genetskih in drugih dejavnikov individualiziramo zdravljenje v smislu doseganja optimalnih učinkovitosti in varnosti. Ključno vlogo v tem procesu imajo poleg zdravnikov in farmacevtov tudi strokovnjaki laboratorijske medicine, saj zagotavljajo informacije, na osnovi katerih oblikujemo optimalno zdravljenje za določenega bolnika. Na Katedri za klinično biokemijo in laboratorijsko medicino razvijamo različna področja personalizirane (oz. precizne) medicine, kot so farmakogenomika, nutrigenomika, in celično zdravljenje, in sicer v kontekstu različnih bolezni, kot so akutna limfoblastna levkemija, kronična limfatična levkemija, osteoporoza in degenerativne bolezni sklepov ter avtoimunske bolezni. Nadaljnja translacija omenjenih pristopov v klinično prakso je odvisna od stopnje izobraženosti zdravstvenih delavcev na tem področju. Zato je pomemben cilj Katedre in Fakultete za farmacijo uvajanje teh vsebin tudi v študijske programe.

KLJUČNE BESEDE:

avtoimunske bolezni, degenerativne bolezni sklepov, levkemija, osteoporoza, personalizirana medicina

ABSTRACT

Recently, personalised approaches in the treatment of several chronic diseases such as cancer, osteoporosis, autoimmune and joint diseases are being translated from the research to the clinical practice. The goal of the personalised medicine is individualisation of therapy to achieve its optimal efficiency and safety. Laboratory medicine professionals play a key role in this process, since they provide the information needed to optimize the therapy. Researchers at the Chair of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine have been developing several fields of personalised (or precision) medicine, such as pharmacogenomics, nutrigenomics and cell ther-



apy, in the context of various diseases, such as acute lymphoblastic leukaemia, chronic lymphocytic leukaemia, osteoporosis, degenerative joint disease and autoimmune diseases. Further translation of these approaches into clinical practice depends on the level of education of health professionals in this field. Thus, the incorporation of these topics into study programs is of the utmost importance.

KEY WORDS:

autoimmune diseases, degenerative joint diseases, leukaemia, osteoporosis, personalized medicine

1 UVOD

Sledeč najnovejšim trendom v znanosti na Katedri za klinično biokemijo in laboratorijsko medicino s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) v zadnjih dveh desetletjih intenzivno razvijamo različne personalizirane diagnostične in terapevtske pristope, kot so farmakogenomika, nutrigenomika in celična zdravljenja, ki spadajo na področje t. i. precizne medicine.

Precizna medicina je nov pristop v medicini in farmaciji, ki pri zdravljenju in preprečevanju bolezni upošteva genetsko ozadje posameznika, pa tudi njegov življenjski slog in okoljske dejavnike, ki jim je izpostavljen. Ta pristop omogoča zdravstvenim delavcem oblikovanje optimalnih terapevtskih in preventivnih strategij za posamezne skupine bolnikov z diagnozo določene bolezni (npr. rak, avtoimunske bolezni). Gre za nadgradnjo trenutno najbolj razširjenega pristopa v medicini, kjer terapevtske strategije prilagodijo »povprečnemu« bolniku in zanemarijo interindividualne razlike med bolniki. Čeprav je izraz precizna medicina relativno nov, pa omenjeni princip v medicini že dolgo uporabljamo. Na primer, pri transfuziji krvi ne apliciramo krvi naključno izbranega donorja, ampak izberemo tistega s skladno krvno skupino, saj bi v nasprotnem primeru bolniku lahko škodovali. Čeprav posamezne podobne primere lahko najdemo v različnih vejah medicine, je rutinska uporaba tovrstnih pristopov v zdravstvu relativno omejena. Raziskovalci, ki se s tem področjem ukvarjamo, pa upamo, da bo v prihajajočih letih uporaba preciznih oz. perso-

naliziranih pristopov v medicini postala bolj razširjena (1).

V strokovni literaturi pogosto pride do prekrivanja izrazov precizna in personalizirana medicina. Izraz personalizirana medicina je starejši in ima zelo podoben pomen kot precizna medicina. Izraz precizna medicina je uvedel *US National Research Council*, ker bi izraz personalizirana medicina lahko napačno razumeli v smislu razvoja zdravil in drugih terapevtskih pristopov za vsakega posameznika posebej, v resnici pa gre za identifikacijo pristopov, ki bodo najbolj učinkoviti in varni za določeno skupino bolnikov z določenimi gentskimi in okoljskimi dejavniki tveganja (2).

Personalizirane pristope razvijajo v sklopu več različnih znanstvenih področij, kot so farmakogenomika, nutrigenomika, vakcinogenomika, toksigenomika, celična zdravljenja idr.

Farmakogenomika je ena izmed najbolj razvitih vej precizne medicine, ki proučuje, kako genetski ustroj posameznika vpliva na njegov odziv na zdravila. To relativno novo področje združuje farmakologijo in genomiko z namenom razvoja učinkovitih in varnih zdravil, katerih odmerki so prilagojeni posameznikovi genetski zasnovi (1). Nutrigenomika poskuša identificirati optimalen način prehrane, ki ustreza posameznikovi genetski sestavi, vakcinogenomika poskuša identificirati genetske označevalce učinkovitosti in varnosti cepiv, toksigenomika pa proučuje genetske vzroke za variabilnost v občutljivosti posameznikov na različne ksenobiotike in toksine. Celična zdravljenja predstavljajo najsodobnejši personalizirani pristop v zdravljenju raka, sklepnih in drugih bolezni.

V naslednjih poglavjih bomo predstavili raziskovalne dosežke Katedre s področja precizne medicine. To je raziskovalno področje, ki ga Katedra razvija že več kot 15 let, in sicer v sklopu zdravljenja in preventive različnih patoloških stanj, kot so osteoporoza, sklepne bolezni, rak in levkemije, avtoimunske bolezni in ateroskleroza.

