

Put prema biobanci kultiviranih kožnih fibroblasta bolesnika s nasljednim metaboličkim poremećajima u Hrvatskoj

Marija Zekušić¹, Ksenija Fumić¹, Karmen Bilić¹, Ana Škaričić¹, Danijela Petković Ramadža², Tamara Žigman², Vladimir Sarnavka², Mario Ćuk^{2,3}, Ivo Barić^{2,3}, Dunja Rogić¹

Rijetke bolesti etiološki su heterogena skupina najčešće nasljednih, kroničnih i degenerativnih bolesti s pojavnošću manjom od 5 na 10 000 osoba. Poznato je više od 7000 rijetkih bolesti od kojih više od 600 ima osobitosti nasljednih metaboličkih poremećaja. Zbog velike kliničke heterogenosti i zahtjevnih dijagnostičkih testova put do konačne dijagnoze je često dug te uključuje i obradu u inozemnim laboratorijima. Unatoč tome, dio bolesnika ostaje bez konačne dijagnoze. U situacijama kad je bolesnik vitalno ugrožen uz mogućnost letalnog ishoda i pri sumnji na nasljednu metaboličku bolest, biopsija kože je dio standardnog postupka. Posljednjih godina sve je više dostupnih mogućnosti liječenja za širok spektar nasljednih metaboličkih bolesti. Osnovni preduvjet za njihovu djelotvornost je pravodobna dijagnoza. Kultivirani kožni fibroblasti pohranjeni u biobanke vrijedan su biološki materijal. Osim za postavljanje dijagnoze, mogu se primijeniti i za provjeru djelotvornosti novih pristupa liječenju kao što su male molekule pratitelji. Sve navedeno upućuje na značenje organiziranja biobanke fibroblasta prema međunarodno prihvaćenim standardima.

Ključne riječi: fibroblasti; metabolizam; prirodene griješke; Hrvatska

UVOD

Biobanke su organizirane zbirke pohranjenih bioloških uzoraka kao što su ljudski DNA, stanične kulture, tkiva i drugi biološki materijal. Primarno su osmišljene u dijagnostičke svrhe, no u posljednje su vrijeme prepoznate kao vrijedan materijal za znanstvena istraživanja i razvoj novih terapija. Preduvjet za uporabu i razmjenu pohranjenih uzoraka biobanke je standardiziranje svih laboratorijskih postupaka. EuroBioBank (EBB) europska je mreža bioloških banaka osnovana 2001. godine (www.eurobiobank.org). Posebna se pozornost posvećuje kontroli kakvoće primjenom standardnih operativnih postupaka (SOP) i međunarodnoj normi za medicinske laboratorije HRN EN ISO 15189:2012. Uspostava mreže EBB-a je osobito značajna za istraživanja rijetkih bolesti te je zbog toga od velikog interesa ostvarivanje bolje međusobne suradnje svih država članica Europske unije (1). Trenutno stanje u europskim biobankama pokazuje znatnu neusklađenost tehničkih zahtjeva (uvjeti skladištenja, prikupljanja i raspodjele uzoraka) kao i pravne regu-

lative (zaštita prava pacijenata i informirani pristanak). Zato se i kod nas pojavila potreba za usklađivanjem svih SOP-a i preporuka povezanih s EBB-om (2-5).

Biobanke tkiva i stanica

Biobanka je javna ili privatna neprofitna organizacija koja prikuplja, obrađuje, skladišti i raspodjeljuje biološki materijal u skladu s domaćim i međunarodnim propisima. Za biološke uzorke koji se pohranjuju potrebno je jasno odrediti svr-

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Zagreb

² Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb

³ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Marija Zekušić, magistar molekularne biologije;
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku; Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; Kišpatićeva 12, Zagreb

Primljeno/Received: 15. 11. 2016., Prihvaćeno/Accepted: 10. 4. 2017.

