Aktivnost palmitoil-protein tioesteraze 1 u homogenatu leukocita mjerena fluorimetrijskom metodom

Hulita, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:592151

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Andrea Hulita

Aktivnost palmitoil-protein tioesteraze 1 u homogenatu leukocita mjerena fluorimetrijskom metodom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

Zahvaljujem se mentorici Dr.sc. Kseniji Fumić na pomoći, strpljenju i trudu koje je imala tijekom izrade mog diplomskog rada.

Hvala također i svim djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb koji su mi pomogli prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

„Nature is nowhere accustomed more openly to display her secret mysteries than in cases where she shows tracings of her workings apart from the beaten paths; nor is there any better way to advance the proper practice of medicine than to give our minds to the discovery of the usual law of nature, by careful investigation of cases of rarer forms of disease.“

William Harvey, 1657

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 Rijetke bolesti 1
1.1.1 Nasljedni metabolički poremećaji 3
1.1.2 Lizosomske bolesti nakupljanja 5
1.1.3 Neuronalne ceroidne lipofuscinoze 10
1.2 CLN1 14
1.2.1 Uzroci CLN1 14
1.2.2 Znakovi i simptomi 19
1.2.3 Dijagnoza 20
1.2.4 Liječenje 21
2 OBRAZLOŽENJE TEME 22
3 MATERIJALI I METODE 23
3.1. Ispitanici 23
3.2. Uzorci 23
3.3. Načelo enzimske metode 23
3.4. Načelo metode spektrofluorimetrije 23
3.4.1. Spektrofluorimetar 27
3.5. Instrumenti 28
3.6 Kemikalije i reagensi 29
3.7. Priprema reagenasa 30
3.7.1. Reagens 1. Supstratni pufer: citrat-fosfat 100-200 mM pH 4,0, 0,02% (w/v) natrij azid 30
3.7.2. Reagens 2. Kloroform/metanol 2:1 (svježe pripremljen) 30
3.7.3. Reagens 3. 4-MU 6-tio-palmitat-b-D-glukopiranozid, 3,4 mM – supstrat 30

3.7.4. Reagens 4. 100 U/mL b-glukozidaza iz badema 30
3.7.5. Reagens 5. 0,02% natrij azid (w/v) 30
3.7.6. Reagens 6. 10% BSA u 0,02% natrij azida 30
3.7.7. Reagens 7. 0,02% natrij azida / 0,9% NaCl 31
3.7.8. Reagens 8. 5% Triton X-100 u kloroform/metanol 2:1 (svježe pripremljen) 31
3.7.9. Reagens 9. 0,2% BSA / natrij azid / NaCl (svježe pripremljen) 31
3.7.10. Reagens 10. 33 mM DTT u 0,2% BSA / natrij azid/ NaCl (svježe pripremljen) 31
3.7.11. Reagens 11. Supstrat 4-MU 6-tio-palmitat-b-D-glukopiranozid 0,64mM 31
3.8. Postupak 32
3.8.1. Izolacija i homogenizacija leukocita iz pune krvi 32
3.8.2. Mjerenje proteina u uzorcima izoliranih leukocita 32
3.8.3. Priprema reagenasa neposredno prije rada 33
3.8.4. Postupak 33
3.8.5. Pripravljanje standarda 4-metilumbeliferona (4-MU) 34
3.8.6. Uvjeti očitavanja na spektrofluorimetru 35
3.8.7. Fluorimetrijsko očitanje rezultata 35
3.8.8. Račun 36
4. REZULTATI I RASPRAVA 37
4.1. Rezultati mjerenja 37
4.2. Rasprava 40
5. ZAKLJUČAK 42
6. LITERATURA 43
7. SAŽETAK 48
Summary 49
8. PRILOG 50
8.1 Popis kratica 50
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1 Rijetke bolesti

Rijetke bolesti su bolesti koje zahvaćaju jako mali broj ljudi. Definiciju rijetkih bolesti je teško postaviti. Dok su neke bolesti rijetke u jednom dijelu svijeta, u drugom mogu biti relativno česte. Kao primjer populacije u kojoj se rijetke bolesti često javljaju, može se navesti etnička skupina Aškenazi Židova. U toj populaciji, čak 1 od 4 osoba je nositelj određene mutacije gena koja može uzrokovati rijetku bolest; najčešće su to Gaucherova bolest, cistična fibroza, Tay-Sachsova bolest itd. (https://www.uofmhealth.org/).

Stoga razne države imaju različite definicije rijetkih bolesti, a sama definicija se većinom temelji na broju oboljelih ljudi. U Sjedinjenim Američkim Državama rijetka bolest se definirala 1983. godine kao bolest koja pogađa manje od 200000 ljudi (https://rarediseases.info.nih.gov/). U Europskoj Uniji je Europska Komisija za javno zdravstvo definirala rijetku bolest kao bolest koja je opasna po život ili kronično iscrpljujuća, te pogađa 1 od 2000 ljudi (https://en.wikipedia.org/). Danas se navodi preko 7000 rijetkih bolesti.

Većina rijetkih bolesti se manifestira vrlo rano, najčešće u dječjoj dobi. Razlog tome je činjenica da je više od 80% rijetkih bolesti uzrokovano genetskim mutacijama koje se ili nasljeđuju ili nastaju de novo (Institute of Medicine i sur., 2010). Druge rijetke bolesti proizlaze iz izloženosti raznim infekcijama ili toksinima, neispravnog imunološkog odgovora organizma te posljedica štetnih reakcija na pojedine lijekove. Za mnoge rijetke bolesti, uzroci još uvijek nisu poznati.

Iako postoji velika klinička i genetska heterogenost rijetkih bolesti, one ipak pokazuju određene zajedničke karakteristike. Teške su, kronične i progresivne, te uvelike mijenjaju kvalitetu života bolesnika (PUIU i Dan, 2010).

Liječenje rijetkih bolesti je uglavnom simptomatsko jer za većinu rijetkih bolesti lijek još uvijek ne postoji. Međutim, napretkom medicine, produljuje se i životni vijek pacijenata s pojedinim rijetkim bolestima. Npr. djeca sa cističnom fibrozom su 1960. godine imali očekivani životni vijek kraći od 10 godina, dok je uz današnju terapiju prosječno očekivani životni vijek produljen i do 40 godina (Institute of Medicine i sur., 2010). Također, danas je moguće utjecati

i na sprječavanje nastanka pojedinih rijetkih bolesti, npr. imunizacijom, smanjenjem izloženosti toksinima poput azbesta i žive, uzimanjem folne kiseline tijekom trudnoće radi sprječavanja rijetkog poremećaja spine bifide itd.

U novije doba, sve se više stavlja naglasak na rano otkrivanje rijetkih bolesti. Pravovremenim početkom liječenja pacijenata produljuje im se očekivani životni vijek i poboljšava životni standard. U tu svrhu je 2005. godine, Američki fakultet za medicinsku genetiku (ACMG) preporučio probir kod novorođenčadi na 29 rijetkih bolesti koje su većinom teške i nasljedne (Institute of Medicine i sur., 2010). Takve teške i nasljedne bolesti se općenito svrstavaju u pet širokih kategorija: poremećaji metabolizma organskih kiselina, poremećaji oksidacije masnih kiselina, poremećaji metabolizma aminokiselina, hemoglobinopatije i drugi poremećaji.

Liječenje rijetkih bolesti je kroz povijest nailazilo na puno prepreka od kojih je najznačajnija bila financijska neisplativost. Razvoj lijekova namijenjenih liječenju rijetkih bolesti nije pratio razvoj lijekova namijenjenih za bolesti od kojih obolijeva većina populacije. Zbog malog broja oboljelih od pojedine rijetke bolesti, farmaceutske kompanije nisu mogle prodajom lijekova na tržištu vratiti sredstva uložena u njihovo istraživanje i razvoj. Zbog toga je pristup u razvoju lijekova za rijetke bolesti bio specifičan. Dokument o orphan lijekovima (*engl*. orphan = siroče) (Orphan Drug Act, ODA), usvojen 1983. u SAD-u, bio je početak sustavnog pristupa u politici prema lijekovima za rijetke bolesti. Nakon SAD-a, slične ili iste politike prema orphan lijekovima uvode i zemlje u ostalim dijelovima svijeta (http://www.orpha.net/). Japan je uveo zakon 1993, Australija 1997. a Europa 1999 godine. Tim usvojenim aktima regulirala su se ključna pitanja vezana uz regulativu, pravni i financijski aspekt razvoja ovih vrsta lijekova te se tako i diljem svijeta uspostavila primjena politike o orphan lijekovima. Sve to je dovelo do okretanja medicine istraživanju rijetkih bolesti.

Da oboljeli od rijetkih bolesti ne bi ostali na marginama znanstvenog i terapijskog napretka, te da bi imali ista prava na kvalitetnu terapiju kao i svi ostali oboljeli od drugih bolesti, osnivale su se razne udruge koje su se zalagale (i još uvijek se zalažu) za prava oboljelih od rijetkih bolesti te razne kompanije koje su se počele okretati otkrivanju novih lijekova. U SAD-u, najznačnija je Nacionalna organizacija za rijetke bolesti (NORD), ne-profitna organizacija osnovana 1983. godine, te u Europi, Europska organizacija za rijetke bolesti (EURORDIS). One pružaju pomoć i savjetovanja pacijentima i njihovim obiteljima te se zalažu za otkrivanje

rijetkih bolesti, njihovom pravovremenom tretmanu i liječenju. Sve to postižu kroz različite oblike edukacija, istraživanja i pružanja usluga.

Temeljni izazov u razvoju lijekova za većinu rijetkih bolesti jest nedovoljno znanje o patofiziologiji ili prirodnoj povijesti bolesti. Širom svijeta obično postoji manji broj iskusnih kliničkih istraživača koji se bave specifičnom rijetkom bolešću, a za razliku od bolesti veće prevalencije, obično je objavljeno i vrlo malo znanstvene literature. Budući da se radi o rijetkim bolestima, vrlo često je i broj pacijenata potrebnih za provođenje kliničkih ispitivanja na novim lijekovima mali ili nedovoljan.

Stoga, razvoj i primjena različitih analitičkih metoda za specifično dokazivanje (identifikaciju) i kvantificiranje analita od interesa je jedan od preduvjeta uspješne dijagnostike i liječenja rijetkih bolesti kao i razvoja novih lijekova.

1.1.1 Nasljedni metabolički poremećaji

Izraz „nasljedni metabolički poremećaji“ je prvi puta opisao Sir Archibald Garrod 1908. godine kako bi opisao bolesti koje nastaju zbog blokade u metaboličkom putu zbog smanjene aktivnosti određenog enzima (Bonilla Guerrero i sur., 2018).

Nasljedni metabolički poremećaji utječu na razgradnju ili sintezu određenih molekula ili tvari. Primjeri poremećaja koji utječu na razgradnju pojedinih molekula su organske acidurije, aminoacidopatije, peroksisomalni poremećaji, lizosomske bolesti nakupljanja, glikogenske bolesti nakupljanja i poremećaji oksidacije masnih kiselina. U tim poremećajima dolazi do nakupljanja supstrata defektnog enzima spremnog za razgradnju. Suprotno tome, kod porfirija, nedostatka cerebralnog kreatina i kongenitalnih poremećaja glikozilacije zbog defekta enzima ne može doći do sinteze određenih molekula i tvari i dolazi do nakupljanja prekursorskih molekula. Pri tome dolazi do pojave abnormalnih metabolita/intermedijara na temelju kojih se može postaviti dijagnoza pacijenta.

Kod većine nasljednih metaboličkih bolesti, osoba nasljeđuje dvije defektne kopije gena od roditelja – od svakog po jedan. Ukoliko osoba naslijedi jedan defektni gen, odgovarajući enzim će imati dovoljnu aktivnost i neće doći do razvoja simptoma metaboličkih poremećaja.

Učestalost nasljednih metaboličkih bolesti je 1 na 1000-2500 novorođenčadi. U pojedinim etničkim populacijama, kao što su Aškenazi Židovi, stopa nasljednih metaboličkih poremećaja je veća (https://www.webmd.com/).

Do danas je otkriveno stotine različitih tipova nasljednih metaboličkih poremećaja, a neki od najučestalijih i najvažnijih su svrstani u sljedeće kategorije: (Bonilla Guerrero i sur., 2018).

a) poremećaji skladištenja lizosoma
b) galaktozemija
c) bolest javorova sirupa
d) fenilketonurija
e) poremećaji skladištenja glikogena
f) mitohondrijski poremećaji
g) peroksisomalni poremećaji
h) poremećaji metabolizma metala
i) organske acidemije
j) poremećaji ureja ciklusa itd.

Klinički fenotipi nasljednih metaboličkih bolesti su široki i često nespecifični. Simptomi se mogu pojaviti u bilo kojoj dobi, no najčešće se pojavljuju već u djetinjstvu. Mogu se pojaviti iznenada ili sporo napredovati. Ponekad mogu postojati i pojedini „okidači“ bolesti poput hrane, lijekova, dehidracije, manjih bolesti ili drugih čimbenika. Klinička slika pacijenata sa nasljednim metaboličkim poremećajima se razlikuje ovisno o tome koji dio metabolizma je zahvaćen, no većinu nasljednih metaboličkih poremećaja prati sličan obrazac simptoma kao što su letargija, slab ili gubitak apetita, povraćanje, gubitak na težini, žutica itd.

