Molekularna dijagnostika Huntingtonove bolesti

Alić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:632096

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marina Alić

Molekularna dijagnostika Huntingtonove bolesti

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Jadranke Sertić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014/2015.

POPIS KRATICA

ACh	acetilkolin
CAG	citozin-adenin-gvanin
CT	kompjuterizirana tomografija
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
GABA	gama aminomaslačna kiselina
GAD	glutaminska acidna dekarboksilaza
HB	Huntingtonova bolest
HTT	huntingtin
KBC	Klinički bolnički centar
KLZD	Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
NMR	nuklearna magnetska rezonanca
PB	Parkinsonova bolest
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)
PHD	patohistološka dijagnoza

SADRŽAJ

1. Sadržaj
2. Summary
3. Uvod.....1
    3.1. Definicija.....1
    3.2. Epidemiologija.....2
    3.3. Genetička osnova.....3
    3.4. Patogeneza.....4
    3.5. Patologija.....5
    3.6. Klinička slika.....6
        3.6.1. Adultni oblik Huntingtonove bolesti.....6
            3.6.1.1. Neurološki simptomi.....6
            3.6.1.2. Psihijatrijski simptomi.....8
            3.6.1.3. Kognitivni simptomi.....8
        3.6.2. Juvenilni oblik Huntingtonove bolesti.....9
            3.6.2.1. Neurološki simptomi.....9
            3.6.2.2. Psihijatrijski simptomi.....9
            3.6.2.3. Kognitivni simptomi.....9
    3.7. Dijagnoza.....10
    3.8. Liječenje.....11
    3.9. Prognoza bolesti.....12
4. Cilj rada.....13
5. Ispitanici.....14
    5.1. Načelo postupka.....15
    5.2. Primarni uzorak.....15
    5.3. Potrebna oprema i reagensi.....15
    5.4. Postupak umjeravanja.....16
    5.5. Faze postupka.....16
6. Rezultati.....19
7. Rasprava.....21
8. Zaključak.....22
9. Zahvale.....23
10. Popis literature.....24

11. Životopis.....26

1. SAŽETAK

Molekularna dijagnostika Huntingtonove bolesti

Marina Alić

Huntingtonova bolest (HB) je autosomno dominantna neurodegenerativna bolest koja dovodi do karakterističnih kliničkih simptoma obilježenih korejom, psihičkim poremećajima, kognitivnim propadanjem i demencijom. Uzrok bolesti je povećan broj trinuklotidnih CAG ponavljanja na kromosomu 4 (4p16.3) koji kodira protein huntingtin (HTT). Specifičnog liječenja za bolest još uvijek nema te se terapija zasniva na ublažavanju simptoma u čemu glavnu ulogu imaju blokatori dopamina.

Cilj rada bio u utvrditi učestalost i dužinu ponavljanja CAG tripleta kod pojedinaca sa sumnjom na Huntingtonovu bolest čiji su uzorci krvi testirani u KBC-u Zagreb u vremenskom periodu od siječnja 2003. do srpnja 2012. godine.

Podaci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije i obrađeni deskriptivnom statistikom.

Analizom 486 uzoraka elekrtoforezom na gelu utvrđen je normalni broj ponavljanja tripleta CAG (do 26) u 303 uzorka (62%), intermedijarni broj ponavljanja tripleta CAG (27-35) utvrđen je kod 24 (5%) uzoraka, a ekspandirani aleli (više od 36 CAG tripleta) bili su prisutni u 159 (33%) uzoraka.

Ključne riječi: Huntingtonova bolest, huntingtin, trinukleotidna ponavljanja-genetika, CAG, elektroforeza na gelu.

2. SUMMARY

Molecular diagnostics of Huntington's disease

Marina Alić

Huntington's disease is an autosomal dominant neurodegenerative disease that leads to characteristic clinical symptoms that manifest as chorea, psychiatric impairment, cognitive decline and dementia. The disease is caused by an increased number of CAG trinucleotide repeats on chromosome 4 (4p16.3) that encodes protein huntingtin (HTT). The selective therapy for Huntington's disease is still non-existent. Current therapy is symptomatic treatment where the dopamine blockers have turned out to be the most useful.

The aim of the study has been to determine the frequency and the extension of CAG trinucleotide repeats in individuals suspected of having Huntington's disease (HD) whose blood samples were tested in UHC Zagreb in time period from January 2003 to July 2012.

The data for this study has been gathered from medical documentation and analysed by descriptive statistics.

Through the analysis of 486 blood samples by gel electrophoresis, the normal amount of CAG trinucleotide repeats (≤ 26) was found in 303 samples (62%), the intermediate number of CAG trinucleotide repeats (27-35) was found in 24 samples (5%), and the increased number CAG trinucleotide repeats was found to be present in 159 samples (33%).

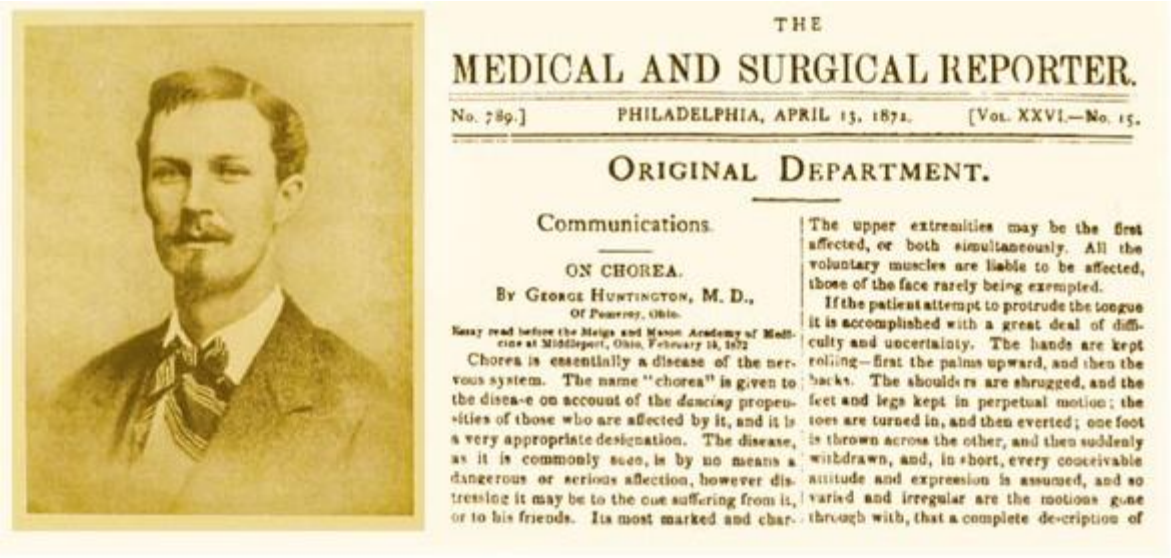
Key words: Huntington's disease, huntingtin, trinucleotide repeats- genetics, CAG, gel electrophoresis.