hu pohrane koja može biti za dijagnostičke (npr. dijagnostika specifične bolesti), terapijske (npr. banka krvi iz pupkove) i istraživačke svrhe (npr. povezana s istraživanjem određene populacije). Kod organiziranja biobanke nužno je unaprijed definirati: način i svrhu dobivanja biološkog uzorka, bilježenje demografskih podataka ispitanika, anamnestičke i ostale relevantne kliničke podatke. Ako osoba čiji se uzorak pohranjuje u biobanku ima postavljenu dijagnozu, u bazu se upisuje šifra Međunarodne klasifikacije bolesti (engl. *International Classification of Diseases-10*, ICD-10) te medicinski centar gdje je postavljena dijagnoza. U nedostatku postavljene dijagnoze u dokumentaciju se upisuje sumnja na određenu bolest (radna dijagnoza). Prije pohrane uzorka pristiglih iz suradnih ustanova, osoblje biobanke treba provjeriti kakvoću uzorka, točnost podataka na uzorku i popratnoj dokumentaciji. Ako se pohranjeni uzorak, osim u dijagnostičke svrhe, namjerava upotrijebiti i za istraživački rad, ta svrha mora biti razumljivo obrazložena u obrascu informiranog pristanka. Biobanka koja je organizirana isključivo za istraživačke svrhe mora uz ostale standardizirane uvjete osiguravati privatnost i povjerljivost ispitanika (6-10). U Hrvatskoj postoje različite biobanke s obzirom na način organizacije i vrstu uzoraka koje pohranjuju (11).

Standardi nužni za uzgoj ljudskih stanica

Biobanka kultiviranih fibroblasta jedna je od najčešće rabljenih za dijagnostičke i/ili istraživačke svrhe. Sva dosadašnja istraživanja na kulturama stanica pokazala su da je većina bioloških uzoraka potencijalno infektivna. Stoga su izrađene smjernice za zaštitu laboratorijskih djelatnika pri svakodnevnom radu s biološkim uzorcima. Ove se smjernice temelje na mišljenju da siguran rad ovisi o stručnom znanju i iskustvu, SOP-u i dosadašnjoj laboratorijskoj praksi. Na osnovi smjernica u laboratorije je uvedena dobra laboratorijska praksa (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP) koja osigurava pouzdanost rezultata.

Mjere sterilnog rada i zaštite osoblja

Uporaba različitih vrsta zaštitne opreme pokazala se ključnom za siguran rad i zaštitu djelatnika od infekcije. Propisana je upotreba zaštitnih ogrtača, rukavica, maske za lice i druge zaštitne opreme te je definirana razina biosigurnosti za različite medicinsko-dijagnostičke laboratorije (www.eurobiobank.org). Laboratorij biosigurnosne razine 2 (BSL-2) biosigurnosna je razina za stanične kulture. Djelatnicima koji rade u laboratoriju razine BSL-2 preporučuje se prije početka rada sa staničnim kulturama cijepljenje protiv hepatitisa B. Na sigurnosnoj razini BSL-2 ulazak u laboratorij treba biti strogo kontroliran i ograničen na određeni broj ljudi koji su prošli odgovarajuću edukaciju.

Laboratorijska oprema i uvjeti smještaja i okoliša

U laboratoriju u kojem se nalazi biobanka trebalo bi imati: laboratorijske ledenice (-80 °C), odgovarajuće spremnike s tekućim dušikom za skladištenje uzoraka uz mogućnost kontinuirane nadopune tekućeg dušika, inkubatore s izvorom CO₂, mikrobiološke kabinete klase II., invertne mikroskope, centrifuge s hlađenjem i odgovarajući laboratorijski informatički sustav. Laboratorijski prostori u kojima se nalaze biobanke trebaju biti uređeni po najvišim tehničkim standardima (kontinuirana opskrba električnom energijom, klimatizacija, mjere higijenske opreznosti). Spremnici s pohranjenim biološkim uzorcima u tekućem dušiku trebaju biti smješteni u zasebnoj prostoriji u kojoj je omogućena periodična izmjena zraka. Pristup u prostoriju sa spremnicima s tekućim dušikom smije imati samo ovlašteno osoblje. Standardi povezani s laboratorijskom opremom (GLP i HRN EN ISO 15189:2012.) podrazumijevaju periodično provjeravanje i validiranje opreme i redovitu edukaciju osoblja, osobito u radu s tekućim dušikom. Tekući dušik je bezbojna tekućina bez mirisa i nije zapaljiv. U tekućem obliku (pri temperaturi -196°C) prikladan je za dugotrajnu pohranu bioloških uzoraka, ali treba biti oprezan, jer kontakt tekućeg dušika s kožom može uzrokovati smrzotine. Posebnu pozornost trebalo bi usmjeriti na kontrolu kakvoće uzorka. To se prvenstveno odnosi na testiranje staničnih kultura fibroblasta prije njihove pohrane u tekući dušik, točnije na njihovu potencijalnu kontaminaciju mikoplazmama, virusima i bakterijama. Isključivo uzorci ispitani i uskladišteni na ovaj način su prikladni za slanje u druge laboratorijske centre. Evidencija i identifikacija svakog pohranjenog biološkog uzorka u spremniku treba biti strogo kontrolirana.

