

126/00. 11. simpozij HDMB

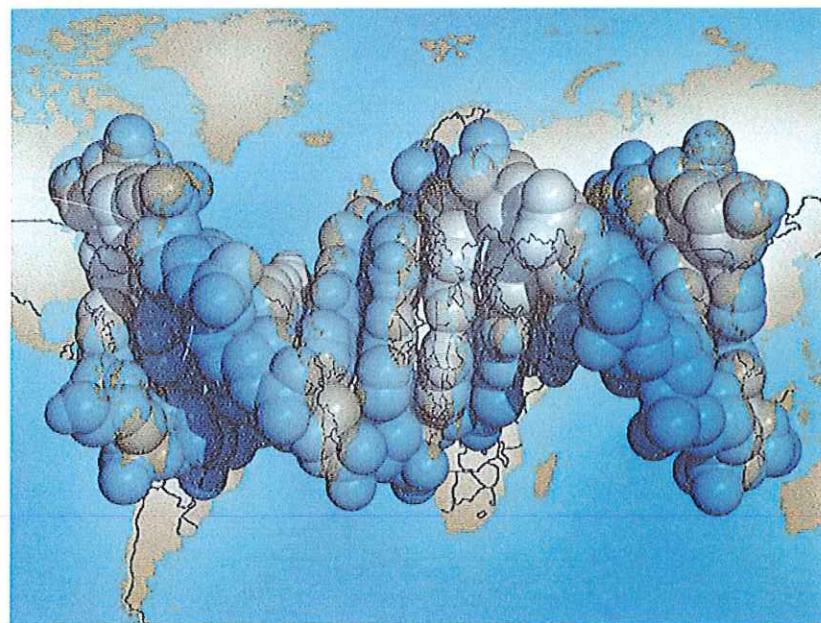
MEDICINA I TEHNIKA 2000

Međunarodni sajam medicinske opreme,
farmacije i laboratorijske opreme
24.-27. 5. 2000.



11. simpozij medicinskih biokemičara

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA



KNJIGA SAŽETAKA

Glavni sponzor:



Zagrebački Velesajam
Dvorana "Klub privrednika", Kineski paviljon
25. svibnja 2000.

...multifaktorne i poligenske bolesti

ATEROSKLOROZA: MULTIFAKTORNA I POLIGENSKA BOLEST

Ana Stavljenić-Rukavina

*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta
i Kliničkog bolničkog centra Zagreb*

PARAOKSONAZA ČIMBENIK RIZIKA U RAZVOJU ATEROSKLOROZE

Ana-Maria Ivanišević¹, Elizabeta Topić¹, Mario Štefanović¹, Vjeran Nikolić², Mirjana Čubrilo-Turek³, Dubravka Juretić⁴, Branka Rekić⁵

¹Klinički Zavod za kemiju, KB "Sestre milosrdnice", Zagreb; ²Klinika za kardiologiju, KB "Sestre milosrdnice", Zagreb; ³Interna klinika Opće bolnice Sveti Duh, Zagreb;

⁴Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb; ⁵Dom zdravlja INA, Zagreb

Ateroskleroza je kronična bolest krvnih žila, koja počinje trenutkom rođenja, a infarkt miokarda je njena najčešća klinička prezentacija. Jedan od genetskih kandidata čimbenika rizika razvoja ateroskleroze je i polimorfizam paraoksonaze (EC 3.1.8.1). Molekularna osnova tog polimorfizma proizlazi iz zamjene dvaju aminokiselina: glutamina (A alel) u arginin (B alel) na kodonu 192. U serumu se paraoksonaza nalazi vezana za HDL čestice, preko svoje hidrofobne N-terminalne domene, a pretpostavlja se da su oksidirani fosfolipidi njeni fiziološki supstrati. Brojni su autori u posljednje vrijeme proučavali ulogu paraoksonaze u razvoju ateroskleroze te povezanost polimorfizma paraoksonaze s razvojem rizika od bolesti krvnih žila. Iako je antiaterogeni učinak paraoksonaze neosporiv, objavljeni rezultati o povezanosti polimorfozma paraoksonaze s razvojem ateroskleroze su diskrepantni. Cilj ovog rada bio je utvrditi distribuciju frekvencija genotipova paraoksonaze za PON1 polimorfizam R192Q u zdravih ispitanika hrvatske populacije te u skupini bolesnika s preboljelim infarktom miokarda. U studiju je uključeno 200 bolesnika s preboljelim infarktom miokarda i 200 zdravih dobrovoljaca. Utvrđene frekvencije genotipova i alela statistički su obradene kako bi se utvrdila njihova eventualna povezanost s povećanim rizikom za razvoj bolesti krvnih žila. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika između frekvencije genotipova zdravih ispitanika i bolesnika s infarktom miokarda ($P=0.008$), pri čemu je BB genotip bio učestaliji u skupini bolesnika. Nije bilo razlike između frekvencije alela zdravih dobrovoljaca i bolesnika. Statistički značajna razlika pronađena je također i usporedbom vrijednosti enzimskih aktivnosti sa ($P=0.027$) i bez NaCl ($P=0.007$), te postotka aktivacije ($P=0.004$) zdravih dobrovoljaca i bolesnika. Enzimske aktivnosti razlikovale su se i između skupina s različitim genotipom, razlike su bile statistički značajne za sva tri genotipa ($P<0.001$). Naši rezultati govore u prilog navodima u literaturi o ulozi paraoksonaze u aterogenezi. Na temelju dobivenih rezultata zaključujemo da bi PON1 polimorfizam mogao predstavljati neovisni čimbenik rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze.