Laboratorijske pretrage su od izrazite važnosti prilikom diferencijalne dijagnostike nasljednih metaboličkih poremećaja. One su često prvi trag koji upućuje na određenu dijagnozu bolesti. Konačna dijagnoza se nakon inicijalnog opažanja postavlja sa dodatnim potvrdnim testovima. Uobičajeni nalazi ukazuju na hipoketotsku hipoglikemiju, laktatnu acidozu, metaboličku acidozu, ketozu, hiperamonijemiju ili metaboličku acidozu u kombinaciji s hiperamonijemijom. Zato je potrebno napraviti široki raspon laboratorijskih testova, poput kompletne krvne slike, ispitivanja jetrene funkcije, ispitivanja bubrežne funkcije, amonijak, krvni plinovi, anionski rascjep, glukoza, laktat, ketoni u mokraći i krvi te mnoge druge. Za

potvrdu dijagnoze su potrebni biokemijski i molekularni genetski testovi te analiza enzimske aktivnosti.

Od 1908. godine, kada je prvi puta opisana urođena greška u metabolizmu, informacije o patofiziologiji, etiologiji, prevalenciji, klasifikaciji, dijagnozi i tretmanu takvih metaboličkih bolesti su se strahovito proširile. Naše znanje o mehanizmu koje prethodi patofiziologiji metaboličkih bolesti neprekidno raste, što dovodi do otkrića sve većeg broja do sada nepoznatih metaboličkih bolesti. Danas se sve više nasljednih metaboličkih bolesti uvrštava u panel bolesti koje se probiru kod novorođenčadi. Metoda odabira koja se danas koristi je tandem masena spektroskopija u uzorku suhe kapi krvi novorođenčeta.

Kao novije područje istraživanja, pojavljuje se i metabolomika kojom bi se naše znanje o metaboličkim bolestima trebala uvelike proširiti. Metabolomika obuhvaća izučavanje cjelokupnog skupa svih metabolita malih molekula prisutnih u biološkim uzorcima. Glavne analitičke tehnike koje se koriste u ovom pristupu su masena spektrometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonanca (NMR). Pristup metabolomike se ponekad naziva i neciljanom analizom zbog većeg opsega otkrivanja u odnosu na tradicionalne ciljane testove za određivanje aminokiselina, acilkarnitina, organskih kiselina, purina, pirimidina i intermedijera biosinteze karnitina. Osim što pomaže u dijagnozi, metabolomika također može dovesti do otkrića novih nasljednih metaboličkih bolesti, novih biomarkera i boljeg razumijevanja regulacije metaboličkih procesa.

1.1.2 Lizosomske bolesti nakupljanja

Lizosomi su organele smještene u citoplazmi eukariotskih stanica koji sadrže enzime hidrolaze koje djeluju u kiseloj sredini (pH oko 5) (Ferreira i Gahl, 2017). Hidrolaze razgrađuju makromolekule (ugljikohidrati, lipidi i proteini) do manjih jedinica poput aminokiselina, masnih kiselina te monosaharida koje se zatim dalje iskorištavaju u metaboličke svrhe.

Lizosomi sadrže oko 50 različitih kiselih hidrolaza koje se ovisno o supstratu svrstavaju u:

1) Nukleaze
2) Fosfataze
3) Lipaze
4) Proteaze

5) Glikozidaze
6) Sulfataze

Lizosomske bolesti nakupljanja nastaju zbog smanjene aktivnosti lizosomskih enzima. To dovodi do nakupljanja supstrata enzima u lizosomima zbog nemogućnosti njihove razgradnje. U rjeđim slučajevima, lizosomske bolesti nakupljanja mogu biti uzrokovane nedostatkom aktivatorskog proteina koji je ključan za aktivaciju određenih lizosomskih hidrolaza ili nedostatkom transportera i nemogućnosti izlaska molekule koja se razgradila iz lizosoma.

Danas postoji oko 50 vrsta tih bolesti, te se procjenjuje da je incidencija bolesti 1 na 5000. No, u nekim populacijama poput Aškenazi Židova te na području Skandinavije taj broj je i veći.

Neke od najčešćih lizosomskih bolesti nakupljanja i njihovih osnovnih karakteristika prikazane su u **Tablici 1**.

Tablica 1. Najčešći tipovi lizosomskih bolesti nakupljanja (preuzeto: Martin-Banderas L i sur., 2016)

Bolest	Defektan protein	Skladišni materijal	Pogođen organski sustav	Patologija CNS-a
Sfingolipidoze				
Fabry	α-galaktozidaza A	Globotriaozilceramid i tvari krvne grupe B	Bubreg, srce	+
Gaucher	β-glukozidaza	Glukozilceramid glukozilsfingozin	Slezena, jetra, koštana srž	+ (tip 2 i 3)
Niemann-Pick tip A i B	Sfingomijelinaza	Sfingomijelin	Slezena, jetra, koštana srž, pluća (tip B)	+ (tip A)
GM1 gangliozidoza	β-galaktozidaza	GM1 gangliozid	Koštani sustav, srce	+
Mukopolisaharidoze				
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	α-iduronaza	Dermatan sulfat i heparan sulfat	Organomegalija, koštani sustav, oko	+
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfataza	Dermatan sulfat i heparan sulfat	Organomegalija, srce	+
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Acetilgalaktozamin -4-sulfataza (arilsulfataza B)	Dermatan sulfat	Slezena, jetra, srce, makrocefalija	-

Lizosomske bolesti su uglavnom nasljedne. Većina lizosomskih bolesti se nasljeđuje autosomno recesivno, a bolesnici razvijaju simptome unutar prve godine života. Klinički tijek bolesti karakterizira brza progresija. Klinička slika bolesti je izrazito heterogena no većinu karakteriziraju slični simptomi poput hepatosplenomegalija, promjene na kostima, zglobovima, očima, facijalna dismorfija, respiratorni i srčani problemi i dr. (Fumić i sur., 2004).

Stečeni poremećaji najčešće nastaju kao posljedica uzimanja pojedinih lijekova. Npr. fosfolipidozu, koju karakterizira nakupljanje fosfolipida u lizosomima, uzrokuje više od 50 vrsta lijekova, poput antiaritmika, antimalarika, antipsihotika itd. koji inhibiraju enzim lizosomsku fosfolipazu (Ferreira i Gahl, 2017).

Postoji nekoliko čimbenika koji utječu na sam tijek bolesti i kliničku sliku pacijenta. To su vrsta mutacije odgovarajućeg gena kao i različiti utjecaji iz okoliša. Najznačajniji, a ujedno i najbitniji čimbenik je preostala katalitička aktivnost zahvaćenog enzima. Conzelmann i Sandhoff postavili su kinetički model koji objašnjava „kritičnu točku“ pri kojoj preostala katalitička aktivnost enzima nije više dovoljna za razgradnju pristiglog supstrata i kada u stanici počinje proces nakupljanja (Fumić i sur., 2004).

U laboratorijima su često potrebne sofisticirane biokemijske tehnike i molekularna dijagnostika za uspostavljanje definitivne dijagnoze lizosomskih bolesti nakupljanja. Najčešći početni pristup laboratorijskoj dijagnostici i probiru lizosomskih bolesti nakupljanja uključuje mjerenje akumuliranih primarnih supstrata ili aktivnosti odgovarajućeg lizosomskog enzima u krvi, urinu, amnionskoj tekućini ili kultiviranim fibroblastima. No, moguće je nastajanje i sekundarnih biokemijskih promjena koje također mogu biti dovoljno specifične za odgovarajuću lizosomsku bolest nakupljanja te se koristiti u postavljanju dijagnoze, praćenju progresije bolesti i odgovora na tretman (Bekri S., 2006)

Homogenat leukocita je najčešći biološki materijal koji se rabi za provođenje testova potvrde. No u nekim slučajevima je stanična kultura fibroblasta neophodna za potvrdu dijagnoze. Katalitička aktivnost većine lizosomskih enzima može se mjeriti uz visokospecifične 4-metilumbeliferonske supstrate (Fumić i sur., 2004).

Tretmani koji su danas dostupni su npr. transplantacija koštane srži. Uočeno je da se njome kod Hurlerove bolesti može spriječiti mentalna retardacija kod djece ukoliko se izvede prije nego što pacijent navrši 2 godine života (https://rarediseases.org/).

Enzimska nadomjesna terapija se pokazala efektivnom kod pacijenata sa nekim lizosomskim bolestima nakupljanja. Primjer za enzimsku nadomjesnu terapiju jest uvođenje agluceraze u liječenje Gaucherove bolest. Agluceraza je modificirani oblik enzima β-glukocerebrozidaze iz posteljice čovjeka (Fumić i sur., 2004).

Razvoj rekombinantne DNA tehnologije i genetskog inženjeringa doveo je do razvoja novih lijekova. Primjer je sintetski lijek imigluceraza (Cerezyme), rekombinantni oblik enzima agluceraze, koji je FDA odobrio 1994. za liječenje Gaucherove bolesti te se njime danas uspješno liječi preko 3000 bolesnika u svijetu (Fumić i sur., 2004).

Primjeri lizosomskih bolesti nakupljanja koji se liječe enzimskom nadomjesnom terapijom prikazani su u **Tablici 2**.

Tablica 2. Enzimska nadomjesna terapija lizosomskih bolesti nakupljanja (preuzeto: Martin-Banderas i sur., 2016)

Lizosomska bolest (deficijentni enzim)	**Ime**	**Vrsta**	**Godina 1. autorizacije na tržištu**	**Kompanija**
Gaucher (glukocerebrozidaza)	Ceredaza (α-gluceraza)	Pročišćen iz humane placente; glikoinženjering *in vitro*	1991	Genzyme-Sanofi SA
Gaucher (glukocerebrozidaza)	Cerezyme (imigluceraza)	Proizveden u transgenim CHO stanicama; glikoinženjering in vitro	1995	Genzyme-Sanofi SA
Gaucher (glukocerebrozidaza)	VPRIV uglavnom (vela-gluceraza α)	Proizveden u transgenim humanim fibroblastima; glikoinženjering tijekom kultiviranja stanica	2010	Shire
Gaucher (glukocerebrozidaza)	Elelyso (taligluceraza α)	Proizveden u rekombinantnim, glikoinženjerskim stanicama mrkve	2013	Protalix-Pfizer
Hurler i Hurlel-Scheie (MPS-I; α-L iduronaza)	Aldurazyme (laronidaza)	Proizveden u glikoinženjerskim CHO stanicama	2003	Biomarin (proizvodi) Genzyme-Sanofi SA
Fabry (α-galaktozidaza)	Fabrazyme (agalzidaza β)	Proizveden u glikoinženjerskim CHO stanicama	2001	Genzyme-Sanofi SA
Maroteaux-Lamy (MPS-VI; N-acetilgalaktozamin-4-sulfataza)	Naglazyme (galsulfaza)	Proizveden u glikoinženjerskim CHO stanicama	2005	Biomarin
Pompe (kisela α-glukozidaza)	Myzozyme & Lumizyme (alglukozidaza α)	Proizveden u glikoinženjerskim CHO stanicama	2006	Genzyme-Sanofi SA
Hunter (MPS-II; iduronat-2-sulfataza)	Elaprase (idursulfaza)	Proizveden u transgenim humanim fibroblastima; glikoinženjering tijekom kultiviranja stanica	2007	Shire

Danas je još uvijek većina lizosomskih bolesti nakupljanja neizlječiva te se liječe simptomatski. No unatoč tome, svakim danom se otkrivaju sve kvalitetnije terapije koje produžuju životni vijek pacijenata i poboljšavaju im kvalitetu života.

1.1.3 Neuronalne ceroidne lipofuscinoze

Neuronalne ceroidne lipofuscinoze su skupina nasljednih lizosomskih poremećaja koji uzrokuju degeneraciju živčanog sustava. Karakterizira ih unutarstanično nakupljanje autofluorescentnog skladišnog lipopigmenta. Ovi poremećaji su najčešći uzročnici nasljednih neurodegenerativnih poremećaja kod djece. Incidencija ovih poremećaja je 1,3-7 na 100000 ljudi. Nasljeđuju se autosomno recesivno (Glykys i Sims, 2017).

Neuronale ceroidne lipofuscinoze obuhvaćaju nekoliko vrsta poremećaja koji su se otkrivali tijekom povijesti. Prvotno su se nazivi poremećaja davali prema imenu osobe koja ih je prva identificirala, te se ti nazivi i danas pojavljuju u literaturi. Prema kliničkoj dobi nastanka razlikujemo: novorođenački (INCL), kasno-novorođenački (LINCL), mladenački (JNCL) i odrasli (ANCL) oblik. Trenutno se prakticira razlikovanje poremećaja prema genetskoj etiologiji.