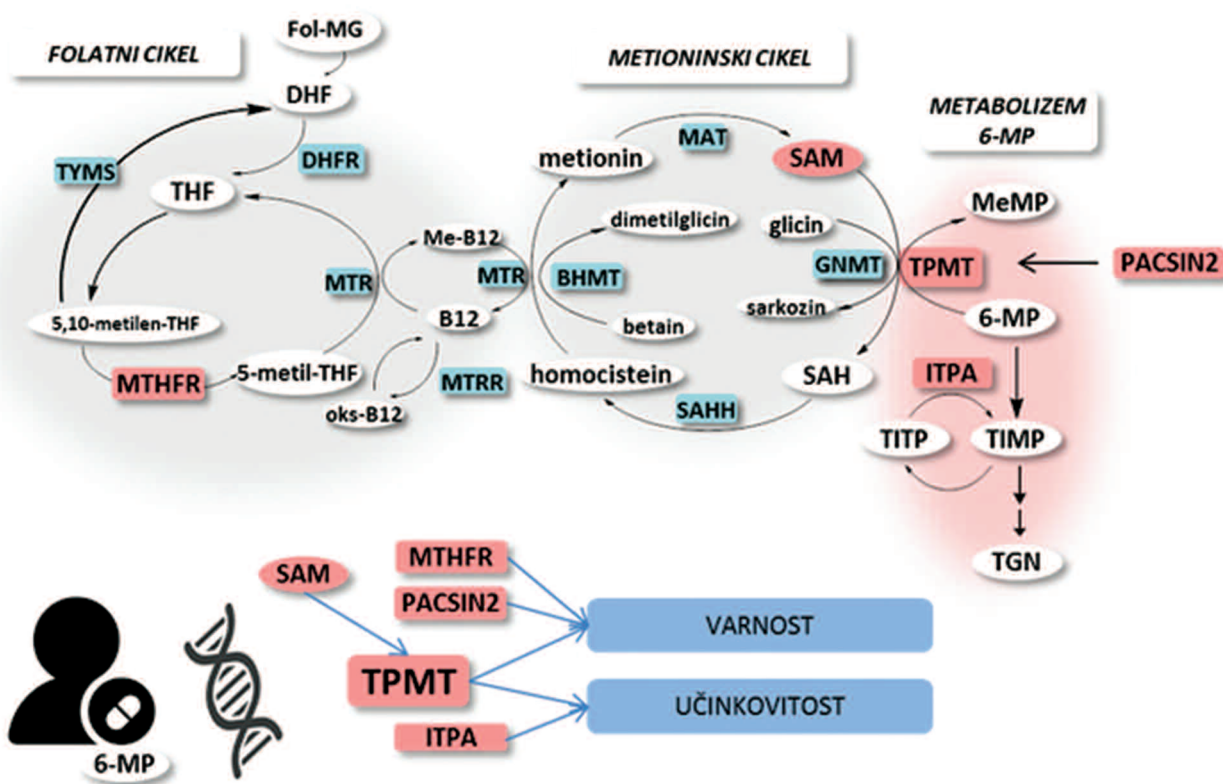
2 TRANSLACIJSKE RAZISKAVE V ONKOLOGIJI

V okviru translacijskih raziskav v onkologiji smo na UL FFA soustvarjali razvoj znanosti in s sodobnimi pristopi prenašali spoznanja v klinično prakso in v procese predkliničnih raziskav zdravil. Najvidnejše rezultate razisko-

valna skupina prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan dosega na področjih patologij limfocitov B, in sicer smo s farmakogenetskimi pristopi proučevali toksičnost 6-merkaptopurina, ki predstavlja temelj vzdrževalnega zdravljenja akutne limfoblastne levkemije. Nadalje smo s proučevanjem molekularnih mehanizmov celične smrti doprinesli k identifikaciji novih tarčnih molekul, ki omogočajo razvoj novih ciljanih zdravljenj pri kronični limfocitni levkemiji.

2.1 PERSONALIZIRANO ZDRAVLJENJE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE

Med najuspešnejše primere uvajanja farmakogenetskih označevalcev v klinično prakso z namenom prilagajanja odmerjanja zdravil posamezniku sodi zdravljenje akutne limfoblastne levkemije. Na UL FFA smo v sodelovanju s Pediatrično kliniko Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana nosilci razvoja farmakogenetike v Sloveniji. Prvi



Slika 1: Personalizirani pristop k zdravljenju s tiopurini. Poleg gena TPMT na varnost in učinkovitost tiopurinskih zdravil vplivajo še drugi geni in intermediati metioninskega in folatnega cikla, ki smo jih identificirali v naših raziskavah. Fol-MG: folat monoglukuronid, DHF: dihidrofolat, DHFR: dihidrofolat reduktaza, THF: tetrahydrofolat, TYMS: timidilat sintaza, MTHFR: 5,10-metilen-tetrahydrofolat reduktaza, MTR: metionin sintaza, MTRR: reduktaza metionin sintaze, BHMT: betain homocistein metiltransferaza, MAT: S-adenozilmetionin sintaza, SAM: S-adenozilmetionin, GNMT: glicin N-metil transferaza, SAH: S-adenozil-homocistein, SAHH: S-adenozil-homocistein hidrolaza, TPMT: tiopurin-S-metil transferaza, 6-MP: 6-merkaptopurin, MeMP: metil-merkaptopurin, PACSIN2: substrat protein kinaze C in kazein kinaze v nevronih 2, ITPA: inozin trifosfataza, TIMP: 6-tioinozin-5'-monofosfat, TITP: tioinozin trifosfat, TGN: tiogvanin nukleotidi.

Figure 1: Personalised approach in thiopurine therapy. In addition to the TPMT gene, other genes and intermediates of the methionine and folate cycles, identified in our research, also influence the safety and efficiency of the thiopurine therapy. Fol-MG: folate monoglucuronide, DHF: dihydrofolate, DHFR: dihydrofolate reductase, THF: tetrahydrofolate, TYMS: thymidylate synthase, MTHFR: 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase, MTR: methionine synthase, MTRR: methionine synthase reductase, BHMT: betaine-homocysteine methyltransferase, MAT: S-adenosylmethionine synthetase, SAM: S-adenosylmethionine, GNMT: glycine N-methyltransferase, SAH: S-adenosyl homocysteine, SAHH: S-adenosyl homocysteine hydrolase, TPMT: thiopurine S-methyltransferase, 6-MP: 6-mercaptopurine, MeMP: methyl-mercaptopurine, PACSIN2: protein pinase C and casein kinase substrate in neurons 2, ITPA: inosine triphosphatase, TIMP: 6-thioinosine-5'-monophosphate, TITP: thioinosine triphosphate, TGN: thioguanine nucleotides.



slovenski raziskovalni projekt smo na področju farmakogenetike pridobili leta 2002. Na osnovi farmakogenetskih spoznanj (3) smo razložili vzrok za interindividualno raznolikost v odzivu na zdravljenje s 6-merkaptopurinom in pojavnost toksičnosti. V ta namen smo proučili genetske variabilnosti v encimu tiopurin S-metiltransferaza (TPMT), ki ima poglavito vlogo pri deaktivaciji tiopurinov in v veliki meri vpliva na razlike v odzivu posameznikov na zdravljenje (4). Sledili so številni projekti, ki so širili meje znanja in prinašali nova spoznanja. V sodelovanju z Estonskim genomskim centrom in Univerzo v Tartuju smo v metaanalizi vsegenomskih podatkov potrdili pomembno povezanost med genetskimi polimorfizmi v TPMT in aktivnostjo tega encima (5). Med pomembnejše dosežke sodi tudi identifikacija novih bioloških označevalcev, kot so genetske različice v genih MTHFR (4, 6), PACSIN (7), ITPA (8) ter vsebnost metabolita S-adenozil-metionina (9) (slika 1). Kot največji uspeh dela na področju zdravljenja otroške akutne limfoblastne levkemije vidimo uspešen prenos naših spoznanj v klinično prakso. Z obravnavo in z genotipizacijo pacientov z življenjsko ogrožajočimi neželenimi učinki tiopurinov smo zmanjšali neželene učinke zdravljenja in izboljšali kakovost življenja pacientov. Še več, spoznanja teh raziskav vključujemo tudi v Laboratorij za molekularno diagnostiko, ki deluje v okviru Katedre.