Literatura:

1. Hegele RA. Genetic prediction of coronary heart disease: lessons from Canada. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59 (Suppl 230):153-167
2. Russel R. Mechanisms of Disease: Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *NEJM* 1999;340(2):115-126
3. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(6):1067-1073
4. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999;5:381-386
5. Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 1999;31(3):217-224

CISTIČNA FIBROZA: MODEL SLOŽENIH KORELACIJA IZMEĐU GENOTIPA I FENOTIPA KOD MONOGENSKIH POREMEĆAJA

Jadranka Sertić

*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
i Kliničkog bolničkog centra Zagreb*

Cistična fibroza (CF) je autosomno recesivna egzokrinopatija, karakterizirana abnormalnim transportom iona kroz membrane epitelnih stanica. Klinički simptomi klasičnog oblika su progresivna obstruktivna bolest pluća, disfunkcija gušterića, povećana koncentracija klorida u znoju i neplodnost muških. Parcijalni oblik CF (CFTR-patiјe) kao što je CBAVD (razvojna anomalija reproduktivnog sustava), kronični pankreatitis i asma reflektiraju se varijabilnim heterozigotnim alelima CF lokusa. Mutacije gena za cistično fibroznim regulator provodljivosti (CFTR) dovode do blažih i težih kliničkih slika. CFTR gen je otkriven prije deset godina i do sada je otkriveno više od 800 mutacija i polimorfnih mesta. Molekularnom analitikom evaluiraju se pojedini aleli i tako doprinosi molekularnoj dijagnostici koja je prvi put u Hrvatskoj uvedena 1991 godine zahvaljujući prof. dr. Ani Stavljenić Rukavina. Danas se CFTR i poly T genotipizacija provodi elektroforetskim ili hibridizacijskim tehnikama. Rezultati naših istraživanja pridruženi Europskoj shemi otkrivaju pojavnost sljedećih CF mutacija u Hrvatskoj: DF508-64.49%; G542X-3.26%; N1303K- 2.89%; G551D – 1.09%; 3849+10kbC→T – 0.27%; 1717-1G→T – 0.36%, 621+1G→T – 0.36%; CFTRdel121kb – 0%.

Također je otkriveno, uz već postojeće, i povezanost CF fenotipa i genotipa DF508/DF508 & 9T/9T kao i pojavnost 5T alela kod CBAVD ispitanika (27.0%).

Analitičku i kliničku valjanost molekularnih pretraga potvrđuju rezultati ECCACF međunarodne kontrole kakvoće. Značajnu znanstvenu djelatnost prožimaju rezultati epidemioloških multicentričnih istraživanja, prepoznatljivi u svjetskoj bibliografiji.

Literatura:

1. Petreska L, Plašeska D, Kočeva S, Stavljenić A, Efremov GD. Two new mutations (1811+1G→A and Y569C) in the CFTR gene in patients of Macedonian and Croatian Origin. *Acta Med Croatia* 1996;18:39-41.
2. Dequer E and Cassiman JJ. Evaluation of CFTR gene mutation testing methods in 136 diagnostic laboratories: report of a large European external quality assessment. *Eur J Hum Genet* 1998;6:165-75.
3. Macek Jr M, Dörk T, Krebsova A, Maček M, Dequer E, Cassiman JJ. Distribution and ethnic/regional origin of 101 cystic fibrosis mutations in central and eastern European population. 1st Alpe Adria meeting on human genetics. Brijuni Islands, Croatia April 14-15, 2000.
4. Tsui LT. The impact of the human genome project and disease gene research. Human genomics, the basis of the medicine of tomorrow. 2nd conference Kyoto, April 16-19, 2000.
5. Sertić J, Saiki RK, Cvitković P, Stavljenić Rukavina A. Detection of cystic fibrosis mutations by Roche research prototype assays in congenital absence of vas deferens. Human Genomics, the basis of the medicine of tomorrow. 2nd conference Kyoto, April 16-19, 2000.
6. Dörk T, Macek Jr M, Sertić J, Richter D, Stavljenić Rukavina A, Tsui LC, Zielenski J. A Novel 21-kilobase deletion, CFTRdel2,3 (21kB), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet*; in press.
7. (CFGAC 1999; URL://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).

PROBIRANJE GENA ZA MIJELINSKI PROTEIN NULA (MPZ) U BOLESNIKA S NASLJEDNIM NEUROPATIJAMA I NEURODEGENERATIVnim OBOLJENJIMA POVEZANIM S NEUROPATIJOM

Gršković B¹, Mitrović Z.², Stavljenić Rukavina A.¹

¹*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb*

²*Centar za neuromuskularne bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb*