Sustav kontrole kakvoće

Primjenu HRN EN ISO 15189:2012. standarda za medicinske laboratorije i dokumentirano praćenje sustava kontrole kakvoće trebalo bi kontinuirano provoditi laboratorijsko osoblje. Kvalitativni standardi se primjenjuju na sav potrošni materijal koji se rabi u radu sa sterilnim kulturama, opremu (inkubator s izvorom CO₂, mikroskopi, mikrobiološki kabineti, centrifuge i drugo), osoblje (stručna edukacija i osposobljavanje djelatnika) te laboratorijske procese (izolacija primarnih i sekundarnih kultura fibroblasta te dugotrajno zaleđivanje). Dostizanje, nadzor i praćenje ovih važnih standarda složen je i financijski zahtjevan proces.

Opis postupka

Uzimanje uzorka kože standardnom metodom

Stanična kultura kožnih fibroblasta optimalan je biološki materijal za provođenje dijagnostičkih testova potvrde pri kliničkoj sumnji na nasljedne metaboličke bolesti. Ovisno o



SLIKA 1. Prikaz uspostave kulture fibroblasta od usitnjavanja kože, prebacivanja bioptata u kultivacijske bočice do uzgoja fibroblasta u inkubatoru s izvorom CO₂.

kliničkoj slici, liječnik odlučuje o potrebi biopsije kože. Koža kao organ je lako dostupna i uzimanje bioptata metodom „punch“ je relativno neinvazivno u odnosu na druge tkivne biopsije (12). Prije planirane biopsije kože liječnik bi trebao upoznati ispitanika i/ili skrbnika sa svrhom uzimanja biološkog materijala i osobnom dobrobiti.

Uzimanje uzorka kože *post mortem*

Biopsija kože *post mortem* indicirana je u slučajevima nepoznatog uzroka bolesnikove smrti i/ili ako je postojala opravdana sumnja na nasljedni metabolički poremećaj (13,14). Posebnu pozornost treba posvetiti sterilnosti biopsije kože. Poželjno je napraviti biopsiju s različitih mjesta u roku od dva sata nakon smrti, a uzorke biopsije ostaviti u sterilne epruvete s hranjivim medijem, eventualno u sterilnu fiziološku otopinu. Prihvatljivo je uzeti dvije biopsije veličine 2x2 mm pune debljine kože. U slučajevima uzimanja biopsije kože sa zakašnjenjem, povećava se mogućnost kontaminacije uzorka.

Postupak dopreme uzorka

Nakon biopsije u sterilnim uvjetima epruvetu s bioptatom treba obilježiti (ime i prezime, datum uzimanja biopsije) i s uputnicom u što kraćem roku dostaviti u laboratorij. Ako bioptat nije moguće odmah dalje obraditi, može se čuvati u hladnjaku na 2-8 °C do 48 sati. Primarna kultura fibroblasta uspostavlja se metodom kožnog eksplantata (15-17). Svaki zahtjev za upostavljanje stanične kulture fibroblasta treba prije toga najaviti djelatnicima Odjela za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti. Prije početka biopsije potrebno je od laboratorija zatražiti epruvetu sa sterilnim hranjivim medijem za dostavu bioptata. Hranjivi medij priprema se u mikrobiološkom kabinetu za sterilan rad: na Dulbeccov medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*, DMEM) (Sigma) dodaje se 20% fetusnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovin Serum*, FBS), 1% L glutamina (Euro-

Clone) i 1% antibiotika (Sigma); filtrira se kroz filter od 0,22 μm u sterilnoj boci i pravilno obilježi. Tako priređen hranjivi medij se čuva na 2-8 °C do mjesec dana i rabi kao prijenosni medij za bioptate i kao hranjivi medij za rast stanica.

U skladu s tim preporukama u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) pohranjuju se kultivirani kožni fibroblasti pacijenata s dijagnozom i/ili sumnjom na nasljedne metaboličke bolesti. Stanične kulture kožnih fibroblasta su u najvećem broju uspostavljene i pohranjene od bolesnika kojima je primarna biopsija napravljena u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, no jedan dio primarnih bioptata kože poslan je i iz drugih bolničkih centara.

