

# Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze i omjer S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u osoba s trajno povišenom aktivnošću kreatin kinaze

---

**Petković Ramadža, Danijela**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:170070>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Danijela Petković Ramadža**

**Nedostatna aktivnost  
S-adenozilhomocistein hidrolaze  
i omjer S-adenozilmetionina i  
S-adenozilhomocisteina u osoba s trajno  
povišenom aktivnošću kreatin kinaze**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2018.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Danijela Petković Ramadža**

**Nedostatna aktivnost  
S-adenozilhomocistein hidrolaze  
i omjer S-adenozilmetionina i  
S-adenozilhomocisteina u osoba s trajno  
povišenom aktivnošću kreatin kinaze**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2018.

Autorica disertacije je Danijela Petković Ramadža, dr. med., specijalist pedijatar u Zavodu za genetiku i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i asistentica Katedre za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor disertacije je prof dr. sc. Ivo Barić, dr. med., specijalist pedijatar – subspecijalist genetike, pročelnik Zavoda za genetiku i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i redoviti profesor Katedre za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mjesto izvođenja istraživanja: Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Odjel za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Laboratorij za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

## ZAHVALA

Hvala mom mentoru prof. dr. sc. Ivi Bariću koji je osim što me vodio kroz izradu ove disertacije, moj učitelj pedijatrije i metabolizma.

Hvala prof. dr. sc. Kseniji Fumić i kolegicama iz Odjela za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb (a posebno Željki, Mariji, Klari, Josipi, Ljiljani, Saši i Ani).

Hvala doc. dr. sc. Mili Lovrić i Predragu Donatu.

Hvala dr. sc. Oliveru Vugreku, Filipu Rokiću i kolegama iz Laboratorija za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

Hvala višoj medicinskoj sestri Višnjici Hrustić i ostalim kolegicama sa Zavoda za genetiku i bolesti metabolizma, kao i kolegicama u Poliklinici Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Hvala dragim kolegama pedijatrijskim neurolozima i neurolozima te ostalim specijalistima iz Kliničkih bolničkih centara i drugih bolničkih ustanova koji su nam uputili svoje pacijente i tako omogućili izradu ove disertacije.

Hvala doc. dr. sc. Milanu Miloševiću na pomoći oko statističke obrade podataka.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci.

# SADRŽAJ

## POPIS KRATICA

1. UVOD .....	1
1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja i spoznaja.....	1
1.1.1. Posljedice nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze.....	1
1.1.1.1. Pregled do danas objavljenih slučajeva.....	2
1.1.1.2. Raznolikost kliničke slike bolesti.....	4
1.1.1.3. Biokemijske osobitosti bolesti zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze .....	5
1.1.1.4. Liječenje bolesti zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze	7
1.1.1.5. Razlozi za mali broj do danas otkrivenih bolesnika.....	7
1.1.2. Metabolizam S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina.....	8
1.1.3. Koncentracija S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u različitim biološkim uzorcima.....	11
1.1.4. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH) .....	12
1.1.5. Dismetilacija uslijed promijenjene koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te njihovog omjera .....	14
1.1.6. Bolest mišića zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze.....	15
1.1.6.1. Mehanizam nastanka bolesti mišića zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze .....	15
1.1.6.2. Bolest mišića u drugim prirođenim poremećajima ciklusa metionina.....	19
1.1.6.3. Dodatne pretpostavke o mehanizmu nastanka bolesti mišića zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze.....	20
1.1.6.4. Dokazi da patološki procesi u mišićima započinju u fetalnom razdoblju.....	20
1.1.7. Gen <i>AHCY</i> i njegovi polimorfizmi .....	21
1.1.7.1. Građa gena <i>AHCY</i> .....	21
1.1.7.2. Polimorfizmi gena <i>AHCY</i> .....	21
1.1.7.3. Patogene mutacije u genu <i>AHCY</i> .....	23
1.2. O kreatin kinazi i stanjima koja dovode do njezine povišene aktivnosti u krvi .....	25
1.2.1. Osnovno o kreatin kinazi .....	25
1.2.2. Povišena aktivnost kreatin kinaze u krvi .....	27
1.2.3. Povišena aktivnost kreatin kinaze bez simptoma.....	28

2. HIPOTEZA .....	30
3. CILJEVI RADA .....	31
4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE .....	32
4. 1. Ispitanici .....	32
4. 2. Materijali i metode.....	34
4.2.1. Prikupljanje podataka.....	34
4.2.2. Mjerenje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	34
4.2.2.1. Reagensi i sastav otopina .....	34
4.2.2.2. Oprema i pribor .....	35
4.2.2.3. Postupak pripreme uzoraka za HPLC-analizu .....	36
4.2.2.3.1. Uzorkovanje krvi i deproteinizacija.....	36
4.2.2.3.2. Centrifugiranje .....	36
4.2.2.3.3. Izdvajanje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina vakuum sustavom.....	37
4.2.2.4. Razdvajanje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	38
4.2.2.4.1. Priprema otapala i HPLC uređaja.....	38
4.2.2.5. Referentne vrijednosti za S-adenozilmetionin, S-adenozilhomocistein i metilacijski potencijal u našem laboratoriju.....	40
4.2.3. Izdvajanje genomske DNA .....	41
4.2.3.1. Postupak .....	41
4.2.4. Određivanje polimorfizma gena <i>AHCY</i> analizom duljine restrikcijskih ulomaka nakon lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	42
4.2.4.1. Postupak .....	43
4.2.5. Sekvenciranje egzona 2, 3 i 4 gena <i>AHCY</i> .....	45
4.2.5.1. Postupak .....	46
4.2.6. Statističke metode .....	48
5. REZULTATI.....	49
5. 1. Bolesnici s nedostatnom aktivnošću S-adenozilhomocistein hidrolaze u ispitivanoj skupini .....	49
5.2. S-adenozilmetionin, S-adenozilhomocistein i metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini .....	50
5.2.1. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitanika i u referentnoj skupini .....	50

5.2.2. Međusobni odnos koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina, metilacijskog potencijala i kreatin kinaze u ispitivanoj skupini.....	55
5.2.3. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na dob ispitanika.....	57
5.2.4. Usporedba S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na spol ispitanika.....	58
5.3. Učestalost polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena <i>AHCY</i> u ispitivanoj populaciji .....	59
5.3.1. Kliničke i biokemijske osobitosti nositelja polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena <i>AHCY</i> .....	61
5.3.2. Sekundarne spoznaje proizašle iz određivanja polimorfizama gena <i>AHCY</i> .....	62
6. RASPRAVA.....	63
6.1. Postoje li u skupini bolesnika s miopatijom nerazjašnjene etiologije i/ili trajno povišenom aktivnošću kreatin kinaze osobe s nedostatnom aktivnošću S-adenozilhomocistein hidrolaze.....	63
6.2. Odnos metilacijskog potencijala u dvije skupine ispitanika.....	65
6.3. Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu .....	66
6.3.1. Na koji način povišena koncentracija S-adenozilhomocisteina može nepovoljno utjecati na biološke procese, neovisno o metilacijskom potencijalu?.....	67
6.3.2. Nepovoljan utjecaj povišene koncentracije S-adenozilmetionina na biološke procese unutar stanice .....	68
6.3.3. Dodatni dokazi da povišene koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina imaju nepovoljan učinak na mišićne stanice .....	70
6.4. Čimbenici koji mogu utjecati na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala .....	72
6.5. Pouzdanost metode za mjerenje koncentracija S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u punoj krvi .....	74
6.6. Učestalost polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena <i>AHCY</i> u ispitivanoj skupini .....	76
6.7. Sekundarne koristi i spoznaje proizašle iz ovog istraživanja .....	77
7. ZAKLJUČCI.....	78
8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....	79
9. KRATKI SADRŽAJ I NASLOV NA ENGLLESKOM JEZIKU .....	81
10. POPIS LITERATURE .....	84
11. PRILOZI.....	93
12. KRATKA BIOGRAFIJA .....	96



## POPIS KRATICA

AdoHcy – S-adenozilhomocistein

AdoMet – S-adenozilmetionin

ADK – adenzin kinaza

ADP – adenzin difosfat

AHCY – gen koji kodira S-adenozilhomocistein hidrolazu

AMP – adenzin monofosfat

ATP – adenzin trifosfat

BHMT – betain-homocistein metiltransferaza

CBS – cistationin  $\beta$ -sintetaza

CK – kreatin kinaza

CK-BB – izoenzim kreatin kinaze podrijetlom iz mozga

CK-MB – izoenzim kreatin kinaze podrijetlom iz srca

CK-MM – izoenzim kreatin kinaze podrijetlom iz poprečno-prugastog mišića

DAD – detektor s nizom dioda (od engl. *Diode-Array Detector*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EtBr – etidij bromid

EMG – elektromiografija

GAMT – gvanidinoacetat metiltransferaza

GLB – pufer za nanošenje uzoraka (od engl. *Gel Loading Buffer*)

GNMT – glicin N-metiltransferaza

GSH – glutation

HEK 293 – stanice podrijetlom bubrega embrija čovjeka (od engl. *Human Embryonic Kidney 293*)

Hcy – homocistein

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (od engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

IS – interni standard

ICH – Međunarodna konferencija za harmonizaciju (od engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

LC-MS – tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (od engl. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

Lys – lizin

MAT – metionin adenoziltransferaza

Met – metionin

miCK – mitohondrijski izoenzim kreatin kinaze

MR – magnetska rezonanca

MS – metionin sintetaza

mRNA – glasnička RNA (od engl. *messenger RNA*)

mtDNA – mitohondrijska DNA

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza

MTs – metiltransferaze

NAD – nikotinamid adenin dinukleotid

PCR – lančana reakcija polimerazom (od engl. *Polymerase Chain Reaction*)

RFLP – polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (od engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA – ribonukleinska kiselina (od engl. *ribonucleic acid*)

SAHH – S-adenozilhomocistein hidrolaza

SNP – polimorfizam jednog nukelotida (od engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

tHcy – ukupni homocistein

TAE – tris-acetat-EDTA

THF – tetrahydrofolat

5-MTHF – 5-metiltetrahydrofolat

5,10-MTHF – 5,10-metilentetrahydrofolat

TRIS – trihidroksimetilaminometan

UTR – netranslatirajuća regija (od engl. *untranslated region*)

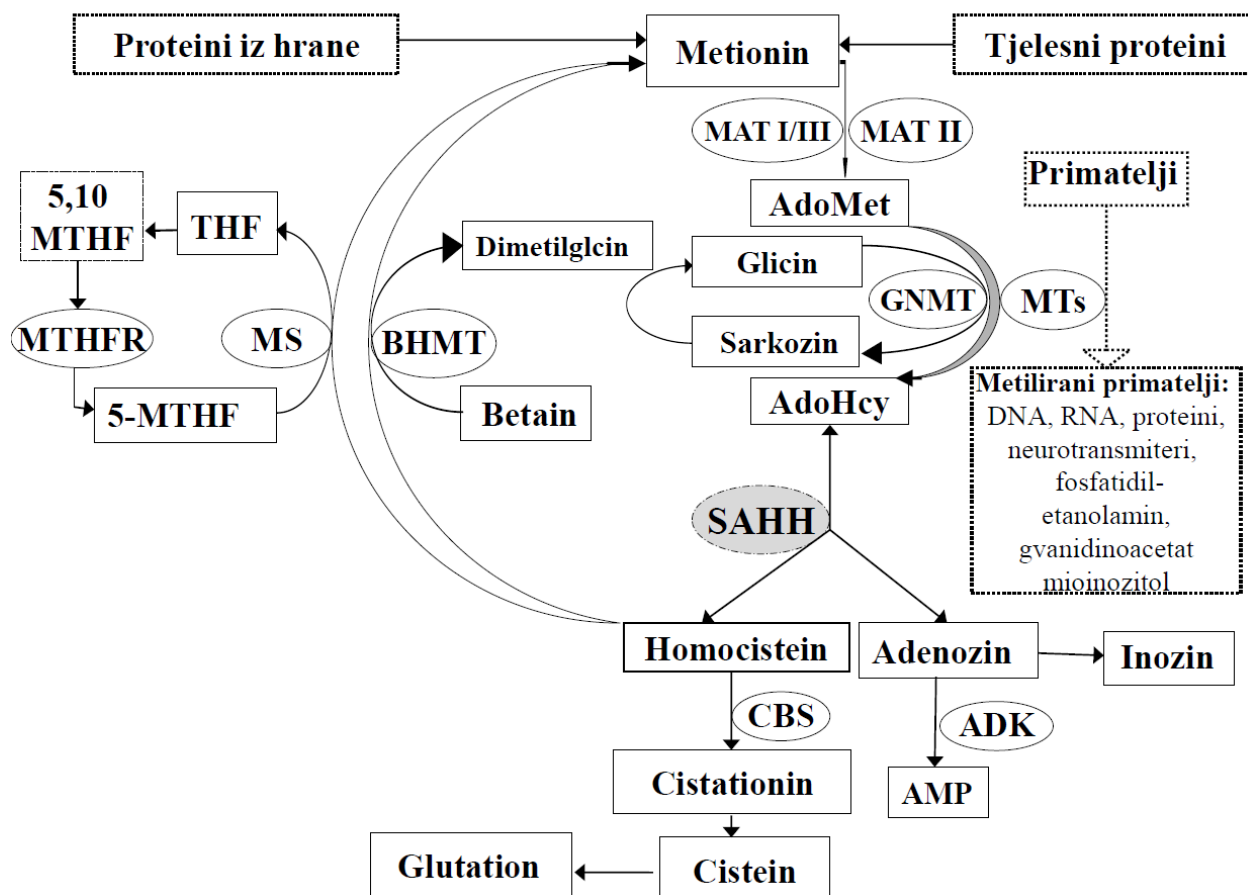
# 1. UVOD

## 1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja i spoznaja

### 1.1.1. Posljedice nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze

Bolest koja nastaje zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH, EC 3.3.1.1 adenozilhomocisteinaza) (OMIM # 613752) je autosomno recesivno nasljedni poremećaj metabolizma metionina. Prvi opis ovog poremećaja je, u suradnji s kolegama iz inozemstva, objavila naša istraživačka skupina, 2004. godine (1). Enzim SAHH katalizira pretvorbu S-adenozilhomocisteina (AdoHcy) u homocistein (2). AdoHcy je snažan inhibitor brojnih metiltransferaza pa je stoga i ključan u regulaciji procesa metilacije u stanici (3). Metilacijski ciklus stanice prikazan je na slici 1.

Zbog nedostatne aktivnosti SAHH i nakupljanja AdoHcy nastaje multisistemski poremećaj koji se, u većine bolesnika, očituje miopatijom, zaostajanjem u psihomotoričkom razvoju, problemima u ponašanju, usporenom mijelinizacijom bijele tvari mozga, poremećajem koagulacije i znakovima bolesti jetre (1, 4-11). Nedavno je opisano troje bolesnika, dva brata i sestra, koji, iako su naslijedili istovjetne mutacije gena *AHCY* od svojih roditelja, ispoljavaju različitu kliničku sliku, kako u odnosu na ostale bolesnike tako i međusobno. Zbog toga je upitno da li su simptomi, koje ovi bolesnici imaju, uzrokovani samo nedostatnom aktivnošću SAHH (12).