2.2 RAZISKAVE KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE

Drugi segment raziskav raziskovalne skupine prof. Mlinarič-Raščan posega v področje razumevanja malignih pretvorb limfocitov B s poudarkom na patologiji kronične limfocitne levkemije, najpogostejše in trenutno neozdravljive krvne novotvorbe pri odraslih. Večina sodobnih zdravil za njeno zdravljenje sicer povzroči apoptozo celic, vendar pa predstavlja odpornost proti zdravilom resen problem in poziva k iskanju inovativnih in učinkovitih farmakoloških pristopov za zdravljenje kronične limfocitne levkemije. Ugotovili smo, da imajo serinske proteaze (10, 11) in prostaglandinski receptor EP4 (12–14) odločilno vlogo v regulaciji procesov celične proliferacije in celične smrti v limfocitih B. S farmakološkim pristopom smo ugotovili, da EP4 inducira od kaspaz odvisno programirano celično smrt v maligno spremenjenih celicah B, najizraziteje v celicah Burkittovega limfoma (15, 16). S tem smo nakazali na potencial uporabe agonistov receptorja EP4 v optimizaciji zdravljenja maligno spremenjenih celic B, kar je tudi predmet trenutnih raziskav (17).

V procesih nadaljnjega odkrivanja novih zdravil smo kot obetavno farmakološko tarčo identificirali ubikvitin-proteasomski sistem (UPS) (15). Proteasom in za imunske celice specifičen imunoproteasom sta multikatalitična kompleksa, ki preko razgradnje proteinov regulirata številne znotrajcelične procese. Kot izjemen dosežek raziskovalne skupine štejemo raziskave na področju zaviralcev imunoproteasoma. V sodelovanju s sodelavci Katedre za farmacevtsko kemijo UL FFA smo uspeli razviti in biološko ovrednotiti nove reverzibilne zaviralce imunoproteasoma z nepeptidno osnovno strukturo, ki selektivno zavirajo kimotripsinu podobno podenoto ($\beta 5i$) človeškega imunoproteasoma, medtem ko je delovanje na konstitutivni proteasom zanemarljivo (18). K znanstveni pomembnosti raziskav, ki smo jih vodili na UL FFA na področju translacijskih raziskav v onkologiji je doprineslo plodno interdisciplinarno sodelovanje naše skupine z raziskovalci s Pediatrične in Hematološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Estonskega genomskega centra Univerze v Tartuju, Sacklerjeve Medicinske fakultete Univerze v Tel-Avivu ter Univerz v Trstu, Bernu in Linköpingu na Švedskem.

3 RAZISKAVE NA PODROČJU KRONIČNIH BOLEZNI

Na UL FFA že več desetletij razvijamo področje diagnostike in optimizacije zdravljenja kostnih bolezni v sklopu raziskovalne skupine prof. Janje Marc, ki se osredotoča na iskanje mehanizmov bolezni in tako na iskanje novih genetskih označevalcev osteoporozе kot tudi farmakogenetskih kazalcev zdravljenja le-te.

3.1 VSEGENOMSKE RAZISKAVE IN FUNKCIJSKA GENETIKA ZA PERSONALIZIRANO LABORATORIJSKO DIAGNOSTIKO IN ZDRAVLJENJE KOSTNIH IN DRUGIH KRONIČNIH BOLEZNIH

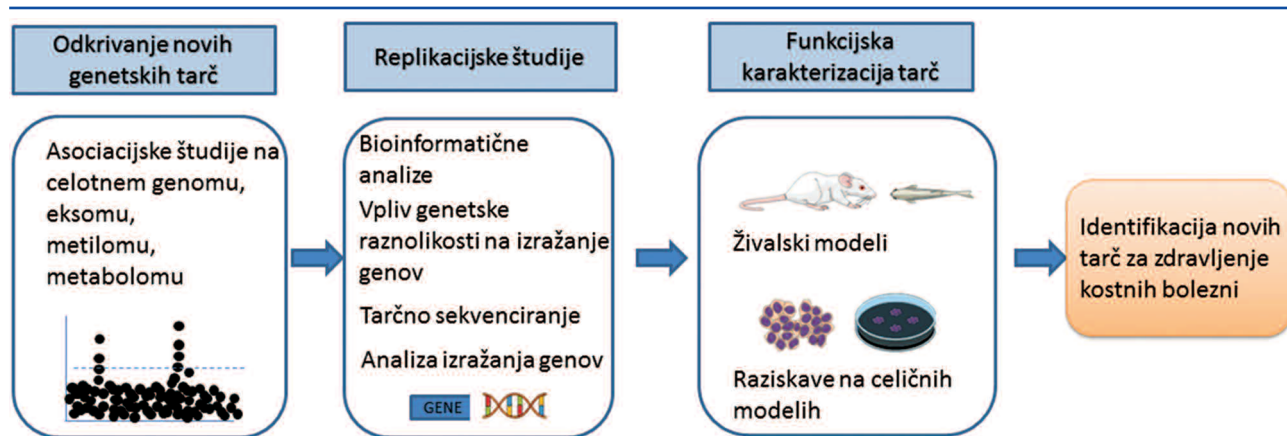
Eden izmed najpogostejših načinov za odkrivanje genetskih lokusov, ki so vpleteni v nastanek kroničnih bolezni, so vsegenomske asociacijske raziskave (*GWAS*, *genome wide association studies*). Osteoporozа in osteoartrza sta primera takšnih večfaktorskih in poligenjskih kroničnih bolezni kostnega tkiva (19). Za tovrstne raziskave je po-