Uspostava stanične kulture fibroblasta

Bioptat kože prebacuje se iz epruvete u Petrijevu zdjelicu i usitnjava na manje komadiće skalpelom i škarama. Nakon usitnjavanja biopsije na komadiće veličine 2x2 mm potrebno ih je prenijeti u 25 cm² sterilne kultivacijske bočice za adherentne kulture bez medija i ostaviti 5 do 10 minuta. Nakon toga dodaje se 3-5 mL medija za uzgoj stanica i bočica se čvrsto zatvori. Radi veće sigurnosti od kontaminacije preporučuje se upotrebljavati kultivacijske bočice koje imaju čep s filterom. Kultivacijsku bočicu s bioptatom potrebno je preko noći staviti u inkubator na 37 °C i 5% CO₂. Medij se mijenja nakon 24 sata, a nakon toga je potrebno ga mijenjati tri puta na tjedan (slika 1).

Nakon tri do pet dana moguće je vidjeti pojedinačne fibroblaste kako rastu na dnu kultivacijske bočice iz bioptata. Primarna kultura fibroblasta dostiže konfluenciju oko 80% za 10-ak dana. Tada je potrebno stanice tripsinizirati (Trypsin 0,25% /EDTA 0,02%) (slika 2). Tripsinizacija je postupak kojim se za 3-5 minuta u inkubatoru kidaju međustanične veze i dobiva suspenzija stanica. Na stanice je potrebno dodati istu količinu medija za rast fibroblasta, kako bi se neutraliziralo djelovanje tripsina, te stanice centrifugirati na 350 x g 5



SLIKA 2. Uspostavljanje primarne kulture fibroblasta, od pojedinačnih fibroblasta koji izlaze iz bioptata do 50% , odnosno 90% konfluentne kulture fibroblasta

minuta. Supernatant se pomno ukloni i na pelet se stavi novi medij za rast fibroblasta. Stanice se dobro resuspendiraju i zasijavaju u nove kultivacijske bočice veličine 25 ili 75 cm², ovisno o potrebi. Preporučena količina medija u kultivacijskim bočicama od 25 cm² iznosi 3-5 mL, a u bočicama od 75 cm² iznosi 12-15 mL. Ovisno o broju dobivenih fibroblasta, stanice se raspoređuju u druge subkulture. Na nove kultivacijske bočice treba napisati ime i prezime pacijenta, datum i broj nove pasaže te datum promjene medija. Stanice se dnevno provjeravaju na invertnom mikroskopu s faznim kontrastom.

Dugotrajna pohrana fibroblasta

Pohrana fibroblasta provodi se u epruvetama od 2 mL namijenjenim isključivo za duboko zaleđivanje. Epruvete se prije toga označe (ime i prezime pacijenta, vrsta stanica, broj pasaže, datum zaleđivanja, broj stanica) i za vrijeme postupka drže se na hladnoj podlozi. Nakon tripsinizacije i cetrifugiranja, odnosno pošto je uklonjen supernatant, na talog stanica se stavi 1,8 mL svježe pripremljenog medija za zaleđivanje (hranjivi medij 90%, dimetilsulfoksid 10%) i pomno resuspendira da se dobiju pojedinačne stanice. Broj stanica koje su zaleđivane iznosi oko 1×10^6 po ampuli. Nakon toga se epruvete najprije stave u ledenicu na -86 °C (Thermo Scientific), a nakon 24 sata se spremaju na dugotrajno skladištenje u tekući dušik na -196 °C. Prijeko je potrebno voditi evidenciju o mjestu skladištenja uzoraka u akreditacijskim zapisima, kako bi se u svakom trenutku znalo točno mjesto i količina pojedinih uzoraka u spremniku tekućeg dušika.

Dosadašnji rezultati i harmonizacija procesa

U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti uspostavljen je postupak uzgoja stanične kulture kožnih fibroblasta izdvojenih od pacijenata s rijetkim nasljednim metaboličkim bolestima. Prema EBB-u i normi ISO 15

189:2012. izrađeni su standardni operativni postupci, radne upute i obrasci. U akreditacijskoj dokumentaciji opisani su postupci vezani za izolaciju humanih kožnih fibroblasta, pohranu, raspodjelu ili slanje bioloških uzoraka u referentne centre za rijetke bolesti u EU te način praćenja i evaluacije uzoraka u registru biobanke. U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti napisana je opća radna uputa vezana za organizaciju rada. Također su napisane radne upute i pripadajući obrasci vezani za laboratorijsku opremu, reagense i potrošni materijal, kao i za uvjete smještaja i okoliša. U radnim je uputama opisan rad s tekućim dušikom i prva pomoć kod ozlijeđivanja s tekućim dušikom.