**Slika 1.** Ciklus metionina. AdoMet – S-adenozilmetionin, AdoHcy – S-adenozilhomocistein, THF – tetrahidrofolat, 5,10-MTHF – 5,10-metilentetrahidrofolat, 5-MTHF – 5-metiltetrahidrofolat, AMP – adenzin monofosfat, MAT – metionin adenziltransferaza (E.C.2.5.1.6), GNMT – glicin N-metiltransferaza (E.C.2.1.1.20), MTs – metiltransferaze ovisne o AdoMet, SAHH – S-adenozilhomocistein hidrolaza (E.C.3.3.1.1), CBS – cistationin β-sintetaza (E.C.4.2.1.22), MS – metionin sintaza (E.C.2.1.1.13), BHMT – betain-homocistein metiltransferaza (E.C.2.1.1.5), MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza (E.C.1.5.1.20), ADK – adenzin kinaza (E.C.2.7.1.20). Slika preuzeta i dijelom modificirana iz literaturnog navoda 13.

### 1.1.1.1. Pregled do danas objavljenih slučajeva

Dječak u kojeg je bolest po prvi put opisana je u dojenačkoj dobi imao usporen psihomotorički razvoj i hipotoniju, a na magnetskoj rezonanci (MR) mozga je nađena zakašnjela mijelinizacija bijele tvari. U krvi je izmjerena povišena aktivnost kreatin kinaze (CK) koja je upućivala na zahvaćenost mišića. Uz to je, kao pokazatelje zahvaćenosti jetre, imao povišenu aktivnost aminotransferaza (premda navedeno barem dijelom može biti i posljedica oštećenja mišićnih stanica), nizak albumin i poremećenu koagulaciju.

Patohistološkom analizom tkiva jetre je dokazano da bolesnik ima kronični hepatitis s umjerenom portalnom fibrozom, a ultrastrukturno su nađeni oskudan grubi endoplazmatski retikulum te umnoženi glatki endoplazmatski retikulum i mitohondriji, koji su bili uvećani i nepravilnog oblika. Patohistološkom analizom mišića se dokazala sporo progresivna destruktivna miopatija.

Dječak je imao izrazitu hipermetioninemiju te višestruko povišene koncentracije S-adenozilmetionina (AdoMet) i osobito AdoHcy u plazmi. AdoMet i AdoHcy su bili povišeni približno 30, odnosno 150 puta, u odnosu na srednju vrijednost referentnog raspona. Dijagnoza je postavljena na temelju snižene aktivnosti enzima SAHH u tkivu jetre (3% u odnosu na kontrolne vrijednosti), eritrocitima i fibroblastima (5-10% u odnosu na kontrolne vrijednosti). Potvrđena je nalazom dviju mutacija u egzonu 4 gena *AHCY* – stop kodon nasljeđen od majke i mutacija pogrešnog smisla (engl. *missense*), nasljeđena od oca (1).

Drugi bolesnik, mlađi brat prvoopisanog bolesnika, je od rođenja imao slabost mišića s oslabljenim primitivnim i odsutnim dubokim tetivnim refleksima te usporen psihomotorički razvoj. Ovo je ukazivalo na prenatalno postojanje bolesti. Uz kliničke simptome i znakove bolesti, imao je slične biokemijske i neuroradiološke promjene kao njegov brat. I ovaj bolesnik je bio nositelj istovjetnih patogenih mutacija gena *AHCY*, a enzimska aktivnost SAHH u eritrocitima mu je bila 15% u odnosu na kontrolne vrijednosti. U dobi od tri i pol mjeseca započeto je liječenje djetom s ograničenim unosom metionina uz dodatak fosfatidilkolina i kreatina, što je dovelo do kliničkog boljitka u vidu poboljšanja mišićne snage i psihomotoričkog razvoja, poboljšanja mijelinizacije mozga i sniženja koncentracija AdoMet i AdoHcy u krvi. Učinci ovog liječenja su bili slični i u prvoopisanog bolesnika (4).

Od 2005. godine, kada su opisani ovi bolesnici, opisano je ukupno 14 bolesnika (mi pratimo četvero) iz sedam obitelji (5, 6, 8-12). Moguće je da je od navedenog poremećaja bolovala i djevojčica koja je imala hipermetioninemiju, miopatiju i mentalnu zaostalost, a koju je opisao Gaull još 1981. godine (14). U nje bolest nije potvrđena zbog toga što u vrijeme otkrića nije bila definirana biokemijski/genetički. Osobnom komunikacijom s inozemnim centrima, imamo informacije da je u svijetu bolest potvrđena u još nekolicine bolesnika.

### 1.1.1.2. Raznolikost kliničke slike bolesti

Klinička slika bolesti je varijabilna pa je tako dvoje dojenčadi imalo izuzetno težak tijek bolesti koji se očitovao fetalnim hidropsom zbog zatajenja jetre, teškom hipotonijom, razvojnom anomalijom mozga, zatajenjem disanja i na koncu smrtnim ishodom u ranoj dojenačkoj dobi. Razvojna anomalija mozga je uključivala dilataciju ventrikla zbog atrofije bijele tvari, hipoplaziju korpusa kalozuma, prednjeg dijela ponsa i nekih dijelova malog mozga te široku cisternu magnu (8). Na drugom kraju fenotipskog izražaja je mlada žena koja je prve simptome bolesti razvila tek u dvadesetim godinama kada su se pojavili znakovi hepatopatije i slabosti mišića. U dobi od 30 godina je oboljela od hepatocelularnog karcinoma te je učinjena transplantacija jetre nakon čega je došlo do daljnjeg pogoršanja slabosti mišića, a umrla je u 32. godini života. Njezin sin, nositelj istovjetnih mutacija (konsangvinitet), je u dobi od sedam godina bio bez ikakvih simptoma, iako je imao jasne biokemijske pokazatelje navedenog poremećaja (povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy u plazmi). Od iste bolesti su vjerojatno bolovala i njezina dva brata (dječakovi ujaci), no bolest u njih nije potvrđena. Jedan je od rane dobi imao miopatiju i bio je psihomotorički zaostao, a umro je u dobi od 35 godina od ciroze jetre. Drugi brat je također imao slabost mišića i umro je od hepatocelularnog karcinoma u dobi od 17 godina (10). Premda nije publicirano, osobnom komunikacijom smo saznali za dvoje bolesnika koji su prve simptome, a vodeći su bili ataksija i blage intelektualne poteškoće, razvili u adolescenciji. Podatke o eventualnoj slabosti mišića i aktivnosti CK nemamo.

Koliko je poznato, većina, u literaturi opisanih bolesnika, je imala miopatiju i/ili trajno povišenu aktivnost CK. Izuzetak čini troje bolesnika, dva brata i sestra, koji imaju dvije heterozigotne mutacije gena *AHCY* (p.R49C i p.T363I) i jasan biokemijski poremećaj (AdoHcy je u njih bio povišen 87, 19 i 14 puta, a AdoMet od jedan i pol do tri puta; u odnosu na referentne vrijednosti). Klinička slika se u ovo troje bolesnika razlikuje, a različita je i u odnosu na ostale opisane bolesnike. Tako je najstarije muško dijete u dobi od 14 godina imalo infantilni autizam i insuficijenciju gušterače, žensko dijete u dobi od pet godina cerebralnu paralizu i spasticitet, a muško dijete u dobi od dvije godine mišićnu hipotoniju, psihomotoričko zaostajanje i epilepsiju. Za razliku od ostalih opisanih bolesnika, nisu imali povišene aminotransferaze i CK, kao niti zakašnjelu mijelinizaciju (12). Premda su imali jasno povišeni AdoMet i AdoHcy, zbog toga što je jedna mutacija klasificirana kao varijanta nepoznate patogenosti, a klinička slika različita, teško je odrediti da li je nedostatna aktivnost

SAHH uzrok bolesti, odnosno kliničke slike tih bolesnika. Aktivnost enzima SAHH nije izmjerena.

### **1.1.1.3. Biokemijske osobitosti bolesti zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze**

Glavna biokemijska obilježja bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH su, uz povišenu aktivnost CK, i povišene koncentracije AdoMet, AdoHcy i metionina (Met), uz normalan ili blago povišeni ukupni homocistein (tHcy) (13). Blago povišenje ukupnog homocisteina u nekih bolesnika objašnjava se inhibitornim djelovanjem povišenog AdoMet na metiltetrahidrofolat reduktazu i remetilaciju homocisteina u metionin. U svih bolesnika kojima su navedeni metaboliti mjereni, izmjerena je višestruko povišena koncentracija AdoMet i AdoHcy u plazmi (1, 4, 5, 9-11) i snižen omjer AdoMet/AdoHcy. U većine bolesnika je omjer AdoMet/AdoHcy u plazmi bio manji od jedan (iznimka je bolesnik kojeg su opisali Buist i suradnici i brat prvoopisanog bolesnika koji su imali omjer AdoMet/AdoHcy veći od jedan (4, 5) (tablica 1)). Prema literaturnim podacima iz nekoliko istraživanja, srednja vrijednosti omjera AdoMet/AdoHcy u plazmi zdravih ispitanika je između 2,7 i 8,5 (15). Koncentracija metionina u plazmi bolesnika, čak i prije primjene dijeta s ograničenim unosom metionina, može biti u granicama vrijednosti koje se smatraju fiziološkim (4, 9, 11).

U tablici 1 je prikaz kliničkih i biokemijskih parametara svih oboljelih, do sada opisanih u literaturi, dob u kojoj je učinjena analiza, odnosno postavljena dijagnoza bolesti, te biokemijska obilježja i tip mutacije gena *AHCY*. Nisu prikazani bolesnici opisani u literaturnom navodu 12 zbog oskudnih objavljenih podataka, ali su podatci koji su o njima poznati prethodno navedeni u tekstu (u odlomku 1.1.1.2.).



**Tablica 1.** Mutacije gena *AHCY*, aktivnosti enzima SAHH, biokemijske osobitosti i dob u vrijeme analize/potvrde dijagnoze u literaturi opisanih bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH.

Bolesnik	Lit. navod	Dob u vrijeme biokemijske analize	Mutacije gena <i>AHCY</i>	Aktivnost SAHH	AdoMet	AdoHcy	AdoMet/AdoHcy	Met	CK
1	1	Dojenče	c.336G>A/c.428A>G; Y143C/W112stop	5-10% u fibroblastima i eritrocitima	30x*	150x*	0,59	15x	19x
2	4	Novorođenče	c.336G>A/c.428A>G; Y143C/W112stop	15% u eritrocitima	1,7x	5x	1,13	N – 1,7x	10x
3	5	26 godina	c.428A>G/c.266C>T Y143C/A89V	20% u eritrocitima	28x*	20x*	2,5	18x	60x
4	6	Novorođenče	c.336G>A/c.428A>G; Y143C/W112 stop	-	1,8x	6.5x	0,28	N	70x
5	8	Dojenče	c.145C>T/c.257A>G R49C/D86G	20% u eritrocitima	40x*	200x*	0,66	12x	42x
6	8	Novorođenče	c.145C>T/c.257A>G R49C/D86G	-	-	-	-	4,5x	-
7	9	4,5 godina	c.145C>T/c.211G>A R49C/G71S	11% u eritrocitima i fibroblastima	23x	84x	0,47	12x	8,6x
8	10	Rane dvadesete godine	c.146G>A/c.146G>A R49H/R49H	-	-	-	-	-	4-20x
9	10	7 godina	c.146G>A/c.146G>A R49H/R49H	-	20x	116x	0,59	9x	2-10x <sup>o</sup>
10	11	Dojenče	c.428A>G/c982T>G Y143C/ Y328D	-	55x*	300x*	0,63	19x*	5x

U tablici su prikazane najviše izmjerene vrijednosti navedene u publikacijama.

x = povećanje koncentracije u plazmi u odnosu na gornju granicu referentnog raspona

x\* = povećanje koncentracije u plazmi u odnosu na srednju vrijednost referentnog raspona

N = vrijednost unutar referentnog raspona za dob

<sup>o</sup> = podatci dobiveni osobnim kontaktom

#### **1.1.1.4. Liječenje bolesti zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze**

Ovim se bolesnicima preporučuje niskoproteinska dijeta s ograničnim unosom metionina, koja u većine oboljelih dovodi do poboljšanja nekih kliničkih i biokemijskih pokazatelja bolesti (13). Klinički znakovi miopatije su trajni, a i aktivnost CK ostaje trajno povišena. Zbog inhibicije metiltransferaza koje sudjeluju u sintezi kolina i kreatina bolesnicima je potrebno nadomjestiti ove spojeve. Potrebno je nadomjestiti i cistein, jedan od produkata metioninskog ciklusa, a s ciljem da se spriječi njegov manjak i posljedična deplecija važnog staničnog antioksidansa, glutaciona (13).

Potencijalno obećavajući pristup liječenju je transplantacija jetre koja je do sada učinjena u jedne djevojčice, kako bi se smanjila koncentracija AdoMet i AdoHcy u plazmi i korigirao biokemijski poremećaj, s obzirom na to da niskoproteinskom dijetom nisu postignuti očekivani rezultati. Rani ishod je bio vrlo zadovoljavajući: došlo je do značajnog pada koncentracije AdoMet i AdoHcy u plazmi, do poboljšanja omjera AdoMet/AdoHcy i normalizacije nekih drugih biokemijskih parametara koji su, prije transplantacije, upućivali na poremećene procese metilacije (kreatina, fosfatidilkolina, itd.). Tijekom praćenja, šest mjeseci nakon transplantacije, aktivnost CK je ostala povišena, ali je došlo do bržeg rasta opsega glave te poboljšanja motoričkih, govornih i socijalnih vještina (11). Međutim, za procjenu dugoročne učinkovitosti transplantacije kao metode liječenja nedostaje informacija o kognitivnom razvoju i statusu mišića tijekom duljeg razdoblja.

#### **1.1.1.5. Razlozi za mali broj do danas otkrivenih bolesnika**

Vrlo je vjerojatno da se bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH nedovoljno često dijagnosticira, s obzirom na to da su specifični biokemijski testovi, nužni za potvrdu dijagnoze, dostupni samo u specijaliziranim laboratorijima. Stoga je moguće da se bolesnici s blažim simptomima ne prepoznaju te da je klinički izražaj bolesti šarolikiji nego što je danas poznato.

Premda se bolest može otkriti probirom novorođenčadi, metoda je nepouzdana jer samo mjerenje metionina nema dovoljnu osjetljivost, dok, s druge strane, metionin može biti povišen i u brojnim drugim stanjima, što ga čini nedovoljno specifičnim. Iako je očekivana incidencija bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH razmjerno velika (o navedenom će biti

riječi u daljnjem tekstu), a bolest je, ako se pravovremeno prepozna, barem dijelom lječiva, za sada nije uvrštena u programe probira novorođenčadi, upravo zbog nedovoljne osjetljivosti testa određivanja koncentracije metionina i relativno nedostupnih specifičnijih testova (7, 13). Što se ciljanog probira tiče, stav je da u svakog bolesnika s hipermetioninemijom nejasne etiologije treba izmjeriti koncentracije AdoMet i AdoHcy u plazmi (13).

