

Dani humane genetike

prof. dr. sc. Ljiljana Zergollern-Čupak

Uvodnik

Izuzetno mi je zadovoljstvo da se i ove godine održavaju „Dani humane genetike prof. dr. sc. Ljiljana Zergollern-Čupak“ i sve vas pozdravljam u ime našeg društva koje je predvodnik svih značajnih promjena iz područja humane genetike u Republici Hrvatskoj. Slijedeći višegodišnju tradiciju održavanja ovog simpozija, cilj nam je okupiti stručnjake iz različitih područja genetike i srodnih područja, kako bismo prikazom svojih stručnih i znanstvenih dostignuća dodatno potaknuli razvoj genetike u našoj zemlji te motivirali mlađe kolege iz različitih suradnih struka.

Ovogodišnji simpozij okuplja vodeće stručnjake iz područja kliničke genetike, stanične i molekularne biologije, regenerativne i personalizirane medicine, farmakogenomike, antropološke i forenzičke genetike, glikomike itd., te će svi sudionici simpozija imati rijetku priliku svjedočiti interdisciplinskom pristupu sagledavanja ključnih izazova suvremene genetike.

Vjerujemo da će razmjena iskustava sa stručnjacima koji imaju bogato iskustvo u primjeni novih dijagnostičkih i terapijskih metoda, uvelike pridonijeti integraciji navedenih postupaka u kliničku praksu u Hrvatskoj, te da ćemo na taj način, između ostaloga, unaprijediti dijagnostiku i liječenje rijetkih genetičkih bolesti u svim granama medicine.

Radujem se skorom susretu.

Prof. dr. sc. Dragan Primorac, dr. med.
Predsjednik Hrvatskog društva za humanu genetiku

DANI HUMANE GENETIKE PROF. DR. SC. LJILJANA ZERGOLLERN-ČUPAK

Zagreb, Hrvatski liječnički zbor, 8.12.2018.

8.30.-9.00. Registracija sudionika, Otvaranje skupa.

Uvodna predavanja:

- 9.00.-9.30. Dragan Primorac, Damir Hudetz, Igor Borić, Eduard Rod, Željko Jeleč, Trpimir Vrdoljak, Gordan Lauc, Andrea Skelin, Denis Polančec, Lucija Zenić, Irena Trbojević-Akmačić, Boro Nogalo, Mirjana Turkalj, Mihovil Plečko, Ozren Polašek: **Stanična terapija u liječenju oštećenja hrskavičnog tkiva: Iskustva Specijalne bolnice Sv. Katarina**
- 9.30.-10.00. Gordan Lauc: **Glikozilacija imunoglobulina G kao biomarker i funkcionalni efektor bolesti**

Odabrana plenarna predavanja:

- 10.00.-10.15. Renata Zadro: **Od otkrića Philadelphia kromosoma do moderne terapije kronične mijeloične leukemije**
- 10.15.-10.30. Jadranka Sertić, Hana Ljubić, Ana Merkler, Domagoj Caban, Ana Acman Barišić, Senka Škaro, Karolina Petrović: **Molekularna laboratorijska dijagnostika cistične fibroze od 1991.-2018. u Kliničkom bolničkom centru Zagreb**
- 10.30.-10.45. Ana Šepac, Sven Seiwerth, Zeljko J. Bosnjak, Filip Sedlić: **Usmjerena diferencijacija ljudskih kardiomiocita iz pluripotentnih matičnih stanica**
- 10.45.-11.15. Pauza**
- 11.15.-11.30. Denis Polančec, Lucija Zenić, Damir Hudetz, Igor Borić, Željko Jeleč, Eduard Rod, Trpimir Vrdoljak, Andrea Skelin, Mihovil Plečko, Mirjana Turkalj, Boro Nogalo, Dragan Primorac: **Imunofenotipizacija stromalne vaskularne frakcije iz mikrofragmentiranog adipoznog tkiva i lipoaspirata pacijenata s osteoartritisom**
- 11.30.-11.45. Eduard Rod, Igor Matić, Maja Antunović, Vesna Vetma, Ivan Pavičić, Damir Hudetz, Inga Marijanović, Dragan Primorac, Alan Ivković: **Optimizacija genske (ex vivo) terapije koštanim morfogenim proteinom-2 u rekonstrukciji prednje ukrižene sveze koljena**
- 11.45.-12.00. Petar Ozretić, Vesna Musani, Sonja Levanat: **Primjena računalnih programa za procjenu kliničkog značaja genskih varijanti nađenih u 5'UTR gena *BRCA2***
- 12.00.-12.15. Lidija Bach-Rojecky, Dalia Vađunec, Katarina Žunić, Jelena Kurija, Ivan Mikula, Dragan Primorac: **Farmakogenomika u liječenju boli**
- 12.15.-12.30. Jasmina Čatić, Andrea Skelin, Luka Boban, Vilim Molnar, Vid Matišić, Paulo Zekan, Alen Juginović, Ivan Mikula, Lidija Bach-Rojecky, Ivana Erceg-Ivkošić, Damir Erceg, Dragan Primorac: **Multimodalni koncept farmakogenomskog testiranja u kliničkoj praksi: Model Specijalne bolnice Sv. Katarina i OneOme**
- 12.30.-12.45. Irena Drmić Hoffman: **Sekvenciranje novije generacije (NGS) u dijagnostici i liječenju hematoloških malignih bolesti**
- 12.45.-13.00. Tamara Žigman, Danijela Petković Ramadža, Ivo Barić: **Metode sekvencioniranja nove generacije u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti- prednosti i izazovi**
- 13.00.-13.15. Vjekoslav Krželj, Papazovska Cherepnalkovski Anet, Ivana Čulo Čagalj, Joško Markić, Ana Skelin Glavaš, Tina Majstorović, Janoš Terzić, Bernarda Lozić: **Kliničke manifestacije nedostatne aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u Dalmaciji**

- 13.15.-13.30. Radenka Kuzmanić-Šamija, Ivana Unić, Jasna Petrić: **Od kliničke slike do genske terapije**
- 13.30.-13.45. Mirjana Turkalj, Lucija Zenić, Damir Polančec, Kristian Vlahoviček, Olga Malev, Boro Nogalo: **Jesu li primarne imunodeficijencije u djece rijetke bolesti?**
- 13.45.-14.45. Ručak**
- 14.45.-15.00. Romana Gjergja Juraški, Nataša Nenadić Baranašić, Feodora Stipoljev, Sanda Huljev Frković, Tamara Žigman, Fran Borovečki, Zlatko Sabol, Nina Barišić: **Genetička osnova epilepsija i epileptičkih sindroma u djece i personalizirani terapijski pristup**
- 15.00.-15.15. Ljubica Boban, Dragan Primorac: **Dijagnostika i liječenje Osteogenesis Imperfecte- personalizirani pristup**
- 15.15.-15.30. Danijela Petković Ramadža, Vladimir Sarnavka, Jurica Vuković, Vjekoslav Krželj, Bernarda Lozić, Silvija Pušeljić, Tamara Žigman, Ivana Čulo Čagalj, Višnja Tomac, Hana Pereira, Maria João Silva, Isabel Tavares de Almeida, Isabel Rivera, Ksenija Fumić, Ivo Barić: **Galaktozemija u Republici Hrvatskoj: klinički izražaj i genotip**
- 15.30.-15.45. Josip Vlaić, Davor Bojić, Darko Antičević: **Kongenitalna spondilo-epifizalna displazija – operacijsko liječenje varus deformacije zgloba kuka**
- 15.45.-16.00. Marijana Odobašić, Alenka Gagro: **X-vezana kronična granulomatozna bolest**
- 16.00.-16.15. Vedrana Škaro: **Neinvazivno prenatalno testiranje**
- 16.15.-16.30. Anita Barišić, Jadranka Vraneković, Ivana Babić Božović, Bojana Brajenović-Milić: **Marker kromosom- izazov u prenatalnoj dijagnostici: prikaz slučaja**
- 16.30.-17.00. Pauza**
- 17.00.-17.15. Damir Marjanović, Dubravka Havaš, Jelena Šarac, Saša Missoni, Dragan Primorac: **Najnoviji trendovi u oblasti humane identifikacije**
- 17.15.-17.30. Marina Korolija, Viktorija Sukser, Sara Rožić, Lucija Barbarić: **Začetak i smjer razvoja forenzične genomike u CFIV "Ivan Vučetić"**
- 17.30.-17.45. Gordan Mršić, Petar Ozretić, Josip Crnjac, Siniša Merkaš, Sara Rožić, Viktorija Sukser, Ivana Račić, Lucija Barbarić, Maja Popović, Marina Korolija: **Analiza 12 X-STR markera u populaciji Hrvatske i primjena u forenzici**
- 17.45.-18.00. Liang Niu, Scott Langevin, RickyLeung, GeZhang, Roman Jandarov, Mario Medvedovic, Shuk-MeiHo, AiminChen, Jelena Šarac, Tonko Carić, Matea Zajc Petranović, Dubravka Havaš Augustin, Luka Bočkor, Saša Missoni, Pavao Rudan, Ranjan Dekka: **Asocijacijska studija kardiometaboličkih tragova na razini cijelog epigenoma u populaciji Jadranskih otoka**

Uvodna predavanja

1. STANIČNA TERAPIJA U LIJEČENJU OŠTEĆENJA HRSKAVIČNOG TKIVA: ISKUSTVA SPECIJALNE BOLNICE „SV. KATARINA“

Dragan Primorac^{1,2,3,4,5,6,7,8}, Damir Hudetz^{2,9}, Igor Boric^{1,3,4}, Eduard Rod^{1,2}, Željko Jeleč^{1,2,10}, Trpimir Vrdoljak^{1,9}, Gordjan Lauc^{11,12}, Andrea Skelin¹¹, Denis Polančec⁸, Lucija Zenic⁸, Irena Trbojević-Akmačić¹¹, Boro Nogalo⁸, Mirjana Turkalj^{2,8}, Mihovil Plečko¹, Ozren Polašek³

¹ Specijalna bolnica „Sv. Katarina“, 49210 Zabok/10000 Zagreb, Hrvatska

² Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, 31000 Osijek, Hrvatska

³ Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, 21000 Split, Hrvatska

⁴ Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, 51000 Rijeka, Hrvatska

⁵ Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 51000 Rijeka, Hrvatska

⁶ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, PA, SAD

⁷ University of New Haven, CT, SAD

⁸ Dječja bolnica „Srebrnjak“, 10000 Zagreb, Hrvatska

⁹ Klinička bolnica „Sveti Duh“, 10000 Zagreb, Hrvatska

¹⁰ Sveučilište Sjever, 42 000 Varaždin, Hrvatska

¹¹ Genos d.o.o., 10 000, Zagreb, Hrvatska

¹² Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hijalina hrskavica je avaskularna, aneuralna i alimfatična, a njena prehrana se odvija isključivo difuzijom iz sinovijalne tekućine. Jedino razdoblje tijekom kojeg hijalina hrskavica dobiva hranu subhondralnim krvnim žilama je u razdoblju njenog razvoja. Interakcija kolagenskih vlakana (prvenstveno kolagen tipa II.) s proteoglikanima (molekule koje sadrže tzv. *core protein* i glikozaminoglikane (GAG), točnije: hondroitin-sulfat, heparan-sulfat, dermatan sulfat i keratan sulfat) ima važnu ulogu u strukturoj i mehaničkoj stabilnosti hijaline hrskavice. Ugrađivanje vode u makromolekule proteoglikana te posljedično djelovanje molekula GAG, koje stvaraju tzv. *swelling pressure*, pridonosi reverzibilnoj deformaciji zglobne hrskavice koja pri djelovanju sila ne mijenja svoj volumen. Početna oštećenja hrskavice, nažalost, ne dovode do nastanka boli, kako zbog nedostatka krvnih žila (nedostatak upalnog odgovora) tako i zbog nedostatka osjetnih živaca, što je ozbiljan klinički problem u prevenciji razvoja osteoartrisa (OA). No s vremenom progresija oštećenja hrskavice, prvenstveno stvaranjem erozija, točnije vertikalnih procjepa hrskavice, dovodi do njene daljnje degeneracije, ali i nastajanja fragmenata hrskavice koji plutaju u sinovijalnoj tekućini, što u konačnici pokreće citokinski odgovor i nastanak upalne reakcije sinovijalne membrane zglobne čahure te stvaranje prvih kliničkih znakova upale, otoka i boli. Prilikom gubitka pokrova hrskavice, dolazi do značajnog trenja površinskih slojeva subhondralnih kostiju koje su sada u međusobnom kontaktu, te posljedičnog nastajanja disfunkcije zgloba, tipično za osteoartritis (OA). S druge strane, kao posljedica oštećenja hrskavice dolazi do preraspodjele opterećenja te nastajanja karakterističnih promjena koje se očituju radiološki. Liječenje OA-a dugo se vremena temeljilo isključivo na liječenju boli i u najtežim slučajevima ugradnji totalne endoproteze. Nove spoznaje, posebice iz polja tkivnog inženjeringa i regenerativne medicine, daju nadu oboljelima od OA-a, a od posebnog su interesa istraživanja vezana za učinak mezenhimalnih stromalnih/matičnih stanica (MSC), koje po definiciji u određenim laboratorijskim uvjetima *in vitro* mogu formirati koštano, hrskavično, masno ili mišićno tkivo. Zbog specifičnih svojstava MSC-a, koja se očituju na mjestu ozljede (angiogenetski, antiapoptotični, protuupalni, imunomodulatorni učinci), a sve lučenjem bioaktivnih faktora, potiče se učinak cijeljenja ili regeneracije oštećenog tkiva. U Specijalnoj bolnici „Sv. Katarina“ u suradnji s Genosom i Dječjom bolnicom Srebrnjak, provedene su tri studije: prva koja je uključivala aplikaciju autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva sa stromalnom vaskularnom frakcijom (SVF) u 21-og pacijenta s OA-om koljena, nakon čega su praćeni klinički parametri učinkovitosti terapijskog postupka kroz razdoblje od 12 mjeseci. Druga studija koja je kroz razdoblje od 24 mjeseca pratila učinak autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva na sintezu glikozaminoglikana hrskavice u 11-ero pacijenata. Treća studija je obuhvatila polikromatsku imunofenotipizaciju stanica stromalne vaskularne frakcije iz mikrofragmentiranog adipoznog tkiva i lipoaspirata pacijenata s osteoartritisom me-