trebna analiza zelo velikega števila (nekaj deset tisoč) bolnikov in vzorcev, zato je nujno združevanje nacionalnih raziskovalnih skupin v večje mednarodne konzorcije. Raziskovalna skupina prof. Janje Marc je del konzorcija GE-FOS/GENOMOS že od leta 2008 (20–23). V asociacijskih študijah v celotnem genomu smo odkrili več kot 150 genetskih lokusov, ki so povezani z mineralno kostno gostoto (21, 24–29), in dokazali, da je za izgubo kostnega tkiva pri starejših ljudeh odgovorno tudi povečanje količine maščobnega tkiva v kostnem mozgu. V vsegenomski metaanalizi smo odkrili, da je 49 novih genskih lokusov, povezanih s porazdelitvijo maščevja, pomembnih tudi za kostno biologijo (22). Odkriti genski lokusi predstavljajo nov pristop k razlagi mehanizmov, ki so vpleteni v etiologijo kostnih bolezni, ter pomembno izhodišče za zgodnjo diagnostiko osteoporoze in njeno personalizirano zdravljenje. Potencialno vlogo teh genskih lokusov je potrebno predhodno funkcijsko ovrednotiti. Slednje predstavlja izjemno zahtevno delo na celičnih, tkivnih in živalskih modelih (Slika 2). Skupina postaja mednarodno prepoznavna na tem področju. V funkcijski raziskavi smo pokazali vpletenost adrenergičnega receptorja $\alpha 2A$ ($\alpha 2A$ -AR) v neuroendokrino uravnavanje kostne prenovne na nivoju človeškega kostnega tkiva z uporabo imunohistokemije in ocene izražanja gena ob prisotnosti in odsotnosti genetskih polimorfizmov $\alpha 2A$ -AR (30). V zadnji funkcijski razi-

skavi smo z uporabo metod utišanja genov in povišanega izražanja gena (*loss and gain of function*) na primarnih celicah skupaj z analizo človeških kostnih vzorcev razložili razlike v kakovosti kosti (kostni gostoti) med moškimi in ženskami na molekularnem nivoju (31).

3.2 FARMAKOGENETIKA KOSTNIH BOLEZNI

Osteoporoza je najpogostejša kostna bolezen, ki prizadene vsako tretjo žensko in vsakega petega moškega po 55. letu starosti. Za zdravljenje osteoporoze imamo danes na voljo več zdravil, pri čemer se učinkovitost zdravljenja med posamezniki, ki prejemajo enako zdravilo, razlikuje. Eden od možnih razlogov za to so razlike v zapisu posameznikovega genoma, ki jih proučuje farmakogenomika. Farmakogenomski pristop bi pri osteoporozi pomenil veliko prednost za zgodnejše ugotavljanje, ali bo zdravljenje uspešno ali ne, saj danes učinkovitost zdravljenja preverjamo šele po enem letu ali več, prav tako se tudi pomembnejši neželeni učinki razvijejo šele po večletnem zdravljenju. Farmakogenomskih raziskav na področju osteoporoze zaenkrat ni veliko. Večinoma gre za ocenjevanje vpliva posameznih farmakogenetskih polimorfizmov/označevalcev na mineralno kostno gostoto in raziskave navadno ne vključujejo povezanosti genetskih variabilnosti s koncentracijo



Slika 2: Predstavitev glavnih raziskovalnih korakov pri iskanju novih tarč, primernih za razvoj zdravil za zdravljenje kostnih bolezni. V vsegenomskih, eksomskih, metilomskih in metabolomskih asociacijskih raziskavah odkrijemo potencialne tarčne lokuse, ki so povezani s pojavom kostnih bolezni. V replikacijskih raziskavah te tarčne lokuse potrdimo in jih ovrednotimo z računalniškimi analizami. Najbolj pomembne tarče okarakteriziramo na sesalskih celičnih kulturah ali živalskih modelih. Rezultat je odkritje novih tarč, ki bi bile lahko vpletene v metabolizem kosti (povzeto po (19)).

Figure 2: Representation of main steps in search of new drug targets for bone disease therapy. First, genetic loci associated with the development of bone diseases are identified through genome-, exome-, methylome- and metabolome-wide association studies. These loci must be confirmed in replication studies and further evaluated by bioinformatic analysis. Finally, the most significant targets are investigated using mammalian cell lines and animal models, resulting in the identification of potential drug targets involved in the bone metabolism.