### 1.1.2. Metabolizam S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina

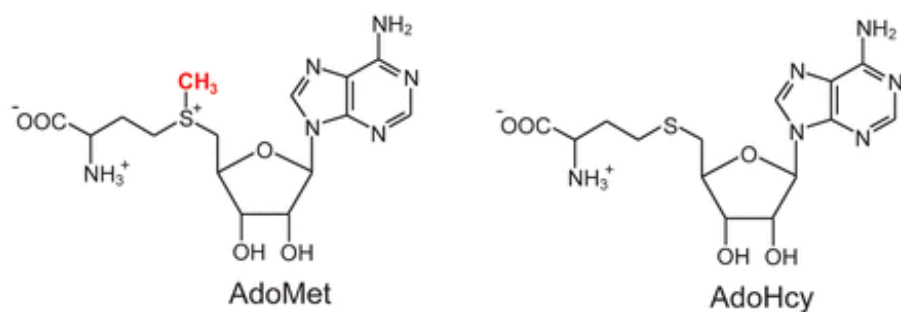
AdoMet je spoj uključen u razne biokemijske procese, kao univerzalni donor metilne skupine u stanicama sisavaca. Sintetizira se iz adenzin trifosfata (ATP) i metionina, djelovanjem enzima metionin adenziltransferaze (MAT I/III i MAT II). AdoMet sudjeluje u procesima metilacije različitih proteina, aminokiselina, DNA, RNA, lipida, neurotransmitera, gvanidinoacetata i drugih molekula (3). Više od 200 proteina u čovjeka su poznate metiltransferaze ili proteini s predmnijevanom metiltransferaznom aktivnošću. Neke od njih imaju ključnu ulogu u epigenetskim procesima (16). Pretpostavlja se da između 0,6 i 1,6% otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frames*) genoma čovjeka i genoma nekih drugih vrsta (miša, kvasaca, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*) kodira AdoMet-ovisne metiltransferaze (17). Metilacija molekule DNA, kovalentno vezanje metilne skupine na peti atom ugljika na citozinu, jedan je od ključnih epigenetskih mehanizama koji omogućava genomski upis, inaktivaciju X-kromosoma, utišavanje transposona, inaktivaciju tumor supresorskih gena i drugo. Metilacija molekule DNA je izrazito važna za sve aspekte funkcioniranja stanice i zbog toga se intenzivno proučava u području razvojne biologije, ali i u području mnogih bolesti, uključujući zloćudne i druge kronične bolesti (18). U tablici 2 su prikazane neke od važnih biomolekula koje su podložne metilaciji, kao i uloga metilacije tih molekula u ključnim biološkim procesima.

Enzim glicin N-metiltransferaza (GNMT) vjerojatno regulira količinu AdoMet u stanici i homeostazu procesa metilacije. Na to upućuju spoznaje da aktivnost ovog enzima, kojeg najviše ima u jetri (čini oko 1-3% proteina citoplazme hepatocita) regulira 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF), a produkt reakcije koju katalizira GNMT, sarkozin nema poznatu biološku ulogu (19).

**Tablica 2.** Neke od važnih transmetilacijskih reakcija. Preuzeto i dijelom modificirano iz literaturnog navoda 20.

Makromolekula	Primatelj metilne skupine / funkcija
DNA	DNA-citozin / reguliranje aktivnosti gena
RNA	mRNA-gvanin / zaštita mRNA ( <i>capping</i> )
	tRNA-citozin, -gvanin, -adenin / promjena fleksibilnosti tRNA
Karboksilna skupina proteina	L-izoaspartat (D-aspartat) / popravak proteina
Amino skupina proteina	Lizin u histonima / reguliranje aktivnosti gena
	Arginin u histonima / reguliranje aktivnosti gena
	Histidin u aktinu i miozinu / interakcija proteina
Lipidi	Fosfatidiletanolamin / sinteza fosfatidilkolina
N-metiltransferaze	Glicin / održavanje koncentracije S-adenozilmetionina u stanici
	Gvanidinoacetat / sinteza kreatina
	Nikotinamid / metabolizam piridina
	Histamin / inaktivacija
O-metiltransferaze	Katekolamini (norepinefrin, epinefrin, dopamin) / inaktivacija
S- i As-metiltransferaze	Tioli, tiopurini / metabolizam ksenobiotika
	Detoksikacija arsenita

Kao produkt metilacije posredovane metiltransferazama ovisnim o AdoMet nastaje AdoHcy, koji je jedini unutarstanični izvor homocisteina i kompetitivni inhibitor brojnih metiltransferaza. Međutim, nisu sve metiltransferaze jednako ovisne o koncentraciji AdoHcy. Neke, koje AdoHcy inhibira, su izrazito osjetljive; kao naprimjer gvanin-N-1 tRNA metiltransferaza i L-izoaspartat (D-aspartat) metiltransferaza koja je uključena u popravak proteina (3). Kemijska struktura AdoMet i AdoHcy je prikazana na slici 2.



**Slika 2.** Kemijska struktura AdoMet i AdoHcy. Slika je preuzeta i modificirana iz literaturnog navoda 21.

Koncentracija AdoHcy u tkivima ovisi o aktivnosti enzima SAHH, koji reverzibilno katalizira njegovu razgradnju na adenzin i homocistein. Reakcija je termodinamski povoljnija u smjeru biosinteze, pa je za aktivnost u smjeru hidrolize važna brza razgradnja produkata. Adenzin se dalje deaminira u inozin djelovanjem enzima adenzin deaminaze, ili se fosforilira u adenzin monofosfat pomoću enzima adenzin kinaze. Homocistein se razgrađuje transulfuracijom do cisteina, ili se ponovno remetilira u metionin, čime se zatvara krug ciklusa metionina (22).

AdoMet je ključna molekula u ciklusu metionina, zbog toga što, u suvišku, blokira enzim metiltetrahydrofolat reduktazu i smanjuje stvaranje 5-metiltetrahydrofolata koji je supstrat za remetilacijski enzim metionin sintazu, dok, s druge strane aktivira enzim cistationin beta-sintetazu i transulfuraciju homocisteina (20). Omjer AdoMet/AdoHcy utječe na prijenos metilnih skupina s AdoMet na primatelje metilne skupine u stanici pa se stoga ovaj omjer naziva „metilacijski omjer“, „metilacijski indeks“ ili “metilacijski potencijal” (23, 24). Transmetilacijske reakcije se odvijaju u svim stanicama organizma, najvećim dijelom u jetri (oko 85%), u kojoj se metabolizira približno polovica metionina unešenog hranom (25). Opisani biokemijski procesi su dio ciklusa metionina kojii je prikazan na slici 1.

### 1.1.3. Koncentracija S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u različitim biološkim uzorcima

U većini stanica u organizmu je fiziološka vrijednost metilacijskog potencijala veća od 10 (26, 27). U plazmi je njegova vrijednost niža; srednja vrijednost u plazmi je, u istraživanju objavljenom od Gellekinka i suradnika, iznosila 8,5. U istom radu je napravljen osvrt na srednje vrijednosti omjera AdoMet/AdoHcy u plazmi, u nekoliko ranije objavljenih publikacija, koje su iznosile od 2,7 do 8,5 (15). Razlike dobivene u pojedinim istraživanjima su, vjerojatno, posljedica različitih metoda koje su korištene za mjerenje navedenih metabolita. Na primjer, prema jednom istraživanju provedenom na 50 zdravih ispitanika (kontrolne skupine) je srednja vrijednost metilacijskog potencijala u plazmi bila 2,5, no uz vrlo širok raspon - od 1,25 do 44,8 (28). Prema našim preliminarnim mjerenjima metilacijskog potencijala u plazmi zdravih ispitanika (N = 50) metodom tandemske spektrometrije masa, sa svrhom izrade referentnih vrijednosti koncentracija AdoMet i AdoHcy, omjer AdoMet/AdoHcy u plazmi je približno 2.

Koncentracije AdoMet i AdoHcy su i do 10 puta više u punoj krvi u odnosu na plazmu (29, 30). U eritrocitima su koncentracije AdoMet i AdoHcy približno dva, odnosno jedan i pol puta više nego u punoj krvi (31). U urinu su njihove koncentracije višestruko više nego u plazmi (AdoMet ~ 100 puta, a AdoHcy ~ 30 puta) zbog toga što se AdoMet i AdoHcy izlučuju bubrezima. Frakcijska ekskrecija AdoMet bubrezima je 93%, a AdoHcy 39%. Zbog toga je omjer AdoMet/AdoHcy u urinu viši nego u plazmi i punoj krvi (30).

U našem smo istraživanju mjerili AdoMet i AdoHcy u punoj krvi. Prema Fuxu i sur. metilacijski je potencijal u punoj krvi iznosio  $10,2 \pm 4,0$  (32), a u našoj referentnoj skupini zdravih ispitanika (N = 58) je bio značajno viši od 10 (medijan = 30) (32). Moguće objašnjenje ovih razlika je korištenje različitih metoda mjerenja.

Koncentracije AdoMet i AdoHcy ovise o vrsti tkiva, ali i o razvojnoj fazi organa (26). Tako je, na primjer, koncentracija AdoMet u tkivu jetre odrasle osobe između 35-70 nmol/g tkiva (33), a slične koncentracije su izmjerene i u jetri štakora (34). Podatke o koncentraciji AdoMet i AdoHcy u mišićima dobili smo mjerenjem AdoMet i AdoHcy u homogenatu mišićnih stanica (neobjavljeni podatci). U homogenatu miocita poprečno-prugastih mišića zdravih ispitanika koncentracija AdoMet je bila ~ 300 nM, a AdoHcy ispod 10 nM (2,88-9,36), dok je metilacijski potencijal u većini mjerenja bio približno 30; sličan medijanu

metilacijskog potencijala pune krvi u skupini zdravih ispitanika. Zanimljivo je da smo ovim mjerenjima pokazali da je koncentracija oba metabolita bila viša u mioblastima u odnosu na miotube, koje su „zreliji“ oblici stanica. Ovo je u skladu sa spoznajama da se intenzivni metilacijski procesi događaju u ranijim razvojnim fazama stanica (26).

#### **1.1.4. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH)**

SAHH je ubikvitarni i visoko konzervirani protein koji funkcionira u obliku tetramera. Svaka podjedinica SAHH sastoji od 432 aminokiseline, molekularne mase oko 48 kDa (35). Monomer čine tri podjedinice: a) NAD-domena (aminokiseline 193-346) na koju se veže kofaktor NAD<sup>+</sup>, b) katalitička domena (aminokiseline 1-190 i 355-402) na koju se veže supstrat AdoHcy te c) C-terminalna, dimerizacijska domena (aminokiseline 403-432) (36). Struktura enzima, određena kristalografijom, prikazana je na slici 3. Enzim se posttranslacijski acetilira na lizinima (Lys<sup>401</sup> i Lys<sup>408</sup>). Premda značaj ove modifikacije nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da acetiliranje proteina rezultira inhibicijom katalitičke aktivnosti enzima te na taj način utječe na metilacijom posredovane procese u stanici (37).

SAHH je jedini enzim u stanicama eukariota koji sudjeluje u pretvorbi AdoHcy u homocistein. Zbog toga je njegova uloga za procese metilacije ključna. Nalazi se u citoplazmi i u jezgri stanice. Konformacija katalitičke domene SAHH slična je katalitičkim domenama metiltransferaza zbog čega je omogućen slobodni protok AdoHcy-molekule između džepova koje stvaraju metiltransferaze i SAHH (38). Upravo je bliski kontakt SAHH i metiltransferaza u jezgri i citoplazmi stanice nužan za neometane procese transmetilacije, čime je omogućena brza razgradnja AdoHcy, glavnog inhibitora metiltransferaza (39).



**Slika 3.** Strukture S-adenozilhomocistein hidrolaze. Enzim je tetramer kojem su vezna mjesta za kofaktor  $\text{NAD}^+$  smještena centralno (označeno svijetlo sivom bojom), a katalitičke domene na koje se veže AdoHcy nalaze se na periferiji (označeno tamnom bojom). Preuzeto iz literaturnog navoda 35.

O biološkoj važnosti ovog enzima govori i činjenica da homozogotna delecija gena *AHCY* u miševa dovodi do rane embrionalne smrti (40). Inhibitori SAHH potiču diferencijaciju stanice, a sudjeluju i u regulaciji ekspresije gena i apoptozi (41) te se upravo stoga proučavaju i koriste kao antivirusni, antiparazitarni, antitumorski i protuupalni lijekovi (42, 43, 44). Danas se zna da su brojni patološki učinci hiperhomocisteinemije, uz oksidacijski stres zbog stvaranja radikala superoksid aniona i hidrogen peroksida, posljedica nakupljanja AdoHcy i/ili promjene metilacijskog potencijala te inhibicije transmetilacijskih reakcija (20, 45). S obzirom na to da se hiperhomocisteinemija povezuje s kardiovaskularnim bolestima, tromboembolijom, demencijom i drugim bolesnim stanjima, neupitno je da je neometano odvijanje procesa metilacije u stanici preduvjet za normalno funkcioniranje cijelog organizma (46, 47).

U oboljelih zbog nedostatne aktivnosti SAHH, aktivnost enzima u eritrocitima je značajno snižena, između 5% i 20% u odnosu na kontrolne vrijednosti (1, 4, 5, 9). Kao i u drugim enzimopatijama, za očekivati je da će klinička slika biti utoliko teža što je rezidualna enzimska aktivnost niža. Za sada, zbog malog broja opisanih bolesnika (pri čemu određivanje aktivnosti enzima SAHH nije učinjeno u svih bolesnika) ne postoji nedvojbeno korelacija između težine bolesti i aktivnosti enzima. Do sada nije opisano postojanje bolesnika s nemjerljivom aktivnošću enzima ili s rezidualnom aktivnošću manjom od 5%, što je u skladu



s otkrićem dobivenim na modelu miša, a koje upućuje na to da je takvo stanje nespojivo sa životom. To niti ne čudi s obzirom na ključnu ulogu AdoMet i AdoHcy u procesima metilacije različitih, biološki važnih molekula.

U istraživanju koje je provedeno na liniji stanica HEK-293 podrijetlom iz bubrega embrija čovjeka pokazano je da pojačana ekspresija enzima SAHH ne mijenja globalnu metilaciju molekule DNA. Zbog toga je zaključeno da, u fiziološkim uvjetima, enzimska aktivnost nije ograničavajući čimbenik u transmetilacijskim reakcijama. Zanimljivo, u istom istraživanju je pokazano da višestruko povišena enzimska aktivnost SAHH dovodi do adenozinom inducirane apoptoze stanice (48).

### **1.1.5. Dismetilacija uslijed promijenjene koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te njihovog omjera**

Pod pretpostavkom da su metiltransferaze DNA u bolesnika koji boluju od bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH i imaju visoku koncentraciju AdoHcy inhibirane, bilo bi očekivano da je DNA hipometilirana. To, međutim, nije tako; u nekih je bolesnika dokazano da je DNA u leukocitima hipermetilirana. Uz to, liječenje dijetom koje je dovelo do poboljšanja biokemijskih parametara bolesti, nije imalo značajnog učinka na smanjenje hipermetiliranosti DNA u leukocitima, iako je tijekom praćenja jednog bolesnika postojao negativan trend metiliranosti DNA, u leukocitima (1, 4, 5). Navedeno je bilo dodatno iznenađujuće i stoga što je već bilo pokazano da su povišene koncentracije tHcy i AdoHcy u krvi povezane s hipometilacijom DNA u limfocitima (45). Moguće objašnjenje je različita razina inhibiranosti pojedinih metiltransferaza s AdoHcy. Pri tom metiltransferaze koje su jako osjetljive na povišenu koncentraciju AdoHcy bivaju inhibirane, pa više supstrata, AdoMet, ostaje metiltransferazama DNA koje nisu toliko inhibirane povišenom koncentracijom AdoHcy. Pri tom dolazi do hipermetilacije različitih molekula, koje metiliraju metiltransferaze manje podložne inhibiciji s AdoHcy, pa tako i molekule DNA (49). U istraživanju objavljenom 2016. godine pokazano je prisustvo globalne hipermetilacije molekule DNA u leukocitima u nekih, ali ne u svih bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH. Dodatno, razinu metiliranosti molekule DNA nije bilo moguće povezati s biokemijskim poremećajem (ostatnom enzimskom aktivnošću i stupnjem povećanja AdoHcy

u odnosu na fiziološke koncentracije). Jedan od bolesnika s globalno hipermetiliranom molekulom DNA, nije imao hipermetilirane upisane gene, dok u drugog bolesnika, koji je imao hipermetilirane upisane gene, nije nađena globalna hipermetilacije molekule DNA. Stoga se pretpostavilo da je aberantna metilacija molekule DNA prisutna samo u onih bolesnika koji su u embrionalnom razdoblju bili izloženi kritično visokoj koncentraciji AdoHcy što je dovelo do globalne hipermetilacije molekule DNA ili hipermetilacije pojedinih dijelova molekule DNA (50).