todom protočne citometrije, a prethodni rezultati (*Polančec i sur. First Mediterranean Symposium on Comprehensive Joint Care, Split, 2018.*) su pokazali da SVF izdvojen iz mikrofragmentiranog masnog tkiva uglavnom sadrži progenitore endotelinih stanica (CD31⁺CD34⁺), pericite (CD31⁻CD34⁺CD146⁺) i supraadventicijske adipozne stromalne stanice (CD31⁻CD34⁺CD146⁻) te u manjem broju zrele endotelne stanice (CD31⁺CD34⁻). U prve dvije (kliničke) studije pacijenti oboljeli od OA-a su kategorizirani sukladno bodovnom sustavu Kellgren-Lawenceove metode, bodovanjem ICRS-a (eng. *International Cartilage Repair Society Cartilage Lesion System*), služeći se magnetskom rezonancijom, utvrđivanjem stupnja devijacije osovine donjih ekstremiteta te sukladno rezultatima dobivenih nakon kliničkog pregleda. U prvoj studiji, 12 mjeseci nakon aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva, pacijenti su detaljno obrađeni i evaluirani sukladno rezultatima dobivenim analizom upitnika WOMAC (eng. *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*), KOOS (eng. *Knee Osteoarthritis Scoring System*) i VAS (eng. *Visual Analogue Scale*) upitnika. Od 21-og ispitanika njih 18-ero pokazalo je statistički značajno poboljšanje kliničkog statusa u odnosu na početne rezultate. Istodobno su primjenom MRI-a metodu oslikavanja hrskavice kontrastnim sredstvom dGEMRIC (eng. *Delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage*), analizirani rezultati 11-ero pacijenata (20 koljena), koji su praćeni kroz razdoblje od 24 mjeseca. Ranije se pokazalo (*Hudetz i sur. Genes. 2017;8(10):270; doi:10.3390/genes8100270*) da je metoda oslikavanja hrskavice kontrastnim sredstvom dGEMRIC, a koja indirektno prikazuje količinu GAG-a u hrskavici, iznimno osjetljiva u utvrđivanju promjene razine GAG-a nakon aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva. Zaključno, u 11-ero pacijenata (20 koljena) oboljelih od OA-a, koji su praćeni kroz razdoblje od 24 mjeseci, utvrđeno je da je u većine pacijenata razina GAG-a (indirektno mjereći indeksom dGEMRIC) viša nego što je to bilo izmjereno na početku studije, a prije aplikacije mikrofragmentiranog masnog tkiva, što direktno sugerira da je učinak stanica koje se nalaze u SVF-u dugotrajan.

2. GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G KAO BIOMARKER I FUNKCIONALNI EFEKTOR BOLESTI

Gordan Lauc*

* Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Genos d.o.o.

Sve molekule imunoglobulina G su glikozilirane, a glikanski dio molekule u značajnoj mjeri određuje njezine efektorske funkcije. Za razliku od polipeptidnog dijela koji je potpuno određen slijedom nukleotida u odgovarajućem genu, glikanski dijelovi nisu izravno zapisani u genomu, te je njihova struktura određena i genskim i okolišnim čimbenicima. Kako je i većina kompleksnih bolesti pod značajnim utjecajem okolišnih faktora, glikani su mnogo bolji biomarkeri za te bolesti od genskih polimorfizama. Glikoanalitički laboratorij Genosa vodeći je laboratorij za visokoprotočnu glikomiku u svijetu, te smo u posljednjih nekoliko godina analizirali više od 80 000 uzoraka u sklopu različitih kliničkih i epidemioloških studija. U većini bolesti koje smo analizirali (uključujući dijabetes, upalne bolesti crijeva, kolorektalni karcinom, reumatoidni artritis, sistemski eritemski lupus i druge) pronašli smo značajna odstupanja u sastavu glikoma. Neke od tih razlika vidljive su i nekoliko godina prije pojave prvih simptoma bolesti i omogućuju vrlo ranu, u nekim slučajevima čak preventivnu dijagnostiku.

Odabrana plenarna predavanja

3. OD OTKRIĆA KROMOSOMA PHILADELPHIA DO SUVREMENE TERAPIJE KRONIČNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Renata Zadro*

* Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Godine 1960. prvi je put u povijesti medicine opisana povezanost između kromosomske abnormalnosti i zloćudne bolesti. Tada su, naime, *Nowell i Hungerford* identificirali sićušan kromosom, poslije nazvan Philadelphia, kromosom koji je posljedica uravnotežene recipročne traslokacije t(9;22) (q34;q11). U translokaciji t(9;22) veliki se dio protoonkogena Abelson (*ABL1*) na položaju 9q34 postavlja unutar gena *BCR* na položaju 22q11, što rezultira nastankom fuzijskoga gena *BCR/ABL1*. Produkt nastaloga gena fuzijski je protein s povišenom aktivnošću tirozin-kinaze koji utječe na signalne putove unutar stanice uključene u kontrolu stanične smrti, proliferacije i međustanične adhezije i odgovoran je za nastanak kronične mijeloične leukemije. Otkriće ove abnormalnosti olakšalo je postavljanje točne dijagnoze ove leukemije te omogućilo razvoj ciljane terapije i tehnika za praćenje minimalne ostatne bolesti. Naime, terapija kronične mijeloične leukemije je tijekom godina doživjela revolucionarni obrat. Nakon radijacije i konvencionalne terapije, alogenične transplantacije matičnim stanicama i interferona-alfa, pravi je prodor učinjen primjenom lijeka imatiniba kao prvog u klasi malih molekula, pa je kronična mijeloična leukemija postala prvi model bolesti za tzv. ciljanu terapiju. Imatinib ne djeluje izravno na kodiranje *BCR/ABL1*, već se natječe za vezno mjesto ATP-a na tirozin-kinazi i time uspostavlja mehanizam stanične smrti. Nakon imatiniba razvijeni su i testirani inhibitori tirozin-kinaze druge i treće generacije (dasatinib, nilotinib, bosutinib i ponatinib) koji također učinkovito inhibiraju kinaznu aktivnost *BCR/ABL1*. Glavna prednost dostupnosti većeg broja inhibitora tirozin-kinaze je mogućnost optimiziranja terapije prema pacijentu u slučaju nepodnošenja postojećeg lijeka ili pojave mutacija. Terapija inhibitorima tirozin-kinaze zahtijeva pouzdane metode za praćenje odgovora na lijek. Pri postavljanju dijagnoze kronične mijeloične leukemije prisutnost kromosoma Philadelphia dokazuje se konvencionalnom citogenetičkom analizom i fluorescentnom *in situ* hibridizacijom. Molekularnim metodama lančane reakcije polimerazom utvrđuje se tip fuzijskog prijepisa. Praćenje odgovora na terapiju uz pretragu uključuje kompletnu krvnu sliku, citogenetičku analizu i kvantificiranje fuzijskog prijepisa *BCR/ABL1*. Prema preporukama Europske leukemijske mreže (*European LeukemiaNet*) nakon postavljanja dijagnoze kronične mijeloične leukemije izvodi se kromosomska analiza koštane srži svakih tri do šest mjeseci i zatim svakih šest mjeseci do postizanja potpune citogenetičke remisije, te kvantitativna lančana reakcija polimerazom svaka tri mjeseca do postizanja znatnog molekularnog odgovora. Mutacijska se analiza preporučuje u slučaju daljnjeg razvoja bolesti ili neuspjeha terapije. Citogenetičkom i molekularnom analizom omogućeno je bolje razumijevanje djelovanja ove zloćudne hematološke bolesti u organizmu pojedinog pacijenta pa time i izbor odgovarajuće terapije.

4. MOLEKULARNA LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA CISTIČNE FIBROZE OD 1991.-2018. U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU ZAGREB

Jadranka Sertić^{1,2}, Ana Merkler¹, Hana Ljubić¹, Domagoj Caban¹, Ana Acman Barišić¹, Senka Škaro¹, Karolina Petrović¹

¹ Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

² Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju

Dijagnostički pristup cističnoj fibrozi uključuje analizu gena *CFTR* radi identifikacije mutacija i stratifikacije. Molekularna laboratorijska dijagnostika cistične fibroze provodi se u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku od 1991. godine.

Genotipizacija je tada uključivala analizu jedne najčešće mutacije, a danas primjenjujući IVD *Devyser* reagens, PCR i kapilarnu elektroforezu počinje s više desetaka mutacija kao što su F508del, I507del, 1717-1G→A, G542X, G551D, R553X, R560T, 3849 +

10kbC→T, R1162X, 3659delC, W1282X, N1303K, G85E, 621 + 1G→T, R117H, R117C, 711 + 1G→T, 1078delT, R347P, R347H, R334W, 1898 + 1G→A, 2183AA→G, 2184insA, 2789 + 5G→A, 3120 + 1GA, CFTRdele2,3 (21kb), Y1092X (C>A), L1077P, R1066C, L1065P, T338I, I336K, 1677delTA, 3272-26A>G, 2143delT + 5T, 7T, 9T. Analizom DNA-a u 118-ero ispitanika utvrđene su mutacije na oba alela F508del/F508del, jedan ispitanik je bio homozigot G542X/G542X, a osmero je složenih heterozigota F508del/2789+5G>A, F508del/R117H, G542X/R347P, F508del/N1303K, F508del/G542X, F508del/CFTRdele2,3, 621+1G>T/R117H, F508del/Y1092X(C>A). Sekvenciranjem su utvrđene i mutacije F508del/c.1302delA (p.Leu435Phefs7), F508del/Y1092X, F508del/1811+1G>A, R117H/N1148K, F508del/621+1G>C F508del/dup.ex.22T, F508del/cftrdele2.3, F508del/1811+1G>C i varijante nepoznatog značenja F508del/-8G>C, N/-8G>C, c.224G>A R75Q /N, c.-8G>C.

Klinički bolnički centar Zagreb 2018. godine ima međunarodnu suradnju i sudjeluje u Europskim mrežama putem programa vanjske procjene kakvoće radi harmonizacije molekularne laboratorijske dijagnostike cistične fibroze, uključujući točnost genotipizacije i interpretacije rezultata analize prema pravilima Društva za varijacije u humanom genomu. Vanjska procjena kakvoće potiče na istraživanje novih mutacija, održava kakvoću, slijedi nove trendove u analitici i dijagnostici, omogućuje povezivanje nacionalnih i međunarodnih registara bolesnika te može unaprijediti zdravstvenu skrb bolesnika.

5. USMJERENA DIFERENCIJACIJA LJUDSKIH KARDIOMIOCITA IZ PLURIPOTENTNIH MATIČNIH STANICA

Ana Šepac¹, Sven Seiwerth^{1,2}, Željko J. Bošnjak³, Filip Sedlić⁴

¹ Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

² Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Hrvatska

³ Medical College of Wisconsin, Sjedinjene Američke Države

⁴ Katedra za patofiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

Cilj: Ciljevi našeg rada su uspostaviti metode za učinkovitu i reproducibilnu *in vitro* diferencijaciju ljudskih kardiomiocita iz pluripotentnih matičnih stanica te verificirati uspješnu kardiomiogenezu primjenom različitih biljega, uključujući one genske.

Metode: Linije ljudskih pluripotentnih stanica su tretirane čimbenicima rasta aktivinom A i koštanim morfogenetskim proteinom-4. Živi, diferencirani kardiomiociti su obilježavani reporterskim genskim konstruktom, MLC 2v-EGFP, koji je transferiran lentivirusnim vektorom te omogućava isključivu vizualizaciju kardiomiocita putem zelene fluorescencije. Vektor je dobiven podkloniranjem genskog konstrukta u lentivirusni transfer plasmid *pHR(+)/c.Ub.MCSoligo.R(-)W(+)*. Kvantitativnim PCR-om je određivan panel gena specifičnih za pojedine stadije kardiomiogeneze. Određivali smo vremenski slijed izražaja sljedećih gena: *OCT4* (biljeg pluripotentnosti), *brachyury* (T; biljeg mezendoderma), *MESP1*, *NKX2.5* i *ISL1* (biljezi rane faze kardiomiogeneze), *GATA4*, *MEF2C*, *TNNT2* i *MYL7* (biljezi kasne kardijalne diferencijacije) te *HCN4*, *SCN5A*, *CACNA1C*, *KCNH2*, *KCNJ2* i *KCND3* (ionski kanali u srčanim stanicama). Elektrofiziološkim, imunocitokemijskim i funkcionalnim metodama testirana je učinkovitost diferencijacije i zrelost stanica. Uz pomoć konfokalnog mikroskopa uz primjenu fluorescentnog indikatora Fluo-4 AM u stvarnom su vremenu snimane kalcijeve mijene (eng. *calcium transients*).