.

3. UVOD

3.1. DEFINICIJA

Huntingtonova bolest (HB) je autosomno dominantna neurodegenerativna bolest koju je prvi put opisao američki liječnik George Huntington 1872. godine. Uzrok bolesti su abnormalna ponavljanja tripleta CAG (citozin-adenin-gvanin) na genu za protein huntingtin (HTT) na kratkom kraku kromosoma 4p16.3. Normalna ponavljanja CAG tripleta su do 26, 40 i više će dovesti do razvoja bolesti dok je ponavljanje tripleta 26-40 puta nosi veći rizik razvoja bolesti u potomstvu nositelja. Bolest se manifestira neurološkim, psihijatrijskim i kognitivnim poremećajima i neminovno u roku 5-20 godina rezultira smrću (Sertić et al. 2015).



THE

MEDICAL AND SURGICAL REPORTER.

No. 789.] PHILADELPHIA, APRIL 13, 1872. [Vol. XXVI.—No. 15.

ORIGINAL DEPARTMENT.

Communications.

ON CHOREA.

By George Huntington, M. D.,

Of Pomeroy, Ohio.

Read before the Meigs and Mason Academy of Medicine at Middleport, Ohio, February 18, 1872

Chorea is essentially a disease of the nervous system. The name "chorea" is given to the disease on account of the *dancing* propensities of those who are affected by it, and it is a very appropriate designation. The disease, as it is commonly seen, is by no means a dangerous or serious affection, however distressing it may be to the one suffering from it, or to his friends. Its most marked and characteristic manifestations are limited to the muscles of voluntary motion, and consist of a series of involuntary movements, more or less violent, which the patient cannot entirely control. The upper extremities may be the first affected, or both simultaneously. All the voluntary muscles are liable to be affected, those of the face rarely being exempted.

If the patient attempt to protrude the tongue it is accomplished with a great deal of difficulty and uncertainty. The hands are kept rolling—first the palms upward, and then the backs. The shoulders are shrugged, and the feet and legs kept in perpetual motion; the toes are turned in, and then everted; one foot is thrown across the other, and then suddenly withdrawn, and, in short, every conceivable attitude and expression is assumed, and so varied and irregular are the motions gone through with, that a complete description of

Slika 1. George Huntington i naslov rada „On chorea“ objavljenog 1872. godine u časopisu *Medical and Surgical Reporter*

(izvor:http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n10/fig_tab/nrg1686_F1.html)

3.2. EPIDEMIOLOGIJA

Epidemiološki podaci o prevalenciji Huntingonove bolesti variraju, tako je u općoj svjetskoj populaciji 4-5/1000 000 (Pogledić i Relja 2012), u populaciji zapadnoeuropskog prodrijetla 5-10/100 000 (Hećimović et al. 2002), a prevalencija HB na području bivše Jugoslavije pa tako i Hrvatske prema podacima iz 1989. godine bila je 4.46/100 000 (Sepičić et al. 1989). Bolest pokazuje jednoliku spolnu distribuciju s težom kliničkom slikom ako je defektni gen naslijeđen od oca. Simptomi bolesti se najčešće ne manifestiraju do odrasle dobi (30 do 50 godina) iako je moguće ranija pojava bolesti i simptoma u pojedinaca koji imaju više od 60 ponavljanja CAG tripleta (Brandt et al. 1996) što je karakteristično za juvenilini tip (Westphalov oblik) kada se kliničke manifestacije viđaju prije 20. godine, ponekad i u djetinjstvu, a bolest završava smrtnim ishodom već u roku 5-10 godina.

Tablica 1. Prevalencija HB u svijetu

(izvor: http://web.stanford.edu/group/hopes/cgi-bin/hopes_test/hopes-news-episode-1/)

Populacija	Prevalencija HB / 100 000 stanovnika
Južnoafrička Republika (crnci)	0.06
Japan	0.1-0.4
Hong Kong	0.37
Finska	0.6
Europa i zemlje s izvorno europskim stanovništvom	4-10
Sjeverna Irska	6.4
Južni Wales	7.61
Škotska (Regija Grampian)	9.94
SAD	10

3.3. GENETIČKA OSNOVA

Huntingtonova bolest je posljedica ponavljanja tripleta CAG (citozin-adenin-gvanin) , a karakterizira ju ekspanzija CAG-poliglutaminskog slijeda (poliQ) huntingtinskog (HTT) proteina, što rezultira toksičnom funkcijom (Pogledić i Relja 2011). Gen HTT otkriven je 1993. na kratkom kraku kromosoma 4, a njegov proizvod je protein težine 340 kDa. Uloga proteina huntingtina koji je ubikvitaran nije sa sigurnošću potvrđena, ali postoje indicije koje ukazuju na njegovu bitnu ulogu u unutarstaničnom transportu, regulaciji transkripcije, inhibiciji apoptoze i embrionalnom razvoju. U zdravih osoba broj ponavljanja tripleta CAG kreće se od 9 do 26, a broj ponavljanja od 27 do 35 čini intermedijarne alele, tj. osobe koje ih nose su zdrave, ali postoji rizik razvoja bolesti u potomaka kod kojih može doći do povećanja broja ponavljanja. Zastupljenost intermedijarnih alela u općoj populaciji je 1-7%. Ponavljanje 36 ili više tripleta CAG po penetrantnosti se dijeli na dvije skupine. Kada su ponavljanja u rasponu od 36 do 39 CAG tripleta bolest se može pojaviti u kasnijoj dobi ili se uopće ne pojaviti međutim, rizik pojave bolesti u potomaka je uvelike povećan. U pojedinaca s 40 i više ponavljanja tripleta CAG penetrantnost je 99 % (Sertić et al. 2015). Bolest nastupa ekspanzijom od 36 pa ponekad čak i do 120 ponavljanja. Broj ponavljanja tripleta obrnuto je proporcionalan dobi javljanja prvih simptoma pa se kod ponavljanja više od 60 tripleta karakterističnih za juvenilni oblik HB bolest manifestira već prije 20. godine, a kod oblika s više od 80 ponavljanja bolest nastupa već u doba djetinjstva (Brikman et al. 1997). Kako je riječ o genu na autosomnom kromosomu rizik oboljenja za svako dijete oboljelog roditelja je 50% . Međutim, anticipacija- povećanje ponavljanja tripeta CAG u svakoj sukcesivnoj generaciji izraženije je ako je gen dobiven od oca te se u tih pojedinaca bolest razvija u ranijoj životnoj dobi i s težom kliničkom slikom. (Imarisio et al. 2008).