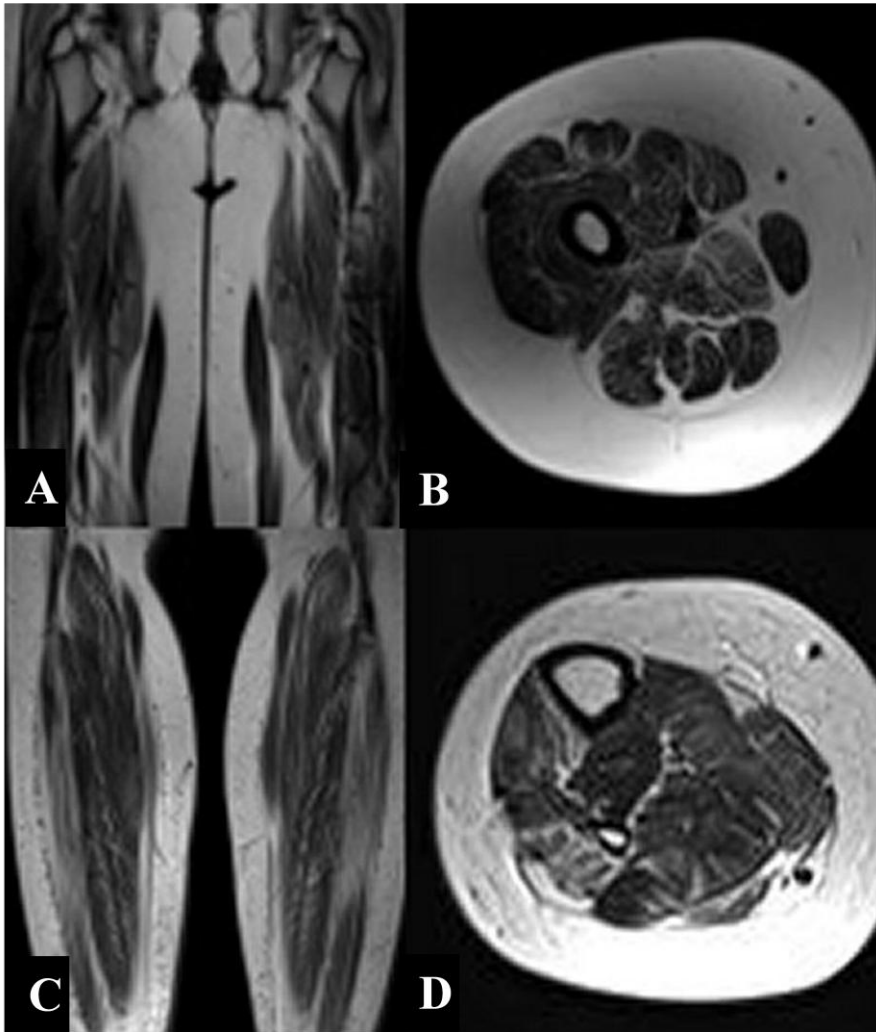
Dismetilacija uslijed promijenjene koncentracije AdoMet i AdoHcy te njihovog omjera značajna je i u karcinogenezi. Opisan je rani razvoj hepatocelularnog karcinoma u mlade bolesnice s nedostatnom aktivnošću SAHH (u dobi od 30 godina) i njezinog brata za kojeg se pretpostavlja da je bolovao od iste bolesti, i umro u dobi od 17 godina (10). Brojne su studije *in vitro*, na linijama stanica miša i čovjeka, i *in vivo*, na modelu miša, pokazale da snižena koncentracija AdoMet, odnosno poremećen metilacijski potencijal, pridonosi razvoju steatohepatitisa i hepatocelularnog karcinoma (51). Također je dokazan povoljan utjecaj i obrat patološkog procesa nakon egzogenog dodavanja AdoMet. Davanje AdoMet bolesnicima s alkoholnim steatohepatitisom i hepatitisom C može spriječiti razvoj hepatocelularnog karcinoma (51). Suprotno tomu, miš s manjkom GNMT (*Gnmt*<sup>-/-</sup>) koji u tkivu jetre ima višestruko povišene koncentracije metionina i AdoMet, blaže snižen AdoHcy te omjer AdoMet/AdoHcy 100 puta viši od kontrola, razvija steatozu jetre, fibrozu i hepatocelularni karcinom (52). Iz ovoga se može zaključiti da i povišen, a ne samo snižen metilacijski potencijal može stvoriti predispoziciju za navedena stanja.

## **1.1.6. Bolest mišića zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze**

### **1.1.6.1. Mehanizam nastanka bolesti mišića zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze**

U većine, do sada opisanih bolesnika, jedan od vodećih simptoma bila je miopatija s višestruko povišenom aktivnošću CK (1, 4-6, 9-11). U dvoje bolesnika, u kojih se klinička slika očitovala rano, i u kojih je učinjena biopsija mišića, nađene su distrofične promjene (1, 5). U jedne bolesnice s kasnim početkom bolesti nađena je atrofija mišićnih vlakana, ali bez

znakova distrofije (10). Na MR mišića nogu učinjenom u troje braće nađena je atrofija mišićnih vlakana uz masnu degeneraciju i edem, a promjene su bile najizraženije u najstarijem brata, što govori u prilog progresivnom propadanju mišića (53). MR mišića nogu jednog od bolesnika prikazan je na slici 4.



**Slika 4.** Degeneracija mišića u 13-godišnjeg bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH prikazana magnetnom rezonancom. MR mišića natkoljenica u T1 mjenom vremenu, koronarni presjek (A) i transverzalni presjek (B); i mišića potkoljenica u T1 mjenom vremenu, koronarni presjek (C) i transverzalni presjek (D). Postoji degeneracija mišića stražnjice (*m. adductor magnus* i *m. gluteus maximus*). Mišići natkoljenica su manje zahvaćeni, a masna infiltracija (na slici prikazana svijetlije od okolnih mišića) se vidi i u peronealnim mišićima (*m. soleus* i *m. gastrocnemius*).

U bolesnika koje pratimo je koncentracija sukcinat dehidrogenaze, enzima Krebsovog ciklusa koji je smješten na unutarnjoj membrani mitohondrija, bila unutar referentnog raspona. Ovo upućuje na intaktne mitohondrije i ne govori u prilog raspadanju mišićne

stanice. Vjerojatniji uzrok povišene koncentracije CK u krvi ovih bolesnika bilo bi oštećenje membrane mišića. Međutim, u jednog bolesnika koji je imao aktivnost sukcinat dehidrogenaze unutar granica referentnih vrijednosti, patohistološki nalaz mišića i MR su pokazali na distrofične promjene (slika 4). U tkivu mišića dvojice ranije spomenutih bolesnika (prvoopisanog bolesnika i njegovog brata) je metodom imunohistokemije dokazano da nema značajnije razlike u distribuciji i ekspresiji SAHH, u odnosu na kontrolu (slika 5); ljubaznošću prof. Hans Lochmüllera.



**Slika 5.** SAHH u uzorcima poprečno-prugastog mišića bolesnika i u kontrolnom uzorku. Korišteno je anti-SAHH protutijelo (miš), razrjeđenje 1:100, uvećanje 40x. Na slikama A i C prikazani su uzorci bolesnika, a na slici B je kontrolni uzorak.

Nejasno je zašto kod manjka ovog ubikvitarno eksprimiranog enzima propadaju upravo mišići. S obzirom na to da povišena koncentracija AdoHcy dovodi do inhibicije brojnih metiltransferaza i poremećene metilacije raznih biomolekula (hipo/hipermetilacija DNA, modifikacija histona, RNA-interferiranje), vjerojatno je promijenjena aktivnost gena čiji su proteinski produkti važni za održavanje strukture i/ili funkciju mišića. Tako je, na primjer, moguće da inhibicija histidin metiltransferaze ili miozin lizin N-metiltransferaze, ima utjecaj na razvoj bolesti mišića. U dvojice naših bolesnika je metodom imunohistokemije dokazano nepromijenjeno ispoljavanje strukturnih proteina mišića: distrofina, merozina, alfa-, beta-, gama- i delta-sarkoglikana, alfa-distroglikana, disferlina, laminina A, emerina, spektrina, kaveolina-3, kolagena IV.

Jedan od uzroka propadanja mišića mogao bi biti manjak kolina (54). Naime, fosfatidilkolin nastaje iz fosfatidiletanolamina posredstvom AdoMet-ovisne fosfatidiletanolamin metiltransferaze, pa se, posredstvom fosfolipaze D, pretvara u kolin. Dokazano je da ljudi, kojima se ograniči unos kolina u prehrani, imaju višestruki porast

mišićne frakcije CK koja se brzo vraća unutar fizioloških vrijednosti nakon unošenja adekvatne količine kolina hranom (55). Mioblasti u mediju s malo kolina otpuštaju tri i pol puta više CK u odnosu na mioblaste u kulturi s dostatnom količinom kolina. Dodatno, u mioblastima u mediju bez kolina dolazi do apoptoze. Uz to, uslijed manjka kolina dolazi do pojačanog pucanja membrane mišićne stanice što dokazuje da je fosfatidilkolin važan za strukturni integritet stanične membrane (55). To potvrđuju i rezultati studije u kojoj je pokazano da stanice mišića s deplecijom kolina imaju promijenjen sastav fosfolipida u staničnoj membrani, ali i narušen unutarstanični metabolizam lipida, što se očitovalo nakupljanjem lipidnih kapljica u citoplazmi (56). U prilog pretpostavci da je manjak fosfatidilkolina mogući čimbenik koji pridonosi oštećenju mišića u bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH je i činjenica da je prvi opisani bolesnik prije liječenja kolinom imao nisku koncentraciju fosfatidilkolina i kolina u plazmi, pa je za pretpostaviti da je slično bilo i u tkivima, uključujući mišiće (1).

U istog bolesnika je nađen i povišen gvanidinoacetat, vjerojatno zbog inhibicije gvanidinoacetat metiltransferaze, enzima koji sudjeluje u energetsom metabolizmu stanice kataliziranjem pretvorbe gvanidinoacetata u kreatin (1). Fosfokreatin je u stanicama mišića ključan u energetsom metabolizmu, kao brzo dostupni izvor fosfata za sintezu molekule ATP (57). Na modelu miša je dokazano da hiperhomocisteinemija, koja je često praćena povišenjem koncentracije AdoHcy, dovodi do oksidacijskog stresa u stanicama poprečno-prugastog mišića. Dodavanje kreatina dovelo je do neutralizacije negativnih učinaka hiperhomocisteinemije na oksidacijske procese u stanici (58).

Četvrti predmnijevani mehanizam uključen u nastanak bolesti mišića je poremećaj sinteze koenzima Q, važnog staničnog antioksidansa i kofaktora u procesu oksidativne fosforilacije i beta oksidacije, u mitohondrijima. AdoMet je u stanicama eukariota metilni donor u dva procesa O-metilacije unutar složenog puta biosinteze koenzima Q (59).

Nasljedni poremećaji biosinteze koenzima Q očituju se širokim spektrom ranih multisistemskih poremećaja koji uključuje encefalomiopatiju, izoliranu miopatiju i drugo. U poremećajima koji uzrokuju sekundarni manjak koenzima Q, a koji su češći od primarnih, uz cerebralne znakove bolesti vide se i različiti simptomi i znakovi bolesti mišića (slabost, hipotonija, zamaranje i mioglobinurija) (60). Premda u biološkim uzorcima naših bolesnika nije bilo moguće izmjeriti koncentraciju koenzima Q, zbog važnosti metilacijskih procesa u sintezi navedenog koenzima te njegove iznmno značajne biološke uloge, naši su bolesnici

tijekom određenog razdoblja empirijski liječeni koenzimom Q10. Kako na primjenjeno liječenje nije zamijećeno poboljšanje u određenom vremenskom periodu, s istim se prekinulo.

L-karnitin je izuzetno važan spoj za energetske metabolizam stanice. Omogućuje prijenos dugolančanih masnih kiselina, preko unutarnje membrane mitohondrija u matriks mitohondrija, kako bi se ondje iskorištavale u procesu beta-oksidacije. L-karnitin se unosi hranom ili se u organizmu sintetizira iz preteče trimetil-lizina, u čijoj sintezi sudjeluje metiltransferaza ovisna o AdoMet. Bolesnici s poremećajem prijenosa karnitina i njegovim posljedičnim manjkom imaju slabost mišića i kardiomiopatiju. Premda se većina karnitina unosi hranom, moguće je da smanjena endogena proizvodnja zbog inhibicije navedene metiltransferaze, pod određenim okolnostima, može pridonijeti slabosti mišića (61). Iako je u prvoopisanog bolesnika ukupni i slobodni karnitin u plazmi bio u granicama normale, to ne isključuje unutarstanični manjak karnitina (99% karnitina u organizmu se nalazi unutar stanica i to uglavnom u stanicama mišića), zbog smanjene endogene sinteze.

Također, oksidacijski stres zbog smanjene razine glutationa (GSH), koji je posljedica nedovoljne pretvorbe metionina u cistein, koji je prekursor GSH, može dovesti do narušenog oksido-redukcijskog statusa stanice. Oksidacijsko oštećenje stanica središnjeg živčanog sustava i mišića u bolesnika s manjkom SAHH za sada nije dokazano, iako neke studije *in vitro* govore tomu u prilog. Zanatta i suradnici su na stanicama korteksa mozga odraslih miševa dokazali da uslijed povišenih koncentracija AdoMet dolazi do lipidne peroksidacije i oksidacijskog oštećenja proteina u stanici te snižene koncentracije GSH, kao i snižene aktivnosti  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ATPaze koja je nužna za održavanje membranskog potencijala stanice i neurotransmisije (62).

#### **1.1.6.2. Bolest mišića u drugim prirodnim poremećajima ciklusa metionina**

Bolesnici koji boluju od drugih nasljednih poremećaja u ciklusu metionina i homocisteina imaju mišićnu slabost kao dio kliničke slike.

Manjak adenozin kinaze (ADK) je karakteriziran slabošću mišića i hipotonijom, a bolesnici imaju povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy. U nekih je bolesnika njihov omjer očuvan, što dodatno upućuje da promjena koncentracija AdoMet i AdoHcy i narušen metilacijski potencijal dovode do pojave bolesti mišića gore opisanim, ili nekim drugim, nama nepoznatim, mehanizmima (63, 64).

Bolesnici s klasičnom homocistinurijom zbog manjka cistationin beta sintetaze često imaju slabost mišića (65). U jednog bolesnika s homocistinurijom, zbog manjka 5,10 – metiltetrahidrofolat reduktaze, dokazane su strukturne promjene skeletnog mišića: žarišna fragmentacija i prekid Z-linije te disorganizacija miofilamenata (66). Mišićna hipotonija je dio kliničke slike u gotovo svim prirođenim poremećajima remetilacije (67).