Naša baza podataka u velikoj je mjeri usklađena s EBB-om. Bilježe se sljedeći podatci: ime i prezime pacijenta i datum rođenja, medicinski centar koji je poslao uzorak, datum pohrane uzorka, „pasaža“ fibroblasta (broj dijeljenja staničnih kultura), dijagnoza i šifra ICD-10 te odgovorni laboratorijski djelatnik (tablica 1). U razdoblju od 1995. godine pohranjeno je više od 1000 epruveta s fibroblastima (za jednog pacijenta skladišti se minimalno tri epruvete).

Najveći udio čine uzorci bolesnika s potvrđenom dijagnozom bolesti iz skupine lizosomskih bolesti nakupljanja (mukopolisaharidoze n=49, sfingolipidoze n=53, oligosaharidoze n=6, mukolipidoze n=4). Pohranjeni su i fibroblasti bolesnika s dijagnozama poremećaja mitohondrijskog stvaranja energije (n=43), peroksisomskim poremećajima (n=9), poremećajima glikozilacije proteina (n=6), aminoacidopatijama (n=17), organskim acidurijama (n=27) i ostalim nasljednim metaboličkim bolestima (n=21). Osim fibroblasta bolesnika s potvrđenim dijagnozama, pohranjeni su i fibroblasti bolesnika koji su nakon opsežne dijagnostičke obrade ostali bez konačne dijagnoze (n=46).

Upravljanje kontrolom kakvoće sastavni je dio rada u medicinsko-dijagnostičkim laboratorijima. U tu se svrhu izrađuju SOP-i za prikupljanje, obradu, raspodjelu, pohranu uzoraka i

TABLICA 1. Primjer iz evidencije biobanke fibroblasta u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku

R.br.	Ime i prezime / datum rođenja	Bolnica/ Odjel	Datum pohrane	Pasaža	Dijagnoza ICD-10	Šifra ICD-10
1	B. M. (26.06.2008.)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	04.01.2016.	fibroblasti p=0	Idiopatska neuropatija	G60.9
2	B.I. (23.01.2011.)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	19.1.2016.	fibroblasti p=1	Miješani razvojni poremećaj	F83
3	B. I. (23.01.2011.)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	19.01.2016.	fibroblasti p=1	Miješani razvojni poremećaj	F83
4	B. I. (23.01.2011.)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	19.01.2016.	fibroblasti p=1	Miješani razvojni poremećaj	F83.0
5	Z. M. M. (16.12.2014)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	04.01.2016.	fibroblasti p=5	Mukopolisaharidoza tip II	E76.1
6	Z. M. M. (16.12.2014)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	04.01.2016.	fibroblasti p=5	Mukopolisaharidoza tip II	E76.1
7	B. M. (26.06.2008.)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	04.01.2016.	fibroblasti p=0	Idiopatska neuropatija	G60.9
8	Z. M. M. (16.12.2014)	KBC Zagreb, Zavod za metabolizam	04.01.2016.	fibroblasti p=5	Mukopolisaharidoza tip II	E76.1
9	K. novorođenče ž. (18.08.2016.)	KBC Zagreb, Dječja 7	05.01.2017.	fibroblasti p=1	Sijalidoza i stanje nastalo u perinatalnom razdoblju	P96.9
10	K. novorođenče ž. (18.08.2016.)	KBC Zagreb, Dječja 7	05.01.2017.	fibroblasti p=1	Sijalidoza i stanje nastalo u perinatalnom razdoblju	P96.9