Tablica 2. Odnos broja ponavljanja tripleta CAG i ekspresije Huntingtonove bolesti

(izvor: Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi, Sertić et al. 2015, ljubaznošću autora)

Broj ponavljanja tripleta CAG	Ekspresija bolesti
≤ 26	Normalni alel (zdravi alel)
27-35	Intermedijarni alel, još nije patološki nalaz, međutim broj ponavljanja može se povećati pri prijenosu na potomke i u njih izazvati bolest
36-39	Ekspandirani aleli, bolest se može pojaviti u kasnijoj životnoj dobi ili se neće pojaviti, potomci imaju povećan rizik od obolijevanja
≥40	Ekspandirani alel, bolest će se pojaviti s velikom sigurnošću, nisu zabilježeni asimptmatski pojedinci s ovim brojem ponavljanja tripleta CAG

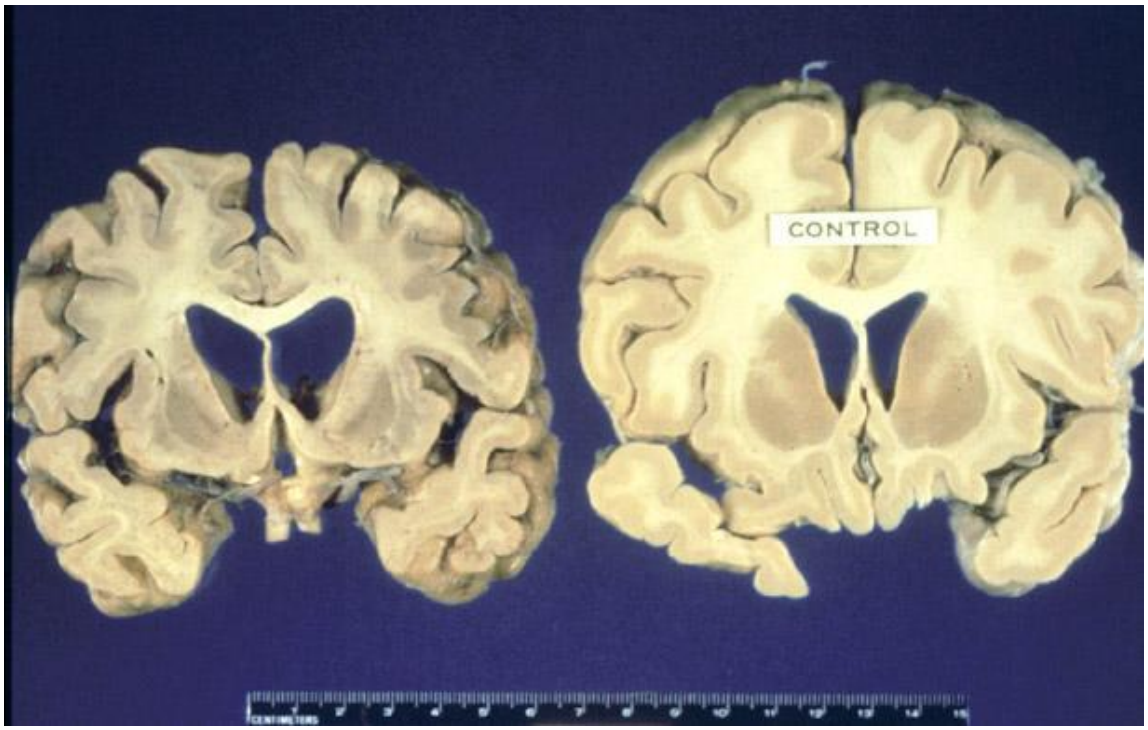
3.4. PATOGENEZA

Protein huntingtin zastupljen je u neuronima posvuda u mozgu prvenstveno kao citoplazmatski protein mada je prisutan i u jezgri, dendritima, mitohondrijima, Golgijevim tjelešcim i endoplazmatskom retikulumu. U većoj količini nalazi se u velikim interneuronima i srednjim trnastim neuronima strijatuma, kortikalnim piramidnim neuronima i Purkinjeovim stanicama malog mozga (koji su najviše zahvaćeni u juvenilnom obliku HB). Njihovo propadanje uzrokuje poremećaj neuronskih krugova bazalnih ganglija s talamusom i korteksom što rezutira nevoljnim pokretima i poremećajima voljne motorike. U juvenilnom obliku bolesti neurodegeneracija je bitno opsežnija što je vidiljivo u specifičnoj kliničkoj slici. Mutirane HTT cijepaju proteolitički enzimi stvarajući velike fragmente koji rade velike nuklearne i citoplazmatske inkluzije zahvaćenih neurona te oni zbog ekscitotoksičnosti glutamata i oksidativnog stresa propadaju apoptozom ili nekrozom (Pogledić i Relja 2011).

3.5. PATOLOGIJA

Patohistološki nalaz (PHD) Huntingtonove bolesti obilježen je izrazitom atrofijom nukleusa kaudatusa i putamena (*nucleus striatum*) bilateralno, udruženom s umjerenim stupnjem atrofije vijuga frontalnih i temporalnih regija (Brinar et al. 2009). Strijatalna degeneracija započinje u medijalnim dijelovima kaudatusa, ali širenjem atrofije zahvaća i druga područja uz poštedu *nucleusa accumbensa.* Karakteristična je jača zahvaćenost prednjih dijelova putamena i kaudatusa. Atrofija kaudatusa mijenja izgled frontalnih rogova lateralnih ventrikula koji su difuzno povećani.