Tablica 3. Klasifikacija neuronalnih ceroidnih lipofuscinoza (preuzeto: Jalanko i Braulke, 2009)

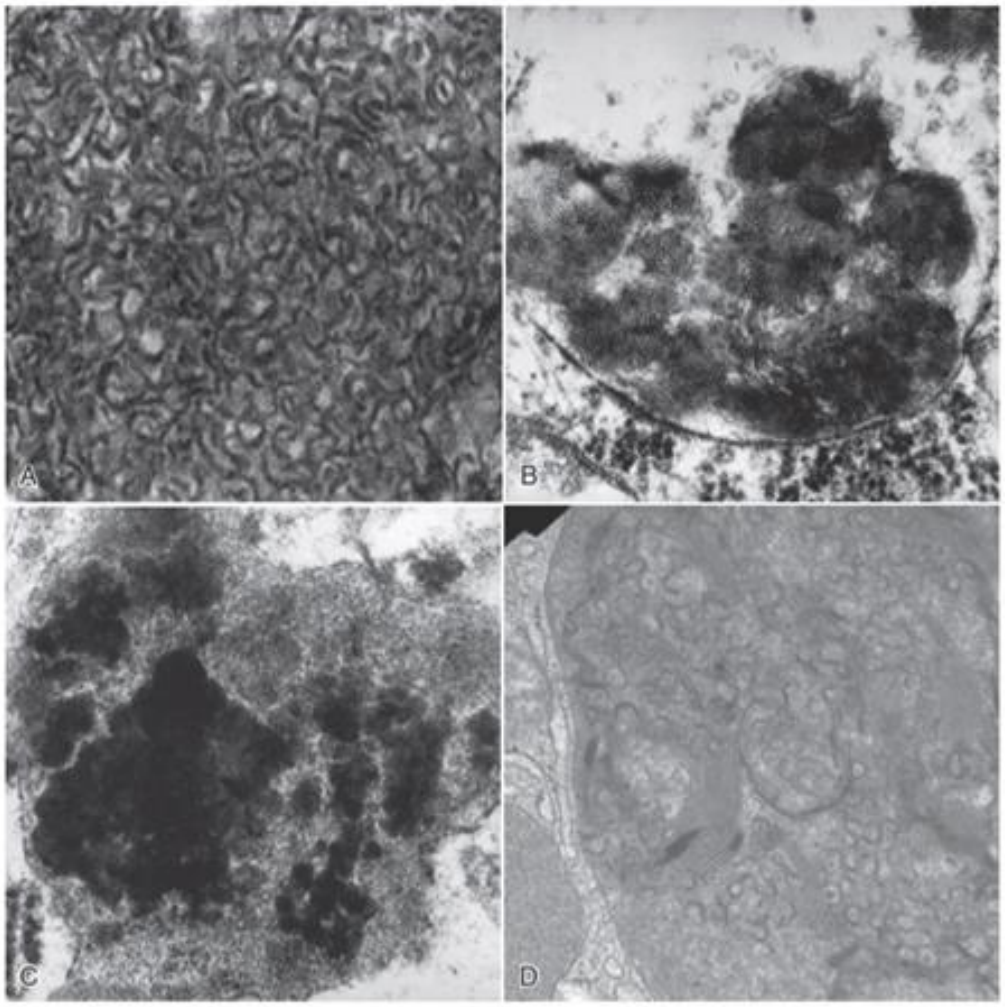
Gen	**Bolest**	**Protein**	**Struktura skladišnog materijala**	**Glavni skladišni materijal**
CLN1	Dječja, kasna dječja, mladenačka i odrasla	PPT1,palmitoil-protein tioesteraza 1, lizosomski enzim	GROD	Sapozini A i D
CLN2	Kasna dječja, mladenačka	TTP1, tripeptidil peptidaza 1, lizosomski enzim	CLP	Podjedinica c ATP sintaze
CLN3	Mladenačka	CLN3, lizosomal transmembranski protein	FPP	Podjedinica c ATP sintaze
CLN4	Odrasla	nepoznato	FFP, granular	Podjedinica c ATP sintaze
CLN5	Kasna dječja, finska varijanta bolesti	CLN5, topljivi lizosomski protein	RLP, CLP, FPP	Podjedinica c ATP sintaze
CLN6	Kasna dječja	CLN6, ER transmembranski protein	RLP, CLP, FPP	Podjedinica c ATP sintaze
CLN7 (MFSD8)	Kasna dječja, turska varijanta bolesti	MFS8, lizosomski transmembranski protein MFS iz familije CLN8	RLP, CLP, FPP	Podjedinica c ATP sintaze
CLN8	Kasna dječja, epilepsija nordijskih zemalja	CLN8, ER transmembranski protein	CLP	Podjedinica c ATP sintaze
CLN9 (nije identificirana)	Mladenačka	nepoznat	CLP (FFP, GROD)	Podjedinica c ATP sintaze
CLN10 (CTSD)	Kongenitalna, kasna dječja	CTSD, katepsin D, lizosomski proteini sa višestrukim funkcijama	GROD	Sapozini A i D
CLCN7	Dječja osteoporoza i CNS degeneracija	CLC7, lzosomski kanalski izmjenjivači klorida	nepoznato	Podjedinica c ATP sintaze

Iako neuronalne ceroidne lipofuscinoze pripadaju skupini lizosomskih bolesti nakupljanja, skladišni materijal koji se nakuplja u lizosomima nije supstrat specifičan za enzim

već su glavni skladišni materijali podjedinica c mitohondrijske ATP sintaze kao i sfingolipidni aktivatorski proteini A i D (Jalanko i Braulke, 2009). Skladištenje navedenih tvari se svrstava u sekundarne biokemijske poremećaje koji su dovoljno specifični za postavljanje dijagnoze (spomenuto u poglavlju 1.1.2).

Zajedničko svojstvo ovim poremećajima je da napadaju središnji živčani sustav. Klinička slika ovih pacijenata je izuzetno teška i bolest je vrlo progresivne prirode. Simptomi koji prate ove poremećaje su kognitivni pad (demencija, encefalopatija), epileptični napadaji koji su često mioklonski (brzi, nekontrolirani mišićni trzaji), poremećaji kretanja poput ekstrapiramidalnog sindroma te gubitak vida. No degeneracija mrežnice oka i gubitak vida se rijetko javlja u odraslom obliku poremećaja. Iako prisutnost navedenih simptoma ukazuje na postojanje ovih poremećaja, bitna je dobra i temeljita diferencijalna dijagnostika što je često razlog za dugu odgodu dijagnoze.

Do 2009. je utvrđeno oko 160 mutacija prisutnih u 8 ljudskih gena (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN7, CLN8 i CLN10) (Jalanko i Braulke, 2009), a do danas vjerojatno i više. Elektronskom mikroskopijom bioptata je utvrđeno nakupljanje autofluorescentnog, voštanog i tamnog lipida u neuronskim endosomima koji podsjećaju na pigment starenja lipofuscin. Te inkluzije se pod mikroskopom mogu vidjeti kao posebne ultrastrukture koje postoje ovisno o kliničkom obliku: granulirani osmofilni depoziti, zakrivljeni, pravocrtni ili kristalni depoziti (Glykys i Sims, 2017). Na temelju pregleda bioptata tkiva, najčešće kože, spojnice i rektalnog tkiva, se može postaviti dijagnoza.



Slika 1. Fotografije uobičajenih inkluzijskih struktura dobivene elektronskom mikroskopijom; A-zakrivljene inkluzije, B-inkluzije otiska prsta, C-granularni osmofilni depoziti, D-pravocrtna tjelešca (preuzeto: Glykys i Sims, 2017)

Detalji patologije samog poremećaja nakupljanja se još uvijek istražuju i razrađuju. Dosad je utvrđeno da postoji nedostatak proteina, blokada staničnih puteva te nakupljanje metaboličkih supstrata koji dovode do postojećih kliničkih fenotipova.

Za istraživanja patologije ovih poremećaja poslužuju životinjski modeli. Danas je popularna istraživačka metoda dobivanje induciranih pluripotentnih matičnih stanica iz ljudskih fibroblasta. Današnje tehnologije omogućuju reprogramiranje diferencijacije stanica u smjeru dobivanja određenog fenotipa na temelju kojih se proučavaju odgovarajući poremećaji. Nedavna izvješća su pokazala uspjeh u stvaranju modela dobivenih tim tehnologijama za proučavanje CLN1 i CLN3 poremećaja.

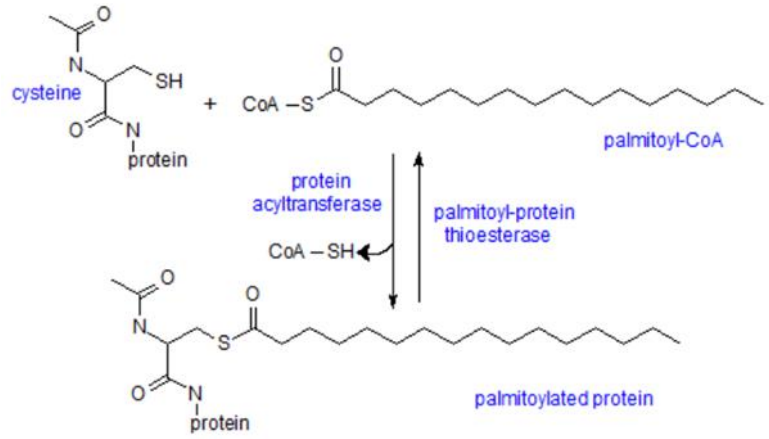
Diferencijalna dijagnoza je izrazito bitna kod ovih poremećaja radi pravovremenog liječenja pacijenta. Najčešće se koristi pregled bioptata pod elektronskim mikroskopom. U budućnosti bi sekvenciranje cijelog genoma trebalo igrati veliku ulogu u otkrivanju ovih poremećaja.

1.2 CLN1

Infantilna neuronalna ceroidna lipofuscinoza, poznata i kao infantilna Battenova bolest ili infantilna CLN1 bolest, je nasljedna neurodegenerativna bolest koja pripada skupini neuronalnih ceroidnih lipofuscinoza. CLN1 bolest nastaje kao posljedica mutacije u genu za topljivi lizosomski enzim palmitoil-protein tioesterazu 1 (PPT1) što dovodi do nakupljanja supstrata tog enzima u lizosomima (Hawkins–Salsbury i sur., 2013).

1.1.4 Uzroci CLN1

Enzim palmitoil-protein tioesteraza 1 (PPT1) je mala glikoproteinska hidrolaza koja se nalazi u lizosomima. Funkcija tog enzima je uklanjanje dugolančanih masnih kiselina (najčešće palmitinske kiseline) vezanih tioesterskim vezama na cisteinske ostatke proteina (**Slika 2**).

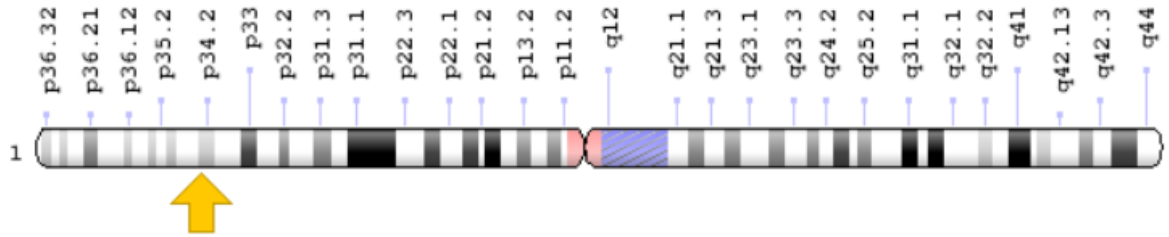


Slika 2. Shematski prikaz reakcije palmitoilacije (preuzeto: http://bisc423ncl.blogspot.com)

Istraživanja su pokazala da se PPT1 enzim, osim u lizosomima, nalazi i u sinaptičkim vezikulama u neuronima (Glykys i Sims, 2017). U neuronima, PPT1 je bitan za pravilan rad

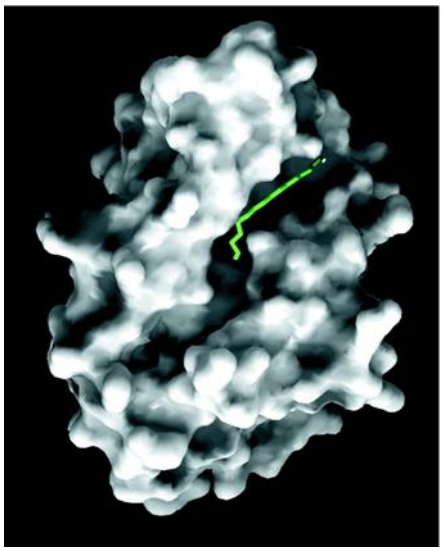
proteina koji sudjeluju u transportu do živčanih završetaka i regulira promet u sinapsama. Točna fiziološka funkcija i in vivo supstrati PPT1 i dalje ostaju nerazjašnjeni, ali je poznato da PPT1 sudjeluje u različitim staničnim procesima, uključujući apoptozu, endocitozu, promet vezikula, sinaptičku funkciju i metabolizam lipida.

Gen PPT1 u kromosomu 1 na poziciji 34.2 (1p34.2) tj. na položaju parova baza 40,071,461 to 40,097,252 nosi instrukcije za sintezu PPT1 enzima.



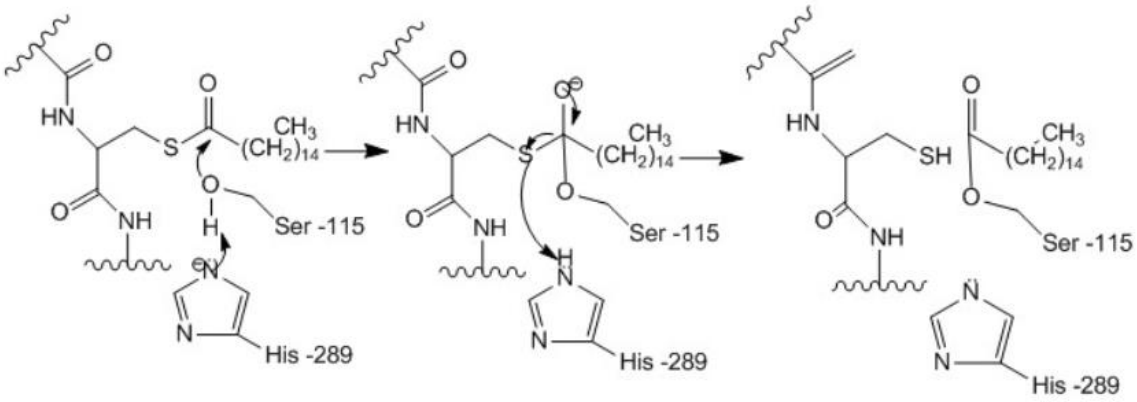
Slika 3. Shematski prikaz položaja gena PPT1 u kromosomu 1 na poziciji 34.2 (1p34.2) (preuzeto: https://ghr.nlm.nih.gov)

Strukturno istraživanje je pokazalo da je enzim PPT1 homodimer koji se sastoji se od 2 identična polipetidna lanca koji tvore 2 domene u enzimu. Svaki polipeptidni lanac građen je od α-heliksa i β-nabranih ploča. Oba paptidna lanca u homodimeru formiraju hidrofobni žlijeb u koji je omogućeno vezanje palmitinske kiseline iz supstrata. Pri tome se tioesterska veza supstrata izlaže djelovanju triju aminokiselina (tzv. katalitička trijada) u aktivnom središtu enzima.