### **1.1.6.3. Dodatne pretpostavke o mehanizmu nastanka bolesti mišića zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze**

U troje bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH je određen sastav proteoma plazme sa svrhom da se otkriju potencijalni biljezi bolesti. Rezultati su pokazali da bolesnici, u odnosu na zdrave ispitanike, imaju pojačanu ekspresiju nekoliko proteina uključenih u imunološki odgovor (68). To dodatno upućuje da bi pokretanje upalne kaskade također moglo imati utjecaja na mehanizam nastanka bolesti, odnosno kliničku sliku. Zanimljivo je da je u jednog bolesnika bila pojačana ekspresija trombospondina 4, koja je već opisana u bolesnika s drugim mišićnim distrofijama; mišićnom distrofijom tipa Duchenne i dermatomiozitisom (68).

### **1.1.6.4. Dokazi da patološki procesi u mišićima započinju u fetalnom razdoblju**

S obzirom na to da se slabost mišića, praćena višestruko povišenom aktivnošću CK, u nekih bolesnika očitovala već po rođenju, vrlo je izgledno da je patogeni proces u stanicama mišića započeo još u fetalnom razdoblju. U skladu s tim je i činjenica da mikroRNA miR-34b koja, između ostalog, smanjuje razinu enzima SAHH, ujedno utječe na miogenezu i to tako da ograničava proliferaciju mioblasta, a potiče diferencijaciju u miocite i stvaranje miotuba (69). Istraživanje na miševima je u skladu s tom hipotezom: u novookoćenih miševa, čije su majke tijekom trudnoće bile izložene hipermetioninemiji, postnatalno je pokazano smanjenje mišićne mase gastroknemijusa i smanjen ukupan udio proteina u homogenatu stanica gastroknemijusa, a povećanje biljega oksidacijskog stresa i čimbenika upale (70).

Prehrana s ograničenim unosom metionina u majke jednog od naših bolesnika za vrijeme trudnoće nije imala utjecaj na stupanj slabosti mišića djeteta, a nije bilo niti evidentne

dugoročne koristi. Naime, tijekom bolesti bio je približno jednak kao i u njegovog brata koji je, bio izložen fiziološkim količinama metionina *in utero* (majka nije bila na dijeti). U oba je bolesnika liječenje niskoproteinskom dijetom započeto u ranoj dojenačkoj dobi.

### 1.1.7. Gen *AHCY* i njegovi polimorfizmi

#### 1.1.7.1. Građa gena *AHCY*

Gen *AHCY*, koji kodira protein SAHH, nalazi se na dugačkom kraku kromosoma 20 (20q11.22). Prekrajanjem primarnog transkripta nastaju dvije zrele mRNA koje kodiraju dvije izoforme enzima (71). Transkripti se razlikuju u N-terminalnom kraju. Prvi transkript (NM\_000687.1) kodira izoformu proteina koju čine 432 aminokiseline, molekularne mase 47,7 kDa. Drugi transkript (NM\_001161766) kodira protein koji čine 404 aminokiseline, molekularne mase 44,7 kDa (72). Shematski je gen *AHCY* prikazan na slici 6. Navedeni gen je visoko konzerviran. Konzerviranost se očituje i na razini proteina; sličnost ovog enzima između čovjeka i kvasca veća je od 70% (35), što dodatno potvrđuje evolucijski konzerviranu ulogu enzima SAHH u stanicama eukariota.



**Slika 6.** Shematski prikaz gena *AHCY*. Bijelo su označeni nekodirajući dijelovi egzona (UTR, engl. *untranslated region*), crno kodirajući dijelovi egzona. Preuzeto i modificirano iz literaturnog navoda 73.

#### 1.1.7.2. Polimorfizmi gena *AHCY*

Učestalost polimorfizama u genu *AHCY* su prvi objavili Bissbort i suradnici 1983. godine, na populaciji jugozapadne Njemačke. Analizirajući protein izdvojen iz eritrocita opisali su dvije izoforme SAHH: SAHH-1 i SAHH-2; koje se javljaju s učestalošću 96%



(SAHH-1) i 4% (SAHH-2) (74). Raspodjela učestalosti navedenih izoformi slična je i u populaciji Japana: 95,3% (SAHH-1) i 4,7% (SAHH-2) (75). Izoforma SAHH-3 je po prvi puta opisana u populaciji zapadne Njemačke, kada je istraživanje učinjeno na većem broju ispitanika (N = 647); SAHH-1: 97%, SAHH-2: 2,5% i SAHH-3: 0,5% (76). Slična pojavnost navedenih izoformi pokazana je i u populaciji Italije: SAHH-1 96,8%, SAHH-2 2,3% i SAHH-3 0,9% (77). Kasnije je učestalost polimorfizama gena *AHCY* opisana i u drugim populacijama. Naša je istraživačka skupina pokazala postojanje četiri inačice proteina SAHH u populaciji Hrvatske (N = 237) (metoda horizontalne elektroforeze u škrobnom gelu i enzim-specifično bojenje) (78). Na ovaj su način otkrivena četiri različita elektromorfna proteina SAHH: SAHH-1, SAHH-2, SAHH-3 i SAHH-4. Varijanta SAHH-4 je opisana po prvi put. Nađeno je da je učestalost pojedinih izoformi redom: SAHH-1 94,1%, SAHH-2 3,2%, SAHH-3 0,6%, SAHH-4 1,5%. Osim ovih elektromorfi, otkrivena je i izoforma koja se pojavljuje s frekvencijom od 0,6%, koja izrazito smanjuje količinu proteina, a nazvana je SAHH\*0. Denzitometrijom je određena koncentracija SAHH\*0 proteina i izračunato da odgovara približno 7,5% koncentracije divljeg tipa proteina. Na temelju dobivenih rezultata se pretpostavilo da bi u našoj populaciji jedna od 30 000 osoba mogla biti homozigot za SAHH\*0 (78). Ukoliko bi se navedena pretpostavka pokazala točnom, nedostatna aktivnost SAHH bi mogla biti jedan od češćih uzroka nasljedne miopatije.

Već su ranije Gellenkik i sur. opisali gensku osnovu izoforme SAHH-2 u kojoj u egzonu 2 dolazi do zamjene citozina u timin na položaju 112 (112 C>T) što rezultira zamjenom aminokiseline arginin na položaju 38 triptofanom (p.R38W) (79). Aminokiselina na položaju 38 nalazi se unutar katalitičke domene, neposredno uz aktivno mjesto i blizu kanala koji se stvara prilikom organizacije homotetramera. Oznaka polimorfizma SAHH-2 je rs13043752.

U polimorfizmu SAHH-3, čiju su gensku osnovu opisali Fumić i sur., dolazi do zamjene gvanina adeninom na položaju 377 (377G>A) u egzonu 4 što rezultira zamjenom glicina u arginin na položaju 123 (p.G123R) (80). Glicin na položaju 123 (odnosno arginin u mutiranom proteinu) se nalazi u katalitičkoj domeni, ali na vanjskom dijelu podjedinice. Oznaka polimorfizma SAHH-3 je rs41301825.

Sekvenciranjem kodirajućeg područja gena *AHCY* nije nađeno promjena u osoba s proteinskom izoformom SAHH-4 pa se pretpostavilo da je njezin nastanak posljedica posttranslacijske modifikacije (80).

Funkcijskim analizama izoformi SAHH-2 i SAHH-3 je pokazano da nema smanjenja aktivnosti enzima u odnosu na divlji tip. Aktivnost ove dvije inačice je  $\geq 94\%$ , u smjeru sinteze i hidrolize AdoHcy. Međutim, dokazano je da navedene varijante utječu na termalnu stabilnost enzima, naročito varijanta SAHH-2. Naime, 10-minutno izlaganje izoforme SAHH-2 temperaturi od  $50^{\circ}\text{C}$  dovodi do  $77\%$  gubitka enzimske aktivnosti, dok navedeni uvjeti na divlji tip proteina i izoformu SAHH-3 nemaju utjecaja. Pri temperaturi višoj od  $53^{\circ}\text{C}$  dolazi do potpune inaktivacije proteina SAHH-2. Izoforma SAHH-3 je termalno stabilnija od izoforme SAHH-2. Temperatura pri kojoj dolazi do razmotavanja proteina (engl. *unfolding*) nešto je niža u odnosu na divlji tip, za oko  $1,5^{\circ}\text{C}$  (80). Nestabilnost navedenih izoformi bi u uvjetima *in vivo* mogla imati i veći značaj. Moglo bi se zaključiti da bi opisane varijante gena *AHCY* u različitim okolnostima mogle nepovoljno djelovati na aktivnost proteina i na taj način uzrokovati bolest ili pridonijeti njezinom razvoju. U prilog zaključcima izvedenim iz naših istraživanja idu i rezultati istraživanja koje su objavili Feng i suradnici 2009. godine, a u kojem su sekvencirali gen *AHCY* u 240 osoba, pripadnika četiri etničke skupine populacije Sjedinjenih Američkih Država. Otkrili su ukupno 39 varijanti (polimorfizama jednog nukleotida), uključujući i dva gore navedena polimorfizma. Vidjela se značajna različitost u pojavnosti pojedinih varijanti između etničkih skupina, a varijabilnost je osobito bila izražena unutar populacije Afroamerikanaca. Učinjene su i funkcionalne genomske studije i pokazano je da niti jedna od varijanti ne dovodi do značajno smanjenog izražaja proteina i enzimske aktivnosti u odnosu na divlji tip, osim inačica SAHH-2 i SAHH-3, koje imaju nešto sniženu enzimsku aktivnost (73).

### 1.1.7.3. Patogene mutacije u genu *AHCY*

Za razliku od opisanih polimorfizama, patogene mutacije koje su prisutne u bolesnika značajno smanjuju enzimsku aktivnost proteina. U literaturi je do sada opisano osam patogenih mutacija koje uzrokuju bolest, a mutacije i njihove kombinacije u bolesnika su prikazane u tablici 1. Još je jedna mutacija, opisana u dva brata i sestre za koje se pretpostavlja da boluju od bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH, upitne patogenosti (T363I), dok je druga mutacija u istih bolesnika (R49C) od ranije poznata kao patogena. S obzirom na raznolikost kliničke slike, teško je pretpostaviti u kojoj je mjeri biokemijski poremećaj (povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy) pridonio simptomima tih bolesnika, koji su značajno različiti od kliničke slike u ranije opisanih bolesnika (detaljnije opisano u

odlomku 1.1.1.2.). Patogene mutacije nalaze se u egzonima 2, 3 i 4 koji kodiraju podjedinicu koja veže supstrat AdoHcy: R49C, R49H, G71S, D86G, A89V, W112STOP. Dodatno, mutacija Y143 nalazi se u katalitičkoj podjedinici, a mutacija Y328D u podjedinici za koju se veže  $\text{NAD}^+$ . Katalitičke i fizikalno-kemijske osobine nekih od mutiranih proteina (W112STOP, Y143C, A89V, D86G i R49C) su detaljno proučene i opisane od strane Vugreka i suradnika koji su otkrili da navedene mutacije dovode do značajnog gubitka enzimske aktivnosti u odnosu na divlji tip proteina (49, 81, 82). Opisane mutacije ne dovode do potpunog gubitka katalitičke aktivnosti, nego destabiliziranjem strukture proteina, rezultiraju promijenjenom kinetikom enzimske reakcije (49). Uz to je dokazano da mutirani proteini imaju različitu unutarstaničnu raspodjelu i interakciju s drugim proteinima, u odnosu na divlji tip. Mutirani protein Y143C je, u odnosu na divlji tip, predominantno smješten u jezgri (do četiri puta više u odnosu na divlji tip), dok su mutante Y328D, A89V i G71S u jezgri zastupljene dvostruko više u odnosu na divlji tip. Mutirani protein R49C ima sličnu staničnu raspodjelu kao divlji tip, a mutirani protein D86C je predominantno smješten u citoplazmi, u odnosu na divlji tip proteina (39).

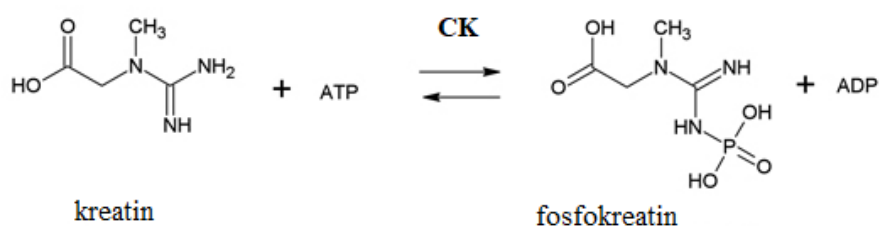
Roditelji bolesnika koji su heterozigoti, odnosno nositelji samo jedne mutacije gena *AHCY* nisu imali kliničkih niti biokemijskih pokazatelja bolesti, a koncentracije AdoMet i AdoHcy, kao i metilacijski potencijal su im bili normalni (1, 5). Nasuprot tomu, brat bolesnika kojeg su opisali Stender i suradnici, koji je također heterozigot i bez kliničkih simptoma bolesti, je u dobi od 9 godina imao blago povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy, uz uredan metilacijski potencijal (10).

## 1.2. O kreatin kinazi i stanjima koja dovode do njezine povišene aktivnosti u krvi

### 1.2.1. Osnovno o kreatin kinazi

Kreatin kinaza (CK), naziva se i kreatin fosfokinaza ili fosfokreatin kinaza (EC 2.7.3.2). To je dimerni enzim ispoljen u mnogim stanicama i tkivima, a najsnažnije u onima u kojima se, zbog visokog energetskeg metabolizma, brzo troši ATP. Enzim ima tri različita citoplazmatska izoenzima: mišićni (CK-MM), moždani (CK-BB) i srčani izoenzim (CK-MB); te mitohondrijski izoenzim (miCK). U poprečno-prugastim mišićnim stanicama izoenzim CK-MM čini većinu kreatin kinaze, a izoenzim MB oko 5%; dok je u srčanom mišiću udio izoenzima CK-MB značajno veći, oko 25-30%, a CK-MM čini oko 70%. Izoenzim CK-BB je dominantan u mozgu i glatkom mišićju. Za razliku od prethodno navedenih izoenzima mjerenje aktivnosti CK-BB se rutinski ne koristi u kliničkoj dijagnostici.

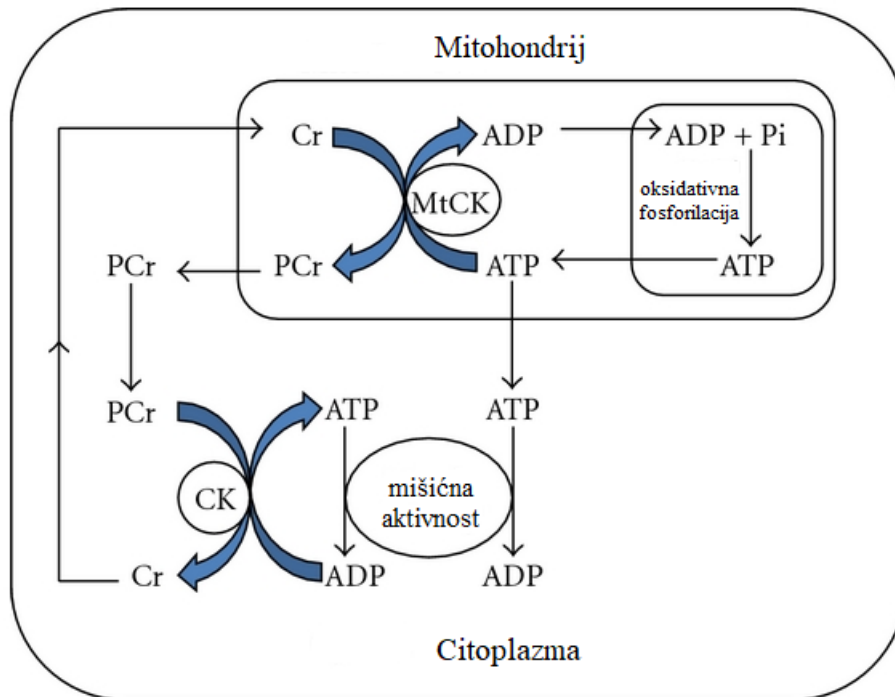
CK je ključan enzim u održavanju energetske homeostaze u stanici mišića. Molekula gvanidinoacetat koja nastaje iz spoja arginina i glicina se metilira posredstvom gvanidinoacetat metiltransferaze (GAMT) te nastaje kreatin. Kreatin se reverzibilno fosforilira enzimom CK u kreatin monofosfat koji služi kao glavna zaliha fosfata za brzu regeneraciju ATP (83). Biokemijska struktura kreatina i reakcija koju katalizira CK je prikazana na slici 7.