Biokemijske promjene obilježene su degeneracijom gabaergičkih neurona i smanjenjenim gabaergičkim (GABA) i acetilkolinskim (ACh) projekcijama u vanjski dio globusa palidusa. Smanjene su koncentracije biosintetičkih enzima GABA-e i ACh i to glutaminske acidne dekarboksilaze (GAD) i kolinacetil-transferaze.



Slika 2. Frontalni rez mozga oboljelog od Huntingtonove bolesti lijevo i mozak zdrave osobe desno.Vidljiva je izrazita atrofija nucleusa caudatusa i putamena lijevo, kao i proširanje lateralnih ventrikula i trećeg moždanog ventrikula.

(izvor:http://pathology.mc.duke.edu/neuropath/CNSlecture4/CNSlecture4.htm)

3.6. KLINIČKA SLIKA

Bolest se najčešće javlja u odrasloj dobi (30 do 50 godina) i manifestira se trijasom simptoma : neurološkim, psihijatrijskim i kognitivnim. Kako se bolest može javiti u adultnom i juvenilnom obliku simptomi se dijelom razlikuju i neki su specifičniji za jedan ili drugi oblik pa će biti opisani posebno.

3.6.1. Adultni oblik Huntingtonove bolesti

Simptomi se karakteristično javljaju u odrasloj dobi, najčešće oko 40. godine i obilježeni su koreiformnim pokretima, izrazitim kognitivnim propadanjem i demencijom.

3.6.1.1. Neurološki simptomi

Koreiformni poremećaji (grč.*chorea*–ples) obilježeni su nevoljnim pokretima distalnih mišića udova zahvaćajući mišiće prstiju i dlanova ruku te mišiće lica. Tipični pokreti ruku opisuju se u litaraturi kao „ruke muzačice“ (milkmaid grip). Kasnije ti poremećaji postaju izraženiji i zahvaćaju sve mišiće tijela i udova. Kretnje jezika su specifične zbog nemogućnosti zadržavanja voljne protruzije te se ta patognomonična kretnja opisuje kao „kameleonov jezik“ ili “harlekinski jezik“ (Sertić et al. 2015). Izražene su teškoće u hodu i sakadnim pokretima oka. Povećana je učestalost treptanja praćena nevoljnim protruzijama jezika. U uznapredovaloj fazi bolesnik je rijetko miran duže od nekoliko sekundi. Pokreti se stereotipno ponavljaju. Mišićni tonus u početku bolesti je snižen, ali kasnije može pokazivati različite stupnjeve rigidnosti, tremora i bradikinezije, elemenata koji podsjećaju na Parkinsonovu bolest (PB) (Brinar et al. 2009). Govor postaje nerazumljiv i eksplozivan, a gutanje otežano.



Slika 3. Ruke muzačice (milkmaid grip)
(izvor:http://health.usf.edu/medicine/neurology/hdcenter/)



Slika 4. Tipčan izgled koreje kod bolesnika s HB (izvor: http://pixshark.com/huntingtons-chorea.htm)

3.6.1.2. Psihijatrijski simptomi

Psihički simptomi pojavljuju se kad i neurološki ili im mogu prethoditi. Prisutni su kod 33 do 76% bolesnika s HB (Sertić et al. 2015). Pacijenti su sumnjičavi, impulzivni, lako razdražljivi i skloni ispadima bijesa. Često se javlja depresija, poremećaji ličnosti, poremećaji ponašanja pa i teže psihoze. U kasnijem tijeku bolesti česta su psihotična stanja praćena halucinacatornim doživljajima, paranoidnim sumanutostima i opsesivno-kompulzivnim stanjima. Depresija i anksioznost uzrok su velikog broja suicida kod bolesnika s HB-om, poglavito u ranoj fazi bolesti kada dolazi do velikih promjena u životu bolesnika (Cummings 1995).

3.6.1.3. Kognitivni simptomi

Kognitivni poremećaji javljaju se prije motoričkih i često sami pacijenti shvate da imaju problema s koncentracijom. Kao posljedica supkortikalnih poremećaja zahvaćene su egzekutivne funkcije i smanjena je mentalna fleksibilnost što rezultira otežanim snalaženjem u novonastalim situacijama. Kognitivni deficit je progresivan i u konačnici dovodi do demencije. Brzina progresije kognitivnog deficita veća je kod velikog broja ponavljanja tripleta CAG, kod depresivnih i apatičnih stanja te kod ranijeg nastupa same bolesti (Sertić et al. 2015).

3.6.2. Juvenilni oblik Huntingtonove bolesti

Juvenilni ili Westphalov oblik HB-a javlja se u 8-10% slučajeva. Karakteriziran je ponavljanjem 60-100 tripleta CAG i nastupom bolesti prije 20. godine života, a najmlađi opisani pacijent kojemu je bolest bila dijagnosticirana imao je samo 18 mjeseci. Prenositelj bolesti u 90% slučajeva je otac i nastup bolesti je progresivniji te je prosječno vrijeme trajanja bolesti od dijagnoze 9.3 godine (Barišić et al. 2009).

3.6.2.1. Neurološki simptomi

Za razliku od adultnog tipa bolesti kod kojeg je glavni i najraniji simptom koreja, ona se kod juvenilnog oblika javlja u samo 50 % slučajeva. Početak bolesti obilježen je oponentnom fenotipskom prezentacijom s hipokinetsko-rigidnim simptomima, tremorom, distonijom, ataksijom, dizartrijom, disfagijom, mioklonizmima, epilepsijom. Moguća su oštećenja piramidnih puteva i amiotrofija (Barišić et al. 2009).

3.6.2.2. Psihijatrijski simptomi

Psihijatrijski simptomi za juvenilni oblik bolesti ne razlikuju se od simptoma karakterističnih za adultni tip, osim u vremenu i opsegu nastupa.

3.6.2.3. Kognitivni simptomi

Osim ranijeg nastupa demencije kod juvenilnog oblika HB-a djeca pokazuju karakteristično loš uspjeh u svladavanju školskog gradiva (Barišić et al. 2009).

3.7. DIJAGNOZA

Dijagnoza bolesti temelji se na kliničkom pregledu, anamnezi i detaljnoj obiteljskoj anamnezi. Potvrđuje se molekularno-genskom dijagnostikom, a kako bolest rezultira patognomoničnim promjenama mozga moguća je dijagnoza pomoću slikovnih metoda CT i NMR (Kloppel et al. 2009).