podataka u skladu s nužnim standardima i normom HRN EN ISO 15189:2012. Harmonizacija tih postupaka na europskoj razini jedan je od ciljeva EBB-a. To će omogućiti optimalno iskorištenje potencijala pohranjenih staničnih linija fibroblasta pacijenata s nasljednim metaboličkim poremećajima. Zbog toga su dosad primjenjivani laboratorijski protokoli zamijenjeni s dokumentima usklađenim s EBB-om i HRN EN ISO-om 15189:2012. U našoj bazi podataka, koju smo u velikoj mjeri uskladili s EBB-om, potrebno je osim upisa dijagnoze i šifre ICD-10 upisati i šifru OMIM (engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM). Drugi važan čimbenik za optimalnu upotrebu biobanke fibroblasta je formiranje odgovarajućeg obrasca za informirani pristanak, koji bi omogućio i naknadne analize. Naime, u standardnoj obavijesti pacijentu o dijagnostičkom, odnosno terapijskom postupku, informirani se pristanak odnosi samo na planirane dijagnostičke pretrage, tako da se pohranjeni uzorci ne mogu upotrijebiti za dodatna istraživanja. Uputno je dati informaciju o mogućoj upotrebi viška biološkog uzorka za istraživanje u području rijetkih metaboličkih bolesti, i to bi trebao biti sastavni dio informiranog pristanka (7). U homogenatu kožnih fibroblasta mogu se mjeriti aktivnosti enzima, metabolita i biomarkera nužnih za postavljanje dijagnoze i praćenje terapije. Takav uzorak može se iskoristiti i za izolaciju DNA-a.

Kultivirani kožni fibroblasti imaju važnu ulogu u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti. U nekim slučajevima to je i prijeko potreban uzorak za mjerenje enzimske aktivnosti (npr. sumnja na sijalidozu ili poremećaj beta-oksidacije masnih kiselina) (13).

Novi terapijski pristupi i tehnologije

U posljednje vrijeme novi terapijski pristupi uključuju i terapiju malim molekulama pratiteljima (eng. *chaperone therapy*). Takav pristup liječenju posebice je značajan za lizosomske bolesti nakupljanja kao što su Gaucherova bolest (18), Fabryjeva bolest (19), Krabbeova leukodistrofija (20) i dr. Učinkovitost terapije malim molekulama pratiteljima ovisna je o vrsti mutacije gena koji kodira sintezu određenog enzima. Za ispitivanje učinka malih molekula pratitelja nužna je stanična kultura fibroblasta. Stanice se opterećuju dodatkom različitih koncentracija malih molekula pratitelja, nakon čega se mjeri eventualni porast aktivnosti zahvaćenog enzima. Osim toga, iz pohranjenih fibroblasta pacijenata moguće je postaviti dijagnozu metodom sekvenciranja nove generacije (21-23). Nove tehnologije otvaraju niz mogućnosti za buduća istraživanja u području nasljednih metaboličkih bolesti radi boljeg razumijevanja etiologije bolesti, povezanosti genotipa i fenotipa i razvoja novih terapija. Biobanke fibroblasta će zasigurno imati veliku ulogu u tim nastojanjima. Prijeko je potrebna kontinuirana suradnja kliničkog i laboratorijskog osoblja da bi se uspješno organizirala biobanka kultiviranih kožnih fibroblasta bolesnika s nasljednim metaboličkim poremećajima.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./All authors have completed the *Unified Competing Interest form* at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