Rezultati: Četrdeset dana nakon indukcije kardiomiogeneze jasno se mogu uočiti opsežna područja nakupina stanica koje se spontano i ritmično kontrahiraju. Analiza zastupljenosti kardiomiocita je pokazala njihovu visoku obogaćenost (65-85%) u diferenciranim stanicama. Snimanja su pokazala dva različita profila stanica. Jedne su s kraćim akcijskim potencijalima i kraćim mijenama kalcija koje odgovaraju atrijskim kardiomiocitima. Druge imaju dulje akcijske potencijale i dulje kalcijeve mijene, a odgovaraju ventrikulskim miocitima. Promatranje vremenskog slijeda izražaja gena rane i kasne faze diferencijacije srčanih stanica otkrilo je očekivani obrazac i potvrdilo normalnu kardiomiogenezu u svim testiranim staničnim linijama. Strukturne analize diferenciranih kardiomiocita su pokazale postojanje ispruganih sarkomera (imunocitokemijsko obilježavanje titina, sarkomernog α -aktinina i srčanog troponina T), što potvrđuje postojanje zrelih sarkomera, koje su glavne funkcionalne jedinice srčanih stanica. Funkcionalnost diferenciranih kardiomiocita verificirana je i dokazivanjem adekvatnog odgovora na prekondicionirajuće stimuluse inhalacijskim anestetima, pri čemu su dobiveni odgovori diferenciranih kardiomiocita korelirali s odgovorima zrelih (adultnih) kardiomiocita.

Zaključak: Usmjerena diferencijacija ljudskih pluripotentnih matičnih stanica učinkovit je način generiranja funkcionalnih kardiomiocita. Na ovaj se način mogu proizvoditi vrijedni eksperimentalni modeli za proučavanje bolesti srca. Poticanje proliferacije ili diferencijacije kardiomiocita iz matičnih stanica uzbudljiv je pristup koji bi se u budućnosti mogao primjenjivati za terapijsku regeneraciju srca.

6. IMUNOFENOTIPIZACIJA STROMALNE VASKULARNE FRAKCIJE IZ MIKROFRAGMENTIRANOG ADIPOZNOG TKIVA I LIPOASPIRATA PACIJENATA S OSTEOARTRITISOM

Denis Polančec¹, Lucija Zenić¹, Damir Hudetz^{2,3,4}, Igor Borić^{2,5,6}, Željko Jelež^{2,4}, Eduard Rod^{2,4}, Trpimir Vrdoljak^{2,3,4}, Andrea Skelin^{2,7}, Mihovil Plečko², Mirjana Turkalj^{4,11,12}, Boro Nogalo^{4,11}, Dragan Primorac^{1,2,4,6,8,9,10}

¹ Odjel za translacijsku medicinu, Dječja bolnica Srebrnjak, Zagreb, Hrvatska

² Specijalna bolnica „Sv. Katarina“, Zabok, Hrvatska

³ Klinička bolnica „Sveti Duh“, Zagreb, Hrvatska

⁴ Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Osijek, Hrvatska

⁵ Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka, Hrvatska

⁶ Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, Hrvatska

⁷ Genos d.o.o. za vještačenje i analizu, Zagreb, Hrvatska

⁸ Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, Hrvatska

⁹ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA, SAD

¹⁰ University of New Haven, West Haven, CT, SAD

¹¹ Odjel za pulmologiju i alergologiju predškolske i školske dobi, Dječja bolnica Srebrnjak Zagreb, Hrvatska

¹² Hrvatsko katoličko sveučilište, Zagreb, Hrvatska

Cilj: Lipogems® (Lipogems, Italija) sustav je za mehaničku mikrofragmentaciju lipoaspirata masnog tkiva koji se uspješno primjenjuje za autolognu intraartikularnu injekciju kod bolesnika s osteoartritisom koljena ili kuka. Osteoartritis (OA) je kronična i progresivna degenerativna bolest, pri kojoj zbog propadanja hrskavice dolazi do bolnosti i gubitka funkcije zglobova. Prema rezultatima naše nedavne studije primjena autolognog mikrofragmentiranog masnog tkiva sa stromalnom vaskularnom frakcijom (SVF) u bolesnika s OA-om dovodi do porasta razine glikozaminoglikana u hijalinoj hrskavici, što dovodi do smanjenja boli i poboljšanja sposobnosti kretanja (Hudetz i sur. 2017.). Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati protokol za izolaciju stanica SVF iz lipoaspirata (LA) dobivenih klasičnim postupkom te mikrofragmentiranog lipoaspirata procesiranog putem sustava Lipogems (LG), kao i usporediti imunofenotipski profil populacija stanica SVF protočnom citometrijom.

Metode: Uzorci LA-a i LG-a 10-ero pacijenata s OA-om koljena. Nakon izolacije stanica SVF blagom razgradnjom kolagenazom, stanice su izbrojane i pomoću prototipa tube DuraClone MSC (Beckman Coulter, SAD) provedena je imunofenotipizacija mezenhimnih matičnih stanica. Tube DuraClone MSC sadrže koktel protutijela za detekciju staničnih površinskih biljega: CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146. Mrtve stanice i stanične jezgre obojane su bojom *Live/Dead Yellow Fixable Stain* (ThermoFisher, SAD) i DRAQ7 (Beckman Coulter, SAD). Za analizu datoteka FCS (od eng. *Flow Cytometry Standard*) primijenjen je računalni program *FlowLogic* (Inivai Technologies, Australija).

Rezultati: U uzorcima LA-a i LG-a identificirano je pet glavnih subpopulacija stanica s jezgrom: stanice CD45⁺ (leukociti) te unutar frakcije CD45⁺ zrele endotelne stanice (CD31⁺CD34⁻), progenitor i endotelne stanice (CD31⁺CD34⁺), periciti (CD31⁻CD34⁺CD146⁺) i supraadventicijske adipozne stromalne stanice (CD31⁻CD34⁺CD146⁻). Relativni udio progenitora endotelne stanice i pericita u uzorcima LG-a bila je viša u usporedbi s uzorcima LA-a, dok je relativni udio supraadventicijskih adipoznih stromalnih stanica i leukocita bio niži. Također, za progenitore endotelne stanice, pericite i supraadventicijske adipozne stromalne stanice iz LG-a i LA-a utvrđen je različit izražaj staničnih biljega CD73 i CD90, karakterističnih za mezenhimne matične stanice.

Zaključak: Prototip tube DuraClone MSC uspješno je uporabljen za imunofenotipizaciju stanica SVF iz LA-a i LG-a protočnom citometrijom. Činjenica da je SVF iz uzoraka LG-a obogaćen progenitorima endotelne stanice i pericitima, uz popratno smanjenje udjela leukocita, ide u prilog protuupalnom i regenerativnom učinku mikrofragmentiranog autolognog masnog tkiva dobivenog tehnologijom Lipogems u terapiji osteoartritisa.

7. OPTIMIZACIJA GENSKJE (EX VIVO) TERAPIJE KOŠTANIM MORFOGENIM PROTEINOM-2 U REKONSTRUKCIJI PREDNJE UKRIŽENE SVEZE KOLJENA

Rod E^{1,8}, Matic I², Antunović M², Vetma V², Pavičić I¹⁰, Hudetz D^{1,3,8}, Marijanović I², Dragan Primorac^{1,6,7,8,9}, Ivković A^{3,4,5}

¹ Specijalna bolnica Sveta Katarina, Bračak 8, Zabok, Hrvatska

² Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

³ Zavod za ortopediju, Klinička bolnica „Sveti Duh“, Sveti Duh 64, Zagreb, Hrvatska

⁴ Zavod za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Radmile Matejčić 2, Rijeka, Hrvatska

⁵ Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 3, Zagreb, Hrvatska

⁶ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA

⁷ Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Hrvatska

⁸ Medicinski fakultet, Sveučilište u Osijeku, Josipa Huttlera 4, Osijek, Hrvatska

⁹ Dječja bolnica "Srebrnjak", Srebrnjak 100, Zagreb, Hrvatska

¹⁰ Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Hrvatska

Cilj: Svrha ovog istraživanja je bila provjeriti hipotezu da je pomoću adenovirusnog vektora, koji nosi gen za kodiranje koštanog morfogena proteina-2 (*Ad.BMP-2*), moguća uspješna *in vitro* transdukcija humanog mišićnog tkiva unutar sat vremena te dokazati da tako transducirano humano mišićno tkivo ima sposobnost osteogene diferencijacije.

Metode: Uzorci humanog mišićnog tkiva prikupljeni tijekom rekonstrukcije prednje ukrižene sveze 31. bolesnika upotrijebljeni su u ovoj *in vitro* analitičkoj i eksperimentalnoj studiji. Da bi se optimizirao protokol transdukcije, uzorci 28-ero pacijenata su transducirani pomoću adenovirusnog vektora koji je nosio luciferaza cDNA (*Ad.luc*). Tijekom tog dijela istraživanja primjenjivali smo različite doze *Ad.luc*, različito vrijeme transdukcije te dodatak pozitivnih iona za pojačavanje transdukcije. Tako optimizirani protokol dodatno je testiran pomoću *Ad.BMP-2*, služeći se humanim mišićnim uzorcima triju novih bolesnika. Otpuštene razine koštanog morfogena proteina 2 (*BMP-2*) u osteogenom mediju izmjerene su svaka tri dana tijekom razdoblja od 21-og dana pomoću enzimskog imunotesta ELISA. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu izmjerili smo ekspresiju ranih i kasnih osteogenih markera 14. i 21. dana. Nakon 21. dana uzgoja mišićno tkivo je imunohisto-kemijski obojeno na kolagen tip I (*COL-I*).

Rezultati: Uspostavili smo novi protokol transdukcije rabeći 10⁸ PFU ($P < 0,05$) kao optimalnu dozu adenovirusnog vektora, 30 minuta ($P < 0,05$) kao optimalno trajanje kontakta i pokazali da dodatak pozitivnih iona lantana i kalcija nije utjecao na poboljšanje transdukcije ($P < 0,05$). Humani mišićni uzorci transducirani pomoću *Ad.BMP-2* prema tako optimiziranom protokolu pokazali su pojačanu ekspresiju svih testiranih osteogenih markera ($P < 0,05$), značajno otpuštanje *BMP-2* ($P < 0,05$) i snažnu ekspresiju *COL-I*.

Zaključak: Rezultati ove studije potvrdili su hipotezu da je *Ad.BMP-2* sposoban transducirati humano mišićno tkivo i usmjeriti ga prema osteogenoj diferencijaciji unutar 30 minuta.

8. PRIMJENA RAČUNALNIH PROGRAMA ZA PROCJENU KLINIČKOG ZNAČENJA GENSKIH VARIJANTI NAĐENIH U 5'UTR GENA *BRCA2*

Petar Ozretić, Vesna Musani, Sonja Levanat*

* Laboratorij za nasljedni rak, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Štetne promjene u genima *BRCA1* i *BRCA2* povezane su s nasljednim i sporadičnim oblicima raka dojke i jajnika. Genetičko testiranje tih dvaju gena već se desetak godina provodi na institutu Ruđer Bošković. Jedan od glavnih problema kod genetičkog testiranja općenito su varijante nepoznatog kliničkog značenja (eng. *variants of unknown significance*, *VUS*). Više od polovice pronađenih varijanti gena *BRCA1/2* čine baš takve promjene. Za procjenu funkcionalnog, a posljedično i kliničkog značenja takvih genskih varijanti često se primjenjuju računalni programi. No značenje promjena koje se nalaze u regulatornim regijama mnogo je teže predvidjeti nego utjecaj onih koje se nalaze u kodirajućoj genskoj regiji. Za regulaciju proteinske ekspresije vrlo je važna 5' netranslatirana regija (5'UTR) gena. Cilj ovog istraživanja je primijeniti računalne programe radi procjene funkcionalnog značenja genskih varijanti nađenih u 5'UTR-u gena *BRCA2*.

Za ispravno funkcioniranje 5'UTR-a važna je njena sekundarna (2D) struktura koju čini intramolekulska sparivanje baza. 2D struktura molekula RNA može se relativno jednostavno računalno predvidjeti. U ovom istraživanju iskorišten je baš takav pristup za procjenu utjecaja varijanti gena *BRCA2* na 2D strukturu njegovog 5'UTR-a. Iz javno dostupnih baza podataka genskih varijanti *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) i *Genome Aggregation Database* (gnomAD) sakupljene su sve poznate varijante gena *BRCA2* nađene u 5'UTR-u. Iz baze anotirani 5'UTR-a (UTRdb) sakupljene su sekvence 5'UTR-a gena *BRCA2* iz različitih organizama. Pomoću programa RNAalifold dizajnirana je konsenzus 2D struktura 5'UTR-a gena *BRCA2*. Primjenom programa RNAfold istražen je utjecaj varijanti nađenih u 5'UTR-u humanog gena *BRCA2* na njenu konsenzus 2D strukturu.