Mutacije koje zahvaćaju MPZ gen povezane su s teškim Charcot-Marie-Tooth 1 (CMT) fenotipom povezanim s jakim usporenjem brzina provodljivosti kroz periferne živce. Blagi ili asimptomatski CMT2 fenotip s graničnim brzinama provodljivosti također je opisan. Cilj rada bio je probiranje svih 6 eksona MPZ gena za supstitucije jedne baze metodom jednolančanog konformacijskog polimorfizma DNA (SSCP) u 108 bolesnika iz 54 obitelji s različitim neuromuskularnim i neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i 73 bolesnika iz 54 obitelji s CMT sindromom. Bolesnici su bili upućeni na rutinski neurološki i elektromioneurografski (EMNG) pregled. Promijenjena elektroforetska pokretljivost jednolančanih ulomaka u gelu poliakrilamida uočena je samo u eksonima 1 i 4 kod dva člana iz različitih obitelji: u eksonu 1 kod oca s blagim CMT2 fenotipom, te kćeri čiji je EMNG nalaz bio uredan. Majka s CMT1 sindromom i jako usporenim brzinama provodljivosti imala je normalnu pokretljivost ulomaka u gelu. SSCP analiza eksona 4 pokazala je promijenjenu pokretljivost kod oca i jednog sina od troje djece koja su bila slično zahvaćena s naslijednom spastičnom paraplegijom (HSP) s polineuropatijom. Otac nije imao simptome HSP niti CMT, međutim EMNG nalaz pokazao je granične brzine provodljivosti kao i amplitude osjetnih živčanih potencijala. Pretpostavljamo da rijetka zastupljenost promjena u sekvenci kodirajuće regije MPZ gena može biti povezana s blagim CMT2 fenotipom ili uopće ne mora pokazivati simptome karakteristične za CMT sindrom.

FARMAKOGENETIKA I ALKOHOLIZAM

Elizabeta Topić

Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Vezu između genetske predispozicije pojedinca i njegove sposobnosti da metabolizira neki lijek ili neki strani spoj proučava najnovija grana farmakoloških znanosti nazvana farmakogenetika. Razlike u sposobnosti metaboliziranja i bioaktivaciji lijeka mogu dovesti do teške toksičnosti ili neuspjeha terapije uslijed promjene odnosa između doze i koncentracije farmakološki aktivnog lijeka u krvi a rezultat su polimorfizma gena i/ili enzima uključenih u metabolizam lijeka.

Najvažniji oksidativni enzimski sustav uključen u metabolizam lijekova je enzimska superporodica citokroma P450 (CYP). Zastupljenost pojedinih izoenzima u humanoj jetri vrlo je različita, a najveći udio pripada skupini izoenzima porodice A, 2C i 2E. Izoenzim CYP2E1 predstavlja glavni alternativni sustav kojim se metabolizira alkohol, a odgovoran je i za metabolizam mnogih lijekova. CYP2E1 je kodiran jednim genom smještenim na 10. kromosomu, a do sada je poznato njegovih sedam različitih lokusa. Identificirana su dva alela ovog gena, C c2. Mutantni alel c2 kojem nedostaje restriktivno mjesto RsaI povezan je s većom translacijskom aktivnosti, razinom proteina i enzimskom aktivnosti te rezultira pojačanim metabolizmom supstrata CYP2E1. Pokazalo se da alkohol djeluje na CYP2E1 na tri načina: kao induktor, kao supstrat koji se oksidira i kao inhibitor oksidacije drugih supstrata – lijekova. Početno kronično uzimanje alkohola ubrzava metabolizam lijekova-supstrata CYP2E1, izaziva njegovu indukciju, te dovodi do relativne neosjetljivosti alkoholičara na većinu lijekova. Kronično uzimanje visokih koncentracija alkohola u daljnjoj fazi dovodi do pojačane oksidacije alkohola, dok se metaboliziranje lijekova gotovo u potpunosti prekida, faza neosjetljivosti na lijekove. Dugoročna intoksikacija visokim koncentracijama alkohola, inducira CYP2E1 do te mjere da pojačano metabolizira alkohol ali i lijekove, pa su u tih alkoholičara nerijetko potrebite mega doze određenog lijeka. Ako se određeni lijekovi i alkohol uzimaju istovremeno, kompetitivna enzimska inhibicija rezultira smanjenim klirensom i izrazito visokom razinom lijeka koja u nekim slučajevima može uzrokovati smrt. Iste posljedice mogu nastati uslijed genetskih mutacija enzima glavnog i/ili alternativnog metaboličkog puta alkohola.

Metode molekularne biokemije razvijene u kliničkim laboratorijima omogućuju otkrivanje alelskih mutacija te prepoznavanje homozigotnih ili heterozigotnih nositelja mutantnih gena. Prednost molekularne dijagnostike na području farmakogenetike je upravo činjenica da rezultati farmakogenetske analize osiguravaju podatak o genotipskim/fenotipskim osobinama ispitanika glede njegove sposobnosti metaboliziranja lijeka prije samog početka terapije. Poznavanjem polimorfizma enzima glavnog i alternativnog metaboličkog puta alkohola omogućuje da se načini odabir istovrsnog lijeka koji se metabolizira drugim enzimom te tako spriječe neželjene reakcije ili terapijske pogreške uslijed premale ili prevelike doze lijeka u alkoholičara.

Literatura:

1. Topić E. Pharmacogenetics and Clinical Laboratory. Biochimia Medica 2000;
2. 10: 5-19.
3. Ingelman-Sundberg M. i sur. Ethanol-inducible CYP450 2E1 genetic polymorphism, regulation and possible role in the ethiology of alcohol-induced liver disease. Alcohol 1993; 19:447-452.