Gensko testiranje za HB može biti dijagnostičko ili presimptomatsko. Dijagnostičko testiranje se radi kod pojedinaca sa kliničkom slikom koja ukazuje na HB te se traži potvrda radne dijagnoze. Presimptomatsko testiranje se radi u punoljetnih osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom radi utvrđivanja rizika razvoja bolesti i genskog savjetovanja. Određen dio pacijenata šalje se na testiranje kada klinička slike nije sasvim karakteristična za HB u cilju isključivanja dijagnoze. Kako je za više od 99% slučajeva HB-a karakteristično ponavljanje tripleta CAG na genu HTT, genska analiza koja pokaže ponavljanje više od 40 tripleta CAG ima osjetljivost 99%. Također, ako se u pacijenta nađu dva alela HTT unutar normalnog raspona ponavljanja tripleta može se sa sigurnošću isključiti HB (Sertić et al. 2015).

Genska analiza se u djece ne radi osim u slučaju pozitivne obiteljske anamneze ili prisutnosti dva od sljedećih kriterija : epilepsija, loš uspjeh u školi, teškoće u hodu, ekstrapiramidni znakovi i oralna motorička disfunkcija. (Barišić et al. 2009).

HB genotipizacija radi se u cilju potvrđivanja ili isključivanja dijagnoze, a metode kojima se provodi su PCR te elektroforeza u gelu i kapilarna elektroforeza, a razlika metoda je u dva tripleta baza.

3.8. LIJEČENJE

Specifičnog lijeka za Huntingtonovu bolest nema te se sve manifestacije bolesti liječe simptomatski. U simptomatskom liječenju koreje koriste se blokatori dopamina(neuroleptici, tetrabenazin) (Janković i Clarence Smith 2011) , blokatori glutamata (amantadin, memantin), banzodiazepini i antiepileptici (valproat, levitiracetam, karbamazepin, fenitoin, topiramat), u juvenilnom tipu bolesti koriste se i dopaminimimetici (L-dopa) (Barišić et al. 2009), a u slučaju distonije i antikolinergični lijekovi. Pokušalo se s primjenom lijekova koji interferiraju s mitohondrijskim metablozimom poput koenzima Q10 i L-karnitina, ali bez većeg uspjeha. Esencijalne masne kiseline kao linoleinska, dokozaheksaenoična i eikozapentaenoična te tokoferol u kombinaciji s blokatorima dopamina i antiglutaminergičkim lijekovim u eksperimentalnim istraživanjima pokazuju uspjeh u spriječavanju gubitak motoričke funkcije i pomažu u liječenju koreje (Barišić et al. 2009).

Tablica 3. Neki oblici terapije HB-a (Pogledić i Relja 2012)

Antidopaminergici	**Tetrabenazin** **Sulpirid** **Tiaprid** **Haloperidol**	**100 mg/dan** **300-1200 mg/dan** **3 g/dan** **3x2 mg /dan**
Anti-glutamatergici	Amantadin Memantin Ketamin	100-400 mg/dan 50-100 mg/dan 0.1; 0.4; 0.6 mg/kg/sat
Energetski metaboliti	Etil-eikozapentanoična kiselina Nezasićene masne kiseline L-acil karnitin Kreatin	2 g/dan 8 g/dan 45 mg/dan 8 mg/dan
Antioksidansi	Opc-14117	60-120-240 mg/dan
Ostali	Kanabidol Donepezil Fluoksetin Minociklin Piracetam Trans-dihidrolizurid	10 mg/kg/dan 10 mg/dan 20 mg/dan 100 ili 200 mg/dan 12 g 5 mg/dan

3.9. PROGNOZA BOLESTI

Huntingtonova bolest je nezaustavljiva progresivna neurodegenerativna bolest za koju ne postoji specifični lijek, već se terapijski tretiraju samo simptomi (Pogledić i Relja 2012). Bolest neminovno vodi smrtnom ishodu. Kod juvenilnog oblika prosječno preživljenje od trenutka dijagnoze iznosi 9.3. godine (Barišić et al. 2009), dok kod adultnog to može biti i do 20 godina.

4. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je utvrditi učestalost ponavljanja tripleta CAG na kromosomu 4p16.3 u pacijenata sa sumnjom na Huntingtonovu bolest čiji su uzorci periferne krvi bili testirani na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb u vremenskom periodu od siječnja 2003. do srpnja 2012. godine.

5. ISPITANICI I METODE

U ovom radu testiralo se broj ponavljanja tripleta CAG kod osoba čija klinička slika je ukazivala na Huntingtonovu bolest, a genetska analiza se radila elektroforezom na gelu u razdoblju od siječnja 2003. do srpnja 2012. godine na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Podaci su prikupljeni iz baze podataka i ukupno je analizirano 486 testiranih uzoraka.

Primarni uzorak korišten u analizi bila je periferna venska krv u kojoj su se djelovanjem osmotskom tlaka razorili eritrociti radi lakšeg izdvanjanja neoštećenih limfocita i izdvajanja DNA. Dobivena DNA se pročišćuje precipitacijom, a koncentracija DNA određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnim dužinama 260 nm (za DNA) i 280 nm (za proteine) zbog eventualne zagađenosti uzorka proteinima. Uzorku DNA dodaje se etidijev bromid radi lakše vizualizacije pod UV svjetlom i dobivena smjesa se stavlja na 2% agarozni gel te se elektroforezom provjerava kvaliteta dobivene DNA. Izdvojeni uzorci DNA stavljaju se u epruvete s imenom i prezimenom pacijenta, laboratorijskom brojem, vrstom pretrage i datumom te se pohranjuju u hladnjaku na temperaturu + 4 ºC.

5.1. Načelo postupka

Određivanje broja tripleta CAG u prvom eksonu IT15 gena provodi se umnažanjem DNA fragmenata od interesa lančanom reakcijom polimeraze-PCR u termobloku te njegovom elektroforezom i vizualizacijom na agaroznom gelu.

5.2. Primarni uzorak

Venska krv čuvana u epruveti s podtlakom s otopinom K- ili Na-EDTA za vensku krv.

5.3. Potrebna oprema i reagensi

Potrebna oprema i regensi navedeni su u tablici 4. i 5.