**Slika 7.** Shematski prikaz prijenosa fosfata između kreatina i ATP-a/ADP-a u reverzibilnoj reakciji koju katalizira CK.

Fosfokreatin i kreatin su puno manje molekule od molekula ATP i ADP te stoga slobodno difundiraju unutar stanice i prenose energiju u obliku visokoenergetskog spoja

fosfata, od mjesta gdje se energija stvara, mitohondrija, u ostale odjeljke stanice (slika 8). Na taj način je u tkivima s visokim energetskekim metabolizmom osigurana stalna regeneracija ATP-a iz ADP-a (npr. u stanici mišića).



**Slika 8.** Ciklus kreatina (Cr) i fosfokreatina (PCr) u stanici mišića. Kreatin se u mitohondriju refosforilira u PCr djelovanjem mitohondrijske CK (MtCK) ATP-om nastalom u procesu oksidacijske fosforilacije. PCr iz mitohondrija prelazi u citoplazmu, u kojoj pomoću citoplazmatske CK iz ADP-a regenerira ATP, koji je nužan za mišićnu funkciju i homeostazu mišićne stanice. Preuzeto i minimalno modificirano iz literaturnog navoda 84.

Mitohondrijska izoforma CK je oktamer smješten u kristama i između vanjske i unutarnje membrane mitohondrija. Ima ključnu ulogu u prijenosu energije u obliku kreatin fosfata između mitohondrija i citoplazme. U različitim stanjima s pojačanim energetskekim zahtjevima i pri oksidacijskom stresu dolazi do pojačane ekspresije ovog enzima. Pri tom se nerijetko mogu vidjeti nakupine miCK kao kristalična inkluzijska tjelešca u mitohondrijima, karakteristična za mitohondrijske citopatije (85).

U zdravoj populaciji postoje varijacije u aktivnosti CK u krvi pa tako muškarci, zbog većeg udjela mišićne mase, imaju višu aktivnost CK u odnosu na žene. Aktivnost CK ovisi i o fizičkoj aktivnosti pojedinca. Također, CK je viši u osoba crne rase. Uz navedeno, postoje

varijacije fizioloških vrijednosti u odnosu na dob (86). U tablici 3 su prikazane referentne vrijednosti CK prema dobi i spolu.

**Tablica 3.** Referentni intervali kreatin kinaze (CK) prema dobi i spolu. Vrijednosti su izražene u internacionalnim jedinicama na litru (U/L). Navedene vrijednosti smatraju se referentnim u ovlaštenim biokemijskim laboratorijima u Republici Hrvatskoj, nakon provedenog projekta "Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području medicinske biokemije".

Spol i dob	CK (U/L)
M; do 3 godine	60 – 305
M; 4 – 6 godina	75 – 230
M; 6 – 7 godina	60 – 365
M; 8 – 19 godina	70 – 285
M; od 20 godina	0 – 177
Ž; do 3 godine	60 – 305
Ž; 4 – 6 godina	75 – 230
Ž; 6 – 7 godina	60 – 365
Ž; 8 – 19 godina	55 – 249
Ž; 20 godina	0 – 153

M = muški spol, Ž = ženski spol

### 1.2.2. Povišena aktivnost kreatin kinaze u krvi

CK se smatra glavnim pokazateljem oštećenja stanice mišića pa se stoga koristi u dijagnostici i praćenju tijeka bolesti i liječenja različitih bolesti i stanja koja se odražavaju na poprečno-prugasti mišić. Praćenje dinamike CK i posebno srčanog izoenzima je osobito korisno u dijagnostici akutnog infarkta miokarda. Povišenu aktivnost CK u krvi nalazimo pri različitim bolestima i stanjima koja zahvaćaju poprečno-prugasti mišić: na primjer, upalne bolesti mišića (autoimunosne i virusom inducirane), nasljedne miopatije, mišićne distrofije, metaboličke miopatije, bolesti motornog neurona, ali i nakon intenzivnije mišićne aktivnosti, tijekom vježbanja (84). Razlozi za povišenje aktivnosti CK u krvi mogu biti i sistemske

bolesti kao npr. sistemske virusne infekcije, bolesti vezivnog tkiva, celijakija, bolest bubrega, kardiovaskularne bolesti, neravnoteža elektrolita, toksična oštećenja, trauma, stanja s pojačanom mišićnom aktivnošću (npr. epileptički status), endokrinopatije (ponajprije hipotireoza), neki lijekovi (statini, fibrati, antiretrovirusni lijekovi i drugi) (86). Uzroci trajno povišene CK u krvi su najčešće prirodene mišićne bolesti, osobito distrofije, ali i metaboličke miopatije. Metaboličkim miopatijama se tradicionalno nazivaju bolesti koje dovode do narušenog intermedijarnog metabolizma stanice mišića, a to su mišićne glikogenoze, uključujući i Pompeovu bolest, poremećaji beta oksidacije masnih kiselina, mitohondrijske miopatije i manjak mioadenilat deaminaze (87). Navedene skupine bolesti su praćene povremeno ili trajno povišenom aktivnošću CK.

U bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH, ukoliko su pretpostavljeni mehanizmi nastanka bolesti točni, narušen je energetske metabolizam u stanici mišića, što, barem dijelom, pridonosi nastanku oštećenja. Kao što je već ranije rečeno, većina, nama poznatih bolesnika, ima trajno povišenu aktivnost CK. U sintezi kreatina, supstrata CK, sudjeluje metiltransferaza ovisna o AdoMet – GAMT. Prema nekim pretpostavkama, GAMT troši značajan udio metilnih grupa iz AdoMet (do 40%). Sintaza kreatina je, uz unos hranom, nužna za održavanje unutarstanične koncentracije kreatina, sa svrhom održavanja homeostaze energetskog metabolizma usprkos gubitku zbog konverzije kreatina u kreatinin koji se potom izlučuje bubrežima (88).

### **1.2.3. Povišena aktivnost kreatin kinaze bez simptoma**

Dio osoba s povišenom aktivnošću CK u krvi nema mišićne slabosti niti drugih simptoma i znakova bolesti mišića. U tih je osoba uredan i neurološki status. U obitelji ovih osoba nema neuromišićnih oboljenja. Katkad se ovakvo stanje naziva „idiopatskom hiperCKemijom“. Navedeni termin je prvi puta upotrijebio Rowland, 1980. godine (89).

U navedenoj se skupini nerijetko nalaze osobe koje će u kasnijem životu razviti simptome i znakove bolesti mišića. Tako je u jednom istraživanju objavljenom 2002. godine, nakon što je učinjena temeljita obrada ispitanika, uključujući i histološku analizu tkiva mišića, pokazano da je od 114 osoba s asimptomatskom hiperCKemijom 21 osoba (18,4%) imala

neuromišićnu bolest. U čak 57 osoba (50%) su nalaz elektromiografije (EMG) ili histološke analize odstupali u odnosu na normalni nalaz (90).

Jedan od uzroka asimptomatski povišene aktivnosti CK je tzv. „makro CK“ – enzimski kompleks koji nastaje vezanjem CK i imunoglobulina, odnosno CK i nekih drugih proteina, a češće se vidi u sklopu autoimunskih i zloćudnih bolesti. Smatra se da je „makro CK“ uzrok oko 4% idiopatski povišene aktivnosti CK (91).

Bolesnik s nedostatnom aktivnošću SAHH, otkriven u presimptomatskoj fazi bolesti, nakon što je njegova majka zbog navedene bolesti umrla od hepatocelularnog karcinoma (10), nije imao simptome mišićne slabosti i dobro je podnosio napore (trenirao je nogomet), a imao je trajno povišenu aktivnost CK (podatci dobiveni osobnom komunikacijom). Zbog navedenog, pretpostavljamo da bi se između osoba s asimptomatskom/idiopatski povišenom CK mogli otkriti bolesnici s nedostatnom aktivnošću SAHH, u presimptomatskoj fazi bolesti, a eventualno i oni s blažim kliničkim izražajem koji možda nikada niti neće razviti simptome slabosti mišića.



## 2. HIPOTEZA

1. Nedostatna aktivnost SAHH je uzrok bolesti u nekih bolesnika s miopatijom nejasne etiologije, u kojih je trajno povišena aktivnost CK u krvi.

2. Snižen metilacijski potencijal (omjer AdoMet/AdoHcy) je povezan s razvojem bolesti mišića, neovisno o uzroku promjene vrijednosti metilacijskog potencijala.

3. Polimorfizmi gena *AHCY* rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) su povezani s rizikom za razvoj bolesti mišića, odnosno za povišenje aktivnosti CK u krvi.

### 3. CILJEVI RADA

1. Među bolesnicima s miopatijom nerazjašnjene etiologije i drugim osobama s trajno povišenom aktivnošću CK otkriti bolesnike s nedostatnom aktivnošću SAHH ili drugim prirođenim poremećajima povezanim s aberantnim metabolizmom metionina i udruženim s povišenim koncentracijama AdoMet i/ili AdoHcy. Novootkrivene bolesnike detaljno obraditi, klinički i laboratorijski, te na taj način dobiti nove/dodatne spoznaje o prirođenim poremećajima metilacije, a ponajprije bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH.

2. Izmjeriti koncentraciju AdoMet i AdoHcy u krvi ispitanika, izračunati omjer AdoMet/AdoHcy i dobivene rezultate usporediti s referentnim vrijednostima. Uz to, posebno provjeriti imaju li osobe s trajno povišenom aktivnošću CK, kao skupina i pojedinačno, značajno različite koncentracije AdoMet i AdoHcy te snižen omjer AdoMet/AdoHcy, u odnosu na referentne vrijednosti.

3. Analizirati polimorfizme gena *AHCY* rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) te usporediti njihovu učestalost u ispitanika u odnosu na pojavnost u zdravih ispitanika.

4. Utvrditi povezanost navedenih polimorfizama s pojavom bolesti mišića, odnosno povišenom aktivnošću CK u krvi, iz čega se neizravno može zaključiti povećava li prisustvo navedenih polimorfizama rizik za razvoj bolesti mišića.

## 4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ispitanici za uključanje u istraživanje su odabrani prema niže navedenim kriterijima.

#### **Uključni kriteriji:**

1. Trajno povišena aktivnost CK u krvi nepoznate etiologije, neovisno o tome ima li ispitanik simptoma slabosti ili drugih znakova bolesti mišića, ili je bez simptoma. „Trajno povišena aktivnost CK” označavala je barem dvostruko višu vrijednost od gornje granice referentnog raspona za dob i spol, izmjereno u dva ili više navrata. Referentne vrijednosti CK prema dobi i spolu prikazane su u Uvodu, tablica 3.

2. Rezultati do tada učinjene obrade nisu objasnili etiologiju povišene aktivnosti CK. „Obrada“ se odnosi na osnovnu metaboličku obradu (uključujući testiranje na Pompeovu bolest), molekularnu-genetičku obradu (testiranje na Duchenne/Becker mišićnu distrofiju u muške djece), te ostalu obradu učinjenu po nahođenju nadležnog neurologa/neuropedijatra.

#### **Isključni kriteriji:**

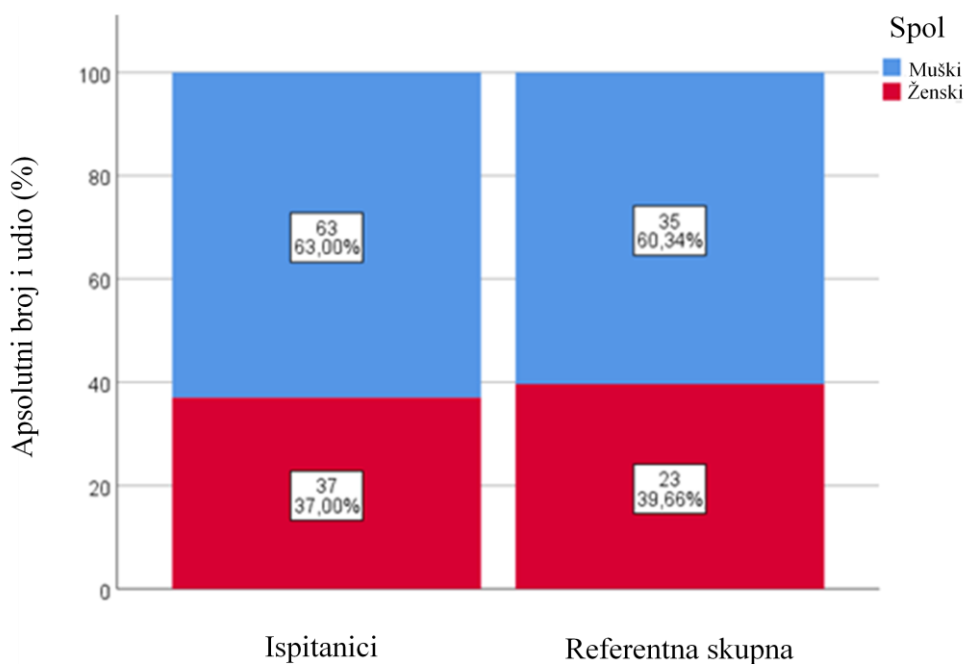
1. Jasno definirana etiologija bolesti ili drugo stanje koje je uzrokovalo trajno povišenu aktivnost CK u krvi.
2. Uzimanje lijekova koji su mogli uzrokovati povišenu aktivnost CK u krvi.
3. Povremeno povišena aktivnost CK u krvi ispitanika.

Prije uključivanja u istraživanje, ispitanici koji su zadovoljavali uključne kriterije, a nisu imali zadovoljen niti jedan isključni kriterij, dobili su usmenu i pisanu obavijest o istraživanju. Obavijest za ispitanike i obrazac informiranog pristanka bili su prilagođeni dobi ispitanika. Ispitanicima je objašnjeno da je sudjelovanje u istraživanju dobrovoljno i da će njihovi osobni podatci biti zaštićeni.

U istraživanje smo uključili 100 ispitanika, oba spola i svih životnih dobi. Od ukupno 100 ispitanika 37 je bilo ženskog, a 63 muškog spola; 53 djece do 18 godina i 47 odraslih. Po dobnim skupinama je raspodjela bila: 0 do uključivo 10 godina – 32 ispitanika, 11 godina do uključivo 20 godina – 21 ispitanik, 21 godina do uključivo 40 godina – 24 ispitanika, 41 do uključivo 60 godina – 17 ispitanika, 61 godina i više – 6 ispitanika.

Referentnu skupinu čini 58 zdravih ispitanika oba spola i svih životnih dobi, u kojih je mjerenje AdoMet, AdoHcy i metilacijskog potencijala bilo učinjeno u prethodnom istraživanju (32).

Raspodjela po spolu je bila slična u ispitivanoj i referentnoj skupini (slika 9).