GENOTIPIZACIJA CITOKROMA P-450 CYP2D6 U PSIHIJATRIJSKIH BOLESNIKA NA TERAPIJI PSIHOAKTIVNIM LIJEKOVIMA

Mario Štefanović¹, Elizabeta Topić¹, Ana Maria Ivanišević¹, Francisca Blazinić², Jadranka Čulav², Željko Skočilić²

1. *Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb*
2. *Psihijatrijska klinika Vrapče, Zagreb*

Polimorfna izoforma sustava Citokroma P450 – CYP2D6 ima važnu ulogu u oksidativnom metabolizmu dijela psihotaktivnih lijekova. CYP2D6 "null aleli" (CYP2D6*3, *4, *5, *6, *7, i *8) kodiraju neaktivno enzimske forme. Homozigoti za kombinacije ovih alela predstavljaju sporometabolizirajući fenotip – engl. Poor metabolizer phenotype – PM, dok se nosioci samo jednog oštećenog alela (dok drugi ostaje funkcionalan) smatraju srednjemetabolizirajući (eng. Intermediate metabolizer phenotype - IM). Važnost genotipizacije bolesnika s ovim inaktivnim genskim varijantama jest u mogućnostima unaprijeđenja liječenja. Cilj istraživanja bio je pomoću multipleks alel specifične reakcije polimeraze ispitati učestalosti inaktivnih alela u skupini psihijatrijskih bolesnika oboljelih od depresije (n=49) i shizofrenije (n=86) u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika (n=145). Jedini pronađeni aleli u svim skupinama bili su CYP2D6*3, *4 i *6. Za frekvencije alela, genotipa i predviđenog fenotipa, u skupini depresija nije pronađena razlika u odnosu prema zdravima ($p>0,05$). Međutim, skupina shizofrenija statistički se od zdravih značajno razlikuje u frekvencijama alela ($p=0,002$), genotipova ($p=0,016$) i fenotipova ($p=0,018$). Ustanovljeni relativni rizik od 2,542 za alel CYP2D6 *4 upućuje na značajnu povezanost ovog alela sa shizofrenijom, što pokazuje i relativni rizik za PM fenotip (homozigoti za *4/*4) a koji iznosi 5,020. Također smo istražili i vezu polimorfizma CYP2D6 sa nuspojavama izraženim u bolesnika na dugotrajnoj terapiji psihofarmacima. Značajna razlika ustanovljena je za frekvencije alela ($p=0,002$), genotipa ($p=0,029$) i fenotipa ($p=0,002$) između skupina bolesnika koji imaju, odnosno nemaju izražene nuspojave. Relativni rizik od 2,626 i 5,333 za alele 2D6*4 i 2D6*6, te 7,080 za PM fenotip ukazuju na značajnu povezanost polimorfizma CYP2D6 i stvarnog metaboličkog kapaciteta osobe (odnosno izraženih nuspojava). Time smo pokazali da genotipizacija i fenotipizacija CYP2D6 može biti od velike koristi u predviđanju djelovanja psihotaktivnih lijekova, iako stvarnu korist u predviđanju kliničkih efekata tek treba ustanoviti.

DETEKCIJA UDVOSTRUČENIH CYP2D6 GENA LONG-PCR METODOM

Nada Božina, Inja Tramišak , Paula Granić , Ana Stavljenić-Rukavina

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Postoje velike interindividualne i interetničke razlike u aktivnosti citokrom P450 (CYP) enzima, što utječe na bioraspoloživost lijekova koji su podvrgnuti oksidativnom metabolizmu. Polimorfni enzim CYP2D6 (debrisokin 4-hidroksilaza) metabolizira velik broj klinički važnih lijekova kao što su antidepresivi, neuroleptici, β -blokatori, antiaritmici, opijati i drugi. Uz divlji tip gena (CYP2D6*1) poznato je još više od 15 različitih alela udruženih sa nedostatnom, reduciranoj, normalnoj ili povećanom enzimskom aktivnosti. 5-10% bijelaca ima nedostatnu CYP2D6 enzimsku aktivnost zbog naslijeda dva mutantna CYP2D6 nul-alela i pripada slabometabolizirajućem fenotipu (Poor metabolizer-PM). Na drugoj strani raspona metaboličkog kapaciteta je ultrabrz metabolism (Ultrarapid Metabolizer-UM) kao rezultat vrlo jake enzimske aktivnosti, a zbog naslijeda alela sa udvostručenim ili u nekim slučajevima višestruko umnoženim funkcionalnim CYP2D6 genima. Ako se osobama sa UM pripisuju standardne doze lijekova-CYP2D6 supstrata, uočava se terapijski neuspjeh zbog vrlo brze metaboličke konverzije lijeka. U našem radu željeli smo ustanoviti zastupljenost UM genotipa u Hrvatskoj. Primijenili smo Long-PCR metodu za detekciju alela s umnoženim CYP2D6 genom. Pronašli smo učestalost od 4% UM.

... maligne hematološke bolesti

MODERNA MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA MALIGNIH HEMATOLOŠKIH BOLESTI

Renata Zadro

*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i
KBC Zagreb*

Razvoj tehnologije u području molekularne biologije doveo je do radikalnog poboljšanja u evaluaciji hematoloških poremećaja posebno u prepoznavanju pojedinih kliničkopatoloških entiteta koji su definirani kombinacijom morfoloških, imunofenotipskih i kromosomskih karakteristika što je osnova nove podjele zločudnih tumora krvotvornog sustava Svjetske zdravstvene organizacije (WHO 1997). Tako multiparametrijski pristup u evaluaciji malignih hematoloških bolesti uključuje morfološku analizu sa imunocitokemijom, imunofenotipizacijom, citogenetikom i molekularnom analizom. Danas se taj pristup upotpunjuje uporabom protutijela prema fuzijskim proteinima poput PML u akutnoj promijelocitnoj leukemiji (M3) ili ALK u anaplastičnom limfomu s t(2;5).