Slika 4. Prikaz šupljine (žlijeba) formiranog u strukturi PPT1 u koji se veže palmitinska kiselina supstrata (zeleno) (preuzeto: Belizzi i sur., 2000)

Katalitičku trijadu enzima PPT1 čine 3 aminokiseline, Ser115, His289 i Asp233. His289 deprotonira Ser-115, koji nukleofilno napada karbonilni ugljik tioesterske veze u supstratu i provodi cijepanje.



Slika 5. Shematski prikaz reakcije enzim-supstrat koju katalizira enzim PPT1 (preuzeto: https://proteopedia.org)

Dogodi li se mutacija u navedenom genu (1p34.2), nastajanje i funkcija PPT1 enzima postaje narušena, što rezultira nastajanjem bolesti CLN1.

Identificirano je više od 65 mutacija navedenog gena koje dovode do CLN1 bolesti.

Najčešća mutacija koja izaziva CLN1 bolest u cijelom svijetu, označava se kao Arg151Ter (ili R151X) i označava signal za zaustavljanje uputa koje kodiraju nastajanje enzima nakon arginina 151. Ova mutacija rezultira u nastajanju kratkog, a time i nefunkcionalnog enzima.

Druga vrsta mutacije koja se uglavnom javlja kod ljudi finskog porijekla dovodi do zamjene aminokiseline arginina s triptofanom na položaju 122 (Arg122Trp ili R122W). (https://ghr.nlm.nih.gov/)

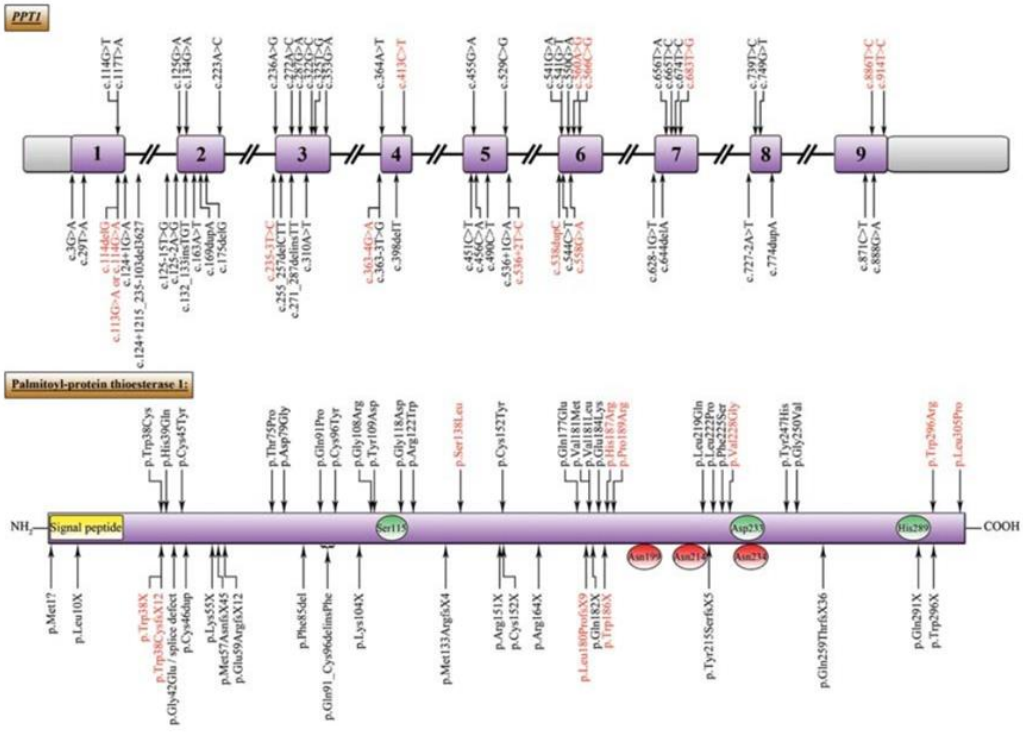
Ovisno o vrsti mutacija, PPT1 enzimi postaju ili vrlo neaktivni ili pokazuju smanjeni stupanj aktivnosti. Stoga se i simptomi bolesti javljaju vrlo rano (i završavaju smrću u djetinjstvu) ili se razvijaju postepeno i uočavaju se u kasnijoj životnoj fazi (kasni-infantilni, juvenilni i odrasli tip).

Do 2010. je identificirano 61 mutacija u genu za PPT1. One pripadaju missense mutacijama, 1 nonsense, 10 „splice-site“, 4 insercije, 6 delecija, 1 insercija-delecija, 1 koja može biti ili missense mutacija ili „splice-site“ mutacija, i 1 mutacija koja utječe na inicijator Met. (Kousi i sur., 2012). Za aktualne podatke, pregled mutacija se može naći u NCL bazi podataka (https://www.ucl.ac.uk).

Neki od tipova mutacija u genu 1p34.2 koji rezultiraju promjenama u PPT1 enzimu navedeni su u **Tablici 4** i shematski prikazani na **Slici 6**.

Tablica 4. Primjeri mutacija u genu za enzim PPT1 (preuzeto: Kousi i sur., 2012)

Gen	Egzon/intron	DNA tip	Predviđen/pokazan utjecaj na protein
PPT1	Egzon 1	c.114G>A	p.Trp38X
PPT1	Egzon 1	c.114delG	p.Trp38CysfsX12
PPT1	Intron 2	c.235-3T>C	splice defect
PPT1	Intron 3	c.363-4G>A	splice defect
PPT1	Egzon 4	c.413C>T	p.Ser138Leu
PPT1	Intron 5	c.536+2T>C	splice defect
PPT1	Egzon 6	c.538dupC	p.Leu180ProfsX9
PPT1	Egzon 6	c.558G>A	p.Trp186X
PPT1	Egzon 6	c.560A>G	p.His187Arg
PPT1	Egzon 6	c.566C>G	p.Pro189Arg
PPT1	Egzon 7	c.683T>G	p.Val228Gly
PPT1	Egzon 9	c.886T>C	p.Trp296Arg
PPT1	Egzon 9	c.914T>C	p.Leu305Pro



Slika 6. Shematski prikaz sekvence PPT1 gena 1p34.2 (gornja slika) i PPT1 enzima (donja slika) koji prikazuje pozicije mutacija na genu i posljedično promjene na enzimu (preuzeto: Kousi i sur., 2012)

1.1.5 Znakovi i simptomi

Klinički tijek klasičnog infantilnog tipa bolesti započinje u vrlo ranoj dobi i izrazito je progresivan. Simptomi nastupaju tijekom prve godine života, a kao prvi simptom već pri rođenju se uočava mikrocefalija. Javlja se kašnjenje u razvoju, mioklonski trzaji i česti napadaji. Odrastanjem ti simptomi postaju sve teži. Može se javiti i progresivni gubitak vida koji dovodi do sljepoće. U pravilu djeca umiru do 10.-e godine života (Glykys i Sims, 2017).

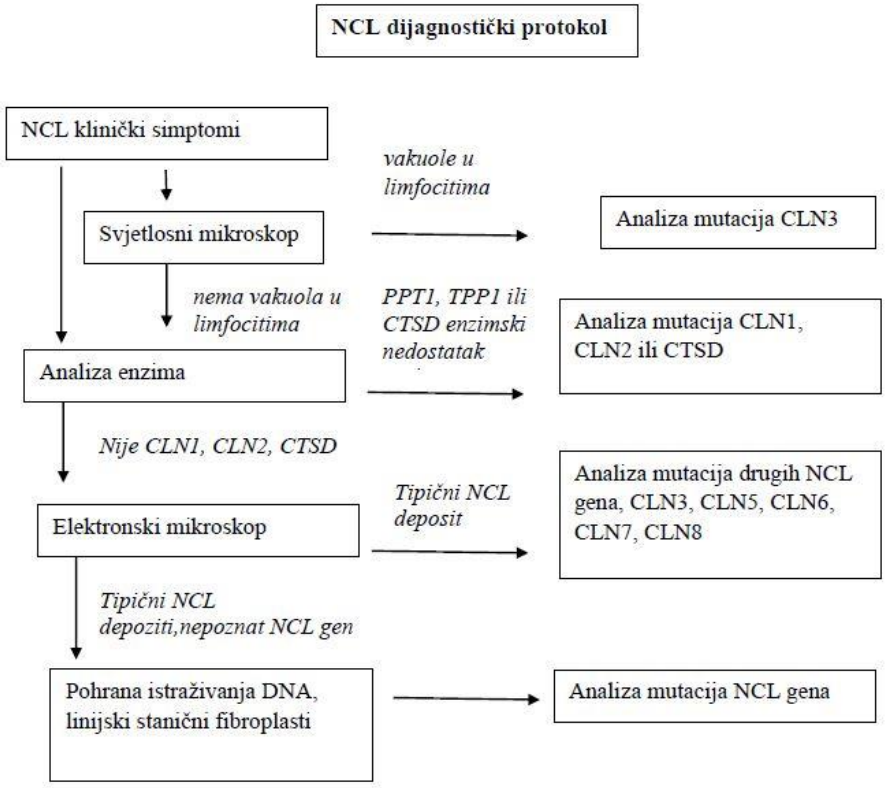
Postoje još 2 rjeđa oblika ove bolesti koji se javljaju u različitoj životnoj dobi bolesnika. Jedan od oblika je maloljetnički koji je sličan CLN3 bolesti. Simptomi bolesti su slični infantilnom obliku samo što nastupaju iza 5.-e godine života i nešto su manje progresivni. Odrasli oblik nastupa nakon 18.-e godine života, a simptomi koji se javljaju su pad psihijatrijskih i kognitivnih sposobnosti praćeni promjenama u vidu (uključuju vidne halucinacije), ekstrapiramidalni sindrom itd. Epileptični napadaji do sada nisu prijavljeni (Glykys i Sims, 2017). Razlog kasnije pojave bolesti je postojanje određene rezidualne aktivnosti enzima. To znači da će se određen dio supstrata enzima PPT1 razgraditi dok je za nakupljanje preostalog nerazgrađenog supstrata potreban određeni vremenski period te se stoga klinički simptomi ispoljavaju u kasnijoj životnoj dobi.

Najčešći lipopigmenti obrazac koji se uočava u CLN1 bolesti se nazivaju granulirani osmofilni depoziti (GROD-ovi) (Jalanko i Braulke, 2009) vidljivi pod mikroskopom kao autofluorescentna skladišta.

Kao što je ranije u radu spomenuto, zbog smanjene aktivnosti lizosomskog enzima, određene masti i pridruženi šećeri i proteini se ne mogu razgraditi. Oni se potom nakupljaju u živčanom i drugom tkivu i izgledaju pod elektronskom mikroskopijom kao da tvore autofluorescentna lizosomska skladišta, nazvana granulirani osmofilni depoziti (GROD-ovi) (Jalanko i Braulke, 2009). Najveći dio GROD-a čine sfingolipidni aktivatorski proteini, saposini A i D. Nakupljanjem uzrokuju propadanje (atrofiju) određenih područja mozga, neurološka oštećenja i druge karakteristične simptome.

1.1.6 Dijagnoza

Sama dijagnoza bolesti započinje postavljanjem anamneze te fizikalnim pregledom bolesnika. U diferencijalnu dijagnostiku se ubraja i laboratorijska dijagnostika. Definitivna dijagnoza se postavlja enzimskim testovima analize aktivnosti PPT1 iz uzorka izoliranih leukocita, u suhoj kapi krvi ili u kultiviranim fibroblastima. Molekularnim testovima se može potvrditi dijagnoza pronađenim mutacijama u genu za PPT1. U nekim situacijama dijagnoza može zahtijevati i mikroskopski pregled bioptata radi pronalaska karakterističnih nakupina lipopigmenata (https://rarediseases.org/).



Slika 7. Dijagnostički protokol za dijagnozu neuronalnih ceroidnih lipofuscinoza (preuzeto: https://www.ucl.ac.uk/)

Od laboratorijskih pretraga, moguće je i sekvencioniranje 1p34.2 PPT1 gena za otkrivanje vrsta mutacije (https://www.ggc.org/).

1.1.7 Liječenje

Liječenje CLN1 je danas još uvijek simptomatsko. Pacijentu je potreban čitav tim doktora, koji se sastoji od neurologa, pedijatra, kirurga, oftalmologa i raznih drugih specijalista. Bitna je i psihološka podrška pacijentu i cijeloj obitelji. Zato postoje razne udruge, poput NORD, koji pružaju potrebnu pomoć i informacije pacijentima.

Istraživačke terapije su dosta rijetke u ovakvim slučajevima zbog malog broja bolesnika i nemogućnosti testiranja potencijalnih lijekova na velikoj skupini bolesnika. U medicinskoj literaturi su stoga zabilježeni razni tretmani kao dio pojedinačnih izvještaja o slučajevima ili male serije pacijenata.