**Slika 9.** Usporedba ispitivane i referentne skupine u odnosu na spol:  $\chi^2$ -test,  $P = 0,740$ .

## **4. 2. Materijali i metode**

### **4.2.1. Prikupljanje podataka**

Informacije o ispitanicima prikupljene su putem anketnog lista (Prilog 1) koji su ispunili liječnici ili ispitanik, uz pomoć liječnika. Dodatni podatci su, prema potrebi, dobiveni i izravnim kontaktom s liječnicima koji su skrbrili o ispitanicima. Podatci iz anketnog lista su obrađeni u Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Identitet ispitanika, i svi drugi podatci bili su dostupni samo glavnom istraživaču na projektu u sklopu kojeg se istraživanje provodilo (mentor ove doktorske disertacije), pod-istraživaču (doktorandu) te najbližim suradnicima.

### **4.2.2. Mjerenje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti**

Koncentracije spojeva AdoMet i AdoHcy iz uzoraka pune krvi izmjerene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

#### **4.2.2.1. Reagensi i sastav otopina**

1. Metanol za LC-MS (Merck, Darmstadt, Njemačka, kataloški broj: 1060351000);
2. Heptansulfonska kiselina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, SAD, kataloški broj: H2766);
3. o-Fosforna kiselina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, SAD, kataloški broj: P6560);
4. Perklorna kiselina 0,6 N: 5,5 mL 70% perklorne kiseline, nadopuniti vodom do 100 mL;
5. Kalij karbonatni pufer, pH 9,50: kalijev karbonat ( $K_2CO_3$ ) 2 mol/L 27,6 g u 100 mL redestilirane vode i kalijev dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) 1 mol/L 10,0 g u 100 mL redestilirane vode, pomiješani u omjeru 1:1 i izmjeren pH;
6. HCl 0,1 M: 0,84 mL 36,4% klorovodične kiseline (HCl) u 100 mL redestilirane vode;
7. Mravlja kiselina, 0,1 M: 4,2 mL mravlje kiseline ( $HCOOH$ , Mt 46,03) do 100 mL redestilirane vode;

8. Pufer TRIS/HCl, 0,02 M, pH 7,4: 0,24 g TRIS (trihidroksimetilaminometan) otopljen u 100 mL redestilirane vode i s 36% HCl podešen na pH 7,4;
9. TRIS-HCl-metanol (70:30): 70 mL pufera TRIS/HCl pH 7,4 pomiješan s 30 mL metanola;
10. Citratni pufer, 10 mM, pH 8,8: 0,21 g limunske kiseline ( $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$ ) otopljeno u 100 mL redestilirane vode i podešen na pH 8,8;
11. S-adenozilmetionin (SAM, AdoMet), 1 mM, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, SAD; A-7007: 0,0056 g na 10 mL 20 mM TRIS/HCl, pH 7,4;
12. S-adenozilhomocistein (SAH, AdoHcy), 1 mM, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, SAD; A-9384: 0,0038 g na 10 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,4;
13. 1-Metiladenozin, 1 mM, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, SAD; M-5001: 0,028 g na 100 mL 0,6 N perklorne kiseline;
14. Radna otopina internog standarda (IS): 200  $\mu$ L matične otopine 1-metiladenozina pomiješano s 800  $\mu$ L TRIS-HCl;
15. Perklorna kiselina s internim standardom: 5 mL perklorne kiseline pomiješano s 25  $\mu$ L radne otopine internog standarda (reagens br. 14);
16. Mobilna faza A: 50 mM  $Na_2HPO_4 \cdot xH_2O$  (6,9 g) i 8 mM heptansulfonska kiselina (1,62 g) otopljeno u 0,8 L vode, potom pH podešen fosfornom kiselinom na pH 3,0; nakon podešenog pH otopina prelivena u odmjernu tikvicu te volumen dopunjen vodom do 1 L, a potom profiltrirano kroz 0,45  $\mu$ m celulozni filter;
17. Mobilna faza B – metanol, plin uklonjen vakumom u ultrazvučnoj kupelji (degasiranje);
18. Matična smjesa AdoMet + AdoHcy: 200  $\mu$ L 1mM AdoMet i 25  $\mu$ L 1mM AdoHcy pomiješano sa 775  $\mu$ L 0,6% perklorne kiseline.

#### 4.2.2.2. Oprema i pribor

1. Shimadzu HPLC Sistem 10A s dioda *array* detektorom (Shimadzu, Kyoto, Japan);
2. HPLC MN EC Nucleosil 100–5 C–18 HD 250 x 4.6 mm + predkolona (MN CC 8/3 Nucleosil 100-5 C-18 HD) (Macherey-Nager, Düren, Njemačka);
3. Automatske podesive pipete i nastavci: 100, 200, 1000 i 5000  $\mu$ l (Kartell, Italija);
4. Uparivač uzoraka u struji zraka ili dušika;
5. Sistem za filtriranje mobilne faze (Millipore, Merck, Darmstadt, Njemačka);

6. Centrifuga (MPW-223e, MPW Med. instruments, Varšava, Poljska);
7. Vakuum pumpa (Dräger, Lübeck, Njemačka);
8. Vibracijska i magnetska mješalica (Kartell, Italija);
9. Ultrazvučna kupelj (Julabo, SAD);
10. Kolone za ekstrakciju na krutoj fazi (Bond Elut LRC-PBA, 100 mg; Agilent Technologies, California, SAD)
11. Vakuum sustav (Varian, Palo Alto, California, SAD);
12. Sistem za dobivanje vode visoke čistoće (Nirosta, Osijek, Hrvatska);
13. Analitička vaga (Ohaus, SAD)

#### **4.2.2.3. Postupak pripreme uzoraka za HPLC-analizu**

##### 4.2.2.3.1. Uzorkovanje krvi i deproteinizacija

Ispitaniku se na tašte ili 3-4 sata nakon obroka (3 sata za dojenčad, 4 sata za stariju djecu i odrasle) izvadi venska krv u epruvetu s EDTA i promiješa. Unutar pola sata se pipetira 2 mL krvi koja se polako ispusti u epruvetu koja sadrži 5 mL ledene 6%-tne perklorne kiseline s internim standardom (reagens 14). Epruveta s 6%-tnom perklornom kiselinom i internim standardom se čuva u ledenici, a izvadi se neposredno prije upotrebe i otopi tako da u vrijeme dodavanja krvi otopina bude hladna. Nakon toga se epruveta zatvori i snažno protrese dok ne nastane homogena smjesa boje čokolade. Do obrade se tako priređen deproteiniziran uzorak krvi pohrani na -20°C ili se postupak nastavi na slijedeći način:

##### 4.2.2.3.2. Centrifugiranje

Epruveta s krvi se dobro protrese i centrifugira (4 000 okretaja, 10 minuta). Supernatant se odvoji u drugu epruvetu i podesi pH na 5,5 s kalijevim karbonatnim puferom (reagens 5) te se zamrzne na -20°C kroz 10 minuta. Potom se ponovno centrifugira (4 000 okretaja, 10 minuta), a nakon toga se supernatant odvoji u novu epruvetu. Tako priređen

uzorak se odmah nanosi na kolonu za ekstrakciju ili se zamrzne na  $-20^{\circ}\text{C}$  do daljnjeg postupka.

#### 4.2.2.3.3. Izdvajanje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina vakuum sustavom

Kolone za ekstrakciju se postavljaju na vakuum sustav, zatvore se ventili na kadici i uključi se vakuum (od  $-5$  do  $-15$  atmosfera). Kolonice se isperu s  $5\text{ mL } 0,1\text{ M HCl}$  (reagens 6). Nakon što otopina lagano kapanjem iscure s kolonice doda se  $5\text{ mL } 0,1\text{ M}$  mravlje kiseline (reagens 7) koja opet lagano kapanjem iscure s kolonice. Potom slijedi ispiranje kolonice s  $5\text{ mL } 0,02\text{ M TRIS-HCl}$ -metanolom (reagens 9) također laganim kapanjem s kolonice. Nakon ispiranja, na kolonicu se dodaje supernatant (uzorak) ili standard (kalibrator) te se polagano „kap po kap“ propušta kroz kolonicu. Nakon što sav uzorak (standard, kalibrator) prođe kroz kolonicu ona se ispere s  $1,5\text{ mL}$  citratnog pufera (reagens 10). Na kraju se AdoMet i AdoHcy eluiraju s  $0,5\text{ mL HCl}$  (reagens 6). Eluat se odmah injicira u HPLC sustav ili se zamrzne na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize.



**Slika 10.** Vakuum sustav za izdvajanje AdoMet i AdoHcy s kolonama za ekstrakciju.



#### 4.2.2.4. Razdvajanje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je kromatografska tehnika za razdvajanje smjese molekula te kvalitativno i kvantitativno mjerenje njihove koncentracije. Uzorak se nanese (injektira) na kolonu punjenu stacionarnom fazom te uz pomoć mobilne faze putuje kroz kolonu pod visokim tlakom. Interakcija uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuje brzinu razdvajanja molekula u uzorku pa se komponente eluiraju s kolone različitom brzinom. Eluat protječe kroz detektor s nizom dioda (DAD, od engl. *Diode-Array Detector*) koji mjeri apsorpciju svjetla određene valne duljine u eluatu.

##### 4.2.2.4.1. Priprema otapala i HPLC uređaja

AdoMet, AdoHcy i IS su mjereni Shimadzu HPLC-sistemom 10A s detektorom s nizom dioda na 258 nm. Volumen injektiranja bio je 50  $\mu$ L, ukupni protok 1 mL/min, kolona je grijana na 35°C i postignut je radni tlak od 1600 do 2650 Psi-a, ovisno o gradijentu. Dobiveni podatci obrađeni su u programu CLASS VP, Shimadzu.

Pumpa A: fosfatni pufer 50 mM, pH = 3,0

Pumpa B: metanol

**Tablica 4.** Kromatografski uvjeti – program gradijenta.

Vrijeme (min)	Pumpa A (%)	Pumpa B (%)
0	100	0
15	70	30
21	60	40
25	60	40
27	100	0
32	100	0

Za validaciju metode ispitana je točnost, preciznost, linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije i stabilnost analita u dugom intervalu, kroz 21 dan, koji su zadovoljavali kriterije koje preporučuje Međunarodna konferencija za harmonizaciju (ICH, od engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*).

Nakon kondicioniranja HPLC-sustava analizirani su standardi IS, AdoMet, AdoHcy. Priređene su:

1. matičnica AdoMet (S-adenosil-L-methionin) 1 mM
2. matičnica AdoHcy (S-adenosil-L-homocistein) 1 mM

Iz matičnice IS (1-metil adenzin) 1 mM priredi se radna otopina IS: 200  $\mu$ L (1 mM/L) + 800  $\mu$ L 6 %-tne perklorne kiseline.

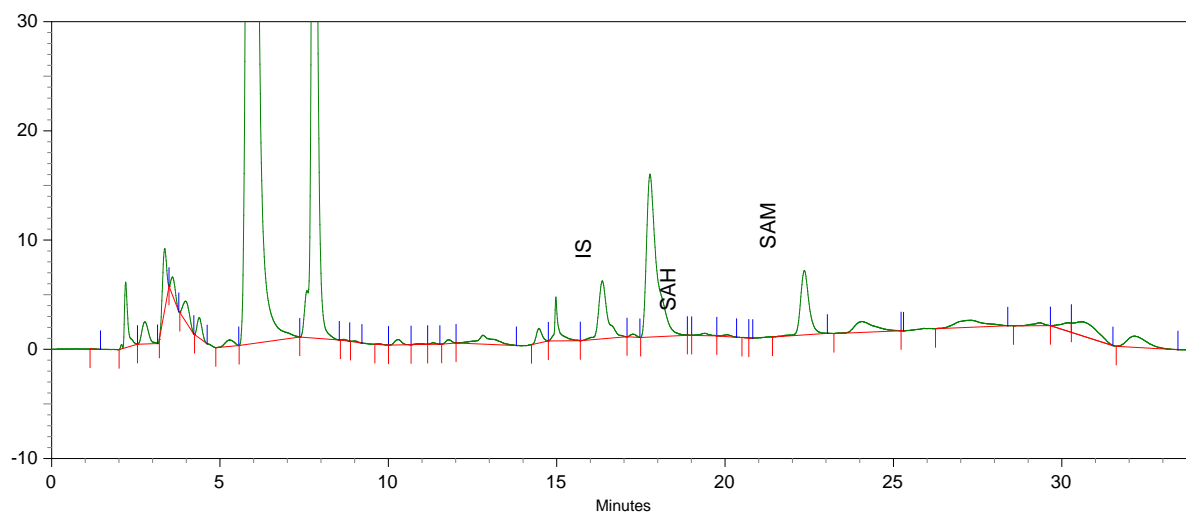
**Tablica 5.** Razrjeđenja matične smjese standarda za kalibracijsku krivulju.

Razrjeđenje	AdoMet (nM)	AdoHcy (nM)
1	2000	250
2	1000	125
3	500	62,5
4	250	31,25

Pripremljeni standardi i kalibracijska krivulja ekstrahirani su kao i uzorci preko kolona za ekstrakciju.

vial 21 inj.vol. 50  
 5.2.2009 18:38:52  
 D:\SAM SAH\SAM SAH 2009\ROW sam sah 2009\05veljaca\_06  
 D:\SAM SAH\SAM SAH 2009\SAM SAH 050209.met  
 D:\SAM SAH\SAM SAH 2009\SEQ sam sah 2009.seq

258 nm



1: 258 nm, 8 nm

Name	Retention Time	Area	Units	ISTD concentration
IS	16,352	96003	nmol/L	<b>1,000</b>
AdoHcy	19,392	4153	nmol/L	<b>71.601</b>

**Slika 11.** Primjer kromatograma jednog od ispitanika s trajno povišenom aktivnošću CK. Interni standard (IS), odnosno 1-metiladenozin (16,4 min), AdoHcy (19,4 min), AdoMet (22,4 min). Prema omjeru površina analita i IS izmjerena je koncentracija pojedinih analita (*ISTD concentration*) koja je za AdoMet iznosila 2479,986 (~2480) nmol/L, a za AdoHcy 71,601 (~71,6) nmol/L.

#### 4.2.2.5. Referentne vrijednosti za S-adenozilmetionin, S-adenozilhomocistein i metilacijski potencijal u našem laboratoriju

Ranije je izmjerena koncentracija AdoMet i AdoHcy u zdravih ispitanika, za potrebe dobivanja referentnih raspona navedenih metabolita u punoj krvi, a nakon što je laboratorijska metoda bila validirana (92). Na temelju dobivnih rezultata je određen referentni raspon koji za AdoMet u punoj krvi iznosi 1600 – 2400 nmol/L, a za AdoHcy 20 – 190 nmol/L. Značajnije razlike prema dobi i spolu nije nađeno pa se navedeni raspon koristi za dječju i odraslu dob te

za oba spola (32). Metilacijski potencijal (omjer AdoMet/AdoHcy) je u većine zdravih ispitanika (56/58) bio veći od 10, a medijan metilacijskog potencijala je bio približno 30.

### 4.2.3. Izdvajanje genomske DNA

Krv za izdvajanje genomske DNA je uzorkovana u epruvete s EDTA (*BD Vacutainer Systems*), a do postupka izdvajanja se čuvala na  $-20^{\circ}\text{C}$ .









Iz 200  $\mu\text{L}$  uzorka krvi ispitanika izdvojena je genomska DNA pomoću komercijalnog seta za izdvajanje DNA (NucleoSpin® Blood, Macherey Nagel, Düren, Njemačka). Metoda se temelji na izdvajanju DNA pomoću kolona na koje se DNA veže i potom ispire različitim puferima.