Tehnike molekularne biologije (PCR, fluorescentna *in situ* hibridizacija i njihove varijante) omogućavaju u modernoj dijagnostici otkrivanje molekularnih promjena poput translokacija t(9;22), t(4;11), klonalnih preuredbi gena za teški lanac imunoglobulina i receptore na T limfocitima, a posebnu važnost imaju u otkrivanju "prognostički dobrih" poremećaja: t(8;21), t(15;17) i inv(16).

Budući je kronična mijeloična leukemija (KML) bila prvi neoplastični proces povezan sa stečenom genetskom abnormalnošću (Philadelphia kromosom), to je dosad najbolje proučavan model leukemije. U većini bolesnika s KML, t(9;22)(q34;q11) uključuje lom u području 5.8 kb BCR gena. Najčešće rabljeni testovi uključuju klasičnu citogenetsku analizu, fluorescentnu *in situ* hibridizaciju sa probama za BCR i ABL, Southern analizu i RT-PCR. Uporaba RT-PCR-a je u otkrivanju citogenetski sakrivenih Ph' kromosoma, praćenju odgovora na terapiju i uporabi kvantitativnog RT-PCR-a za praćenje bolesnika koji su podvrgnuti transplantaciji koštane srži: deseterostruko povećanje ekspresije mRNA smatra se "molekularnim relapsom".

Poznavanje molekularne osnove ove bolesti otvara mogućnost novih terapijskih postupaka (inhibitori tirozin kinaze) koji zahtijevaju razvoj istančane laboratorijske dijagnostike.

MOLEKULARNI POKAZATELJI EKSPRESIJE KINAZE ANAPLASTIČNOG LIMFOMA (ALK)

**Sanja Kozic, Blaženka Grahovac, Slobodanka Ostojić, Rajko Kušec,
Mara Dominis, Branimir Jakšić**

*Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu i Hematološki odjel Kliničke
bolnice "Merkur" Zagreb*

Receptori tirozin kinaza (RTK) imaju važnu funkciju u kontroli proliferacije, diferencijacije i maligne transformacije. Specifične kromosomske aberacije (translokacije, inverzije, delecije) dovode do disregulacije aktivnosti tirozin kinaza, mijenjajući stanične signale i izazivajući stanične transformacije i neoplazije. U gotovo trećine bolesnika s anaplastičnim limfomom velikih stanica (ALCL) pronađen je kromosomalni poremećaj nastao recipročnom translokacijom (2;5)(p23;q35), tvoreći NPM-ALK kimerični gen, odgovoran za ekspresiju kinaze anaplastičnog limfoma (ALK) čija je disregulacija vjerojatno uključena u malignu promjenu stanice.

Učestalost NPM-ALK kimeričnog gena ispitivali smo u zamrznutom arhivskom materijalu limfnih čvorova bolesnika s ALCL (26) i Hodgkinovom bolešću(40). Tijekom ispitivanja specifičnosti i osjetljivosti metode, ispitali smo da li u drugim tkivima hematoloških bolesnika, kao što su koštana srž, tonzile, periferna krv i koža možemo naći NPM-ALK transkript. Također su sva navedena tkiva ispitana na prisutnost ekspresije ALK gena, umnožavanjem komplementarne DNA sekvene ALK gena. Rezultati su pokazali nekoliko vrlo važnih podataka.

Brojni radovi dokazali su ekspresiju ALK proteina u ALCL-u i nekim drugim non-Hodgkin limfomima (NHL), dok je u zdravom tkivu samo nervno tkivo pokazivalo ALK ekspresiju. Podaci o ekspresiji ALK gena u tkivima ne postoje ili su kontradiktorni. Mi smo uspjeli dokazati pomoću RT-PCR metode prisutnost ALK transkripta u svim ispitivanim tkivima, što ukazuje na nužnu nisku razinu ALK ekspresije u održanju stanične ravnoteže.

NPM-ALK transkript dokazali smo u 3 limfna čvora (3/26) bolesnika iz grupe NHL i 2 limfna čvora (2/40) bolesnika iz grupe HD. Samo je u nekoliko radova opisan nalaz NPM-ALK transkripta kod HD bolesnika, dok drugi autori nisu uspjeli dobiti slične rezultate. Moguće objašnjenje ovakvog nalaza je u visokoj osjetljivosti primijenjene metode koja je u mogućnosti prepoznati manji dio stanične populacije sa značajkama ALCL-a, ili u netipičnoj, HD-sličnoj morfološkoj slici NHL-a.