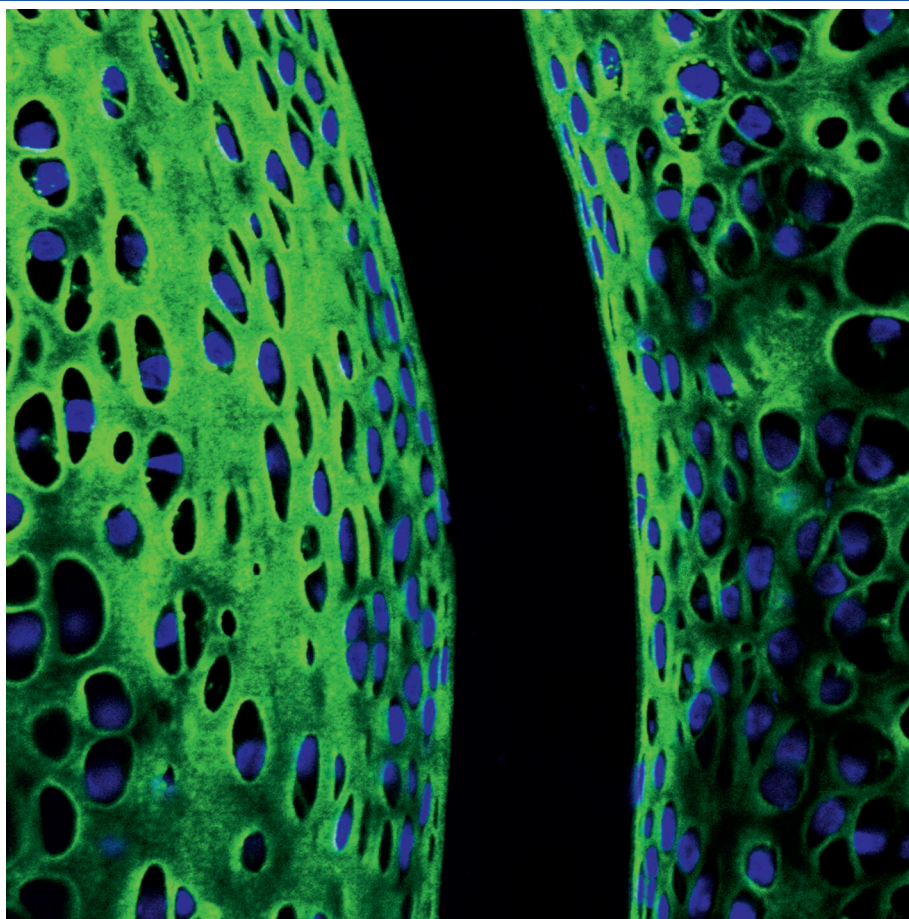


zdravilne učinkovine ali njenih metabolitov, kar bi omogočilo proučevanje funkcionalnosti farmakogenetskih kazalcev. Enega od pomembnih prispevkov na tem področju predstavlja naša raziskava farmakogenomike raloksifena, ki je bila zasnovana večstopenjsko. V njej smo najprej na celičnih modelih potrdili, da so raloksifen in njegovi metaboliti substrati za prenašalec OATP1B1, ter nato na vzorcih bolnikov dokazali, da funkcionalni polimorfizem v genu za OATP1B1 vpliva na serumske koncentracije raloksifena in njegovih metabolitov ter tudi na uspešnost zdravljenja (32). Vključeni smo v mednarodni projekt, v katerem želimo raziskati farmakogenomiko osteoanabolne učinkovine teriparatida. Tu se nismo osredotočili na posamezne gene, ampak smo z vsegenomskim pristopom identificirali genetske polimorf-

izme, ki vplivajo na uspešnost zdravljenja, v teku pa so tudi funkcijske raziskave (33).

4 NAPREDNO CELIČNO ZDRAVLJENJE DEGENERATIVNIH BOLEZNI SKLEPOV

Popolnoma novo področje, ki smo ga na Katedri začeli razvijati šele pred nekaj leti, je zdravljenje degenerativnih sklepnih bolezni z matičnimi celicami. Degenerativne bolezni sklepov, med katerimi je najpogostejša osteoartraza, okrnijo posameznikovo gibanje in predstavljajo veliko



Slika 3: Slika prikazuje hialini hrustanec, ki ga tvori kolagen tipa II (zeleno barvo), s hrustančnimi celicami (njihova jedra so označena modro) v kolenskem sklepu. Pri degenerativnih boleznih sklepov pride do obrabe hrustanca. Cilj regenerativne medicine pri degenerativnih boleznih sklepov je obnova oz. nastanek hialinega hrustanca, ki sklepom omogoča normalno funkcijo.

Figure 3: Figure shows hyaline cartilage formed by type II collagen (green) with cartilage cells (their nuclei are highlighted in blue) in the knee joint. In degenerative joint disease, cartilage wear occurs. The goal of regenerative medicine in degenerative joint disease is to restore or reform the hyaline cartilage which allows the joints to function normally.

breme zdravstvenih sistemov v sodobni družbi. Po naj-novejšem poročilu *UK Arthritis* za leto 2019 je približno 8,75 milijonov ljudi starih 45 let in več, kar je 33 % vseh prebivalcev Združenega kraljestva, potrebovalo zdravljenje za osteoartrozo, tretjina teh pa se jih mora bodisi zgodaj upokojiti, opustiti delo ali zmanjšati število delovnih ur.

Osteoartraza je posledica kombinacije razgradnje sklepa in poskusa popravila škode z endogenim regenerativnim procesom, ki pa naj bi bil pri tej bolezni oslavljen. Pri mladih zdravih posameznikih regenerativni proces po poškodbi tkiv uspešno izvedejo mezenimske matične/stromalne celice, ki sicer gradijo naša tkiva med embrionalnim razvojem. V odraslem organizmu jih najdemo kot redke populacije v več tkivih (kostni mozeg, maščobno tkivo, mišice, sinoviji itd.). Sposobne so regenerirati poškodovana tkiva, npr. zlomljene kosti ali raztrgane mišice (34, 35). Večina dokazov o njihovi regenerativni sposobnosti izhaja iz bazičnih raziskav, objavljenih v uglednih znanstvenih revijah, kjer z uporabo sofisticiranih transgenih živalskih modelov sledijo matičnim/stromalnim celicam, bodisi od embrionalnega razvoja do odrasle življenjske dobe ali pa v fizioloških in patoloških pogojih (36–38). Njihovi izsledki dokazujejo, da ima vsak odrasel organizem v svojih tkivih endogeni komplet matičnih/stromalnih celic za popravilo tkiv. Izziv trenutnih raziskav na področju regenerativne medicine je, kako endogene matične/stromalne celice spodbuditi k ponovnemu opravljanju nalog, ki so jih vršile med embrionalnim razvojem (slika 3).

V sedanjih praksi naprednega zdravljenja se izraz matične celice nanaša na različne oblike celičnih koncentratov, večinoma pridobljenih iz kostnega mozga ali maščobnega tkiva bolnikov samih, ki pa vsebujejo majhne oz. nedoločene količine matičnih/stromalnih celic z neznanimi lastnostmi (34, 35). Poleg tega so ugotovili, da se matične/stromalne celice iz kostnega mozga bolnikov z osteoartrazo razlikujejo od zdravih po številu, topografskih in diferenciacijskih lastnostih (39, 40). V naši raziskovalni skupini smo ugotovili, da obstajajo razlike tudi med matičnimi/stromalnimi celicami iz kostnega tkiva in skeletnih mišic pri istih bolnikih z osteoartrazo (41). To nakazuje, da bi lahko prisotnost degenerativnih bolezni sklepov negativno vplivala na lastnosti matičnih/stromalnih celic, zato avtologna celična zdravljenja morda niso najbolj primerna za njihovo obravnavo.

Trenutno je edini način za obnovo degeneriranega sklepa njegova kirurška zamenjava z umetno protezo. Kljub temu, da je to edino učinkovito zdravljenje osteoartraze, pa bi bilo zaželeno bolezen zdraviti v zgodnji fazi in zau-

staviti njeno napredovanje. Na tem področju veliko obetajo prav napredna celična zdravljenja in regenerativna medicina, katerih končni cilji so obnova celic, tkiv ali organov ter vzpostavitev njihovih normalnih funkcij. Pri osteoartrazi in degeneraciji sinovijskih sklepov bi bilo na ta način možno regenerirati zlasti hrustanec in subhondralno kost.

Čeprav matičnih/stromalnih celic še vedno ne poznamo dovolj dobro, pa trenutno velja, da so to heterogene in tkivno specifične populacije z različnimi sposobnostmi regeneracije tkiv (42). V sinoviji smo pri miših odkrili populacijo, ki ima sposobnost regeneracije poškodovanega hrustanca ter celo sposobnost tvorbe sklepu podobne strukture (43). To razburljivo odkritje je odprlo povsem nova vprašanja: Ali lahko to populacijo matičnih/stromalnih celic identificiramo tudi pri človeku? Kako bi lahko izkoristili njihove sposobnosti v regenerativni medicini? Ali se ta populacija matičnih/stromalnih celic pri degenerativnih boleznih sklepov spremeni in nato prispeva k njihovem napredovanju? Upamo, da nam bodo odgovore na ta vprašanja ponudile nadaljnje raziskave, ki jih trenutno izvajamo na Katedri.