Nađeno je 60-ak varijanti humanog gena *BRCA2* unutar 5'UTR-a. Na osnovi nukleotidnih sekvenci 5'UTR-a gena *BRCA2* iz četiriju različitih vrsta dizajnirana je konsenzus 2D struktura. Računalno predviđanje utjecaja genskih varijanti na 2D strukturu 5'UTR-a humanog gena *BRCA2* klasificiralo je tri tipa genskih varijanti: one koje nemaju utjecaja na 2D strukturu, varijante koje stvaraju stabilniju 2D strukturu i time imaju potencijalno negativan učinak na efikasnost translacije proteina *BRCA2* te varijante koje stvaraju manje stabilni 5'UTR s mogućim pozitivnim učinkom na količinu sintetiziranog proteina *BRCA2*.

Sinteza proteina *BRCA2* vrlo je precizno regulirana te potencijalno negativan utjecaj na normalno funkcioniranje stanica može imati i premala i prevelika količina tog proteina. Naš računalni pristup uputio je na moguće funkcionalno značenje dosad pronađenih varijanti gena *BRCA2* nađenih u 5'UTR-a. No važno je razumjeti da računalno predviđanje utjecaja genskih varijanti ne daje konačnu potvrdu njihovog funkcionalnog značenja, ali uvelike pomaže pri odabiru („prioritizaciji“) varijanti za daljnje funkcionalno testiranje.

9. FARMAKOGENOMIKA U LIJEČENJU BOLI

Lidija Bach-Rojecky¹, Dalia Vađunec¹, Katarina Žunić¹, Jelena Kurija¹, Ivan Mikula², Dragan Primorac^{2,3,4,5,6,7}

¹Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

²Specijalna bolnica Sv. Katarina, Zagreb & Zabok, Hrvatska

³Eberly College of Science, 517 Thomas St, State College, Penn State University, PA 16803, USA

⁴Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Šoltanska 2, 21000 Split, Hrvatska

⁵Medicinski fakultet, Sveučilište u Osijeku, Ulica cara Hadrijana 10, 31000 Osijek, Hrvatska

⁶Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka Hrvatska

⁷Dječja bolnica Srebrnjak, Srebrnjak 100, 10000 Zagreb, Hrvatska

Od kronične boli različitog uzroka pati oko 27% odraslih stanovnika Europske unije, što je veliko opterećenje kako za samog oboljelog, tako i za zdravstveni sustav, ali i društvo u cjelini. Kronična bol nosi visoki stupanj onesposobljenja, a često je praćena razvojem komorbiditeta pa zahtijeva primjenu lijekova tijekom dugog vremenskog razdoblja.

Da bi liječenje boli bilo uspješno, potrebno je za svakog pacijenta odabrati odgovarajući lijek ili kombinaciju lijekova u optimalnim dozama te redovito pratiti učinkovitost i pouzdanost terapije. Usprkos velikom broju dostupnih analgetika na tržištu, oko 50% oboljelih nema očekivani terapijski odgovor te doživljavaju brojne neželjene učinke, od kojih neki mogu biti opasni i potencijalno fatalni, primjerice depresija disanja kod opioida i kardiotskičnost kod nesteroidnih protuupalnih lijekova.

Osim nesteroidnih protuupalnih lijekova i opioidnih analgetika, u liječenju kronične boli danas se primjenjuju i lijekovi iz drugih farmakoterapijskih skupina poput antidepresiva, antikonvulziva i anestetika. U kliničkoj praksi opažaju se velike inter-individualne varijacije u percepciji boli, analgetskom djelovanju lijekova te njihovom profilu podnošljivosti i pouzdanosti. Nedovoljna učinkovitost i nuspojave najčešći su razlozi niske adherencije bolesnika prema propisanoj terapiji, čime je dodatno ugroženo postizanje željenih terapijskih ishoda.

Razumijevanje mehanizama u pozadini takvih inter-individualnih razlika od velike je kliničke važnosti. Mogući razlozi su polimorfizmi gena, uključujući one koji kodiraju: ciljne proteine na koje djeluju lijekovi (enzimi ciklooksigenaza (COX) i katehol-O-metiltransferaza (COMT), μ -receptor za opioide (OPRM1) i dr.), prijenosne proteine (P-glikoprotein) i enzime koji sudjeluju u biotransformaciji lijekova (CYP2D6, CYP3A, UGT i dr.). Osim toga, epigenetičke modifikacije DNA-a, poput povećane metilacije gena *OPRM1* mogle bi objasniti neke paradokсне nuspojave poput hiperalgezije i ovisnosti uzrokovane opioidima.

Farmakogenetička testiranja (polimorfizmi *CYP2D6* i *CYP2C9*) nalaze se u kliničkim smjernicama samo za nekoliko lijekova koji se primjenjuju u liječenju kronične boli, poput kodeina, oksikodona, tramadola, celekoksiba, amitriptilina, klomipramina, doksepina, venlafaksina.

No s obzirom na kompleksne patofiziološke mehanizme nastanka kronične boli, mnogobrojne ciljne proteine na koje lijekovi djeluju te različite metaboličke enzime što utječu na sudbinu lijeka u organizmu, potrebno je proširiti farmakogenomska testiranja. Vrlo je važno uključiti i one gene koji mogu dodatno objasniti inter-individualne razlike u terapijskom i štetnom djelovanju lijekova, a sve radi osiguravanja učinkovite i pouzdane terapije za svakog bolesnika.

10. MULTIMODALNI KONCEPT FARMAKOGENOMSKOG TESTIRANJA U KLINIČKOJ PRAKSI: MODEL SPECIJALNE BOLNICE "SV. KATARINA" I ONEOME

Jasmina Čatić^{1,2,3}, Andrea Skelin⁴, Luka Boban⁵, Vilim Molnar⁵, Vid Matišić⁵, Paulo Zekan⁵, Borna Arsov⁵, Alen Juginović⁶, Ivan Mikula¹, Lidija Bach-Rojecky⁷, Ivana Erceg-Ivkošić^{1,8,9}, Damir Erceg^{2,10}, Dragan Primorac^{1,2,6,9,10,12,13,14,15}

¹ Specijalna bolnica "Sv. Katarina", 49210 Zabok/10000 Zagreb, Hrvatska

² Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, 31000 Osijek, Hrvatska

³ Klinička bolnica Dubrava Dubrava, 10 000 Zagreb, Hrvatska

⁴ Genos d.o.o., 10 000, Zagreb, Hrvatska

⁵ Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 10000 Zagreb, Hrvatska

⁶ Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, 21000 Split, Hrvatska

⁷ Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 10000 Zagreb, Hrvatska

⁸ Klinička bolnica "Sveti Duh", 10000 Zagreb, Hrvatska

⁹ Fakultet za dentalnu medicine i zdravstvo. Sveučilište u Osijeku, 31000 Rijeka, Hrvatska

¹⁰ Dječja bolnica "Srebrnjak", 10000 Zagreb, Hrvatska

¹¹ Sveučilišni Odjel za sestrinstvo, Hrvatsko katoličko Sveučilište, 10000 Rijeka, Hrvatska

¹² Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, 51000 Rijeka, Hrvatska

¹³ Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 51000 Rijeka, Hrvatska

¹⁴ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, PA, SAD

¹⁵ University of New Haven, CT, SAD

Farmakogenomika danas je važan i nedjeljiv dio koncepta personalizirane medicine. Za razliku od tradicionalnog pristupa, koji ne uzima dovoljno precizno individualnu različitost, kroz primjenu farmakogenomskog testiranja moguće je kreirati prilagođenu, personaliziranu i učinkovitiju terapiju, kojom se smanjuje rizik od štetnih učinaka lijekova. Time istodobno smanjujemo potrošnju lijekova i ukupne troškove liječenja. Specijalna bolnica "Sv. Katarina" u suradnji s američkom korporacijom OneOme kao sastavni dio svakodnevne kliničke prakse provodi farmakogenomsko testiranje testom RightMed®. Panel RightMed® analizira (sukladno smjernicama *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)*) utjecaj određenog genotipa na lijek, točnije 25 gena (*CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2C klaster, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP4F2, COMT, DPYD, DRD2, GRIK4, HLA-A, HLA-B, HTR2A, HTR2C, IFNL4, NUDT15, OPRM1, SLC6A4, SLCO1B1, TPMT, UGT1A1, VKORC1*). Uz to u panelu se analiziraju i gen *MTHFR* te geni za faktor II. (Protrombin) i faktor V. (Leiden). Analizom gena uključenih u I. fazu metabolizma lijekova - enzimi citokroma P450 (*CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2C klaster, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP4F2*), gena uključenih u II. fazu metabolizma lijekova (tiopurinska metiltransferaza (TPMT), UDP-glukuronozil-transferaza – (UGT1A1), gena uključenih u sintezu ostalih enzima važnih za metabolizam lijekova (dihidropirimidinska dehidrogenaza (DPYD); vitamin K-epoksidna reduktaza, podjedinica 1 (VKORC1); nudiks hidroksilaza 15 (NUDT15)), gena odgovornih za djelovanje transporterija lijekova (*SLC6A4, SLCO1B1*), gena odgovornih za funkciju receptora za lijekove (serotoninški receptori (*HTR2A, HTR2C*), dopaminski receptor (*DRD2*), opioidni receptor Mu1 (*OPRM1*), ionotropni kainat 4 glutamatni receptor (*GRIK4*), katekol-O-metiltransferaza (*COMT*) te gena odgovornih za sintezu ostalih proteina važnih za funkcioniranje lijekova (*IFNL4*); glavni sustav histokompatibilnosti razreda I., A i B (HLA-A, HLA-B)) dobivamo uvid u terapijski učinak 360 lijekova. Tako se identificiraju lijekovi koji pokazuju snažne i umjerene interakcije s genomom pacijenta i enzimski putovi kojima se ta interakcija ostvaruje. Sukladno dobivenim rezultatima, putem interaktivne platforme RightMed advisor, biraju se zamjenski lijekovi ili prilagođava potrebna doza lijeka, sukladno načelima personalizirane medicine "Pravi lijek, za pravog pacijenta u pravo vrijeme".

11. SEKVENCIJANJE NOVIJE GENERACIJE (NGS) U DIJAGNOSTICI I LIJEČENJU HEMATOLOŠKIH MALIGNIH BOLESTI

Irena Drmić Hofman*

* Klinički bolnički centar Split, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju; Medicinski fakultet Split, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju

Cilj: Sekvenciranje novije generacije (NGS) sveobuhvatna je molekularno-dijagnostička metoda koja se sve više primjenjuje u dijagnostici i omogućava istodobnu analizu mnoštva gena tumorskog DNA-a u jednom testu. Jedan od izazova u genomskoj eri je i dijagnostika hematoloških malignih bolesti, koje karakteriziraju morfološke ili fenotipske sličnosti, ali i niz karakterističnih genskih nestabilnosti poput mutacija, preuredbi gena i amplifikacija. Dodatan dijagnostički problem je i činjenica da jedan dio bolesti hematopoetskih matičnih stanica (posebice mijeloidne neoplazme) u trenutku dijagnoze najčešće ima normalan kariotip, pa je bolest moguće dijagnosticirati i klasificirati uglavnom na temelju genskog profila.

Metode: Molekularni profil hematoloških bolesti eskponencijalno je proširen posljednjih 20 godina, dok su kompleksnost i enorman broj biomarkera poteškoće u analizi pojedinačnih gena. U ovom radu dat ćemo pregled novijih genskih panela prilagođenih za NGS analize, koji omogućavaju analizu desetak do čak stotinjak gena u bolesnika s mijeloidnim neoplazmama. Također ćemo dati pregled postupaka informatičke obrade podataka generiranih genskom analizom (engl. *informatic pipeline*), koji svaki laboratorij treba specifično prilagoditi svojim uvjetima rada.

Rezultati: Simultana analiza ciljnih gena pokazuje da NGS omogućava detekciju somatskih mutacija u desetina ciljnih gena značajnih za: 1) postavljanje dijagnoze bolesti (akutna mijeloična leukemija (AML), mijelodisplastični sindrom (MDS) i mijeloproliferativne neoplazme (MPN)), 2) procjenu prognostičkog rizika, 3) procjenu prikladnosti za ciljanu terapiju te 4) detekciju i praćenje minimalne ostane bolesti (MRD).

Zaključak: Danas je dostupan čitav niz NGS tehnika, reagensa i instrumenata. Primjena metoda NGS u dijagnostici mijeloidnih neoplazmi pruža mogućnost istodobne analize mnoštva ciljnih gena ili regija, koja će zamijeniti čitav niz pojedinačnih testova danas dostupnih u kliničkim molekularnim laboratorijima.