LITERATURA

- Mora M, Angelini C, Bignami F, et al. The EuroBioBank Network: 10 years of hands-on experience of collaborative, transnational biobanking for rare diseases. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:1116–1123. doi:10.1038/ejhg.2014.272.
- Monaco L, Crimi M, Wang CM. The challenge for a European network of biobanks for rare diseases taken up by RD-Connect. *Pathobiology.* 2014;81:231–6. doi: 10.1159/000358492
- Morente MM, Mager R, Alonso S, et al. TuBaFrost 2: Standardising tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. *Eur J Cancer.* 2006;42:2684–91. doi: 10.1016/j.ejca.2006.04.029
- Yuille M, Dixon K, Platt A, et al. The UK DNA banking network: a “fair access” biobank. *Cell Tissue Bank.* 2010;11:241–51. doi: 10.1007/s10561-009-9150-3
- Trouet C. New European guidelines for the use of stored human biological materials in biomedical research. *J Med Ethics.* 2004;30: 99–103. doi: 10.1136/jme.2003.003467
- Grizzle W, Grody WW, Noll WW, et al. Recommended policies for uses of human tissue in research, education, and quality control. *Ad Hoc Committee on Stored Tissue, College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med.* 1999;123:296–300. doi:10.1043/0003-9985 n(1999)123<0296:RPFUOH>2.0.CO;2
- Salvaterra E, Lecchi L, Giovanelli S, et al. Banking together. A unified model of informed consent for biobanking. *EMBO Rep.* 2008;9:307-13. doi: 10.1038/embor.2008.41
- Riegman PH, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P. Biobanking for better healthcare. *Mol Oncol.* 2008;2:213-22. doi: 10.1016/j.molonc.2008.07.004.
- Filocamo M, Baldo C, Goldwurm S, et al. Telethon Network of Genetic Biobanks Staff. Telethon Network of Genetic Biobanks: a key service for diagnosis and research on rare diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;30:129. doi: 10.1186/1750-1172-8-129.
- Budimir D, Polašek O, Marušić A, et al. Ethical aspects of human biobanks: a systematic review. *Croat Med J.* 2011;52:262-79. doi: 10.3325/cmj.2011.52.262
- Borovečki A, Caenazzo L, Ježek D, Karija-Vlahović M, Golubić B. Croatian National Centre for Biobanking– a new perspective in biobanks governance? *Croat Med J.* 2014;55:416–22. doi: 10.3325/cmj.2014.55.416
- Vangipuram M, Ting D, Kim S, Diaz R, and Schüle B. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J Vis Exp.* 2013;77:3779. doi: 10.3791/3779.
- Olpin SE. The metabolic investigation of sudden infant death. *Ann Clin Biochem.* 2004;41:282-93. doi: 10.1258/0004563041201473
- Bennett MJ, Rinaldo P. The metabolic autopsy comes of age. *Clinical Chemistry.* 2001;47:1145-6.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells.* Alan R. Liss Inc., New York. 1983:295. doi: 10.1002/jctb.280450414
- Ambriović Ristov A. *Metode u molekularnoj biologiji.* Zagreb: Institut Ruđer Bošković. 2007.
- Zekušić M. *Biobanka tkiva i stanica pacijenata s rijetkim nasljednim bolestima u Hrvatskoj.* Diplomski rad, PMF. 2015.
- Narita A, Shirai K, Itamura S, et al. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3:200-15. doi: 10.1002/acn3.292.
- Gaggl M, Sunder-Plassmann G. Fabry disease: A pharmacological chaperone on the horizon. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12:653-4. doi: 10.1038/nrneph.2016.138.
- Graziano AC, Pannuzzo G, Avola R, Cardile V. Chaperones as potential therapeutics for Krabbe disease. *J Neurosci Res.* 2016;94:1220-30. doi: 10.1002/jnr.23755.
- Jamuar SS and Tan EC. Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Hum Genomics.* 2015;9:10. doi: 10.1186/s40246-015-0031-5.
- Zhang W, Cui H, Wong LJ. Application of next generation sequencing to molecular diagnosis of inherited diseases. *Top Curr Chem.* 2014;336:19-45. doi: 10.1007/128_2012_325.
- Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet.* 2013;14:681-91. doi: 10.1038/nrg3555.

SUMMARY

A path towards a cultured skin fibroblast biobank of patients with inherited errors of metabolism in Croatia

Marija Zekušić, Ksenija Fumić, Karmen Bilić, Ana Škaričić, Danijela Petković Ramadža, Tamara Žigman, Vladimir Sarnavka, Mario Ćuk, Ivo Barić, Dunja Rogić

Rare diseases are an etiologically heterogeneous group of hereditary, chronic and degenerative disorders with the incidence lower than 5 per 10,000 individuals. More than 7,000 rare diseases have been identified so far, and more than 600 of them have the characteristics of hereditary metabolic disorders. Due to the high clinical heterogeneity and demanding diagnostic tests, the path to final diagnosis is often long and may also involve tests performed in laboratories abroad. Despite this, a number of patients remain without final diagnosis. In life-threatening situations for the patient and in case of suspected hereditary metabolic disease, skin biopsy is part of the routinely performed standard procedure. Recent years have seen an increasing availability of treatment options for a broad range of hereditary metabolic diseases. The basic precondition for therapy efficacy is timely diagnosis. Cultured skin fibroblasts that are stored in biobanks are a valuable biological material. Except for making diagnosis, they may be used to verify the efficacy of novel approaches to treatment, e.g., small chaperon molecules. All of the above indicates the significance of establishing a fibroblast biobank according to the internationally accepted standards.

Key words: fibroblasts; metabolism, inborn errors; Croatia