Nalaz NPM-ALK transkripta u 4 tonzile od ukupno 15 ispitivanih, koje su ekstrahirane djeci s recidivirajućim tonsilitisom, bio je neočekivan. Pozitivne tonzile su ispitane na prisustvo ALK proteina imunohistokemijski i Western blotom pomoću ALK-1 protutijela i dobiveni su negativni rezultati. Naše objašnjenje ovog nalaza ukazuje na genomsku nestabilnost reaktivnog limfatičnog tkiva koje generira (2;5) translokaciju, ali bez ALK ekspresije i bez utjecaja disregulacije tirozin kinaze na zbivanja u stanici. Očigledno su dodatni mehanizmi potrebni da promjena u genomu dovede do malignog preuređenja stanice. Naš nalaz ide u prilog radovima objavljenim zadnjih godina, koji su izvještavali o nalazima kromosomalnih translokacija tipičnih za maligno tkivo, a koji se mogu pojaviti s niskom učestalošću u tkivu zdravih osoba: t(14;18; t(9;22) , t(2;5).

EKSPRESIJA MOLEKULE INHIBITORNOG RECEPTORA CD85 NA T- LIMFOCITIMA U B-KRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI (B-CLL)

Zoran Šiftar

Zavod za kliničku kemiju KB "Merkur", Zagreb

Unatrag nekoliko godina na stanicama imunog sustava sisavaca su otkriveni receptori koji prepoznaju molekule MHC klase I na virusima zaraženim i/ili tumorskim stanicama i prenose inhibitorni signal u stanici dovodeći do supresije staničnog i humorarnog odgovora na prisustvo virusima zaražene ili tumorske stanice.

Do sada je otkriveno preko desetak takvih receptora svrstanih u nekoliko bliskih obitelji čija sinteza je upravljana genima s kromosoma 19 (q13.4).

Jedan od njih i molekula CD85 za koju je nedavno dokazano da odgovara ILT2 inhibitornom receptoru, pripadniku Immunoglobulin like transcript (ILT) porodice, koji se normalno nalazi na B limfocitima, monocitima/makrofazima, dendritičnim stanicama, većini NK stanicama i dijelu T limfocita. ILT2, odnosno CD85 molekula, reagira s velikim brojem pripadnika MHC klase I kompleksa, s neklasičnim pripadnikom MHC klase Ib HLA-G1, i proteinskim produktom humanog citomegalovirusa, UL18. Nakon vezivanja s tim molekulama, CD85 inhibira NK i T stanicama posredovanu citotoksičnost i produkciju limfokina, dok u B limfocita, monocita/makrofaga i dendritičnih stanicu inhibira mobilizaciju Ca^{2+} iona.

Dok se u B limfocita javlja tijekom maturacije kao konstitutivni element, u T limfocita i NK stanica se pojavljuje tijekom aktivacije nakon virusne infekcije ili prezentacije tumorskih stanic.

U ovoj studiji, poslužili smo se modelom B-kronične limfocitne leukemije (B-CLL), u kojoj u cirkulaciji dominiraju maligne B stanice, s namjerom da utvrđimo ekspresiju CD85 molekule na T limfocitima, odnosno na subpopulacijama; pomočničkim, CD4+, i supresorsko-citotoksičnim, CD8+ T limfocitima. Mjerenja ekspresije CD85 su rađena metodom protočne citometrije i to u zdravih osoba koje su poslužile kao kontrolna skupina i u B-CLL pacijenata u različitim stadijima bolesti.

Ekperimentalni podaci su pokazali da je ekspresija CD85 na T limfocitima značajno viša u pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,001$), ali razlike unutar pacijenata podijeljenih prema stadijima bolesti (RAI 0/1; 2 i 3/4) nema.

Ipak, povećanje ekspresije CD85 na T limfocitima u B-CLL pacijenata je povezano s povećanjem CD8+CD85+ subpopulacije T limfocita ($0,01 < p < 0,05$), osim u grupi pacijenata sa stabilnom bolesti (RAI 0/1).

Također je istražen i učinak mono ili polikemoterapije na ekspresiju CD85 na T limfocitima u pacijenata u stadiju RAI 2 i 3/4, ali nismo pronašli značajnu razliku u ekspresiji prije i poslije primanja terapije.

Na osnovu dobivenih rezultata nije sasvim jasno da li prisutnost i brojnost molekule CD85 na T limfocitima u promatranoj bolesti ima značenja u kliničkim i biološkim značajkama bolesti. Moguće je da njezino prisustvo podiže prag reaktivnosti T limfocita protiv tumora sprečavajući ih da reagiraju u reakcijama niskog aviditeta na tumorske antigene koji su očito u B-CLL-u dosta nespecifični ili vrlo niskog intenziteta. Posljedica takovih događanja je na koncu gubljenje nadzora nad tumorom, odnosno njegova ekspanzija.

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA VIRUSA HEPATITISA C

Blaženka Grahovac

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu Zagreb

Hepatitis C virus (HCV), etiološki čimbenik 90-95 % posttransfuzijskog non-A, non-B hepatitisa otkriven je 1989 (Choo i sur.). Više od 50% HCV inficiranih osoba razvije kronični hepatitis koji u određenom broju slučajeva završava hepatocelularnim karcinomom. Iako je glavni put HCV infekcije parenteralni prijenos (transfuzija krvi i krvnih pripravaka, intravenozno uživanje droga), sporadično su zabilježeni prijenosi seksualnim kontaktom, vertikalno s majke na dijete, obiteljskim kontaktom, dok je značajan broj slučajeva akutnog hepatitisa C nemoguće povezati s bilo kojim od navedenih putova i zapravo predstavljaju epidemiološku nepoznanicu.