Postoji nekoliko različitih terapija koje se istražuju za liječenje neuronalnih ceroidnih lipofuscinoza, uključujući klasičnu infantilnu CLN1 bolest. Ove terapije uključuju gensku terapiju, nadomjesnu enzimsku terapiju, transplantaciju matičnih stanica hematopoeze i nekoliko lijekova (https://rarediseases.org/).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Infantilna neuronalna ceroidna lipofuscinoza (CLN1) je vrlo rijetka nasljedna bolest. Veoma je bitno pravovremeno otkriti ovu bolest kako bi se uvela odgovarajuća suportivna terapija i dijete imalo veće šanse preživjeti do pronalaska odgovarajućeg liječenja. Nažalost, danas još uvijek ne postoji efikasna ciljana terapija za ovaj tip CLN. Unatoč tome od velike je važnosti imati dobru i osjetljivu analitičku metodu pomoću koje će se razlučiti pacijent od zdrave populacije. Osim toga, nerijetko dolazi do preklapanja kliničke slike CLN1 i CLN2, pa je i pri svakoj sumnji na CLN2 bitno izmjeriti i aktivnost enzima PPT1 CLN1 bolesti.

Cilj rada je bio razviti fluorimetrijsku metodu za mjerenje aktivnosti PPT1 iz homogenata leukocita, te provjeriti referentne vrijednosti u našoj zdravoj populaciji.

3 MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 25 uzoraka (15 muških, 10 ženskih). 25 uzoraka je uzeto od zdravih ispitanika, koja su preostala nakon obrade u sklopu sistematskih pregleda (uz potpisan informirani pristanak).

3.2. Uzorci

Leukociti su izolirani iz uzoraka venske krvi vađene na EDTA antikoagulans u epruvete od 2 mL.

3.3. Načelo enzimske metode

Sve metode za određivanje enzimske aktivnosti se temelje na principu djelovanja enzima na svoj specifični supstrat (enzim ima ulogu katalizatora u stvaranju produkta), nakon čega se mjeri koncentracija nastalog produkta reakcije ili smanjenje koncentracije supstrata. Time se zapravo određuje brzina enzimske reakcije. Postoje dvije vrste metoda za određivanje enzimske aktivnosti.

Metoda mjerenja aktivnosti enzima palmitoil-protein tioesteraze 1 pripada skupini diskontinuiranih metoda određivanja enzima (metoda jedne točke). U toj metodi, biološki materijal u kojem se nalazi određeni enzim se inkubira zajedno sa supstratom određeno vrijeme, nakon čega se inkubacija prekida dodatkom reagensa koji inaktivira enzim te se potom određuje koncentracija nastalog produkta.

Biološki materijal koji se koristi je homogenat leukocita u kojima se nalazi enzim PPT1 koji se inkubira sa sintetskim supstratom 4-metilumbeliferil 6-tio-palmitat-β-D-glukopiranozid. Reakcija se zaustavlja puferom za prekidanje reakcije koji sadrži inhibitor 0,25M glicinski pufer, pH 10,4. Zatim se mjeri fluorescencija oslobođenog produkta 4-metilumbeliferona koja je proporcionalna aktivnosti enzima u uzorku.

3.4. Načelo metode spektrofluorimetrije

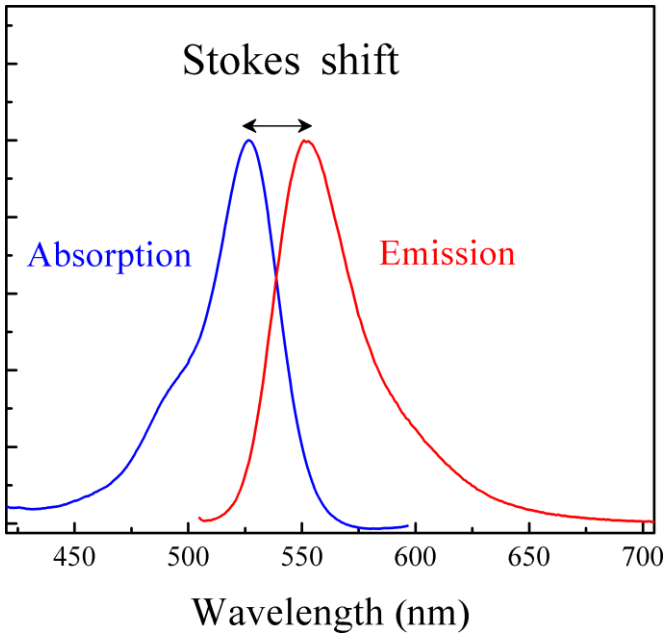
Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju između materije (tvari) i elektromagnetskog zračenja (https://en.wikipedia.org/, 2020). Spektroskopske metode dijelimo na apsorpcijsku i emisijsku spektroskopiju. Spektrofluorimetrija pripada emisijskoj spektroskopiji.

Spektrofluorimetrija je tehnika kojom se otkriva i analizira fluorescencija u uzorku. Fluorescencija je emisija svjetlosti iz tvari koja je apsorbirala svjetlost ili drugo elektromagnetsko zračenje (http://epgp.inflibnet.ac.in/). Snop svjetlosti (obično UV svjetlost) pobudi elektron u molekuli koja prelazi iz osnovnog stanja u ekscitirano stanje koje je više energije. Kada se elektron vraća u osnovno stanje, emitira fluorescenciju.

Za razliku od apsorpcijske spektrofotometrije gdje mjerimo smanjenje intenziteta svjetlosti, spektrofluorometrijom mjerimo pojavu svjetlosti druge valne duljine, tj. mjerimo razliku od intenziteta nula, do neke određene vrijednosti što omogućava puno veću točnost.

Vrlo važno svojstvo spektrofluorimetrije jest mogućnost mjerenja intenziteta emitirane fluorescencije pri vrlo malim koncentracijama uzoraka. Često su dovoljne koncentracije reda 10^{-6} mg/mL.

Pomoću vanjskog izvora zračenja se pobude elektroni u molekuli. Pobuđeni elektroni prijeđu u ekscitirano stanje veće energije te se tamo nalaze u više vibracijskih stanja. Određeni dio energije se gubi kao toplina (tzv. ne-radijacijski prijelaz) sve dok elektroni u molekuli ne dostignu najnižu vibracijsku razinu ekscitiranog stanja. Zatim dolazi do radijacijskog prijelaza pri kojem elektroni prelaze iz ekscitiranog stanja u osnovno stanje pri čemu emitiraju svjetlost veće valne duljine, tj. niže energije. Taj fenomen se naziva Stokesov pomak. Trajanje ekscitiranog stanja je u pravilu 1-10 nsec.

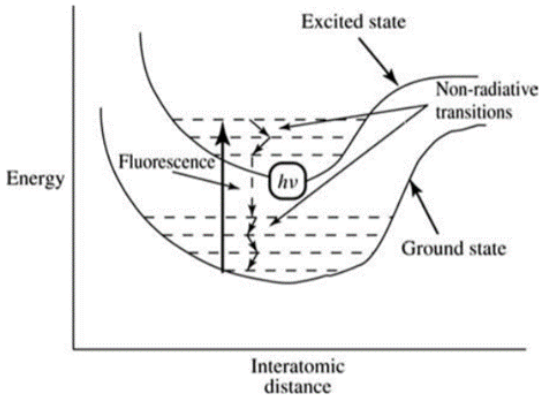


Slika 8. Grafički prikaz Stokesov-a pomaka (pruzeto: https://en.wikipedia.org/)

Tijekom radijacijskog prijelaza, elektroni molekule se mogu spustiti (prijeći) u bilo koji od nekoliko vibracijskih razina u osnovnom stanju, što će rezultirati time da će emitirani fotoni imati različite energije, te stoga i različite frekvencije. Vidljivi dokaz fluorescencije je kada je apsorbirano zračenje u ultraljubičastom području (nevidljivo ljudskom oku) elektromagnetskog spektra, a emitirana svjetlost je u vidljivoj regiji. Sličan fenomen pojavljuje se u nekim atomskim ili molekularnim vrstama.

Fluorescenciju pokazuju samo neke molekule te neki kristali. Važno je da se vibracijska stanja osnovnog elektronskog stanja ne miješaju s vibracijskim stanjima pobuđenog elektronskog stanja, jer bi inače bila omogućena neradijativna relaksacija (tj. izostanak fluorescencije) skroz do osnovnog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja.

Kromofor je nezasićena atomska skupina u molekuli koja uzrokuje obojenost organskih spojeva (apsorbira UV zračenje, a emitira zračenje u području vidljivog spektra), na primjer skupina s nizom konjugiranih dvostrukih veza među ugljikovim atomima (–C=C–C=C–), karbonilna skupina (>C=O), nitrozo-skupina (–N=O), nitro-skupina ($–NO_2$), azo-skupina (–N=N–) i slično. Kromofore koje pokazuju fenomen fluorescencije nazivaju se fluori ili fluorofore.

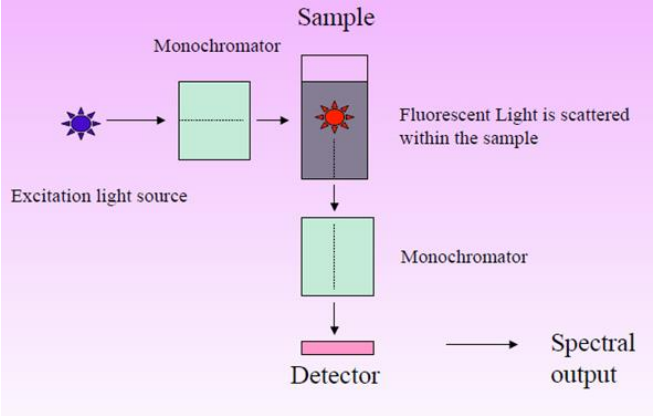


Slika 7. Fizikalna osnova fluorescencije (preuzeto: Sheehan, 2009)

Idealne fluorofore su male, hidrofilne molekule sa većom valnom duljinom u emisijskom spektru, većim Stokesovim pomakom, većim ekscitacijskim koeficijentom i višom kvantnom efikasnošću. Takve molekule su idealne za detektiranje metodom fluorescencije. Fluorofore tipično sadrže nekoliko kombiniranih aromatskih skupina, mogu biti planarne ili cikličke molekule sa nekoliko π veza.

3.4.1. Spektrofluorimetar

Spektrofluorimetar je instrument koji služi za mjerenje fluorescencije.



Slika 9. Princip rada spektrofluorimetra (preuzeto: https://chemistry-dictionary.yallascience.com/)

Spektrofluorimetar sadrži izvor svjetlosti, dva monokromatora, držač uzorka i detektor (https://chemistry-dictionary.yallascience.com/). Ekscitacijski monokromator služi za odabir točno određene valne duljine koja će proći kroz uzorak iz izvora svjetlosti, a drugi, emisijski monokromator služi za odabir određene valne duljine koja će doći do detektora iz uzorka. Detektor se nalazi na 90 stupnjeva od izvora zračenja (snopa ekscitacije). Izvor svjetlosti može biti npr. ksenonska žarulja koja emitira zračenje u UV, vidljivom spektru i spektru blizom infracrvenom zračenju. Svjetlo se pomoću optičkog sustava usmjerava na ekscitacijski monokromator, koji omogućava odabir točno određene valne duljine.

Ekscitirana svjetlost zatim prolazi kroz komoru s uzorkom koja se nalazi u fluorescentnoj kiveti. Koristi se posebna kiveta s četiri prozirne strane od kremena ili stakla. Kad pobuđena svjetlost udari na ćeliju uzorka, molekule u otopini se pobuđuju, te će neke emitirati svjetlost. Svjetlost emitirana pod pravim kutevima u odnosu na nadolazeću zraku se analizira pomoću emisijskog monokromatora. Monokromator analizatora usmjerava emitiranu svjetlost odabrane valne duljine na detektor. Analiza valne duljine emitirane svjetlosti vrši se mjerenjem intenziteta fluorescencije na odabranoj valnoj duljini. Fotomultiplikatorska cijev služi kao detektor za mjerenje intenziteta svjetlosti.



Slika 10. Varyan Carry Eclipse spektrofluorimetar

3.5. Instrumenti

- vodena kupelj
- ultrazvučni homogenizator
- spektrofluorimetar (*Varyan Carry Eclipse Spectrophotometer*)
- spektrofotometar (*CamSpec*)
- vaga
- automatske pipete različitih volumena (*Eppendorf pipete*)
- stakleno laboratorijsko posuđe
- plastično laboratorijsko posuđe
- mješalica
- vorteks (*Bio Vortex VI, Biosan*)
- centrifuga 5417R (*Eppendorf*)
- pH-metar
- sonikator
- vodena kupelj (*Memmert WNB 14*)

- centrifuga (*MPW-223E*)

3.6 Kemikalije i reagensi

- 0,15 mmol/L amonijev klorid (Merck A761045 704, Mr 53,49 g/mol)
- 0,01 mol/L kalij hidrogen karbonat (Kemika 1116707, Mr 100,12 g/mol)
- 0,1 mmol/L EDTA (Kompleksal III, Kemika 1136808, Mr 372,24 g/mol)
- Triton X-100 (Sigma T – 9284, 0,25%)
- DC PROTEIN ASSAY (Bio Rad) – Reagens A, Reagens S, Reagens B
- Radni reagnes A za uzorke koji sadrže Triton X-100
- protein standard II (bovine serum albumine) (Bio Rad)
- 200 mM limunska kiselina Merck 100244, Mr 210,14 g/mol)
- 400 mM natrij hidrogenfosfat (Merck 106586, Mr 141,96 g/mol)
- natrij azid (Sigma S-2002, Mr 65,01 g/mol)
- kloroform/metanol 2:1
- 3,4 mM supstrat 4-MU 6-tio-palmitat-β-D-glukopiranozid (Carbosynth EMO6650, Mr 592,78 g/mol)
- 2500 U β-glukozidaza iz badema (Sigma G-0395)
- redestilirana voda
- BSA (goveđi albumin, ICN Biomedicals, 105033)
- NaCl (Merck 106404, Mr 58,44 g/mol)
- Triton X-100 (Sigma X-100)
- DTT (DL-ditiotreitol, Sigma D-0632, Mr 154,32 g/mol)
- STOP otopina (NaOH + Gly, pH 10,4)
- 4-metilumbeliferon

3.7. Priprema reagenasa

3.7.1. Reagens 1. Supstratni pufer: citrat-fosfat 100-200 mM pH 4,0, 0,02% (w/v) natrij azid

Odvaže se 4,20 g limunske (citratne) kiseline te se doda voda do 100 mL (otopina A). U drugom koraku se odvaže 5,68 g Na_2HPO_4 i doda voda do 100 mL u tikvicu (otopina B). U završnom koraku se pomiješaju 30,7 mL otopine A i 19,3 mL otopine B te se u tu otopinu doda 20 mg natrij azida. pH se prilagodi pomoću pH-metra na 4,0 te se konačnu otopinu dovede do volumena od 100 mL dodatkom vode u odmjernu tikvicu.