Tablica 4. Korištena oprema i reagensi

Redni broj	Reagens	Prozvođač	Kataloški broj
1.	Expand Long Template PCR System Expand Long PCR buffer 1 10 X	Roche	11 681 842 001
2.	dNTP mix 10mM each	Roche	11 581 295 001
3.	DNA Molecular Weight Marker V	Roche	10 821 705 001
4.	DNA Molecular Weight Marker XIII	Roche	11 721 925 001

Tablica 5. Korištene početnice

Početnice(Tib MolBiol):	
HD-1	5'- CGA GTC CCT CAA GTC CTT CCA GCA -3'
HD-2	5'- GTG GCG GCT GTT GCT GCT -3'

5.4 Postupak umjeravanja

Kao referentni materijal upotrebljava se pozitivna (alel s punom mutacijom) i negativna DNA kontrola (normalni uzorak) te slijepa proba (voda). Da bi pretraga bila valjana pozitivna kontrola mora biti proglašena pozitivnom, negativna kontrola mora biti proglašena negativnom, a slijepa proba mora biti bez znakova kontaminacije.

5.5. Faze postupka

Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) počinje dodavanjem pročišćenog uzorka DNA reakcijskoj smjesi koja sadrži enzim DNA polimerazu, dvije oligonukleotidne početnice (eng. *primer*), pufer s MgCl2 i smjesu četiri deoksiribonukleotida: dATP, dGTP, dCTP i dTTP. Reakcija se provodi u 20 do 30 ciklusa da bi se dobila dovoljna količina DNA za vizualizaciju na gelu.

Svaki ciklus PCR ima tri faze koja svaka zahtijevaju određeno vremensko trajanje i određenu temperaturu.

1. DENATURACIJA – pod utjecajem visoke temperature se razdvoji dvolančana molekula DNA
2. AMPLIFIKACIJA – spajanje oligonukleotidnih početnica na komplementarnu regiju denaturirane DNA
3. ELONGACIJA- produljenje lanca DNA uz pomoć enzima DNA polimeraze u smjeru 5'-3' i stvaranje nove dvostruke molekule DNA potpuno identične početnoj molekuli DNA

Tablica 6. PCR HB Sastojci reakcijske smjese (25µl)

Mix	Volumen (µl)	Konc. u reakcijskoj smjesi
sterilna destilirana voda	14.1	
Pufer 1	2.5	1.75 mM
dNTP mix (40mM)	0.9	1.44 mM
HD-1 (5:100) (5 µM)	2.5	0.5 µM
HD-2 (5:100) (5µM)	2.5	0.5µM
Glicerol	1	4%
DNA	1	100-200 ng
Taq-Long (5U/µL)	0.5	2.5 U

Tablica 7. Program korišten u postupku PCR

program: DENATURACIJA			
broj segmenata	Temperature target (ºC)	Hold time (sec)	Cycles
1	98	600	1
program: AMPLIFIKACIJA			
broj segmenenta	temperature target (ºC)	hold time(sec)	Cycles
1	97	35	
2	62	35	10
3	68	60	
1	97	35	
2	62	35	20
3	68	60+10*	
program :EKSTENZIJA			
broj segmenta	temperature ratio (ºC)	hold time (sec)	Cycles
1	68	420	1

60+20*- zvjezdica znači da se u svakom idućem ciklusu dodaje još po 10 sekundi

Analiza PCR produkta

Za elektroforezu se pripremi 2% agarozni gel volumena 50 mL. U jažice gela nanese se po 10µL PCR produkata uzoraka pomiješanih s 3µL loading buffera. U jednu jažicu nanese se 2µL molekularnog markera XIII, pomiješanog s 3µL loading buffera i 6µL destilirane vode. Određivanje veličine DNA fragmenata vrši se na G-box uređaju za snimanje gelova. Uz uzorke koji se ispituju mora se nalaziti i kontrolni uzorak heterozigotnog genotipa. Elektroforeza traje oko 70 minuta pri naponu od 110V. Veličina umnoženih ulomaka određuje se prema DNA molekularnim biljezima. Broj tripleta nukleotida CAG za produkt PCR određuje se prema formuli: n(CAG) = (pb-32)/3.

6. REZULTATI

Na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb u razdoblju od siječnja 2003. godine do srpnja 2012. godine ukupno se genskom testiranju za Huntingtonovu bolest metodom elektroforeze na gelu podvrgnulo 486 pacijenata. Način interpretacije rezultata prikazan je u tablici 8.

Dobiveni rezultati analize elektroforeze na gelu prikazani su u tablici 9.

Tablica 8. Interval izvještavanja rezultata

Rezultat :	Broj tripleta CAG
Normalni aleli:	26 CAG
Intermedijarni aleli:	27-35 CAG
Ekspandirani aleli:	>36 CAG

Tablica 9. Rezultati testiranja u KZLD, KBC Zagreb

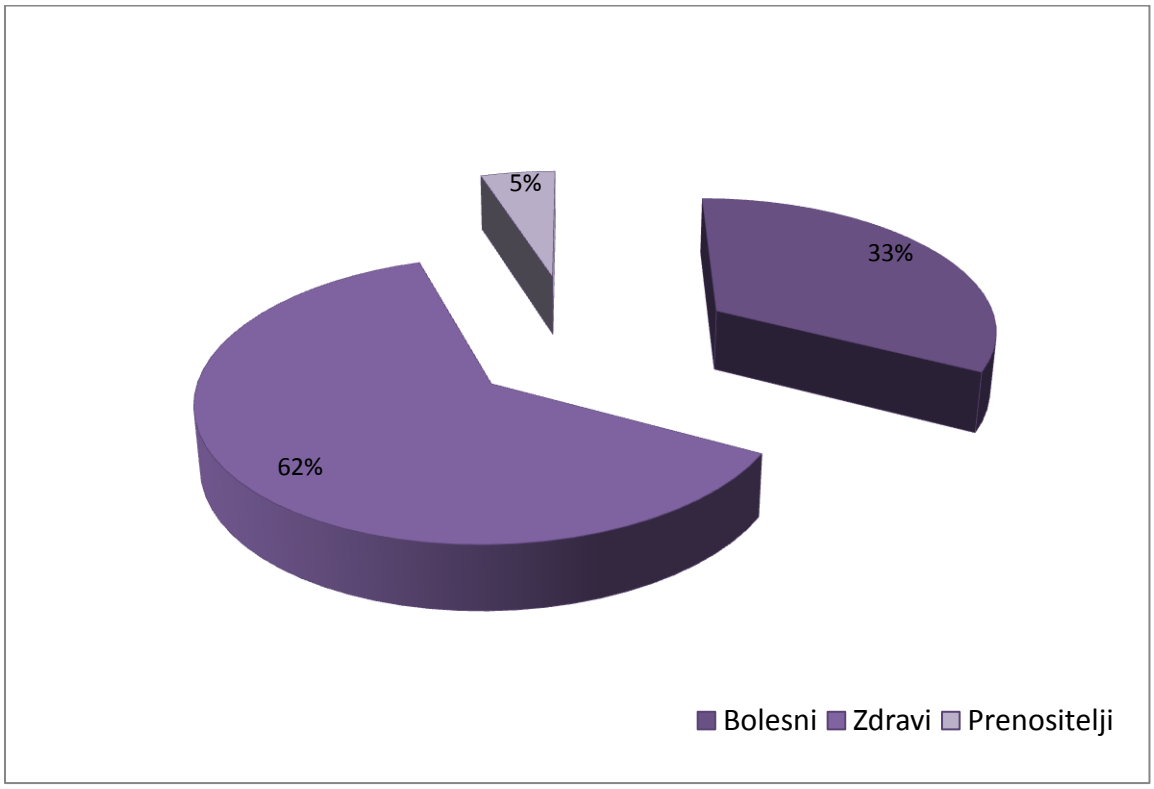
Ukupan broj testiranih:	486	Udio (%)
Normalni aleli ≤26 CAG	303	62
Intermedijarni aleli 27-35 CAG	24	5
Ekspandirani aleli >36 CAG	159	33