HCV genom je pozitivna jednolančana RNA molekula koja se sastoji od 9400 nukleotidnih jedinica koje kodiraju okvir za čitanje poliproteina od oko 3000 aminokiselina. Pomoću virusnih proteaza ili proteaza domaćina cijepa se u tri struktura (proteine nukleokapside i dva glikoproteina ovojnica) i 6 nestrukturnih proteina (dvije virusne proteinaze, jedna helikaza, RNA ovisna RNA polimeraza, dok funkcija preostalih proteinskih produkata još nije definirana). Prema organizaciji genoma, i funkciji poznatih proteina, HCV se ubraja u skupinu flavivirusa.

Bitnih značajaka genoma HCV je visoki stupanj nukleotidne varijabilnosti, prosječno u cijelom genomu od $0,9\text{--}5,2 \times 10^{-3}$ godišnje. Veliki stupanj varijabilnosti tumači se jednim od mehanizama bijega virusa od imunog odgovora domaćina i razvoja trajne infekcije. Genetska varijabilnost nije ujednačena u cijelom virusnom genomu. Npr. 5'nekodirajuća regija je najviše konzervirana dok regije koje kodiraju ovojnice virusa (E1 i E2/NS1) sadrže hipervarijabilne regije koje pokazuju varijabilnost od $1,5 \times 10^{-2}$ po genomu, godišnje.

Od otkrića HCV virusa pa do danas, utvrđeno je šest glavnih HCV genotipova koji se međusobno razlikuju za više od 20% u nukleotidnim sekvencama i oko 30 subtipova koji se unutar glavnih genotipova razlikuju do 10 %. Ova različitost se odražava razlikama u virusnoj replikaciji, intenzitetu bolesti, odgovoru na interferonsku terapiju. Stupanj nukleotidne varijabilnosti dovoljan je da značajno promijeni antigenska i biološka svojstva članova ove virusne grupe i reducira efikasnost testova na antitijela na ove proteine u serološkoj dijagnostici infekcije sa različitim HCV tipovima. Varijabilnost u regiji ovojnice je oko 50 % tako da neutralizirajuća antitijela mogu biti tip specifična i dozvoljavaju multiple infekcije sa različitim HCV varijantama u ponovo izloženih osoba. Pri tomu je značajno da razdioba genotipova pokazuje i različitost u rasprostranjenosti u svijetu. Tipovi 1, 2 i 3 najzastupljeniji su u Zapadnoj Europi, Sjevernoj Americi i Japanu, tip 4 u Africi, tip 5 i 6 u Jugoistočnoj Aziji.

Od 1996. godine u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu djeluje Laboratorij za molekularnu dijagnostiku virusa, čija je zadaća dokazati u krvi serološki reaktivnih dobrovoljnih davatelja krvi, bolesnika i drugih ispitanika, moguće postojanje genoma virusa hepatitis C i B, te HIV-a. Metode koje se redovno primjenjuju su: izolacija RNA ili DNA iz seruma ili plazme, reverzna transkripcija RNA u komplementarnu DNA, umnožavanje ciljne regije virusnog genoma, potvrđne analize hibridizacijom specifičnim oligonukleotidnim probama, genotipizacija virusa pomoću hibridizacije, RFLP analize, ili sekvenciranjem, te određivanje broja virusnih kopija u jedinici plazme, pomoću kompetitivnog PCR-a.

UČESTALOST VIRUSA HEPATITISA G U HRVATSKOJ POPULACIJI

Vesna Dražić, Jasna Bingulac-Popović, Blaženka Grahovac

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu Zagreb

Unatoč otkriću niza hepatotropnih virusa (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV) mnoge kliničke studije ukazivale su na postojanje novog virusnog agensa; 10-20 % hepatitis nepoznate etiologije, svrstano je u skupinu tzv. Non A - non E hepatitis.

1995. godine Simons i sur. su izolirali dva virusa iz krvi tamarina nakon što su im ubrizgali serum 34-godišnjeg kirurga s inicijalima GB oboljelog od akutnog hepatisa. Po njemu su ta dva virusa nazvana GBV-A i GBV-B. Za razliku od ova dva genoma koja do sada nisu izolirana kod ljudi, iz seruma nekoliko bolesnika s hepatitisom, koji su sadržavali antitijela protiv rekombinantnih GBV-A i GBV-B proteina, izoliran je treći virusni genom GBV-C.

Gotovo istovremeno, Linnen i sur. su iz plazme dva bolesnika s post-transfuzijskim non A- non E hepatitisom izolirali virus kojeg su nazvali HGV. Uspoređujući genome GBV-C i HGV, utvrđeno je 85-95 % nukleotidne homolognosti, te gotovo 100 % identičnog aminokiselinskog slijeda, te je zaključeno da se radi o dvije neovisne izolacije istog virusa.

Filogenetskom analizom ustanovljeno je da sva tri GB virusa, odnosno HGV, pripadaju porodici Flavivirida, te sadrže positivno orijentiran jednolančani RNA genom, veličine oko 9 400 nukleotida. Uspoređujući genom GBV-C s drugim Flaviviridama, uočilo se da je najveća sličnost (oko 48%) s genomom GBV-A, a oko 30% sličnosti je s GBV-B i HCV-1. Građa genoma HGV i HCV-1 je najsličnija u NS 3 i NS 5B regijama, a najveća razlika je u E2 i NS 4 regijama.