3.7.2. Reagens 2. Kloroform/metanol 2:1 (svježe pripremljen)

Pomiješa se 10 mL kloroforma s 5 mL metanola u staklenoj tikvicu s poklopcem.

3.7.3. Reagens 3. 4-MU 6-tio-palmitat-b-D-glukopiranozid, 3,4 mM – supstrat

Odvaže se 3,9 mg supstrata i otopi ga se u 1,95 mL pripremljene otopine kloroform/metanol 2:1 u staklenoj tikvici s poklopcem. Uzme se 150 μL alikvota u staklene mikroepruvete i upari do suha (uparivač s dušikom). Skladišti se na 4°C.

3.7.4. Reagens 4. 100 U/mL b-glukozidaza iz badema

Otopi se 2500 U β-glukozidaze u 25 mL vode. Napravi se 10x100 μL i 24x1 mL alikvota. Skladišti se na -80°C.

3.7.5. Reagens 5. 0,02% natrij azid (w/v)

Otopi se 20 mg natrij azida u 100 mL vode. Skladišti se na 4°C.

3.7.6. Reagens 6. 10% BSA u 0,02% natrij azida

Otopi se 1 g BSA (goveđeg albumina) u 10 mL reagensa 5 (0,02% natrij azid (w/v)). Otopina se inaktivira na 10 min na 45°C u termobloku. Skladišti se na 4°C.

3.7.7. Reagens 7. 0,02% natrij azida / 0,9% NaCl

Otopi se 9,29 mg NaCl-a u 10,32 mL reagensa 5 (0,02% natrij azid (w/v)). Skladišti se na 4°C.

3.7.8. Reagens 8. 5% Triton X-100 u kloroform/metanol 2:1 (svježe pripremljen)

Pipetira se 50 μL Triton X-100 i otopi u reagensu 2 (svježe pripremljena otopina kloroform/metanol 2:1) u staklenoj tikvici.

3.7.9. Reagens 9. 0,2% BSA / natrij azid / NaCl (svježe pripremljen)

Pipetira se 30 μL reagensa 6 (10% BSA u 0,02% natrij azida) i otopi u 1,47 mL reagensa 7 (0,02% natrij azida / 0,9% NaCl).

3.7.10. Reagens 10. 33 mM DTT u 0,2% BSA / natrij azid/ NaCl (svježe pripremljen)

Odvaže se 5,1 mg DTT-a i otopi u 1 mL reagensa 9 (svježe pripremljena otopina 0,2% BSA / natrij azid / NaCl). Tako pripremljeni reagens se vorteksira.

3.7.11. Reagens 11. Supstrat 4-MU 6-tio-palmitat-b-D-glukopiranozid 0,64mM

1) Prirede se 2 mikroepruvete od 150 mL reagensa 3

2) Doda se 60 L reagensa 8, vorteksira i upari do suha (uparivač s dušikom)

3) Doda se 400 μL pufera (reagens 1) točki 2 i vorteksira. Provjeri se je li prozirno, a ako nije, sonificira se 10 min. Ako je mutno, odbaci se.

4) Otopi se jedan alikvot od 100 mL reagensa 4 i ostavi na 4°C.

5) Doda se 900 μl reagensa 10 u točku 4. Vorteksira se.

6) Doda se 400 μL točke 5 u svaku mikroepruvetu točke 3. Vorteksira se. Provjeri se je li prozirno, a ako nije, sonificira se 10 min. Ako je mutno, odbaci se.

3.8. Postupak

3.8.1. Izolacija i homogenizacija leukocita iz pune krvi

Leukociti se izoliraju iz pune krve izvađene na EDTA. Sadržaj epruvete se lagano promiješa. Zatim se centrifugira 10 minuta na 4000 okretaja na sobnoj temperaturi. U epruveti dolazi do raspodjele uzorka u 3 sloja. U donjem sloju se nalaze eritrociti, u sredini tzv. „buffy coat“ u kojem se nalaze leukociti i u gornjem sloju plazma. Nakon centrifugiranja, pasterkom se odvoji plazma u bocu za biološki otpad. Leukocitni prsten potom kružnim pokretom pokupimo i prenesemo u čistu epruvetu od 15 mL. Doda se 10 mL otopine za lizu te dobro promiješa. Epruveta se potom ostavi u zamrzivaču na -20°C na 15-20 minuta dok se uzorak ne smrzne. Sadržaj epruvete se potom naglo odmrzne u mlakoj vodi, centrifugira 10 minuta na 4000 okretaja. Supernatant se izlije i ponovi se postupak dodavanja 10 mL otopine za lizu, smrzavanja i odmrzavanja uzorka. Uzorak se centrifugira 10 minuta na 4000 okretaja. U epruveti ostanu čisti leukociti. Izolirani leukociti su spremni za homogeniziranje. Ako se ne uzimaju odmah u postupak, mogu se čuvati na -70°C do 3 mjeseca.

Tijekom cijelog postupka homogenizacije, leukociti moraju biti na hladnoj podlozi. Na izolirane leukocite dodaje se otopina Tritona-X100 za homogenizaciju (dodaje se ovisno o količini leukocita od 200 do 400µL). Uzorak se homogenizira u ultrazvučnom homogenizatoru. Homogenat se prenese u mikroepruvetu sa sigurnosnim čepom od 1,5 mL i centrifugira na 12000 okretaja kroz 5 minuta na +4°C. Supernatant se prenese u novu mikroepruvetu sa sigurnosnim čepom od 2mL, a talog bacimo. Tako priređen homogenat spreman je za mjerenje koncentracije proteina i aktivnosti lizosomskih enzima. Ako se ne koristi odmah, homogenat se može čuvati na -70°C do 3 mjeseca.

3.8.2. Mjerenje proteina u uzorcima izoliranih leukocita

Na 1 mL reagensa A se doda 20 µL reagensa S (radna otopina stabilna je tjedan dana u hladnjaku). U jednu plastičnu kiveticu za jednokratnu uporabu pipetira se 20 µL standarda (1,48 mg/mL), 100 µL reagensa A i 800 µL reagensa B. U ostale plastične kivetice za jednokratnu uporabu pipetira se 20 µL uzorka, 100 µL reagensa A i 800 µL reagensa B. Uzorke treba odmah

dobro vorteksirati. Zatim se ostave 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se mjeri apsorbancija uzorka na 750 nm na spektrofotometru. Spektrofotometar je prvo potrebno nulirati sa praznom kivetom. Reakcija je stabilna sat vremena, no treba očitati apsorbanciju uzorka odmah nakon 15 minuta.

Koncentracija ukupnih proteina se računa prema formuli:

$$\frac{\text{apsorbancija uzorka}}{\text{apsorbancija standarda}} \times \text{koncentracija standarda } 1{,}48 \text{ mg/mL}$$

Za mjerenje katalitičke aktivnosti enzima koncentracija proteina u homogenatu mora se kretati od 1,0 – 3,0 mg/mL.

3.8.3. Priprema reagenasa neposredno prije rada

Reagens 8. (poglavlje 3.7.8.) 5% Triton X-100 u kloroform/metanol 2:1

1) 50 mg Triton X-100 (Sigma X-100)

2) 1 mL kloroform/metanol 2:1 (reagens 2)

Pipetira se 50 uL Triton X-100 i otopi u reagensu 2 u staklenoj tikvici. (reagens 8)

Reagens 9. (poglavlje 3.7.9.) 0,2% BSA / natrij azid / NaCl

1) 30 uL reagensa 6

2) 1,47 mL reagensa 7

Pipetira se 30 μL reagensa 6 i otopi u 1,47 mL reagensa 7. (reagens 9)

Reagens 10. (poglavlje 3.7.10.) 33 mM DTT u 0,2% BSA / natrij azid/ NaCl

1) 5,1 mg DTT (DL-ditiotreitol, Sigma D-0632, MW=154,32)

2) 1 mL reagens 9

PRIPREMA: odvaže se 5,1 mg DTT-a i otopi u 1 mL reagensa 9. Vorteksira se. (reagens 10)

3.8.4. Postupak

U niz epruveta za spektrofluorimetrijsko mjerenje se pipetiraju sljedeće otopine:

1. Pipetirati 20 μL uzorka (1,5-2 mg/mL proteina) u duplikatu.

2. Pipetirati 20 μL ultra čiste vode koja nam služi kao slijepa proba u duplikatu.

3. Pipetirati 60 µL standarda 4-MU (metilumbeliferon)

4. Pipetirati 40 µL supstrata u sve uzorke i slijepe probe

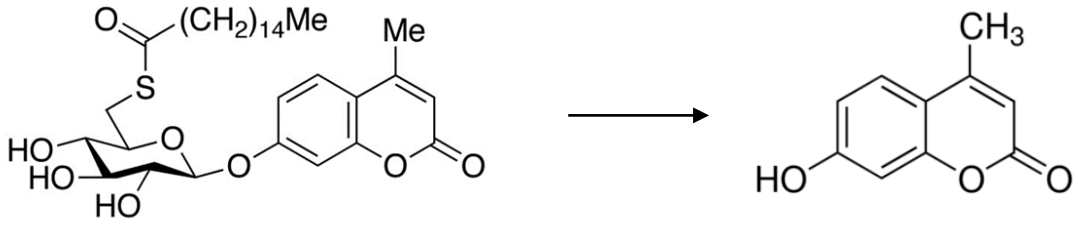
5. Inkubirati 1h na 37°C uz miješanje.

6. Zaustaviti reakciju sa 600 µL pufera za zaustavljanje koji sadrži inhibitor 0,25M glicin pufer pH 10,4 u sve uzorke, slijepe probe i kalibracijsku krivulju.

7.Nakon zaustavljanja reakcije, očitati fluorescenciju

3.8.5. Pripravljanje standarda 4-metilumbeliferona (4-MU)

4-metilumbeliferil 6-tio-palmitat-β-D-glukopiranozid je fluorogeni supstrat palmitoil-protein tioesteraze-1 (PPT1, znan i kao CLN1). 4-metilumbeliferil 6-tio-palmitat-β-D-glukopiranozid je kidan enzimom PPT i oslobađa fluorescentni dio 4-metilumbeliferon (4-MU).



Slika 11. Shematski prikaz nastajanja fluorescentnog 4-MU iz supstrata nakon djelovanja enzima

1. Karbonatni pufer 0,20 M – glicin 0,32 M, pH 10,0

1) Natrij karbonat anhidrid (Merck, 6392, Mr 105,99 g/mol)

2) Glicin (Merck, 4201, Mr 75,07)

Izvažu se 10,6 g natrij karbonat anhidrida i 12 g glicina. Pomiješaju se i otope u posušenoj čaši u 200 mL redestilirane vode. pH se namjesti na 10,0 sa 2 M NaOH. Smjesa se dovede do 500 mL u volumetrijskoj čaši.

2. NaOH

Izvaže se 8 g NaOH i otopi u redestiliranoj vodi. Dovede se smjesa do konačnog volumena sa redestiliranom vodom u 100 mL volumetrijskoj čaši.

3. Standardna stock otopina 4-metilumbeliferona (4-MU)

Izvaže se 4-MU. Otopi se u karbonatnom puferu u staklenoj posudi. Dovede se do konačnog volumena u volumetrijskoj čaši od 250 mL. Naprave se alikvoti od 150 μL i skladište na -20°C.

4. Standardna radna otopina

Razrijedi se 1/100 stock otopine u karbonat-glicinskom puferu. Pomiješaju se 100 μL standardne stock otopine i 10 mL karbonat-glicinskog pufera.

3.8.6. Uvjeti očitavanja na spektrofluorimetru

- Ekscitacijski filter: 355 nm
- Emisijski filter: 460 nm
- Ekscitacijski slit: 5 nm
- Emisijski slit: 5 nm
- Voltaža: 560 V

Osjetljivost mjerenja se može podešavati mijenjanjem vrijednosti voltaže. Ukoliko je voltaža veća, veća je i osjetljivost mjerenja fluorescencije. Širina ekscitacijskog i emisijskog slita mjera je veličine prozora u kojem se odvija mjerenje fluorescencije.

3.8.7. Fluorimetrijsko očitanje rezultata

Prvo je očitana slijepa proba u duplikatu, zatim standard u duplikatu te nakon toga svaki uzorak pojedinačno u duplikatu.