Kako je vidljivo iz tablice 9. od 486 testiranih pacijenata 303 (62%) imalo je do 26 ponavljanja tripleta CAG i time spadaju u grupu pacijenata koji nemaju rizik razvoja HB, ali ni rizik da bolest prenesu na potomstvo te se ta grupa pacijenata smatra zdravima.

U 24 od 486 (5%) pacijenata broj ponavljanja CAG tripleta iznosio je 27-35 te ti pacijenti imaju mali ili neznatan rizik razvoja bolesti međutim kod njihovog potomstva taj rizik je povećan te stoga njih smatramo prenositeljima bolesti.

U 159 od 486 (33%) testiranih pacijenata otkriveno je ponavljanje više od 36 CAG tripleta te se ti pacijenti smatraju bolesnima, bilo da već imaju razvijenu sliku HB ili će se bolest u dogledno vrijeme neminovno klinički manifestirati.

Ukupan rezultat u postotcima svih testiranih pacijenata prikazuje slika 5.



Slika 5. Udio bolesnih, zdravih i prenositelja u KZLD, KBC Zagreb

7. RASPRAVA

U ovom radu su testirana ukupno 486 uzorka krvi u KZLD KBC-a Zagreb u razdoblju od siječnja 2003. do srpnja 2012. godine metodom elektroforeze na gelu. Od ukupno 486 testiranih uzoraka u navedenom razdoblju 62% (303) ispitanika imalo je normalan broj ponavljanja tripleta CAG (do 26 CAG ponavljanja) i time su spadali u skupnu zdravih ispitanika. 33% ispitanih (ukupno njih 159) imalo je broj ponavljanja CAG tripleta koje prelazi kritičnu brojku od 36 CAG te se oni smatraju bolesnima koji već imaju ili će tek razviti kliničke simptome karakteristične za HB. 5% testiranih (24 pacijenta) potvrđeni su kako nositelji bolesti s brojem ponavljana 27-35 CAG tripleta i oni imaju povećan rizik prijenosa bolesti na sukcesivne generacije. Što se tiče genetskog testiranja ono se ne provodi rutinski nego u slučaju da postoje klinički simptomi koji upućuju na HB ili u slučaju da je kod jednog člana obitelji utvrđen povećani broj ponavljanja CAG tripleta te se punoljetni članovi obitelji žele podvrći testiranju zbog mogućeg razvoja bolesti ili zbog prijenosa bolesti na potomstvo. Kod maloljetnih osoba genetsko se testiranje u pravilu ne provodi i smatra se neetičkim, osim u slučaju pozitivne obiteljske anamneze ili barem dvaju od sljedećih kriterija : epilepsija, loš uspjeh u školi, teškoće u hodu, ekstrapiramidni znakovi ili oralna motorička disfunkcija (Barišić et al. 2009).

Samo genetsko testiranje kod bolesti koja još nema specifičnog lijeka i koja neminovno u roku od 5-20 godina završava smrću povlači za sobom mnoge etičke dileme. Dijagnoza bolesti ima mnoge socijalne i pravne implikacije, a slučaju da dođe do zloupotrebe podataka dobivenih genetskim testiranjem otvara se sasvim novo područje za diskriminaciju rizičnih pojedinaca od toga koju školu će upisati pa do toga da ih poslodavac odbije zaposliti jer će u dogledno vrijeme biti nesposobni obavljati zadatke radnog mjesta. Stoga smjernice za genetsko testiranje uključuju objašnjenje načina testiranja, medicinsko, pravno i genetsko savjetovanje, kao i podršku u suočavanju s rezultatima testiranja te pitanja eventualne genetske diskriminacije i dugoročnih posljedica za pojedinca, ali i pravo na izbor i informirani pristanak punoljetne osobe (Sertić et al. 2015). Upravo zbog navedenih razloga bitno je formiranje multidisciplinarnih timova (neurolog, psihijatar, psiholog, klinički biokemičar, analitičar, socijalni radnik, pravnik) pri referantnim ustanovama s ciljem kompleksne medicinske i nemedicinske skrbi ne samo za pacijenta nego i za njegovu obitelj koja se suočava s mnogim teškoćama i promjenama koje dijagnoza HB nosi.

8. ZAKLJUČAK

Huntingtonova bolest (HB) je autosomno dominantna nasljedna neurodegenerativna bolest koju definira dinamička nestabilna sekvenca nukleotidnih ponavljanja ili tripleta (CAG) u prvom eksonu HD gena za huntingtin (HTT) otkriven 1993. godine, a kartiran na 4. kromosomu (p16.3). Simptomi obično započinju između 35 do 44 godine života, a rjeđe se bolest može javiti i u osoba mlađih od 20. godina (juvenilni oblik HB za koji je karakterističan veći broj ponavljanja tripleta) te tada obično uzrokuje težu kliničku sliku te brži i progresiviji tijek bolesti. Kliničku sliku karakteriziraju pojačani nehotični pokreti-koreja, psihički poremećaji i demencija koji nastaju kao posljedica smrti neurona u bazalnim ganglijima i drugom moždanom tkivu.