12. METODE SEKVENCIJANJA NOVE GENERACIJE U DIJAGNOSTICI NASLJEDNIH METABOLIČKIH BOLESTI - PREDNOSTI I IZAZOVI

Tamara Žigman¹, Danijela Petković Ramadža^{1,2}, Ivo Barić^{1,2}

¹ Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb

² Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Cilj: Nasljedne metaboličke bolesti su pojedinačno rijetke, ali kao skupina brojne. Riječ je o monogenski nasljednim bolestima s najčešće autosomno recesivnim obrascem nasljeđivanja, ali ima i onih koje se nasljeđuju autosomno dominantno, X-vezano ili maternalno. Kako je riječ o poremećajima koji zahvaćaju različite biokemijske procese, klinički izražaj je vrlo šarolik. Simptomi se mogu pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi i vrlo su često nespecifični. Unatoč primjeni brojnih klasičnih dijagnostičkih metoda (biokemijske, funkcionalne i slikovne metode), određeni broj bolesnika ostajao je bez etiološki točne dijagnoze, a time mu je i uskraćena mogućnost ciljanog liječenja. Ciljani pristup pronalaženju uzroka, poput Sangerovog sekvenciranja pojedinog gena, imao je ograničen uspjeh uz velike troškove analize. Metode sekvenciranja nove generacije su kroz analizu ciljanih genskih panela, odnosno sekvenciranja cijelog egzoma ili genoma, omogućile postavljanje etiološke dijagnoze kod brojnih bolesnika, kod nekih primjenu ciljanog liječenja, genetičko savjetovanje bolesnika i obitelji te prenatalnu i preimplantacijsku dijagnostiku, u kratko vrijeme i uz razumnu cijenu. Interpretacija nalaza sekvenciranja ostaje za laboratorijske genetičare i kliničare i dalje najveći izazov.

Cilj rada je kroz primjere bolesnika prikazati prednosti i izazove primjene metoda sekvenciranja nove generacije u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti.

Metode: Prikaz troje bolesnika kod kojih smo za postavljanje dijagnoze primijenili metode sekvenciranja nove generacije.

Rezultati: Prva bolesnica je djevojka s hipertrofičnom kardiomiopatijom, kod koje je analizom genskog panela postavljena dijagnoza rijetke srčane glikogenoze, zbog mutacije u genu *PRKAG2*. Navedena je dijagnoza omogućila pokušaj liječenja modifikacijom prehrane. Druga dva bolesnika su djeca s ranom dojenačkom epilepsijom. Kod prvog je nađena varijanta ne-

jasnog značenja u genu *SCN9A*, a u drugog varijanta nejasnog značenja u genu *SCN1A*. Kod potonjeg je kao dodatni izazov ostalo tumačenje predispozicije za razvoj autizma.

Zaključak: Metode sekvenciranja nove generacije omogućile su točnu i razmjerno brzu dijagnozu kod brojnih bolesnika koji boluju ili kod kojih se sumnja da boluju od nasljednih metaboličkih bolesti. Kod nekih je postavljanje točne dijagnoze omogućilo ciljano liječenje, a kod nekih prestanak dijagnostičke odiseje, genetičko savjetovanje i planiranje obitelji. Veliki izazov je tumačenje nalaza dodatnih mutacija ili varijanti nejasnog kliničkog značenja, koje se pojavljuju ako analiza obuhvaća veliki broj gena. S obzirom na mogućnost kasne pojave simptoma, potonje može biti i etički dvojbeno. Dodatni izazov u tumačenju varijanti nejasnog značenja je i nedostatak funkcionalnih studija u velikom broju slučajeva.

13. KLINIČKE MANIFESTACIJE NEDOSTATNE AKTIVNOSTI GLUKOZA-6-FOSFAT DEHIDROGENAZE U DALMACIJI

Vjekoslav Krželj^{1,2}, Anet Papazovska Cherepnalkovski^{1,2}, Ivana Čulo Čagalj^{1,2}, Joško Markić^{1,2}, Ana Skelin Glavaš¹, Tina Majstorović¹, Janoš Terzić², Bernarda Lozić^{1,2}

¹ Klinički bolnički centar Split

² Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

Cilj: Opisati kliničke manifestacije nedostatne aktivnosti enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) u Dalmaciji.

Metode: Analizirali su se podaci dostupni iz naših prethodno provedenih istraživanja u Dalmaciji i 16-ero bolesnika liječenih u Klinici za dječje bolesti KBC-a Split. U svim se istraživanjima za skrining pretragu primijenio fluorescentni spot test, a pozitivni uzorci su se kvantitativno analizirali spektrofotometrijskom metodom. Prvo istraživanje obuhvatilo je 2726-ero ispitanika obaju spolova, što je bio 10% uzorak srednjoškola u srednjoj Dalmaciji, zatim su upotrijebljeni podaci istraživanja 302 slučajno odabrana uzorka muškaraca iz Komiže te nalazi 513-ero ispitanika koji su imali nerazjašnjenu novorođenačku žuticu. Varijante mutacije gena G6PD su se analizirale na uzorku od 24 nesrodna ispitanika muškog spola.

Rezultati: Deficit aktivnosti G6PD-a je dokazan u 183-je ispitanika, a kliničke manifestacije su bile prisutne u 83 (45,3%) slučaja. Jedine uočene kliničke manifestacije su favizam i novorođenačka hiperbilirubinemija. Favizam je registriran u 45-ero (24,6%) naših ispitanika s deficitom aktivnošću G6PD-a. Čak je sedam osoba ženskog spola, heterozigota za G6PD, oboljelo od favizma. Istraživanje provedeno na 10%-tnom uzorku slučajno izabranih srednjoškola u srednjoj Dalmaciji pokazalo je učestalost od 0,44% u oba spola, a u muškaraca 0,75%. Komiža na otoku Visu ima znatno veću učestalost nedostatne aktivnosti enzima G6PD i istraživanje je pokazalo da je deficit prisutan u 5,96% muških ispitanika. Retrospektivno istraživanje muške djece s nerazjašnjenom novorođenačkom žuticom je pokazalo učestalost deficita G6PD-a od čak 7,4%. S obzirom na to da je učestalost u općoj populaciji u muškog spola 0,75%, nedvojbeno je da je i novorođenačka žutica klinička manifestacija nedostatne aktivnosti G6PD-a u Dalmaciji. Molekularnom analizom gena za G6PD pronašli smo šest različitih mutacija. Varijante G6PD-a Cosenza, G6PD-a Mediterana, G6PD-a Union i G6PD-a Casano su bile udružene s kliničkom manifestacijom favizma. Najčešća varijanta u devetero od 24-ero (37,5%) ispitanika neočekivano je bio G6PD Cosenza. U jednom uzorku je otkrivena nova mutacija nazvana G6PD Split s nukleotidnom zamjenom 1442 C→G i posljedičnom promjenom aminokiselina u enzim 481 Pro→Arg, što rezultira umjerenim deficitom aktivnosti G6PD-a.

Zaključak: Nedostatna aktivnost G6PD-a se može klinički manifestirati akutnom hemolitičkom anemijom kao posljedicom infekcije ili uporabom lijekova sa snažnim oksidacijskim svojstvima, kroničnom nesferocitnom hemolitičkom anemijom, favizmom i novorođenačkom žuticom. Jedine dosad opisane kliničke manifestacije deficita G6PD-a u Dalmaciji su favizam i novorođenačka žutica. Korisno je u svim patološkim nekonjugiranim novorođenačkim žuticama nejasnog uzroka analizirati aktivnost G6PD-a.

14. OD KLINIČKE SLIKE DO GENSKE TERAPIJE

*Radenka Kuzmanić-Šamija, Ivana Unić, Jasna Petrić**

* Klinički bolnički centar, Klinika za dječje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Uvod: Mišićne distrofije su heterogena skupina nasljednih bolesti karakterizirane progresivnom mišićnom slabošću i atrofijom mišića. Među njima je najčešća Duchenneova mišićna distrofija. Uzrokovana je mutacijama u distrofinskom genu, prilikom čega

dolazi do gubitka ekspresije proteina distrofina koji je ključan za održanje citoskeleta mišićnih stanica. Geni i njihovi proteinski produkti odgovorni za nastanak mišićnih distrofija otkriveni su za većinu mišićnih distrofija. Molekularna genetička testiranja te određivanje proteinske deficijencije u većini slučajeva nam omogućavaju postavljanje precizne dijagnoze, procjene tijeka bolesti, ali omogućavaju i identifikaciju nositelja i otvara mogućnost prenatalne dijagnoze. Kakvoća života osoba oboljelih od mišićnih distrofija može se znatno poboljšati, odgovarajućim rehabilitacijskim postupcima, adekvatnom respiratornom njegom i kirurškim intervencijama. Razvoj molekularne biologije i molekularne genetike otvorio je vrata drugim terapijskim mogućnostima koji možda neće potpuno izliječiti bolest, ali će svakako poboljšati njen tijek i ublažiti simptome.

Metode: Prikazali smo pacijenta s dijagnozom Duchenneove mišićne distrofije, kojemu je bolest rezultat *nonsense* mutacije u distrofinskom genu, pa je liječen atalurenom koji omogućuje ribosomalnu translaciju mRNK-a preko preuranjenog stop-kodona, što rezultira sintezom proteina pune dužine.

Cilj rada je prikazati najnovije spoznaje o Duchenneovoj mišićnoj distrofiji, uputiti na složenost dijagnostičkih postupaka, na značenje što ranijeg postavljanja dijagnoze, s posebnim osvrtom na molekularno-genetičku dijagnostiku, te prikazati najnovije spoznaje o terapijskom pristupu.

Zaključak: Klinička prezentacija mišićnih distrofija, pa tako i Duchenneove mišićne distrofije, nespecifična je i ne postoji jasna fenotipsko-genotipska korelacija bolesti, ali napredak molekularne genetike omogućio je lakše postavljanje dijagnoze, prepoznavanje poznatih kliničkih entiteta i definiranje novih poremećaja i liječenje.

15. JESU LI PRIMARNE IMUNODEFICIJENCIJE RIJETKE BOLESTI KOD DJECE?

Mirjana Turkalj^{1,2,3}, Lucija Zenić¹, Denis Polančec¹, Jelena Živković¹, Kristian Vlahoviček⁴, Olga Malev¹, Boro Nogalo^{1,2}

¹ Dječja bolnica Srebrnjak, Odjel za translacijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska

² Medicinski fakultet Sveučilišta J.J.Strossmayer, Osijek

³ Hrvatsko katoličko sveučilište, Zagreb

⁴ Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska

Uvod: Primarne imunodeficijencije (PID) nezarazne su i nasljedne bolesti razvoja i/ili funkcije imunskog sustava uzorkovane genskim mutacijama. PID su rastuća skupina od više od 320 različitih genetički determiniranih poremećaja za koje se smatra da su pojedinačno i kolektivno rijetki. Stvarna učestalost PID-a kod djece i odraslih ostaje nejasna, ali nedavne epidemiološke studije upućuju na to da su primarne imunodeficijencije u stalnom porastu. Najčešće su PID-i povezani s poremećajem humoralnog imuniteta. Navedeni poremećaji mogu biti karakterizirani odsutnošću ili prisutnošću B stanica i njihovih produkata - imunoglobulina. U kliničkoj slici kod pedijatrijske populacije koja ima nedostatak protutijela prevladavaju rekurentne upale srednjeg uha, sinusa i pluća te teške infekcije gornjeg i donjeg dišnog sustava. Isto tako vrijedi i za odrasle, iako je u tom slučaju upala srednjeg uha manje uobičajena. Pojava infekcija oportunističkim uzročnicima dovela je do razumijevanja individualne osjetljivosti na infekcije. No učinkovito djelovanje terapije antibiotikom može istodobno zamaskirati prepoznavanje i otkloniti sumnju na PID nakon uspješno riješene infekcije. Mnogi pacijenti imaju dugu povijest ukorijenjenih infekcija prije nego što je PID dijagnosticiran kad su kronične komplikacije već razvijene (npr. bronhiektazije, malapsorpcija). Kompleksnost kliničkog stanja oboljelih od PID-a utječe i na kakvoću života i životnu prognozu samog bolesnika. Stoga je od posebnog značenja rana dijagnostika i rana terapija kako bi se izbjegle nepotrebne komplikacije.

Cilj: Procijeniti pojavnost najčešćih prirođenih imunodeficijencija vezanih za poremećaje produkcije protutijela te bolesti koje su za njih vezane.

Ispitanici i rezultati: Ispitivanje je provedeno u Dječjoj bolnici Srebrnjak u djece u dobi od 4-18 godina, (prosječna dob 9,3 godine). Pojavnost poremećaja produkcije protutijela u djece, posebno selektivni deficit sinteze IgA protutijela (teški i parcijalni) najčešći je poremećaj humoralnog imuniteta u naših ispitanika. Poremećaji produkcije protutijela najčešći su tip PID-a i oni čine oko 70% svih primarnih imunodeficijencija. Učestalost rekurentnih infekcija, astme i alergija u djece sa selektivnim deficitom IgA protutijela (N=95) prema našim istraživanjima bila je statistički značajno viša ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu (N=67, prosječna dob 9,2 godine). Prikazat ćemo na primjeru dvaju bolesnika s PID-om dijagnostički i terapijski postupnik te važnost genetičke i rane dijagnostike u liječenju i prevenciji razvoja komplikacija.

Zaključak: Nužne su nove epidemiološke studije kako bi se dobila realna slika incidencije i prevalencije PID-a i povećala svijest liječnika i sustava javnog zdravstva te realno procijenio utjecaj imunodeficijencija na djecu i odrasle na razini stanovništva. Rana dijagnostika i liječenje, posebno najčešćih PID-a, kao što je selektivni deficit IgA protutijela, ključni su u prevenciji i praćenju bolesnika.