Izvješća o učestalosti pozitivnog nalaza GBV-C / HGV RNA u dobrovoljnih davatelja pokazuju razlike od 0,6% u Italiji do 1,3 - 1,7% u SAD. Virus hepatitis G je izoliran u 36% bolesnika s non-A-E hepatitisom, u 42% anti-HIV pozitivnih osoba, te u 41% bolesnika s hepatitisom C (Fiordalisi i sur.). Linnen i sur. su pronašli znatno nižu učestalost HGV pozitivnih bolesnika s non-A-E hepatitisom (8,2%). Jarvis i suradnici (1996.) našli su čak 3,2% HGV pozitivnih u ukupnoj populaciji u Edinburgu. Navedeni podaci ukazuju da se učestalost virusa znatno mijenja u različitim zemljopisnim područjima.

Putevi prijenosa virusa hepatitis G vrlo su slični prijenosu HCV infekcije. Najznačajniji je parenteralni put kontaminiranom krvlju i krvnim pripravcima, intravensko uzimanje droge, kontaktom u zajednici i seksualnim kontaktom.

Hepatitis G virus u većini slučajeva ne izaziva klinički evidentni hepatitis, ili je hepatitis blage prirode. Razina serumske ALT je obično u granicama normale odnosno porast je umjeren i ne traje duže od oko dvije godine. Međutim u malom broju inficiranih osoba HGV može izazvati tešku sliku hepatitis, te je izoliran iz seruma nekoliko bolesnika s fulminantnim hepatitisom.

Za dijagnostiku virusnog genoma koristi se RT-PCR u kojemu virusnu RNA, uz pomoć RT-transkriptaze i random heksamera, prevodimo u komplementarnu DNA. Za umnožavanje cDNA koriste se oligonukleotidni začetnici smješteni u konzerviranim dijelovima virusnog genoma (najčešće u 5'UT i NS3 regiji).

U studiji koja je provedena u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu 1997 i 1998. god. utvrđeno je da je učestalost HGV - RNA pozitivnog nalaza u skupini DDK, koji su bili HBsAg negativni i anti-HCV negativni, 2,08% (2/98). U skupini DDK koji su anti-HCV pozitivni, zbog čega su isključeni iz daljnog programa darivanja krvi, njih 11,8% (6/51) su imali pozitivan nalaz HGV-RNA. U skupini bolesnika na hemodializi, utvrdili smo da 14,74% (28/190) bolesnika ima HGV-RNA pozitivan nalaz. U skupini bolesnika koji boluju od hemofilije A,B i von Willebrandove bolesti, 15,38% (8/52) imalo je HGV viremiju. Pretraživanje smo proveli i u skupini od 48 HBV-DNA pozitivnih osoba. U ovoj skupini je 8 (16,66%) ispitanika bilo pozitivno na HGV-RNA. U skupini bolesnika s non A-E hepatitisom 6,89% (2/29) je bilo HGV-RNA pozitivno.

IDENTIFIKACIJA VIRUSA MUMPSA IZOLIRANOG IZ CEREBROSPINALNE TEKUĆINE DJECE S POSTVAKCINALNIM ASEPTIČNIM MENINGITISOM

Maja Šantak, Tanja Košutić-Gulija, Dubravko Forčić,¹ Vladimira Kružić,² Goran Tešović,
Renata Zgorelec, Renata Mažuran

*Imunološki zavod Zagreb, ¹Hrvatski zavod za javno zdravstvo Zagreb,
²Klinika za infektivne bolesti «Dr. Fran Mihaljević», Zagreb*

Uporabom cjepiva koje sadrži živi atenuirani virus mumpsa, broj oboljelih od mumpsa je smanjen . Cjepivo nije u potpunosti neškodljivo: za neke od cjepnih sojeva utvrđeno je da su uzrokom posvakcinalnog parotitisa i/ili aseptičnog meningitisa u malom broju slučajeva.

Cilj ove studije bio je utvrditi pojavnost slučajeva posvakcinalnog aseptičnog meningitisa među djecom koja su imunizirana cjepnim sojem mumpsa L-Zagreb koji je sastavni dio trovalentnog cjepiva protiv morbila, mumpsa i rubele (MMR, Imunološki zavod ,Zagreb). Virus mumpsa je izoliran iz cerebrospinalnog likvora djece koja su tijekom 30 dana nakon imunizacije MMR cjepivom razvila aseptični memingitis.

U petogodišnjem razdoblju (1995-1999) sakupljeno je 95 uzoraka likvora djece za koje je postojala sumnja da se radi o postvakcinalnom aseptičnom meningitisu. U 33 uzorka (34%) postojanje virusa mumpsa je potvrđeno virusološkim metodama (CPE, neutralizacija specifičnim antiserumom). Nazočnost virusa mumpsa testirana je tehnikom RT-PCR u namjeri da se odredi soj virusa. U tu je svrhu određen dio nukleotidnog slijeda cijepnog soja virusa mumpsa L-Zagreb. Radi se o SH genu za koji je utvrđena visoka varijabilnost među sojevima zbog čega je taj dio genoma poslužio za razlikovanje cijepnog i divljeg soja virusa, te za uspostavljanje filogenetskog odnosa među izolatima virusa mumpsa.

RT-PCR analiza je dokazala prisutnost cijepnog soja L-Zagreb u 30 od 33 ispitana uzorka (91%). Unatoč pozitivnim rezultatima virološke dijagnostike, u tri uzorka nije utvrđena prisutnost virusne RNA.

B I L J E Š K E