5 AVTOIMUNSKKE BOLEZNI

Avtoimunske bolezni prizadenejo 5 do 8 % populacije, torej okoli 150.000 Slovencev. Kot kronične bolezni predstavljajo veliko breme za bolnika, njegovo okolico in državo. Več kot sto poznanih avtoimunskih bolezni se med seboj pomembno razlikuje v kliničnem izražanju, na katerega vplivajo imunski, okoljski, hormonski in genetski dejavniki. Pri sumu na avtoimunske bolezni je ključna zgodnja prepoznavna, ki je zaradi izrazite heterogenosti v razvoju in poteku večine teh bolezni velikokrat težka in zamudna, vključuje pa klinični pregled, slikovno in laboratorijsko diagnostiko (44).

V dolgoletnem sodelovanju Katedre in Kliničnega oddelka za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana ter drugih domačih in tujih inštitucij smo naredili pomembne korake k učinkovitejši in kakovostni diagnostiki avtoimunskih bolezni v Sloveniji. Ponosni smo, da smo skupaj razvili metodo določanja avtoprotiteles proti b2-glikoproteinu I, ki so eden od diagnostičnih kriterijev v obravnavi antifosfolipidnega sindroma (45), in da smo sodelovali pri razvoju in zamenjavi radioaktivne metode določanja protiteles proti



DNA z varnejšo fluorescenčno metodo, ki smo jo tudi patentirali (46). V primeru revmatoidnega artritisa smo ugotavljali ojačano citrulinizacijo strukturnih proteinov. Če so spremembe obsežne, take proteine imunski sistem prepozna kot tuje. Nastanejo vezišča, proti katerim v zorenju limfocitov ne pride do izločitve (47). Dokazali smo, da lahko spremembe nastanejo tudi na protitelesih. Delna oksidacija hipervariabilne regije naravnih ali protimikrobnih protiteles tako povzroči spremembo specifičnosti vezave protiteles, s čimer pridobijo avtoimunske in vnetne značilnosti (48, 49).

Za raziskave poškodb, ki jih povzročijo avtoimunske reakcije, smo uporabili različne pristope – od analiz medmolekulskih interakcij z metodami molekularne biologije, mikroskopije na atomsko silo in plazmonske resonance (50), do raziskav interakcij na umetnih ali celičnih membranah (51). Še zahtevnejše so bile raziskave z uporabo tkiv bolnikov, kot je to v primeru celiakije, kjer ni na voljo živalskih modelov bolezni (52, 53). Iz multicentričnih raziskav pa vseskozi pridobivamo informacije, ki jih vključimo v eksperimente za razumevanje patogeneze (54), testiranja novih metod ali oblikovanje učinkovitejših algoritmov za laboratorijsko diagnostiko avtoimunskih bolezni (55–57).

Cilj personalizirane medicine v obravnavi bolnika z avtoimunsko boleznijo je izbrati pravo zdravilo ali shemo zdravljenja za specifične značilnosti bolnika v posameznem stadiju bolezni (zagon ali umiritev bolezni). Zaradi številnih na bolnika vezanih dejavnikov lahko prihaja pri uporabi sicer neprecenljivih bioloških zdravil do neželenih imunskih reakcij, kar neposredno vpliva na farmakodinamiko/farmakokinetiko biološkega zdravila, varnost in učinkovitost zdravljenja (58). Zato se tudi na področju avtoimunskih bolezni krepi spremljanje koncentracije bioloških zdravil v krvi in razvoj metod določanja nevtralizirajočih protiteles, ki jih lahko tvori imunski sistem zdravljenega bolnika. S skupnimi močmi je tako Laboratorij za imunologijo revmatizma Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana razvil in uvedel metodo za določanje omenjenih protiteles (anti-adalimumab, anti-infliksimumab) (59).

Poznavanje mehanizmov nastanka avtoimunskih bolezni je še vedno relativno slabo, zaradi dviga razširjenosti teh bolezni pa je zanimanje za področje veliko. To je pokazal tudi 7. Mednarodni kongres avtoimunosti v Ljubljani leta 2010, kjer smo kot soorganizatorji združili 1800 strokovnjakov. Prihodnost personalizirane obravnave v diagnostiki bolnikov z avtoimunskimi boleznimi se kaže v dobri oceni tveganja skozi družinsko anamnezo, pregledu označevalcev vnetja in imunskega odziva ter oceni genetskega tveganja. Raziskave pa potekajo tudi v smeri ocene statusa

ekspozoma posameznika, ki bo vključeval vplive številnih okoljskih dejavnikov na organizem. Vedno bolj je aktualna tudi analiza glikoma, rezultat katere daje vpogled v vrsto, obseg in spremembo glikozilacije proteinov, kar dokazano lahko vpliva na razvoj številnih avtoimunskih bolezni.

6 SKLEP

Katedra za klinično biokemijo UL FFA že več desetletij tako raziskovalno kot pedagoško razvija številna diagnostična področja in tehnologije, kot so molekularna biologija, celična biologija, translacijske preiskave, tkivno in celično inženirstvo. V tem obdobju smo prispevali k razvoju slovenske stroke, prav tako pa v zadnjem obdobju aktivno razvijamo diagnostične pristope, usmerjene k posamezniku. V zadnjem desetletju se naglo uveljavlja personalizirana oz. precizna medicina, kjer diagnostika predstavlja glavno orodje, ki zdravstvene delavce (zdravnike in farmacevte) zalaga z informacijami, ki so osnova za implementacijo personaliziranih zdravljenj. Prihodnost personalizirane medicine v klinični praksi je v tej fazi razvoja odvisna predvsem od pripravljenosti zdravstvenih delavcev (farmacevtov, zdravnikov in strokovnjakov laboratorijske medicine) za njeno implementacijo v klinično prakso, kar pa je neposredno povezano z izobraženostjo omenjenih deležnikov na tem področju. V tem izobraževalnem procesu bodo pomembni vlogo odigrali tako Fakulteta za farmacijo z vključevanjem omenjenih vsebin v študijske programe farmacije in laboratorijske medicine kot tudi Zbornica laboratorijske medicine Slovenije (ZLMS) in Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM) z organizacijo izobraževanj za strokovnjake iz prakse. Prihodnji projekti na področju personalizirane medicine bodo (in deloma že so) usmerjeni v izobraževanje in seznanjanje zdravstvenih delavcev s temi pristopi.