Osobe s Huntingtonovom bolešću imaju produljen ponavljajući slijed tripleta CAG na 4. kromosomu. Aleli u genu HTT smatraju se normalnima kada broj ponavljanja tripleta nije veći od 26 CAG. Intermedijarni aleli su veličine od 27 do 35 tripleta CAG i neće izazvati bolest u nosioca, ali zbog nestabilnosti gena pri prijenosu ns sljedeće generacije potomci nosioca mogu nasljediti alele s povećanim brojem ponavljanja tripleta koji će u njih uzrokovati bolest. Aleli s 36 ili više ponavljanja tripleta CAG vjerojatno će tijekom života izazvati pojavu bolesti, iako su oni od 36 do 39 ponavljanja manje penetrantni (zabilježeni su slučajevi gdje osobama s tim brojem tripleta nije došlo do pojave simptoma bolesti).

Analizom 486 pacijenata u KZLD KBC-a Zagreb elektroforezom na gelu utvrđeno je u 303 (62%) pacijenata ponavljanje do 26 CAG tripleta, u 159 (33%) pacijenata ponavljane tripleta CAG prelazi kritičnu brojku od 36 CAG ponavljanja i oni se smatraju bolesnima ili će u budućnosti razviti bolest, dok je 24 (5%) pacijenata u intermedijarnoj skupini od 27-35 CAG ponavljanja koji pokazuju rizik prijenosa bolesti na potomstvo.

9. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jadranki Sertić na predloženoj temi i uloženom trudu za vrijeme pisanja ovog rada. Uvelike mi je pomogla savjetima i prijedlozima i omogućila pristup potrebnoj literaturi i podacima iz baze podataka Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika potpora za vrijeme pisanja ovog rada i hrabrili su me na svakom koraku dajući mi vjetar u leđa da što prije i kvalitatnije završim ovaj rad.

10. POPIS LITERATURE

Barišić N. Huntingtonova bolest . Barišić i sur. Pedijatrijska neurologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2009:617-619.

Brandt J, Blysma FW, Gross R, StineOC, Ranen N, Ross CA. Trinucleotide repeat lenght and clinical progression in Huntington's disease . Neurology.1996; 46:527-531.

Brinar V, Klepac N, Habek M. Huntingtonova koreja. Brinar V i sur. Neurologija za medicinare.Zagreb: Medicinska naklada,2009:296-298.

Brinkman RR, Mazei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR. The likelihood of being affected with Huntington's disease by particular age, for a specific CAG size. Am J Hum Genet. 1997;60:1202-1210.

Cummings JL. Behavioral and psychiatric symptoms associated with Huntington's disease . Adv Neurol 1995; 65:179-186.

Imarisio S, Carmichel J, Korolchuk V i sur. Huntington's disease from pathology and genetics to potential therapies. Biochem J 2008;412:191-209.

Kloppel S, Henly SM, Hobbs NZ i sur. Magnetic resonance imaging of Huntington's disease: preparing for clinical trials. Neuroscience 2009;164:205-219.

Pogledić I, Relja M. Huntington's disease. Liječ Vjesn 2012;134:346-350

Sepičić J, Antonelli L, Sepić-Grahovac D, Materljan E. Epidemiology of Huntington's disease in Rijeka district, Yugoslavia. Neuroepidemiology 1989;8:105:108

Telarović S, Ćelić I, Ljubić H, Sertić J. Huntingtonova bolest. Sertić J i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada,2015:150-154.

http://web.stanford.edu/group/hopes/cgi-bin/hopes_test/hopes-news-episode-1/

http://www.hopkinsmedicine.org/psychiatry/specialty_areas/huntingtons_disease/patient_family_resources/education_whatis.html

http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#HD

http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n10/fig_tab/nrg1686_F1.html

http://web.stanford.edu/group/hopes/cgi-bin/hopes_test/hopes-news-episode-1/

http://www.google.hr/imgres?imgurl=http://www.cmmt.ubc.ca/sites/default/files/HD%252520prevalence%252520map.jpg&imgrefurl=http://www.cmmt.ubc.ca/research/diseases/huntingtons/HD_Prevalence&h=300&w=499&tbnid=7q2GjLPXIMj6PM:&zoom=1&docid=Dzoh9UJ2cOAdWM&ei=osdLVayHG8zSUfWVgIAL&tbm=isch&ved=0CBsQMygAMAA

http://www.givf.com/geneticservices/huntingtondisease.shtml

http://pathology.mc.duke.edu/neuropath/CNSlecture4/CNSlecture4.htm
http://pathology.mc.duke.edu/neuropath/CNSlecture4/hdgross.jpg

http://health.usf.edu/medicine/neurology/hdcenter/

http://pixshark.com/huntingtons-chorea.htm

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zadru 29.01.1989. godine. Osnovnu školu pohađala sam u Poličniku pokraj Zadra i 2003. godine je završila s odličnim uspjehom i kao najbolja učenica generacije. Za vrijeme osnovne škole redovito sam sudjelovala na natjecanjima iz geografije i 2002. i 2003. sam osvojila 1. mjesto u Zadarskoj županiji. 2003. godine sam upisala gimnaziju „Vladimir Nazor“ u Zadru, jezični smjer. U gimnaziji sam također sudjelovala na natjecanjima iz geografije i 2005. godine osvojila sam prvo mjesto u županiji. 2006 godine odustala sam od natjecanja iz geografije i okrenula se biologiji koje me je puno više zanimala te sam nakon osvojenog 1. mjesta u županiji dobila poziv za državno natjecanje u Krku na Krku te sam zauzela 9. mjesto. 2007 godine također sam sudjelovala na državnom natjecanju iz biologije u Šibeniku te sam osvojila 3. mjesto što mi donijelo dodatne bodove za upis na fakultet. Iste godine završila sam gimnaziju s odličnim uspjehom kao učenik generacije te sam upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. U studenom 2007. godine sudjelovala sam u televizijskom kvizu „Najslabija karika“ i kao najmlađa kandidatkinja uspjela pobjediti.
Za vrijeme školovanja naučila sam se aktivno služiti engleskim i njemačkim jezikom, a talijanskim i španjolskim pasivno.