3.8.8. Račun

$$U/L\ (nmol/sat/mg\ proteina) = \frac{(FI-u\ -FI-b)}{FI-st} \times \frac{60}{vrijeme\ inkubacije} \times \frac{1000}{konc.proteina \times volumen}$$

FI-u = očitana fluorescencija uzorka

FI-st = očitana fluorescencija standarda

FI-b = očitana fluorescencija slijepe probe

Uz $C_{standarda}$ = 5µM

4. REZULTATI I RASPRAVA

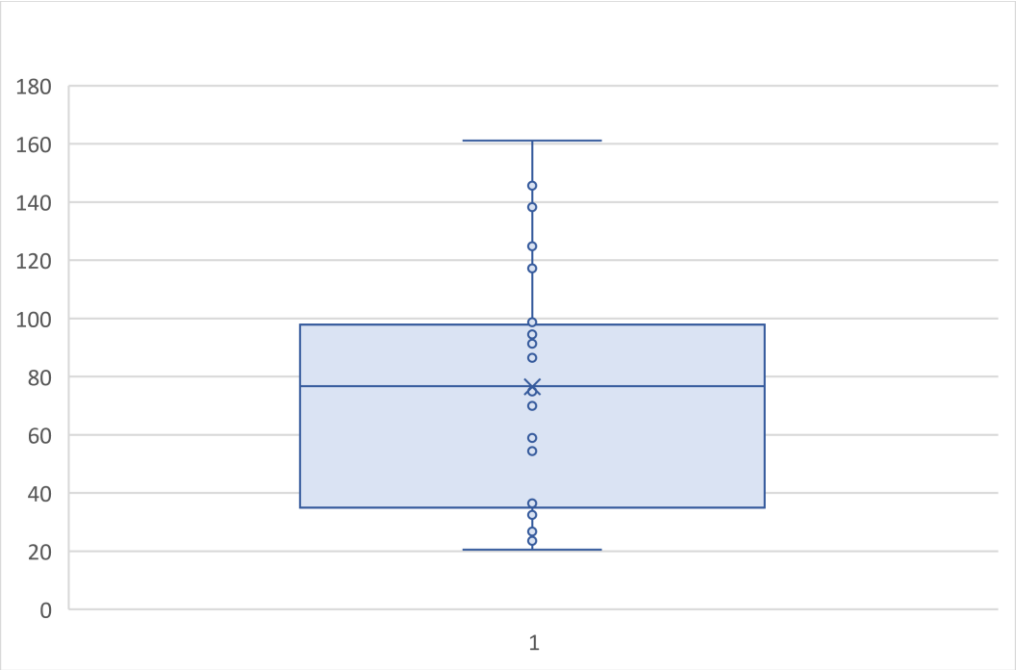
4.1. Rezultati mjerenja

Tablica 5. Izmjerene koncentracije proteina, apsorbancije i aktivnosti enzima PPT1 u uzorcima leukocita.

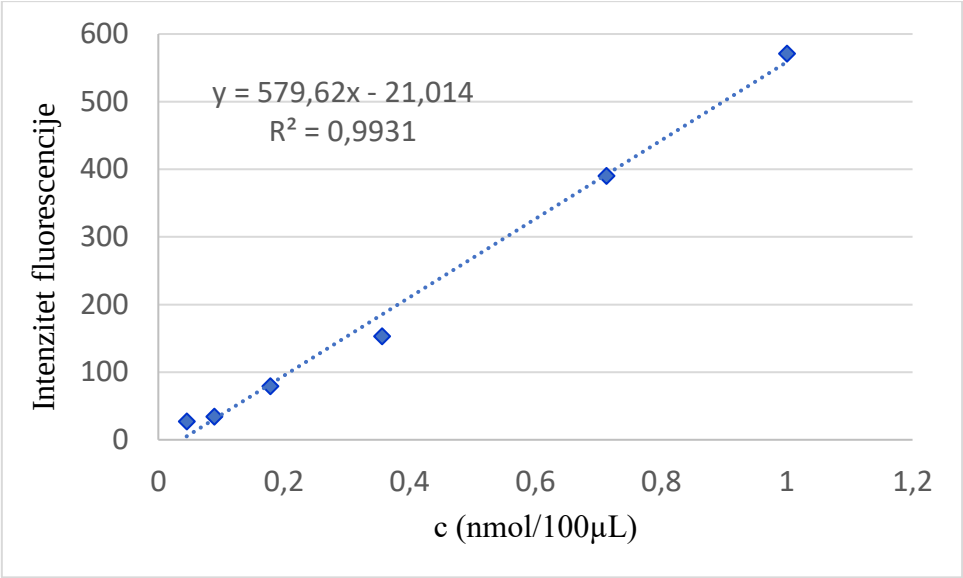
Broj uzorka	Koncentracija proteina (mg/mL)	Intenzitet fluorescencije PPT1	Aktivnost PPT1 (nmol/sat/mg proteina)
1.	1,62	218,74	38,14
2.	1,67	208,66	36,38
3.	1,74	192,67	33,60
4.	1,51	134,82	23,51
5	1,75	186,08	32,45
6.	2,06	924,00	161,12
7.	1,47	337,94	58,93
8.	1,34	715,93	124,83
9.	1,72	541,89	94,49
10.	1,92	835,06	145,61
11.	1,62	566,09	98,71
12.	1,89	792,71	138,22
13.	1,96	672,11	117,12
14.	1,81	532,08	92,78
15.	1,98	556,17	96,98
16.	1,95	523,83	91,34
17.	1,65	401,05	69,93
18.	2,02	495,67	86,43
19.	1,81	439,89	76,70
20.	1,88	526,80	91,86
21.	1,77	158,23	27,60
22.	1,88	117,66	20,52
23.	1,66	153,07	26,70
24.	1,67	312,09	54,42
25.	2,15	429,41	74,88

Tablica 6. PPT1 aktivnost enzima u leukocitima (nmol/sat/mg proteina) u zdravih ispitanika

	Zdravi ispitanici (n=25)
Mean ± SD	82,05 ± 40,66
Minimum	20,52
Maksimum	161,12



Slika 12. Aktivnost enzima PPT1 u leukocitima (nmol/sat/mg proteina) u zdravih ispitanika



Slika 13. Prikaz kalibracijske krivulje standarda 4-MU

Tablica 7. Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji standarda

c (nmol/100µL)	Intenzitet fluorescencije
0,045	27
0,089	34
0,178	79
0,356	153
0,713	390
1	571

4.2. Rasprava

U ovom radu su prikazani rezultati mjerenja aktivnosti enzima palmitoil-protein tioesteraze 1 (PPT1) *in house* fluorimetrijskom metodom u homogenatu izoliranih leukocita.

Za provođenje analize, enzim palmitoil-protein tioesteraza 1 (PPT1) izolirana je iz homogenata leukocita. Leukociti su izolirani iz 25 uzoraka zdrave populacije u epruvetu sa EDTA antikoagulansom. Nizom fizikalno-kemijskih postupaka (centrifugiranje, odvajanje sloja sa leukocitima, provođenje lize, smrzavanje i odmrzavanje, dekantiranje) se dobio homogenat leukocita. Tako pripremljeni homogenati leukocita su spremni za analizu aktivnosti PPT1 enzima.

Supstrat za navedeni enzim zaprimljen je u čvrstom staju te ga se nizom fizikalno-kemijskih postupaka prevelo u stanje pogodno za ispitivanje aktivnosti PPT1. Djelovanjem enzima na supstrat, dobiven je produkt 4-MU čiji se intenzitet fluorescencije mjerio na 460 nm. Cjelokupna analiza aktivnosti enzima palmitoil-protein tioesteraze 1 (PPT1) provedena je fluorimetrijski, mjerenjem intenziteta fluorescentnog signala dobivenog produkta, 4-MU, na 460 nm.

Provedeno je i mjerenje već priređenog standarda, 4-MU pri različitim koncentracijama i iz njega se napravila kalibracijska krivulja.

Korelacijski koeficijent R^2 = 0,9931, pokazuje zadovoljavajuću linearnost mjerenja intenziteta fluorescencije u području koncentracije standarda 0,045 do 1,000 (nmol/100μL).

Prije svakog mjerenja napravljena je analiza slijepe probe za provjeru rada instrumenta i uzorka u kojem su bile prisutne sve komponente osim enzima.

Izmjerena je i aktivnost kontrolnog enzima, β-heksominidaze A. Aktivnosti tog enzima su u referentnom intervalu. Taj podatak pokazuje da su uzorci kvalitetno izolirani.

Referentni interval dobivenih rezultata je određen aritmetičkom sredinom ± standardna devijacija na malom broju ispitanika (n=25). U prikazanom analitičkom postupku dobiven je nešto širi raspon vrijednosti aktivnosti PPT1. Statističkom metodom aritmetičke sredine procjenjuje se referentna vrijednost aktivnosti PPT oko 82 ± 41 nmol/sat/mg proteina za zdrave jedinke.

U literaturi do danas nije opisana razlika u referentnim intervalima ovisno o dobi i spolu.

Pogreške koje mogu utjecati na dobivene rezultate usko su vezane uz puno koraka koji se primjenjuju tokom pripreme uzorka.

U ovoj i sličnim *in house* analizama, neophodno je iskustvo stečeno unutar pojedinog laboratorija za procjenu kritičnih parametara tijekom analize kao i za interpretaciju rezultata.

Zbog visoke specifičnosti cjelokupnog *in house* postupka razvijenog unutar pojedinog laboratorija, vrijednosti aktivnosti enzima nisu apsolutne i ne uspoređuju se između laboratorija. Referentne vrijednosti za zdrave pojedince se stoga definiraju unutar pojedinog laboratorija.

Kao primjer može se navesti studija provedena u Argentini, gdje je analizom aktivnosti PPT1 na zdravoj populaciji dobivena aktivnost 24 ± 11 nmol/h/mg proteina, za razliku od vrijednosti dobivenih u našem laboratoriju koja iznosi 82 ± 41 nmol/h/mg proteina (R.Kohan i sur., 2015.). Studija u Argentini je napravljena na 86 pojedinaca, PPT1 je analiziran iz homogenata leukocita, a kao supstrat je također korišten 4-metilumbeliferil 6-tio-palmitat-β-D-glukopiranozid.

Bitno je napomenuti da referentni intervali ovise i o vrsti uzorka u kojem se određuje aktivnost enzima PPT1 te bi sukladno tome svaki tip uzorka trebao imati svoj referentni interval za aktivnost PPT1.

Primjenom *in house* metode, laboratorij u kojem se vrši analiza jasno razlikuje rezultate aktivnosti PPT1 enzima kod zdravih i bolesnih pacijenata i na taj način uspostavlja dijagnozu.

5. ZAKLJUČAK

- Aktivnost enzima PPT1 u homogenatu leukocita može se određivati fluorimetrijskom metodom.
- Pouzdanost metode uvelike ovisi o predanalitičkom procesu koji obuhvaća izolaciju leukocita, pripremu homogenata leukocita, mjerenje koncentracije proteina te pripremu niza komponenti koje čine supstrat.
- Fluorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima PPT1 je samo jedna od mogućih dijagnostičkih metoda u procesu dijagnostike CLN1. Svaka snižena aktivnost izmjerena u homogenatu leukocita mora se potvrditi odgovarajućom analizom CLN1 gena.
- Uz svako provedeno mjerenje aktivnosti PPT1 potrebno je izmjeriti kontrolni enzim radi provjere kvalitete uzorka (bilo koju lizosomsku hidrolazu).
- Za veću točnost postavljanja referentnog intervala aktivnosti PPT1, potrebno je provesti analizu na većem broju uzoraka u dječjoj i odrasloj dobi.
- U literaturi do danas nije opisana razlika u referentnim intervalima ovisno o dobi i spolu.

6. LITERATURA

1. Ashkenazi Jewish Genetic Panel (AJGP), 2019., https://www.uofmhealth.org/health-library/tv7879, pristupljeno: 15.08.2020.

2. Bellizzi III JJ, Widom J, Kemp C, Lu JY, Das KA, Hofmann LS, Clardy J. The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97, 4573-4578.

3. Bekri S. Laboratory diagnosis of lysosomal storage diseases. U: Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassman G, urednici, Oxford Pharmagenesis, England, 2006.

4. Classic infantile CLN1 disease, 2017., https://rarediseases.org/rare-diseases/santavuori-disease/, pristupljeno: 05.07.2020.

5. CLN1 mutation table, 2017., https://www.ucl.ac.uk/ncl//CLN1mutationtable.htm, pristupljeno: 12.08.2020.

6. FAQs About Rare Diseases, 2017., https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/pages/31/faqs-about-rare-diseases, pristupljeno: 05.05.2020.

7. Ferreira RC, Gahl AW. Lysosomal storage diseases. *Translational Science of Rare Diseases*., 2017, 2, 1–71.

8. Fumić K, Barić I, Mrsić M, Maradin M. Lizosomske bolesti nakupljanja – suvremena dijagnostika i nove mogućnosti liječenja. *Paediatr Croat*, 2004, 48, 160-168.

9. Glykys J, Sims KB. The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Disorders. U: Swaiman's pediatric neurology: principles and practice 6th Edition. Swaiman K, Ashwal S, Ferriero D, Schor N, Finkel R, Gropman A, Pearl P, Shevell M, urednici, Elsevier, 2017, str. 960-987.

10. Hawkins-Salsbury JA, Cooper JD, Sands MS. Pathogenesis and therapies for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (infantile CLN1 disease). *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(11), 1906–1909.

11. Inherited metabolic disorders, 2018., https://www.webmd.com/a-to-z-guides/inherited-metabolic-disorder-types-and-treatments#1, pristupljeno: 05.06.2020.

12. Instrumentation of Fluorescence Spectroscopy (spectrofluorometer) and process, 2013., https://chemistry-dictionary.yallascience.com/2013/09/instrumentation-of-fluorescence.html, pristupljeno: 16.04.2020.