7 ZAHVALE

Avtorji se zahvaljujejo vsem članom Katedre za klinično biokemijo UL FFA, ki so sodelovali pri nastajanju v članku opisanih rezultatov, pa niso sodelovali pri pisanju tega

članka in so navedeni v uvodniku članka. Zahvaljujemo se tudi bivšim članom Katedre, ki so v preteklosti sodelovali pri raziskovalnem in pedagoškem delu Katedre: prvemu predstojniku Katedre, pokojnemu prof. dr. Niku Jesenovcu, zaslužni profesorici dr. Jani Lukač-Bajalo, prof. dr. Darku Černetu, doc. dr. Ivanu Malešiču, doc. dr. Barbari Mlinar, asist. mag. Lidiji Gobec, asist. mag. Sanji Jurada, asist. dr. Darji Bitenc, asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, asist. dr. Zoranu Troštu, asist. dr. Tilnu Kranjcu, asist. dr. Mihi Mileku, asist. dr. Teji Čelhar, asist. dr. Matevžu Prijatelj, asist. dr. Vidu Mlakarju, asist. dr. Simoni Jurkovič Mlakar, dr. Jerneju Murnu, dr. Jani Dragojevič, dr. Petru Vrtačniku, dr. Klemnu Kodriču in drugim, ki so na Katedri delovali krajši čas.

8 LITERATURA

- Hodson R. Precision medicine. *Nature*. 2016 Sep 8;537(7619):S49.
- Toward precision medicine: Building a knowledge network for biomedical research and a new taxonomy of disease. Washington, DC: The National Academies Press; 2011. p. 142.
- Milek M, Murn J, Jakšič Z, Lukač Bajalo J, Jazbec J, Mlinarič Raščan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology*. 2006;77(3):105-14.
- Karas-Kuželički N, Jazbec J, Milek M, Mlinarič-Raščan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009 May;23(5):971-4.
- Tamm R, Magi R, Tremmel R, Winter S, Mihailov E, Smid A, et al. Polymorphic variation in TPMT is the principal determinant of TPMT phenotype: A meta-analysis of three genome-wide association studies. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 May;101(5):684-95.
- Karas-Kuželički N, Milek M, Mlinarič-Raščan I. MTHFR and TYMS genotypes influence TPMT activity and its differential modulation in males and females. *Clin Biochem*. 2010 Jan;43(1-2):37-42.
- Šmid A, Karas-Kuželički N, Jazbec J, Mlinarič-Raščan I. PACSIN2 polymorphism is associated with thiopurine-induced hematological toxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia undergoing maintenance therapy. *Sci Rep*. 2016 Jul 25;6:30244.
- Šmid A, Karas-Kuželički N, Milek M, Jazbec J, Mlinarič-Raščan I. Association of ITPA genotype with event-free survival and relapse rates in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing maintenance therapy. *PLoS One*. 2014;9(10):e109551.
- Karas-Kuželički N, Šmid A, Tamm R, Metspalu A, Mlinarič-Raščan I. From pharmacogenetics to pharmacometabolomics: SAM modulates TPMT activity. *Pharmacogenomics*. 2014 Aug;15(11):1437-49.
- Čelhar T, Batista Napotnik T, Obreza A, Zega A, Anderluh PS, Kikelj D, et al. Azaphenylalanine-based serine protease inhibitors induce caspase-mediated apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jan 5;602(1):15-22.
- Murn J, Urleb U, Mlinarič-Raščan I. Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease. *Genes Cells*. 2004 Nov;9(11):1103-11.
- Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med*. 2008 Dec 22;205(13):3091-103.
- Murn J, Mlinarič-Raščan I, Vaigot P, Alibert O, Frouin V, Gidrol X. A Myc-regulated transcriptional network controls B-cell fate in response to BCR triggering. *BMC Genomics*. 2009 Jul 17;10:323.
- Prijatelj M, Čelhar T, Mlinarič-Raščan I. Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011 Aug;95(1-4):19-26.
- Gobec M, Obreza A, Prijatelj M, Brus B, Gobec S, Mlinarič-Raščan I. Selective cytotoxicity of amidinopiperidine based compounds towards Burkitt's lymphoma cells involves proteasome inhibition. *PLoS One*. 2012;7(7):e41961.
- Gobec M, Sosič I, Brus B, Obreza A, Gobec S, Mlinarič-Raščan I. Discovery of novel small-molecule compounds with selective cytotoxicity for Burkitt's lymphoma cells using 3D ligand-based virtual screening. *Molecules*. 2014 Nov 19;19(11):19209-19.
- Markovič T, Jakopin Z, Dolenc Sollner M, Mlinarič-Raščan I. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov Today*. 2017 Jan;22(1):57-71.
- Sosič I, Gobec M, Brus B, Knez D, Živec M, Konc J, et al. Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like (beta5 i) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 May 4;55(19):5745-8.
- Lovšin N, Zupan J, Marc J. Genetic effects on bone health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018 Jul;21(4):233-9.
- Alonso N, Estrada K, Albagha OME, Herrera L, Reppe S, Olstad OK, et al. Identification of a novel locus on chromosome 2q13, which predisposes to clinical vertebral fractures independently of bone density. *Ann Rheum Dis*. 2018 Mar;77(3):378-85.
- Estrada K, Styrkarsdóttir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*. 2012 Apr 15;44(5):491-501.
- Shungin D, Winkler TW, Croteau-Chonka DC, Ferreira T, Locke AE, Magi R, et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):187-96.
- Trajanoska K, Morris JA, Oei L, Zheng HF, Evans DM, Kiel DP, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ*. 2018 Aug 29;362:k3225.
- Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet*. 2017 Oct;49(10):1468-75.
- Liu YJ, Zhang L, Papiasian CJ, Deng HW. Genome-wide Association Studies for Osteoporosis: A 2013 Update. *J Bone Metab*. 2014 May;21(2):99-116.



26. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesi A, Ahluwalia TS, et al. Life-Course Genome-wide Association Study Meta-analysis of Total Body BMD and Assessment of Age-Specific Effects. *Am J Hum Genet.* 2018 Jan 4;102(1):88-102.
27. Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012 Jul 18;13(8):576-88.
28. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009 Nov;41(11):1199-206.
29. Sabik OL, Farber CR. Using GWAS to identify novel therapeutic targets for osteoporosis. *Transl Res.* 2017 Mar;181:15-26.
30. Mlakar V, Jurkovič Mlakar S, Zupan J, Komadina R, Prezelj J, Marc J. ADRA2A is involved in neuro-endocrine regulation of bone resorption. *J Cell Mol Med.* 2015 Jul;19(7):1520-9.
31. Kodrič K, Zupan J, Kranjc T, Komadina R, Mlakar V, Marc J, et al. Sex-determining region Y (SRY) attributes to gender differences in RANKL expression and incidence of osteoporosis. *Exp Mol Med.* 2019 Aug 14;51(8):97.
32. Trdan Lušin T, Stieger B, Marc J, Mrhar A, Trontelj J, Zavrtnik A, et al. Organic anion transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 and their genetic variants influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics of raloxifene. *J Transl Med.* 2012 Apr 25;10:76.
33. Alonso N AO, Azfer A, Riches P, Ostanek B, Kocjan T, et al. Genome-wide association analysis identifies Cxcr4 gene as predictor of therapeutic response to teriparatide in severe osteoporosis. *Calcified tissue international, Abstracts of the ECTS congress 2017; Salzburg, Austria 2017.* p. s22.
34. Čamernik K, Barlič A, Drobnič M, Marc J, Jeras M, Zupan J. Mesenchymal Stem Cells in the Musculoskeletal System: From Animal Models to Human Tissue Regeneration? *Stem Cell Rev Rep.* 2018 Jun;14(3):346-69.
35. Zupan J, ČK, Jeras M., Barlič A., Drobnič M., Marc J. Mezenhimske matične celice: Uporaba in potencial za zdravljenje in diagnostiko mišično-skeletnih bolezn. *Farmaceutski vestnik.* 2017:234-47.
36. Chan CK, Seo EY, Chen JY, Lo D, McArdle A, Sinha R, et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1-2):285-98.
37. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Taylor Y, Rao M, Si Y, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1-2):269-84.
38. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* 2008 Jun;7(3):335-43.
39. Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, McGonagle D, Conaghan PG, Ponchel F, et al. Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Jul;68(7):1648-59.
40. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Mar;46(3):704-13.
41. Čamernik K, Mihelič A, Mihalič R, Marolt Presen D, Janez A, Trebše R, et al. Skeletal-muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells from patients with osteoarthritis show superior biological properties compared to bone-derived cells. *Stem Cell Res.* 2019 Jul;38:101465.
42. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, et al. No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. *Stem Cell Reports.* 2016 Jun 14;6(6):897-913.
43. Roelofs AJ, Zupan J, Riemen AHK, Kania K, Ansboro S, White N, et al. Joint morphogenetic cells in the adult mammalian synovium. *Nat Commun.* 2017 May 16;8:15040.
44. Čučnik S, Žigon, P, Švec, T, Božič, B. Diagnostični postopki. In: Gašperšič N, Ambrožič, A., editor. *Žepna revmatologija.* Ljubljana: Društvo za razvoj revmatologije; 2019. p. 43-54.
45. Čučnik S, Ambrožič A, Božič B, Skitek M, Kveder T. Anti-beta2-glycoprotein I ELISA: methodology, determination of cut-off values in 434 healthy Caucasians and evaluation of monoclonal antibodies as possible international standards. *Clin Chem Lab Med.* 2000 Aug;38(8):777-83.
46. Kveder T, Lakota K, Švec T, Čučnik S, Žigon P, Ambrožič A, et al., inventors; Fluorometric immunoassay for detection of anti-DNA antibodies = Dosage immunologique fluorométrique pour la détection d'anticorps anti-adndb : United States patent US 10,191,048 B2, 2019-01-29. USA2019.
47. van Beers JJ, Schwarte CM, Stammen-Vogelzangs J, Oosterink E, Božič B, Pruijn GJ. The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and beta-actin. *Arthritis Rheum.* 2013 Jan;65(1):69-80.
48. Artenjak A, Omersel J, Ahlin Grabnar P, Mlinarič-Raščan I, Shoenfeld Y, Sodin-Šemrl S, et al. Oxidatively altered IgG with increased immunoreactivity to beta2-glycoprotein I and its peptide clusters influence human coronary artery endothelial cells. *Lupus.* 2015 Apr;24(4-5):448-62.
49. Omersel J, Jurgec I, Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Sodin-Šemrl S, et al. Autoimmune and proinflammatory activity of oxidized immunoglobulins. *Autoimmun Rev.* 2008 Jul;7(7):523-9.
50. Irman S, Škarabot M, Muševič I, Rozman B, Božič B. The use of atomic force microscopy to study the pathologic effects of anti-annexin autoantibodies. *J Autoimmun.* 2011 Mar;36(2):98-105.
51. Frank M, Sodin-Šemrl S, Irman S, Božič B, Rozman B. Beta2-glycoprotein I and annexin A5 phospholipid interactions: artificial and cell membranes. *Autoimmun Rev.* 2009 Sep;9(1):5-10.
52. Juretič D, Bernik S, Čop L, Hadžija M, Petlevski R, Lukač-Bajalo J. Short-term effect of acarbose on specific intestinal disaccharidase activities and hyperglycaemia in CBA diabetic mice. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2003 Aug;87(7-8):263-8.
53. Šuligoj T, Ciclitira PJ, Božič B. Diagnostic and Research Aspects of Small Intestinal Disaccharidases in Coeliac Disease. *J Immunol Res.* 2017;2017:1042606.
54. De Laat B, Derksen RH, Reber G, Musial J, Swadzba J, Božič B, et al. An international multicentre-laboratory evaluation of a new assay to detect specifically lupus anticoagulants dependent on the presence of anti-beta2-glycoprotein autoantibodies. *J Thromb Haemost.* 2011 Jan;9(1):149-53.
55. Ambrožič A, Božič B, Čučnik S, Gašperšič N, Hočevar A, Huzjan B, et al., editors. *Revmatološki priručnik za družinskega zdravnika.* 5 ed: Revma.net; 2013.
56. Homšak E, Mičetič-Turk D, Božič B. Autoantibodies pANCA, GAB and PAB in inflammatory bowel disease: prevalence,

- characteristics and diagnostic value. *Wien Klin Wochenschr.* 2010 May;122 Suppl 2:19-25.
57. Žigon P, Perdan Pirkmajer K, Tomšič M, Kveder T, Božič B, Sodin Šemrl S, et al. Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies Are Associated with Adverse Pregnancy Outcomes. *J Immunol Res.* 2015;2015:975704.
58. Laptoš T, Omersel J. The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies. *Exp Ther Med.* 2018 Apr;15(4):3161-8.
59. Ogrič M, Tercej M, Praprotnik S, Tomšič M, Božič B, Sodin Šemrl S, et al. Detection of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with rheumatoid arthritis: a comprehensive overview of methodology pitfalls and benefits. *Immunol Res.* 2017 Feb;65(1):172-85.