16. GENETIČKA OSNOVA EPILEPSIJA I EPILEPTIČKIH SINDROMA U DJECE I PERSONALIZIRANI TERAPIJSKI PRISTUP

Romana Gjergja Juraški¹, Nataša Nenadić Baranašić¹, Feodora Stipoljev², Sanda Huljev Frković³, Tamara Žigman³, Fran Borovečki⁴, Zlatko Sabol⁵, Nina Barišić⁶

¹ Dječja bolnica Srebrnjak, MEF, Sveučilište u Osijeku, Odjel neuropedijatrije, Zagreb

² KB „Sveti Duh“, MEF, Sveučilište u Osijeku, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Citogenetski laboratorij, Zagreb

³ KBC Zagreb, MEF, Sveučilište u Zagrebu, Klinika za pedijatriju, Zavod za genetiku, Sveučilište u Zagrebu

⁴ KBC Zagreb, MEF Sveučilište u Zagrebu, Klinika za neurologiju i Centar za translacijska i klinička istraživanja, Sveučilište u Zagrebu

⁵ Poliklinika za dječje bolesti Dr. Sabol, Zagreb

⁶ KBC Zagreb, MEF, Sveučilište u Zagrebu, Zavod za neurologiju Klinike za pedijatriju, Zagreb

Epilepsija u djetinjstvu zahvaća do 1% opće populacije. Dio fenotipa epilepsije povezan je sa specifičnim kromosomskim aberacijama gdje do izražaja dolazi efekt genske doze, ali i sa specifičnim mutacijama različitih gena u rasponu od ionskih kanala do faktora transkripcije. Mutacije koje su uzrok kanalopatijama mogu značiti dobitak ili gubitak funkcije ionskog kanala i pridonijeti patogenezi epilepsije. Osim natrijevih, kalijevi i kalcijevi kanali također su uključeni u epilepsije i epileptičke encefalopatije. Rane epileptičke encefalopatije i epileptički sindromi su teški neurološki poremećaji i dovode do oštećenja motoričkog, kognitivnog i senzornog razvoja zbog recidiva napadaja. Liječenje rijetkih epileptičkih encefalopatija i epileptičkih sindroma je izazov, jer većina lijekova neće biti učinkovita i česte su neželjene nuspojave.

Cilj: Prikazati važnost genetičkog nalaza u procesu donošenja dijagnostičkih i terapijskih odluka u djece s epilepsijom, s posebnim osvrtom na rijetke nasljedne kanalopatije u šestoro djece s epilepsijom.

Metode: Retrospektivna i prospektivna analiza medicinske dokumentacije djece s nasljednom kanalopatijom, koja uzrokuje epilepsiju ili epileptički sindrom, uz uvid u genetički nalaz, cjelonožne i prolongirane video elektronecefalografske zapise, nalaz magnetske rezonancije mozga, kliničku sliku i terapijske opcije.

Rezultati: Prikazali smo skupinu djece s genetičkom epilepsijom/epileptičkim sindromom, s posebnim osvrtom na nasljedne kanalopatije (*SCN1A* i *SCN8A*). Genetički nalaz omogućio je genotipsko-fenotipsku korelaciju, usporedbu s već opisanim slučajevima, kao i određivanje personalizirane terapije. Uspješnost liječenja ovisila je i o pridruženim tegobama koje su opisane uz pojedine nasljedne kanalopatije, kao što su intelektualni deficit, autistički spektar, motoričke smetnje, poteškoće govora, smetnje spavanja. Nuspojave antiepileptičkih lijekova učestalije su u djece s nasljednim epilepsijama zbog primjene politerapije i visokih doza lijekova.

Zaključak: Na primjeru naših bolesnika i njihovih obitelji dokazali smo da je bolje razumijevanje molekularne prirode epilepsije kod svakog pojedinog bolesnika važno za oblikovanje personalizirane terapije, s obzirom na broj mogućih genetičkih promjena i fenotipske varijacije i unutar iste obitelji.

17. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE OSTEOGENESIS IMPERFECTE - PERSONALIZIRANI PRISTUP

Ljubica Boban¹, Dragan Primorac²⁻⁸

¹ Klinika za dječje bolesti Zagreb

² Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku JJ Strossmayer, Osijek

³ Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split

⁴ Dječja bolnica Srebrnjak, Zagreb

⁵ Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

⁶ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA,

⁷ The Henry C. Lee College of Criminal Justice and Forensic Sciences, University of New Haven, West Haven, USA

⁸ Specijalna bolnica Sv. Katarina, Zabok/Zagreb

Osteogenesis imperfecta (OI) ili bolest krhkih kostiju koštana je displazija kojoj su glavno obilježje pojačana lomljivost kosti i sklonost razvoju deformiteta i onesposobljenja. Tradicionalno, kao glavni uzrok OI-ja smatrane su promjene u sintezi i strukturi molekule kolagena tip I. Spoznaje o dijagnostici i liječenju OI uglavnom su bazirane na kliničkim opisima oboljelih, analizi biokemijskih parametara koštanog metabolizma, radiološkim obilježjima te rijetko analizom kolagenskih gena *COL1A1* i

COL1A2. Napretkom molekularne medicine u posljednjih deset godina značajno je rasvijetljena genetička podloga bolesti, pri čemu je definirano sveukupno 18 gena uključenih u njen razvoj. Također je djelomično razjašnjena i uloga pojedinih signalnih putova staničnog matriksa i uloga signalnih molekula u moduliranju aktivnosti osteoblasta/osteoklasta. Unatoč rasvijetljavanju genetičke i dijelom biokemijske podloge *OI*-a, svi patofiziološki mehanizmi nastanka bolesti, uloga pojedinih genskih produkata i procesi unutar staničnog matriksa te odgovor na pojedine terapijske postupke još nisu dovoljno razjašnjeni. Tradicionalni pristup liječenju zasniva se na primjeni bisfosfonata kao inhibitora koštane razgradnje, a u novije vrijeme dizajnirani su novi lijekovi koji moduliraju aktivnost pojedinih signalnih putova te na taj način reguliraju koštani metabolizam.

Suvremeni pristup liječenja genetičkih bolesti nastoji iskoristiti potencijal matičnih stanica; njihovu mogućnost samoobnavljanja i diferenciranja u druge stanične linije. Potencijal matičnih stanica u liječenju *OI*-ja dosad je već primijenjen u nekolicine oboljelih, pri čemu su zabilježeni ohrabrujući rezultati. Mali broj pacijenata liječenih matičnim stanicama još i sad nije dovoljan za donošenje statistički relevantnih zaključaka. Genska terapija kao najsuvremeniji terapijski pokušaj nastoji korigirati genetičke promjene primjenom posebnih alata i tehnika za uređivanje genoma. Iako su rezultati primjene ovih tehnika ohrabrujući na animalnim modelima, zbog kompleksnosti primjene i nepoznavanje utjecaja na ostale dijelove genoma još su u eksperimentalnoj fazi. Heterogenost genetičke podloge, varijabilnost kliničke slike, različite mogućnosti liječenja i odgovora na terapiju nameću personalizirani pristup dijagnostici i liječenju oboljelih. Koncept personalizirane medicine baziran na liječenju „po mjeri bolesnika“ omogućit će optimalan odabir terapijskih postupaka temeljen na genetičkoj mapi bolesnika, obilježjima kliničke slike i njegovim individualnim potrebama.

18. GALAKTOZEMIJA U REPUBLICI HRVATSKOJ: KLINIČKI IZRAŽAJ I GENOTIP

Danijela Petković Ramadža^{1,2}, *Vladimir Sarnavka*¹, *Jurica Vuković*^{1,2}, *Vjekoslav Krželj*³, *Bernarda Lozić*³, *Silvija Pušeljić*⁴, *Tamara Žigman*¹, *Ivana Čulo Čagalj*³, *Višnja Tomac*⁴, *Hana Pereira*⁵, *Maria João Silva*^{5,6}, *Isabel Tavares de Almeida*⁵, *Isabel Rivera*^{5,6*}, *Ksenija Fumić*⁷, *Ivo Barić*^{1,2}

¹ Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb

² Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³ Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Split

⁴ Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Osijek

⁵ Metabolism and Genetics Group, Research Institute for Medicines, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Portugal

⁶ Department of Biochemistry and Human Biology, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Portugal

⁷ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

Cilj: Prikazati klinički izražaj i genotip bolesnika s galaktozemijom u Hrvatskoj. Galaktozemije su rijetki, autosomno recesivno nasljedni poremećaji u Leloirovom putu. Najčešća je klasična galaktozemija zbog nedostatka galaktoza-1-fosfat uridiltransferaze. Bolest se očituje u novorođenačkoj dobi žuticom, hipotonijom, znakovima zatajenja jetre te često sepsom uzrokovanom s *E. coli*. Ako se bolest navrijeme prepozna i liječi djetetom s ograničenim unosom galaktoze, mogu se izbjeći akutne komplikacije opasne za život. Kronične komplikacije, kao što su neurološki simptomi i preuranjeno zatajenje jajnika, javljaju se u većine odraslih bolesnika unatoč dijete. Nedostatak galaktokinaze je rjeđi oblik galaktozemije, a bolesnici razvijaju obostranu kataraktu, ako se navrijeme ne započne s djetetom. Najrjeđi oblik je nedostatak UDP-galaktoza 4-epimeraze. Klinički izražaj je sličan kao u klasičnoj galaktozemiji. Osim ovim trima, povišenje galaktoze u serumu može biti uzrokovano i drugim patološkim stanjima, uključujući nasljedne bolesti.

Metode: Prikupili smo podatke 18-ero bolesnika s klasičnom galaktozemijom i dvoje s nedostatkom galaktokinaze. Genotip je određen sekvenciranjem gena *GALT* (N = 18) i *GALK* (N = 2), u suradnji s inozemnom znanstvenom ustanovom. Liječili smo i bolesnika sa zatajenjem jetre nejasne etiologije, koji je zbog sinergističkog učinka dviju heterozigotnih mutacija u genima *GALT* i *GALE* u tijeku svoje bolesti imao izrazito povišene koncentracije galaktoze u krvi.

Rezultati: Najčešće mutacije gena *GALT* u našoj su populaciji p.Q188R (41,7% alela) i p.K285N (36%). Dokazane su i p.R123X (16,7%), p.E271D (2,8%) te prvi put otkrivena mutacija p.R33C (na jednom alelu). U svih bolesnika, izuzev dvoje s pozitivnom obiteljskom anamnezom, bolest se očitovala akutno u novorođenačkoj dobi. Većina naših odraslih bolesnika i starije djece ima kronične komplikacije, već opisane u literaturi. Dvoje bolesnika s nedostatkom galaktokinaze su romskog podrijetla i homozigoti za mutaciju p.P28T, tipičnu za ovu populaciju. Djevojčici je bolest potvrđena pošto je razvila obostranu kataraktu, a njezin brat je od rođenja na dijete.

Zaključak: U našoj populaciji najčešće mutacije gena *GALT* su, kao i u ostalim populacijama centralne i istočne Europe, p.Q188R i p.K285N. Budući da se u Hrvatskoj ne provodi probir novorođenčadi na galaktozemije, važno je u diferencijalnoj dijagnozi konjugirane hiperbilirubinemije i zatajenja jetre u novorođenčeta misliti na ovu bolest, žurno izmjeriti galaktozu u serumu i urinu te započeti s prehranom bez galaktoze. Odgođeno prepoznavanje bolesti može uzrokovati smrt. Dio bolesnika, usprkos primjerenom liječenju, razvija kronične komplikacije čija je patogeneza još nedovoljno razjašnjena. Dodatne spoznaje se mogu prikupiti putem registra „*European Galactosemia Network Registry*“, u kojem aktivno sudjelujemo.

19. KONGENITALNA SPONDILO-EPIFIZNA DISPLAZIJA – OPERACIJSKO LIJEČENJE VARUS DEFORMACIJE ZGLOBA KUKA

Josip Vlaić¹, Davor Bojić^{1,2}, Darko Antičević^{2,3}

¹ Odjel za dječju ortopediju, Klinika za dječje bolesti Zagreb

² Fakultet Dentalne medicine i zdravstva Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

³ Specijalna bolnica „Sv. Katarina“, Zabok

Cilj: Kongenitalna spondilo-epifizna displazija (KSED) rijetka je autosomno dominantna genetička bolest. Većina bolesnika oboli zbog nove mutacije gena za kolagen tipa II. (*COL2A1*). Na koštanom zglobovnom sustavu dominira zahvaćenost kralježnice i posljedični niži (od 150 cm) rast. Dodatno glavno obilježje težeg oblika KSED-a je zakašnjela osifikacija glave bedrene kosti i varusna deformacija proksimalnog femura – coxa vara (CV). Cilj rada je prikazati rezultate personaliziranog kirurškog liječenja obostranog CV-a u četvero bolesnika i istaknuti novinu u liječenju metodom kontroliranog rasta.