13. Introduction. U: Rare diseases and orphan products: accelerating research and development. Institute of Medicine (US) Committee on Accelerating Rare Diseases Research and Orphan Product Development, Field MJ, Boat TF, Washington (DC), National Academies Press, 2010, str. 15-40.

14. Jalanko A, Braulke T. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793, 697-709.

15. Kohan R, Pesaola F, Guelbert N, Pons P, Oller-Ramirez AM, Rautenberg G, Becerra A, Sims K, Xin W, Cismondi AI, Noher de Halac I. The neuronal ceroid lipofuscinoses program: A translational research experience in Argentina. *BBA – Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852, 2301-2311.

16. Kousi M, Lehesjoki AE, Mole ES. Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Human Mutation*, 2012, 33, 42-63.

17. Lysosomal Storage Disorders, 2006., https://rarediseases.org/rare-diseases/lysosomal-storage-disorders/, pristupljeno: 07.07.2020.

18. Martín-Banderas L, Holgado AM, Durán-Lobato M, Infante JJ, Álvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M. Role of nanotechnology for enzyme replacement therapy in lysosomal diseases. A focus on Gaucher's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 2016, 23, 929-952.

19. NCL1, How mutations to PPT1 cause NCL1, 2012., http://bisc423ncl.blogspot.com/2012/05/ncl1.html, pristupljeno: 08.08.2020.

20. NCL diagnostic protocol, 2007., https://www.ucl.ac.uk/ncl/NCLdiagnosticprotocolv3.pdf, pristupljeno: 05.08.2020.

21. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Type 1 (CLN1) : PPT1 Sequencing, 2020., https://www.ggc.org/test-finder-item/neuronal-ceroid-lipofuscinosis-type-1-cln1-ppt1-sequencing, pristupljeno: 07.08.2020.

22. Orphan lijekovima, 2013., http://www.orpha.net/national/HR-HR/index/o-orphan-lijekovima/, pristupljeno: 10.08.2020.

23. Palmitoyl protein thioesterase, 2020., https://proteopedia.org/wiki/index.php/Palmitoyl_protein_thioesterase#Hydrophobic_Groove, pristupljeno: 11.08.2020.

24. PPT1 gene, 2020., https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PPT1#conditions, pristupljeno: 25.08.2020.

25. PPT1, 2020., https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PPT1#location, pristupljeno: 11.08.2020.

26. Profile of rare diseases. U: Rare diseases and orphan products: accelerating research and development. Institute of Medicine (US) Committee on Accelerating Rare Diseases Research and Orphan Product Development, Field MJ, Boat TF, , Washington (DC), National Academies Press, 2010, str. 41-72.

27. PUIU M, Dan D. Rare diseases, from European resolutions and recommendations to actual measures and strategies. *Mædica* (Buchar), 2010, 5, 128–131.

28. Rare disease, 2020., https://en.wikipedia.org/wiki/Rare_disease, pristupljeno: 05.05.2010.

29. Guerrero BR, Salazar D, Tanpaiboon P. Laboratory diagnostic approaches in metabolic disorders. *Annals of Translational Medicine,* 2018, 6, 470.

30. Sheehan D. Physical Biochemistry: principles and applications. John Wiley & Sons Ltd, 2009, str.66.

31. Spectrofluorimetry, http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S000002BI/P001354/M021514/ET/1501756853ET.pdf, pristupljeno: 16.04.2020.

32. Spectroscopy, 2020., https://en.wikipedia.org/wiki/Spectroscopy, pristupljeno: 09.08.2020.

33. Stokes shift, 2020., https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift, pristupljeno: 12.08.2020.

7. SAŽETAK

Neuronalne ceroidne lipofuscinoze su skupina genetski nasljednih lizosomskih neurodegenerativnih bolesti karakteriziranih unutarstaničnim nakupljanjem skladišnog materijala autofluorescentnog lipopigmenta koji uzrokuje progresivnu neurološku degeneraciju u svim dobnim skupinama. Pripadaju skupini lizosomskih poremećaja nakupljanja. Klinički tijek uključuje progresivnu demenciju, napadaje, progresivno zatajenje vida (osim u obliku koji se javlja u odrasloj dobi) te često poremećaje kretanja. Sveukupno gledajući, ovi poremećaji su najčešći uzročnici nasljednih dječjih neurodegenerativnih bolesti i sve se češće prepoznaju u oblicima koji se javljaju i u odrasloj dobi.

Klasična infantilna bolest CLN1 uzrokovana je mutacijama u genu PPT1. Bolest je genetski poremećaj s pojavom simptoma u dobi između 6 i 24 mjeseca. Također, bolest se može javiti i u kasnijoj životnoj dobi te se definira kao maloljetnička (juvenilna) i rana odrasla (adultna). Simptomi mogu uključivati znakove intelektualnog i motoričkog zaostajanja, uključujući zaostajanje u razvoju, trzanje mišića (mioklonski trzaji) i napadaje.

Rana dijagnoza CLN1 (neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 1) bolesti je presudna kako bi se osigurala optimalna skrb za bolesnike i njihove obitelji. CLN1 bolest je moguće dijagnosticirati mjerenjem aktivnosti enzima PPT1. Ovaj enzim je neophodan za pravilno funkcioniranje lizosoma. Funkcija ove lizosomske tioesteraze je uklanjanje masnih kiselina vezanih tioesterskim vezama na cisteinske ostatke u proteinima (pretežno palmitinske kiseline).

Cilj ovog rada je uvođenje mjerenja aktivnosti enzima palmitoil proteina tioesteraze 1 u uzorku leukocita zdrave populacije izoliranih iz pune krvi fluorimetrijskom metodom. Metoda se pokazala dovoljno pouzdanom za primjenu u selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici nakon postavljene kliničke sumnje na CLN1. Međutim, kako sama fluorimetrijska metoda ima mnogo ograničenja i nedostataka, kao prva metoda probira preporučuje se metoda mjerenja aktivnosti PPT 1 iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru metodom tandem masene spektroskopije.

Summary

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are a group of genetically inherited lysosomal neurodegenerative diseases characterized by the intracellular accumulation of autofluorescent lipopigment storage material that causes progressive neurologic degeneration in all age groups. They belong to the group of lysosomal storage disorders. The clinical course includes progressive dementia, seizures, progressive visual failure (except in the adult-onset forms), and often movement abnormalities. Collectively, these disorders are the most common cause of an inherited childhood neurodegenerative disease and are increasingly recognized in late-onset or adult-onset forms.

Classic infantile CLN1 disease is caused by an alteration in the PPT1 gene. It is a genetic disease with an onset of symptoms between 6 and 24 months of age, However, disease can occur in later life, and these 2 types are called juvenile and early adult type. Symptoms may include signs of intellectual and motor decline including delays in reaching developmental milestones (development delays), twitching or jerking of muscles (myoclonic jerks), and seizures.

Early diagnosis of CLN1 (neuronal ceroid lipofuscinoses type 1) disease is crucial to ensure optimum care for patients and their families. CLN1 disease can be diagnosed by measuring the activity of the enzyme PPT1. This enzyme is necessary for the proper functioning of lysosomes. The function of this lysosomal thioesterase is to remove the fatty acids (mainly palmitic acid) bound by thioester bonds to cysteine residues in proteins.

The aim of this study is to introduce measurement of the activity of an enzyme palmitoyl protein thioesterase 1 in a sample of leukocytes isolated from whole blood by fluorimetric method. This method has proven to be sufficiently reliable for use in selective laboratory diagnostics after clinical suspicion of CLN1 has been established. However, as the fluorimetric method itself has many limitations and drawbacks, the first method of screening is the method of measuring PPT 1 activity from a dry drop of blood sample on filter paper by tandem mass spectroscopy.

8. PRILOG

8.1 Popis kratica

ACMG = (*engl*. American College of Medical Genetics and Genomics), Američki koledž medicinske genetike i genomike

EURORDIS = (*engl*. The European Organisation for Rare Diseases), Europska organizacija za rijetke bolesti

PPT1 = palmitoil-protein tioesteraza 1

NCL = neuronalna ceroidna lipofuscinoza

CLN1 = neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 1

GROD = (*engl.* Granular osmophilic deposit), granulirani osmofilni depozit

CLP = (*engl.* curvilinear profile), profil krivulje

FFP = (*engl.* fingertip profile), profil otiska prsta

INCL = (*engl*. infantile neuronal ceroid lipofuscinoses), dječja neuronalna ceroidna lipofuscinoza

LINC = (*engl*. late infantile neuronal ceroid lipofuscinoses), kasna dječja neuronalna ceroidna lipofuscinoza

JNCL = (*engl*. juvenile neuronal ceroid lipofuscinoses), mladenačka neuronalna ceroidna lipofuscinoza

ANCL = (*engl*. adult neuronal ceroid lipofuscinoses), odrasla neuronalna ceroidna lipofuscinoza

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

BSA = (*engl*. bovine serum albumin), goveđi serumski albumin

4-MU = 4-metilumbeliferon

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diplomski rad

Aktivnost palmitoil-protein tioesteraze 1 u homogenatu leukocita mjerena fluorimetrijskom metodom

Andrea Hulita

SAŽETAK

Neuronalne ceroidne lipofuscinoze su skupina genetski nasljednih lizosomskih neurodegenerativnih bolesti karakteriziranih unutarstaničnim nakupljanjem skladišnog materijala autofluorescentnog lipopigmenta koji uzrokuje progresivnu neurološku degeneraciju u svim dobnim skupinama. Pripadaju skupini lizosomskih poremećaja skladištenja. Klinički tijek uključuje progresivnu demenciju, napadaje, progresivno zatajenje vida (osim u obliku koji se javlja u odrasloj dobi) te često poremećaje kretanja. Sveukupno gledajući, ovi poremećaji su najčešći uzročnici nasljednih dječjih neurodegenerativnih bolesti i sve se češće prepoznaju u oblicima koji se javljaju kasnije u životu i u odrasloj dobi. Klasična infantilna bolest CLN1 uzrokovana je mutacijama u genu PPT1. To je genetski poremećaj s pojavom simptoma u dobi između 6 i 24 mjeseca, no zabilježene su i kasnije prezentacije CLN1 bolesti, a to su maloljetnička (juvenilna) i rana odrasla (adultna). Simptomi mogu uključivati znakove intelektualnog i motoričkog zaostajanja, uključujući zaostajanje u razvoju, trzanje mišića (mioklonski trzaji) i napadaje.

Rana dijagnoza CLN1 (neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 1) bolesti je presudna kako bi se osigurala optimalna skrb za bolesnike i njihove obitelji. CLN1 bolest je moguće dijagnosticirati mjerenjem aktivnosti enzima PPT1. Ovaj enzim je neophodan za pravilno funkcioniranje lizosoma. Funkcija ove lizosomske tioesteraze je da ukloni masne kiseline vezane tioesterskim vezama na cisteinske ostatke u proteinima.

U ovom radu je cilj uvođenje metode za mjerenje aktivnosti enzima palmitoil proteina tioesteraze 1 u uzorcima leukocita zdrave populacije izoliranih iz pune krvi. Koristila se *in house* fluorimetrijska metoda određivanja aktivnosti enzima palmitoil protein tioesteraze 1 u leukocitima izoliranima iz EDTA pune krvi. Metoda se pokazala dovoljno pouzdanom za primjenu u selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici nakon postavljene kliničke sumnje na CLN1. Međutim, kako sama fluorimetrijska metoda ima mnogo ograničenja i nedostataka, kao prva metoda probira preporučuje se metoda mjerenja aktivnosti PPT 1 iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 13 grafičkih prikaza, 7 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CLN1, PPT1, Battenova bolest

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lovorka Vujić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The activity of palmitoyl-protein thioesterase 1 in leukocyte homogenate measured by fluorimetric method

Andrea Hulita

SUMMARY

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are a group of genetically inherited lysosomal neurodegenerative diseases characterized by the intracellular accumulation of autofluorescent lipopigment storage material that causes progressive neurologic degeneration in all age groups. They belong to the group of lysosomal storage disorders. The clinical course includes progressive dementia, seizures, progressive visual failure (except in the adult-onset forms), and often movement abnormalities. Collectively, these disorders are the most common cause of an inherited childhood neurodegenerative disease and are increasingly recognized in late-onset or adult-onset forms. Classic infantile CLN1 disease is caused by an alteration in the PPT1 gene. It is a genetic disorder with an onset of symptoms between 6 and 24 months of age, with recorded later presented CNL1 diseases, juvenile and early adult. Symptoms may include signs of intellectual and motor decline including delays in reaching developmental milestones (development delays), twitching or jerking of muscles (myoclonic jerks), and seizures. Early diagnosis of CLN1 (neuronal ceroid lipofuscinoses type 1) disease is crucial to ensure optimum care for patients and their families. CLN1 disease is diagnosed by measuring the activity of the enzyme PPT1. This enzyme is necessary for the proper functioning of lysosomes. The function of this lysosomal thioesterase is to remove the fatty acids bound by thioester bonds to cysteine residues in proteins.
In this study, the aim is to introduce a method for measuring the activity of an enzyme palmitoyl protein thioesterase 1 in a sample of leukocytes isolated from whole blood. An *in house* fluorimetric method was used to determine the activity of an enzyme palmitoyl protein thioesterase 1 in leukocytes isolated from EDTA whole blood. This method has proven to be sufficiently reliable for use in selective laboratory diagnostics after clinical suspicion of CLN1 has been established. However, as the fluorimetric method itself has many limitations and drawbacks, it is recommended that the first method of screening is the method of measuring PPT 1 activity from a dry drop of blood sample on filter paper.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 13 figures, 7 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CLN1, PPT1, Batten disease

Mentor: **Ksenija Fumić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Somborac Bačura, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.