Metode: Pregledom medicinske dokumentacije u razdoblju od 2006. do 2016. godine nađeno je četvero bolesnika (tri bolesnice), koji su u dobi od 4 do 9,5 godina operirani na oba kuka zbog varus deformacije. U jednog bolesnika (dob 9,5 godina) metoda kirurškog liječenja je bila valgus korektivna osteotomija i unutrašnja fiksacija kutnom pločom. U tri bolesnice (dob: 4, 6+8mj. i 7 godina) primijenjena je novina u liječenju - metoda kontroliranog rasta hemiepifiziodezom velikog trohantera pločicom „8“. Bolesnici su praćeni klinički, radiološki i tri puta s MRI-om. Vrijeme praćenja nakon prve operacije bilo je od 3 do 12 godina.

Rezultati: Dijagnoza je postavljena temeljem praćenja i fenotipa u troje bolesnika, a dodatno u jedne bolesnice genska analiza je pokazala mutaciju za gen *COL2A1*. Indikacija za operaciju je progresivna varus deformacija (kolodijafizarni kut ispod 100 stupnjeva), bolovi, ograničena abdukcija kukova, gegajući hod te poremećen lordotično spino-pelvični odnos u sagitalnoj ravnini. U troje bolesnika bila je potrebna dodatna operacija. U jedne bolesnice, liječene pločicom „8“, vrijeme praćenja je prekratko za konačni zaključak, ali nema znakova pogoršanja varusa i slabinska lordoza je smanjena. U jedne bolesnice metoda kontroliranog rasta nije dala dobar rezultat i slijedi valgus korektivna osteotomija. Iako su dodatno operirani, dvoje bolesnika je izlječeno: bolesnica nakon praćenja od pet godina i bolesnik praćen 12 godina koji je Olimpijski pobjednik u svojoj kategoriji osoba nižeg rasta.

Zaključak: KSED je rijetka bolest koja ima izraženi utjecaj na zglob kuka. Kirurška korekcija je indicirana jer varus deformacija proksimalnog femura ima progresivan prirodni tijek. Metoda kontroliranog rasta hemiepifiziodezom velikog trohantera uz položice „8“ se, prema našim rezultatima, pokazala dobra u bolesnika mlađih od osam godina. No zbog mogućnosti neuspjeha liječenja navedenom metodom, potrebno je znati korektivne osteotomije kuka koje se primarno primjenjuju u bolesnika starijih od devet godina. Dobri dugoročni ishodi liječenja u bolesnika s KSED-om mogu se očekivati kod personaliziranog pristupa liječenju.

20. PRIKAZ DJEČAKA S X-VEZANOM KRONIČNOM GRANULOMATOZNOBOLNOM OD PREZENTACIJE DO LIJEČENJA

Marijana Odošić¹, Slaven Abdović², Martin Čuk², Daniel Dilber³, Zoran Bahtijarević⁴, Srđan Roglič⁵, Goran Tešović^{5,7}, Drago Batinić^{6,7}, Jadranka Kelečić³, Alenka Gagro^{2,7,8}

¹ Opća bolnica, Nova Gradiška

² Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb

³ Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb

⁴ Klinika za kirurgiju, Klinika za dječje bolesti Zagreb

⁵ Zavod za infektivne bolesti djece, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

⁶ Odjel za imunologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

⁷ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

⁸ Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku

Cilj: Prikazati simptome, laboratorijsku obradu, genetičku analizu i liječenje dječaka u kojeg je postavljena dijagnoza X-vezane kronične granulomatozne bolesti s dobrom interdisciplinarnom i međuinstitucijskom suradnjom u našoj zemlji. Kronična granulomatozna bolest je rijetka primarna imunodeficijencija koja nastaje zbog poremećaja u kompleksu nikotinamid dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH, od eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complex*), što dovodi do neučinkovite baktericidne funkcije fagocita i poremećaja uklanjanja patogenih mikroorganizama. U većine bolesnika bolest se manifestira od rane životne dobi infekcijama uzrokovanim određenim vrstama uzročnika kao što su *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* i aspergilus. Stvaranje granuloma, najčešće u respiratornom i mokraćnom sustavu, česta je komplikacija ove primarne imunodeficijencije i obično se manifestira i prije postavljene dijagnoze.

Metode i ispitanici: Drugi dan nakon rođenja našem bolesniku postavljena je dijagnoza perimembranoznog ventrikularnog septalnog defekta. Tijekom prvih nekoliko mjeseci života imao je više infekcija respiratornog i mokraćnog sustava, a dopunska dijagnostika postavila je sumnju i na stenozu uretre i agenezu lijevog bubrega. Od mikrobiološki dokazanih infekcija imao je bronhiolitis uzrokovan respiracijskim sincicijskim virusom, pneumoniju uzrokovanu *Pseudomonas aeruginosa* i infekciju mokraćnih kanala uzrokovanu *Klebsiella pneumoniae*. Primijenjena antimikrobna terapija prolazno je kontrolirala tegobe dojenčeta. U dobi od devet mjeseci zamiječena je najprije otekline, potom i razvoj apscesa dorzuma desnog stopala, a mikrobiološkom analizom dokazana je *Serratia marcescens*. Prema anamnezi, vrstama tegoba djeteta i vrsti bakterija koje su uzrokovale dokazane infekcije postavljena je sumnja na primarnu imunodeficijenciju pa je obavljena obrada, uključujući i genetičku analizu.

Rezultati: Imunološka obrada u dječaka pokazala je leukocitozu, hipergamaglobulinemiju, uredan nalaz imunofenotipizacije perifernih limfocita protočnom citometrijom i uredan nalaz testa proliferacije limfocita mitogenicima, te uredan komplement (C3, C4, CH50). No respiracijski prasak u granulocitima analiziran protočnom citometrijom bio je odsutan u dojenčeta, a u njegove majke snižen za 70%. Na osnovi tog funkcijskog testa u inozemstvu je obavljeno sekvenciranje gena *CYBB* u djeteta i njegove majke, te je nađena mutacija p.Arg91*, c.271C>T, koja dovodi do tzv. klasične X-vezanog CGD-a u djeteta, a majka je heterozigot za ovu mutaciju. Prema preporukama, djetetu je uvedena antimikrobna profilaksa i rekombinantni interferon-gama te je proveden postupak za liječenje transplantacijom koštane srži, koja je i obavljena u našoj zemlji krvotvornim matičnim stanicama genotipski podudarnog nesrodnog davatelja devet mjeseci nakon postavljene dijagnoze.

Zaključak: Opisani bolesnik pokazuje da se kritičkom analizom tegoba, vrste infekcija, kliničke prezentacije i imunoloških testova dostupnih u našoj zemlji može brzo postaviti sumnja na CGD i provesti liječenje.

21. NEINVAZIVNO PRENATALNO TESTIRANJE (NIPT)

Vedrana Škaro*

* Genos DNA laboratorij, Zagreb

Od svog uvođenja u kliničku praksu 2011. godine neinvazivno prenatalno testiranje (NIPT) fetalnih aneuploidija brzo se prihvatilo kao napredna metoda probira širom svijeta. Danas je testiranje dostupno pod različitim komercijalnim nazivima, što katkad dovodi do nedoumica koji od njih odabrati i zašto. Za odgovore na ta pitanja važno je razumjeti osnovna načela sekvenciranja kojima se provode pojedini testovi te načela analiza dobivenih podataka, kako bi se razumjele prednosti i nedostaci svakog testa.

Analiza se provodi iz uzorka krvi trudnice, odnosno iz plazme u kojoj se nalazi slobodni DNA (cfDNA). Tri platforme testiranja cfDNA-a su sekvenciranje cijelog genoma (WGS), ciljano sekvenciranje (nepolimorfne i polimorfne regije - polimorfizam jednog nukleotida (SNP)) i mikročip. Ključna odrednica osjetljivosti NIPT-a je udio slobodnog fetalnog DNA-a (FF), koji je varijabilan jer ovisi o više čimbenika. Stoga je pouzdano mjerenje fetalnog udjela cfDNA-a osnova za pouzdanu interpretaciju rezultata probira. Za svaki test je važno znati koji je minimalni FF utvrđen kao onaj do kojeg se rezultati testiranja mogu smatrati pouzdanim. Kod dizigotne blizanačke trudnoće važno je odrediti FF za svakog blizanca.

Vjerojatnost da je neki pozitivan rezultat uistinu pozitivan, ovisi o pozitivnoj prediktivnoj vrijednosti testa (PPV). PPV testa varira na temelju prevalencije određenog sindroma u nekoj populaciji. Što je prevalencija sindroma u populaciji rjeđa, to je niži PPV, dok osjetljivost i specifičnost ostaju nepromijenjeni.

Pri odabiru opcija testiranja treba uzeti u obzir kliničku relevantnost i PPV za pojedini sindrom. Odabir opcija ovisi i o tipu trudnoće (jednoplodna ili višeplodna, prirodna ili IVF, donirana ili vlastita jajna stanica, zigotnost kod blizanačke trudnoće, nestajući bliznac). Također je važno znati za što je točno validiran pojedini test (za sve sindrome ili samo neke koji se testiraju, samo za prvi ili i za ostale trimestre, za trudnice svih dobnih skupina ili samo za neke dobne skupine, za opću populaciju trudnica ili samo za trudnice rizičnih skupina) te koja su ograničenja (mozaicizam, transplantacija, maligna bolest) kao i čimbenici koji mogu utjecati na FF pa time i na ishod testiranja (tjedni trudnoće, prekomjerna tjelesna masa, antikoagulantna terapija, transfuzija, terapija matičnim stanicama, imunoterapija). Kako bi se nakon dobivenih rezultata izbjegle potencijalne neželjene situacije, važno je provesti savjetovanje trudnica prije i nakon testiranja. Iako su komercijalni NIPT-i dostupni trudnicama i na osobni zahtjev, uputno je da li da se test provede prema preporuci ginekologa koji vodi trudnoću i koji će uvidom u cjelokupni status trudnoće procijeniti potrebu za provođenjem ovakve vrste testa te sugerirati opciju testa koja je najpogodnija za pojedinu trudnicu.

22. MARKER KROMOSOM - IZAZOV U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI: PRIKAZ SLUČAJEVA

Anita Barišić, Jadranka Vraneković, Ivana Babić Božović, Bojana Brajenović-Milić*

* Zavod za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska

Cilj: Prekobrojni marker kromosomi (*eng. small marker chromosomes - SMCs*) čine skupinu strukturno abnormalnih kromosoma koji se pojavljuju u 0,075% prenatalnih slučajeva. Utvrđivanje podrijetla SMC-a u prenatalnoj dijagnostici važno je za postavljanje preciznog kariotipa koji će pridonijeti genetičkom informiranju. U 70% slučajeva SMCs nastaju kao posljedica *de novo* mutacije, dok se preostali nasljeđuju od majke ili oca. Ako se SMC naslijedi od roditelja, nije za očekivati da će njegova prisutnost utjecati na promjenu fenotipa ploda/djeteta. S druge strane, *de novo* SMC može biti uzrok kliničke slike koja se povezuje sa sindromima kao što je izokromosom 18p ili sindrom Pallister-Killian. Konačan utjecaj na fenotip ovisit će o postotku mozaicizma te strukturi genetičkog materijala. Budući da se kromosomsko podrijetlo marker kromosoma ne može odrediti GTG metodom oprugavanja kromosoma, za detekciju se primjenjuju metode molekularne citogenetike. Cilj rada je kroz prikaz slučajeva s prekobrojnim marker kromosomom uputiti na važnost detekcije podrijetla SMC-a u prenatalnoj dijagnostici radi postavljanja preciznog kariotipa, korelacije s fenotipom te pravovaljanog genetičkog informiranja.

Metode: Analiza stanica plodove vode GTG metodom oprugavanja kromosoma i fluorescentne *in situ* hibridizacije.

Rezultati: Prikaz slučajeva sindroma Pallister-Killian (i[12p]), sindroma izokromosoma 18p (i[18p]) i familijarno naslijeđenog SMCidic(15;15)(q11.1;q11.1).

Zaključak: Iako su algoritmi za prenatalnu dijagnostiku SMC-a dobro razrađeni, s obzirom na iznimnu heterogenost područja, nekonzistentne ultrazvučne biljege, mozaicizam i varijacije u kliničkoj prezentaciji, svaki slučaj je izazov u prenatalnoj dijagnostici te ga je potrebno sagledati temeljito i multidisciplinarno.

23. NAJNOVIJI TRENDOVI U PODRUČJU HUMANE IDENTIFIKACIJE

Damir Marjanović^{1,2}, Dubravka Havaš¹, Jelena Šarac¹, Saša Missoni¹, Dragan Primorac^{3,4,5,6}

¹ Institut za antropologiju, Zagreb, Hrvatska

² Internacionalni BURCH univerzitet, Sarajevo, BiH

³ Specijalna bolnica Sveta Katarina, Zagreb, Hrvatska

⁴ Medicinski fakultet, Sveučilište u Spltu, Split, Hrvatska

⁵ Medicinski fakultet Sveučilište u Osijeku, Osijek, Hrvatska

⁶ Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, PA, USA

Cilj: Osnovni cilj izlaganja je prezentiranje dosadašnjih izazova, znanstvenih aktivnosti, ali i uspjeha hrvatskih i svjetskih znanstvenika u području forenzične genetike, posebice u području procesa humane identifikacije. Posebno će biti elaborirane metode koje bi u budućnosti mogle značajno unaprijediti ovaj proces.

Metode: Retrospektivnom analizom bit će prikazan razvoj procesa identifikacije ljudskih ostataka, kako kroz znanstvene radove, tako i kroz prikaz konkretnih forenzičnih slučajeva, ali i kroz analizu procesa identifikacija žrtava masovnih katastrofa u regiji i u svijetu. Usporedno s tim usporedit će se postojeće znanstvene metode koje se primjenjuju u ovom znanstvenom području, kao i na tržištu prisutne tendencije budućeg razvoja procesa identifikacije ljudskih ostataka, s posebnim osvrtom na primjenu novih genetičkih biljega u ove svrhe te primjenu najnovijih molekularno-bioloških metoda poput fenotipizacije, sekvenciranja buduće generacije te analize jednolinijskih (uniparentnih) biljega poput Y kromosoma i mitohondrijskog DNA-a.

Rezultati: Bit će prikazani konkretni rezultati identifikacija žrtava rata u regiji, identificiranja žrtava iz prijašnjih sukoba, ali i primjena ovih metoda u procesu analize kosturnih ostataka koji se mogu tretirati kao arheološki. Poseban osvrt će biti usmjeren na analizu rezultata postignutih u forenzičnim istragama visokodegradiranog DNA-a izoliranog iz kosturnih ostataka što su bili izloženi značajnom negativnom utjecaju vanjske sredine, koji je bitno utjecao na uspješnost primjene standardnih metoda forenzične DNA analize.

Zaključak: Proces forenzične DNA analize je zabilježio značajan napredak u protekla dva desetljeća. Uspješnost standardnih prethodnih antropoloških metoda u procesu identifikacije bio je značajno umanjen kad su u pitanju analize većeg broja kosturiziranih ljudskih ostataka, poput onih pronađenih u masovnim grobnicama u Hrvatskoj i u susjedstvu. S tim u vezi bilo je nužno razviti potpuno novi pristup analize te značajno utjecati na uspješnost provođenja DNA analize kosturnih ostataka. Usporedno s tim bilježi se stalni znanstveni napredak u ovom području i u ovom se trenutku radi na razvijanju većeg broja metoda koje bi trebale unaprijediti dosad postojeća znanja i rezultate u ovoj znanstvenoj grani.

24. ZAČETAK I SMJER RAZVOJA FORENZIČNE GENOMIKE U CFIIV-U "IVAN VUČETIĆ"

Marina Korolija¹, Viktorija Sukser¹, Sara Rožić¹, Lucija Barbarić¹

¹ Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, Ilica 335, 10 000 Zagreb

Tehnologija masivnog paralelnog sekvenciranja (MPS) revolucionarizirala je sva područja temeljnih i primijenjenih znanosti kojima je u fokusu analiza sekvence nukleinskih kiselina. U tom smislu treba unaprijediti vještačenje bioloških tragova prilagodbom naprednih metoda potrebama forenzike. Budući da nova tehnologija nema ograničenja u broju simultano analiziranih DNA biljega po uzorku, forenzični stručnjaci će u budućnosti biti suočeni sa sve kompleksnijim analizama. Stoga je CFIIV „Ivan Vučetić“ prepoznao važnost stasanja DNA stručnjaka nove generacije, koji će ovladati eksperimentalnim protokolima, bioinformatičkim alatima za obradu podataka te interpretacijom rezultata u kontekstu predmeta vještačenja, s konačnim ciljem potpune implementacije MPS-a u rutinsku praksu.

Prva implementirana metoda temeljena na MPS tehnologiji je sekvenciranje humanog mitohondrijskog genoma iz visokokvalitetnih uzoraka krvi i oralnog epitela. Priprema biblioteka za sekvenciranje temelji se na tagmentaciji (enzimsko cijepanje uz dodavanje adapterskih oligonukleotida) mtDNA amplikona duljine 9,1 i 11,2 kb te PCR-u kojim se dodaju oligonukleotidi nužni za sekvenciranje po sintezi (Nextera[®] XT Library Preparation, Illumina[®]). Biblioteke se procjenjuju kvantitativno i kvalitativno pomoću DNA High Sensitivity kita na instrumentu LabChip[®] GX Touch HT (PerkinElmer[®]), spajaju u jedinstveni uzorak te sekvenciraju pomoću MiSeq[®] Reagent v2 kita na MiSeqFGx[®] instrumentu (Illumina[®]). Za analizu podataka se primjenjuju:

ILLUMINA® BaseSpace® aplikacije (mtDNA Variant Processor v.1.0 i mtDNA Variant Analyzer v.1.0), HaploGrep2 v.2.1.1 i PhyloTree Build 17.

Sekvenciranjem 300 mtDNA nesrodnih hrvatskih državljana dobiveni su visokokvalitetni podatci ($\geq Q30$ za $>92\%$ svih sekvenciranih baza), srednje pokrivenosti po uzorku $6512 \pm 910x$. U hrvatskoj populaciji su najzastupljenije makrohaplogrupe H (36%) te U (23%) s podogranakom K (6%). Slijede makrohaplogrupe HV i V (10%), J (8%) i T (8%). Makrohaplogrupe D, R0, X, I, N1 i W imaju frekvencije u rasponu od 1-2%, dok je ogranak A zastupljen s jednim uzorkom. Frekvencije glavnih haplogrupa definiraju hrvatsku populaciju u kontekstu matrilinarnog biljega kao tipično europsku. Neki od kandidata za prijedlog novih ograna u globalnom filogenetskom stablu mtDNA su pronađeni u haplogrupama I5, H47, H55b i U2e2a1d. Ukupno 28% uzoraka ima točkastu heteroplazmiju višu od 10%. Razvoj bioinformatičkog protokola za detekciju heteroplazmija ispod 10% je u tijeku.

Ovim radom je formirana referentna zbirka sekvenci cijelih mtDNA genoma recentne hrvatske populacije, koja će se rabiti prvenstveno za statističke procjene učestalosti haplogrupa u predmetima vještačenja. Sekvence će biti pohranjene u globalnoj forenzičnoj bazi podataka mtDNA-a, čime će se nadmašiti postojeći broj profila dobivenih sekvenciranjem cijelih molekula mtDNA-a. Zbirka će također biti od nemjerljivog značenja za područja molekularne antropologije i molekularne medicine, osobito u lokalnom kontekstu.

25. ANALIZA 12 X-STR MARKERA U POPULACIJI HRVATSKE I PRIMJENA U FORENZICI

Gordan Mršić^{1,2}, Petar Ozretić³, Josip Crnjac⁴, Siniša Merkaš^{1,2}, Sara Rožić^{1,2}, Viktorija Sukser^{1,2}, Ivana Račić^{1,2}, Lucija Barbarić^{1,2}, Maja Popović⁵, Marina Korolija^{1,2}

¹ Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, Zagreb, Hrvatska

² Ured za forenzične znanosti, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

³ Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

⁴ Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Split, Hrvatska

⁵ Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Cilj: U populaciji Hrvatske analizirati 12 STR (eng. *short tandem repeats*) markera na X kromosomu i odrediti alelne frekvencije svih ispitivanih lokusa. Izračunati forenzične parametre i usporediti sličnosti hrvatske s populacijama u svijetu te izraditi referentnu bazu podataka za Centar „Ivan Vučetić“.

Metode: Izolacija DNA-a je napravljena iz prikupljenih briseva bukalne sluznice ili FTA kartica 995-ero osoba, primjenjujući otopinu Chelex® 100 i validirani protokol. Svi su uzorci kvantificirani primjenom qRT-PCR i određena je koncentracija DNA-a. Za umnožavanje DNA-a primijenjen je komercijalno dostupan multipleks Investigator® Argus X-12 Kit što umnožava 12 lokusa na X kromosomu koji su razdijeljeni u 4 povezane skupine (Linkage group): LG1 (DXS10148, DXS10135, DXS8378), LG2 (DXS7132, DXS10079, DXS10074), LG3 (DXS10103, HPRTB, DXS10101), i LG4 (DXS10146, DXS10134, DXS7423). Rezultati PCR reakcije su analizirani na uređaju za kapilarnu elektroforezu 3500 Genetic Analyzer. Prikupljeni podatci su analizirani pomoću GeneMapper ID-X. Statističkom analizom izračunati su populacijski i forenzički parametri te je uspoređena populacija Hrvatske s objavljenim podacima za 13 država Europe.

Rezultati: Najinformativniji marker u populaciji je marker DXS10135, na kojem je ukupno detektirano 35 alela (PIC=0.93), od kojih je najučestaliji alel 25 (f=0.103). Marker DXS8378 je najmanje informativan, jer sadrži samo 7 alela, a zbroj frekvencija 3 najučestalija alela (10, 11 i 12) iznosi 0.949. U muškoj populaciji su svi parovi markera unutar povezanih skupina testirani za neuravnoteženo vezivanje koje je potvrđeno za sedam parova markera. Izračunati forenzični parametri kao što su snaga isključivanja, snaga diskriminacije upućuju na to da se analizirani markeri mogu rabiti u forenzičnim slučajevima za potrebe identifikacije osoba s vrlo visokom pouzdanošću. Usporedba frekvencija haplotipova u hrvatskoj populaciji sa 13 europskih populacija nije pokazala nikakve statistički značajne razlike.

Zaključak: Analiza X-STR markera na uzorku od 995-ero rodbinski nepovezanih osoba je pokazala da se navedeni kit sa 12 markera može primjenjivati u svakodnevnom radu forenzičnog laboratorija. Istraživanje je također pokazalo visoku stopu mutacija na markeru DXS10079 kod kojeg je zabilježeno najviše bialelnih varijanti u muškoj populaciji i trialelnih varijanti u ženskoj.

26. ASOCIJACIJSKA STUDIJA KARDIOMETABOLIČKIH TRAGOVA NA RAZINI CIJELOG EPIGENOMA U POPULACIJI JADRANSKIH OTOKA

Liang Niu¹, Scott Langevin¹, Ricky Leung¹, Ge Zhang¹, Roman Jandarov¹, Mario Medvedovic¹, Shuk-Mei Ho¹, Aimin Chen¹, Jelena Šarac², Tonko Carić², Matea Zajc Petranović², Dubravka Havaš Auguštin², Luka Bočkor², Saša Missoni², Pavao Rudan², Ranjan Deka¹

¹Department of Environmental Health, University of Cincinnati College of Medicine, USA

²Institut za antropologiju, Zagreb, Hrvatska

Cilj: Cjelogenomske asocijacijske studije (GWAS) dosada su identificirale stotine učestalih varijanti gena povezanih s kompleksnim tragovima, međutim te varijante mogu objasniti samo manji dio fenotipske raznolikosti. U posljednje vrijeme sve više pažnje usmjereno je na ulogu epigenetičke varijabilnosti u etiologiji kompleksnih bolesti. Otkrivanje temeljnih genetičkih i epigenetičkih čimbenika koji pridonose povećanom riziku razvoja kardiometaboličkih poremećaja može značajno pridonijeti razvoju novih strategija prevencije i terapije navedenih poremećaja. U ovom istraživanju proveli smo iscrpnu asocijacijsku studiju na razini cijelog epigenoma (EWAS) koristeći longitudinalne uzorke sakupljene u razmaku od 10 godina i integrirali ih s prethodno provedenom GWAS studijom metaboličkih tragova populacije istočnojadranskih otoka Hrvatske. Glavni cilj rada je utvrditi epigenetičke čimbenike koji stoje u podlozi nastanka kardiometaboličkih poremećaja u navedenoj populaciji.

Metode: Postavili smo sljedeće hipoteze: (1) stabilne epigenetičke oznake definiraju razvojnu putanju kardiometaboličkih tragova; (2) dinamične oznake koje se mijenjaju tijekom života ovisno o unutarnjim biološkim procesima i egzogenim stresorima pridonose razvoju kardiometaboličkih poremećaja kasnije u životu; i (3) te epigenetičke oznake u interakciji sa genetičkom raznolikošću utječu na varijabilnost fenotipa. Za testiranje hipoteza iskoristili smo postojeću bazu od >1,400 uzoraka koja sadrži fenotipske, okolišne, DNA i GWA podatke prikupljenu na otoku Hvaru 2007.-2008. godine te ponovo uzorkovali >700 osoba iz prethodne studije 10 godina kasnije (2017.). Također smo proveli EWAS koristeći novorazvijeni EPIC 850K BeadChip methylation array na uparenim uzorcima u dvije vremenske točke kako bi procijenili metilacijske uzorke i proveli integrativnu cjelogenomsku i cjeloepigenomsku analizu kako bi istražili njihov zajednički utjecaj na varijabilnost tragova pomoću pristupa sistemske biologije.

Rezultati: Nakon provođenja asocijacijske studije kardiometaboličkih tragova na razini cijelog epigenoma te integrativne cjelogenomske i cjeloepigenomske analize otkriven je relativno malen medijan beta-vrijednosti metilacijskih uzoraka tijekom 10 godina.

Zaključak: Preliminarno istraživanje temeljeno na nasumično odabranih 112 parova (N=224) uzoraka pokazuje da je medijan beta-vrijednosti metilacijskih uzoraka tijekom 10 godina relativno malen što sugerira da su pronađene epigenetičke oznake stabilne značajke kardiometaboličkih tragova.

Financirano od strane NIH, projekt broj R56HL128493.