#### 4.2.3.1. Postupak

200  $\mu\text{L}$  krvi ispitanika pomiješa se s 25  $\mu\text{L}$  proteinaze K i 200  $\mu\text{L}$  pufera za lizu stanica. Nakon inkubacije od 10 do 15 minuta na temperaturi od  $70^{\circ}\text{C}$ , 425  $\mu\text{L}$  smjese se pomiješa s 210  $\mu\text{L}$  etanola i nanese na kolonu NucleoSpin. Nakon centrifugiranja (centrifuga 5415, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) jednu minutu pri 11000 g filtrat se odstrani, a vezana DNA se ispere s 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i centrifugira jednu minutu na 11000 g. Potom se doda 600  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i centrifugira dva puta po jednu minutu pri 11000 g. Kolona Nucleospin se zatim premjesti u novu epruvetu, doda se 100  $\mu\text{L}$  pufera za otapanje te se nakon inkubacije od jedne minute pri sobnoj temperaturi centrifugira kroz jednu minutu na 11000 g. Postupak je shematski prikazan na slici 12.

Koncentracija DNA dobivene ovim postupkom iznosi 20-60  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

\*g = relativna centrifugalna sila (x zemljino gravitacijsko ubrzanje)

1. Liza uzoraka krvi	2. Prilagodavanje veznih uvjeta	3. Vežanje DNA
 200 $\mu$ L krvi + 25 $\mu$ L proteinaze K + 200 $\mu$ L B3-pufera za lizu stanica miješanje, inkubacija na 70°C 10-15 min	+ 210 $\mu$ L etanola	 Nanošenje na kolonu  1 min. – 11000 g
4. Ispiranje membrane	5. Sušenje membrane	6. Otapanje DNA
 500 $\mu$ L BW-pufera ispiranje 600 $\mu$ L B5-pufera za ispiranje  1 min. – 11000 g x 2	 1 min. – 11000 g	 100 $\mu$ L BE-pufera za otapanje (70°C) inkubacija na sobnoj temp. - 1 min  1 min. – 11000 g

**Slika 12.** Shematski prikaz postupka izdvajanja DNA primjenom komercijalnog kompleta za izdvajanje DNA (ljubaznošću dr. sc. Kristine Gornik Crkvenac).

#### 4.2.4. Određivanje polimorfizma gena *AHCY* analizom duljine restrikcijskih ulomaka nakon lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *Polymerase Chain Reaction*)

Polimorfizmi gena *AHCY* određeni su analizom duljine restrikcijskih ulomaka (RFLP, od engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Nakon umnažanja egzona 2 i 3 te 4 i 5 gena u dvije odvojene reakcije PCR produkti su izloženi djelovanju restrikcijskih endonukleaza. Korišteni su restrikcijski enzimi BsrBI (za detekciju polimorfizma u egzonu 2) i Bsp1286I (za detekciju polimorfizma u egzonu 4). Produkt restrikcije se razdvojio elektroforezom u gelu agaroze kojom je omogućeno razdvajanje različito dugačkih odsječaka molekula DNA. Navedeni dio istraživanja, kao i niže opisano sekvenciranje po Sangeru je učinjeno u Laboratoriju za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

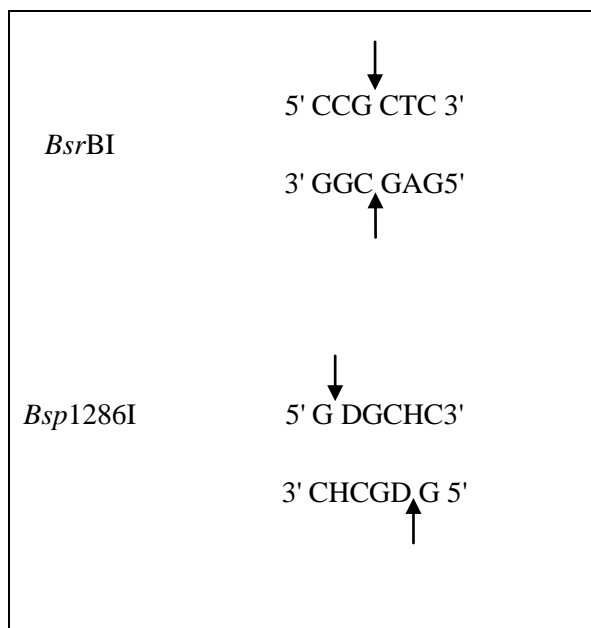
#### 4.2.4.1. Postupak

Nakon izdvajanja genomske DNA iz uzoraka pune krvi, lančanom reakcijom polimeraze umnoženi su egzoni 2 i 3 te 4 i 5 gena *AHCY*. Koristila se komercijalna *Expand Long Range* smjesa enzima za PCR (*Roche*) ili ALLin™ Taq DNA polimeraza s pripadajućim reakcijskim puferom *Reaction Buffer* i MgSO<sub>4</sub> (*Zymo Research*). Sastavnice reakcijske mješavine i uvjeti reakcije su prikazani u tablici 6.

**Tablica 6.** Sastavnice reakcijske mješavine i uvjeti za PCR-a.

Koraci reakcije	Trajanje i temperature
Početna denaturacija	5 min / 95°C
Denaturacija Sparivanje početnica Produljenje	35× $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ sec} / 94^{\circ}\text{C} \\ 15 \text{ sec} / 58^{\circ}\text{C} \\ 30 \text{ sec} / 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$
Završno produljenje	5 min / 72°C
Reakcijska smjesa	<ul style="list-style-type: none"><li>- 5 µL 10 × <i>Reaction Buffer</i> (konačno 1×)</li><li>- 1 µL 100 mM MgSO<sub>4</sub> (konačno 2 µM)</li><li>- 1 µL mješavine dNTP 10 mM svaki (New England Biolabs; konačno 200 nM)</li><li>- 0,5 µL polimeraze (konačno 1 jedinica)</li><li>- 100 ng ukupne genomske DNA</li><li>- 0,75 µL svake početnice (konačno 0,4 mM)</li><li>- do 50 µL ultračiste vode</li></ul>

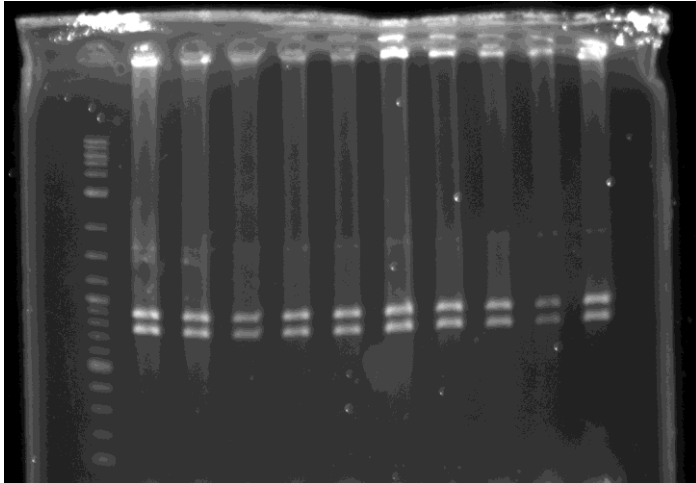
PCR produkt se izložio djelovanju restrikcijskih endonukleaza (egzon 2 i 3 – BsrBI i Bsp1286I, egzon 4 i 5 - Bsp1286I). Mjesta prepoznavanja i cijepanja restrikcijskih endonukleaza prikazana su na slici 13.



**Slika 13.** Mjesta prepoznavanja korištenih restrikcijskih endonukleaza. Strelice pokazuju mjesta cijepanja. D = adenin, gvanin ili timin (sve osim citozina); H = adenin, citozin ili timin (sve osim gvanina).

Gelovi agaroze gustoće 1% - 2% pripremljeni su otapanjem agaroze u puferu TAE (Tris-Acetate-EDTA; 40 mM Tris–acetat, 1 mM EDTA, 20 mM Na–acetat; pH 8,3) uz dodatak etidij bromida (EtBr), konačna koncentracija 0,5 µg/mL, u mikrovalnoj pećnici do vrenja te izlijevanjem u odgovarajuće kalupe s češljicima. Polimerizirani gelovi se uranjaju u kadicu s puferom TAE, te se u jažice unose uzorci prethodno pomiješani s puferom za nanošenje, 6 × GLB (engl. *Gel Loading Buffer*; 30% glicerol, 0,25% bromofenolno modriilo, 0,25% ksilen cijanol FF). U prvu se jažicu nanosi standard DNA poznatih molekulskih masa. Za DNA elektroforezu se koristio *Quick-Load 2-Log DNA Ladder* (Biolabs, New England). Elektroforeza se provela u trajanju od 20 min uz napon od 120 V koristeći aparaturu za horizontalnu elektroforezu *Wide Mini-Sub Cell GT Cell* (BIO-RAD) i *PowerPac™ Basic Power Supply* (BIO-RAD). Za detekciju i vizualizaciju DNA gelove se osvjetljavalo UV-svjetlom transiluminatora BXT 20M MINI 6x8W 312 nm (UVITEC) pri  $\lambda = 312 \text{ nm}$  čime se pobuđuje fluorescencija EtBr interkaliranog u molekulu DNA. Primjer gela prikazan je na slici 14.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



**Slika 14.** Elektroforeza odsječka PCR egzona 2 i 3 u gelu agaroze, nakon cijepanja restriksijskim enzimom *Bsp1286I*. U linijama 1-10 su prikazani odsječci veličine 773 i 897 bp (veličina prije restrikcije 1670 bp). M = DNA molekularni biljeg.

Umnoženi odsječak egzona 2 i 3 dugačak je 1670 parova baza. „Divlji tip“ odsječka posjeduje jedno restriksijsko mjesto za *Bsp1286I* i dva restriksijska mjesta za *BsrBI*, zbog čega, nakon djelovanja ova dva enzima nastaju četiri odsječka duljine 149, 168, 605 i 748. Ukoliko je prisutan polimorfizam rs13043752, nastaju tri odsječka duljine 149, 748 i 773 parova baza (Prilog 2).

Umnoženi odsječak egzona 4 i 5 dugačak je 1191 parova baza. „Divlji tip“ odsječka posjeduje dva restriksijska mjesta za *Bsp1286I*, zbog čega nakon djelovanja enzima nastaju tri odsječka duljine 131, 204 i 856 parova baza. Ukoliko je prisutan polimorfizam rs41301825 nastaju dva odsječka duljine 204 i 987 parova baza (Prilog 2).

Usporedbom veličine DNA odsječaka s kontrolom utvrdilo se je li ispitanik nositelj polimorfizma gena *AHCY*.

#### 4.2.5. Sekvenciranje egzona 2, 3 i 4 gena *AHCY*

U dijela ispitanika te u onih u kojih se metodom RFLP nisu dobili jasni rezultati se učinilo sekvenciranje egzona 2, 3 i 4 dideoksi-metodom po Sangeru (93). Za sekvenciranje smo koristili „*BigDye® Terminator Cycle*“ set za sekvenciranje (*Applied-Biosystems*) prema



uputama proizvođača te specifične početnice za gen *AHCY*, ili servis za sekvenciranje tvrtke *Macrogen* u Nizozemskoj (<https://dna.macrogen.com/eng/>). Koncentracija otopine početnice iznosila je 10  $\mu$ M. Elektroforeza i vizualizacija kromatograma se vršila na uređaju za sekvenciranje „*ABI PRISM DNA sequencer*” (*Applied Biosystems*) u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković ili u servisu za sekvenciranje tvrtke *Macrogen* u Nizozemskoj. Programski alat *SnapGene 3.0* (<https://www.snapgene.com>) korišten je za analizu kromatograma.

#### 4.2.5.1. Postupak

PCR-om su umnoženi egzoni 2, 3 i 4 gena *AHCY* (posupak je opisan u odlomku 4.2.4.1.) koristeći oligonukleotide INahh18 i INahh21 (tablica 7) što generira PCR-umnožak od 3441 parova baza. Tako umnoženi PCR-odsječak podvrgnut je sekvenciranju oba lanca metodom po Sangeru.

**Tablica 7.** Oligonukleotidne početnice za PCR (orijentacija 5' – 3').

Egzon	Uzvodna početnica (5')	Nizvodna početnica (3')
2, 3 & 4 (3441 bp)	INahh18 GTGGATCGGGTCCATGCAGTGA	INahh21 GGCCTGCGCCATCATGTGGGCA

**Tablica 8.** Oligonukleotidne početnice za sekvenciranje egzona 2, 3, i 4.

Egzon	Uzvodna početnica (5')	Nizvodna početnica (3')
2 (314 bp)	INahh1 CTCTTGTTGGTGGGAT	INahh15 CGTCTTCTTCCCTGGCTGAA
3 (193 bp)	INahh16 AGCGTCCCTGGTGCTTTTGA	INahh2 GGCAGAATCCCTTCACA
4 (300 bp)	INahh9 CTGGAGCAGGTACCAAGTT	INahh3 CACCCAGGCCACCAGCA

**Tablica 9.** Redosljed nukleotida u egzonima 2, 3 i 4 gena *AHCY*. Egzoni su označeni masnim slovima, a pozicije početnica koje su smještene u intronima su podcrtane.

<b>Egzon 2</b>
<b><u>CCTCTTGGTTGGTGGGAT</u>GAGGGGACTCACGGAAC<del>TCCCACCTGTTTCCTCCC</del>GTAGCCGACATCG GCCTGGCTGCCTGGGGACGCAAGGCCCTGGACATTGCTGAGAACGAGATGCCGGGCCTGAT GCGTATGCGGGAGCGGTACTCGGCCTCCAAGCCACTGAAGGGCGCCCGCATCGCTGGCTGC CTGCACATGACCGTGGAGACGGCCGTCTCATTGAGACCCTCGTCACCCTGGGTGCTGAGGT GAGGCCACAGCTGTATCACCCCAGAGTCCTTGCCCTCCCTGGGTTCAGCCAGGGAAGAAGACG</b>
<b>Egzon 3</b>
<b><u>AGCGTCCCTGGTGCTTTT</u>GAGCCATCAGTGACCAACAGCCTTGTTTTGATGGCTCTTCTAGGTGCA GTGGTCCAGCTGCAACATCTTCTCCACCCAGGACCATGCGGCGGCTGCCATTGCCAAGGCTG GCATTCCGGGTAAGTCCTGCTTGCTTCTGAGACGTGGAATTTGTGAAGGGATTCTGCC</b>
<b>Egzon 4</b>
<b><u>CTGGAGCAGGTACCAGTT</u>GGGAAGTCCAGGCCCTGATGTGCCACTCACCCCTCCAGTGTATGCCTG GAAGGGCGAAACGGACGAGGAGTACCTGTGGTGCATTGAGCAGACCCTGTACTTCAAGGAC GGGCCCCTCAACATGATTCTGGACGACGGGGGCGACCTACCAACCTCATCCACACCAAGTA CCCGCAGCTTCTGCCAGGTGAGCAGGGCGGGGCAGGTGGGCTGGGTGCTGGTGGCCTGGGTG</b>

#### 4.2.6. Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Opisna statistika je prikazana kroz odgovarajuće udjele i apsolutne frekvencije za kategorijske varijable, dok su se kontinuirane vrijednosti prikazane kroz pripadajuće medijane i interkvartilne raspone.

Razlike u kategorijskim vrijednostima analizirane su Fisherovim egzaktnim testom, uključujući i razlike u raspodjeli polimorfizama između ispitanika s trajno povišenom aktivnošću CK u krvi nejasne etiologije i podataka dobivenih na populaciji zdravih ispitanika u Republici Hrvatskoj. Razlike u kontinuiranim numeričkim vrijednostima između ispitanika i kontrolne skupine analizirane su Mann-Whitney U-testom, odnosno testom Kruskal-Wallis (kada je bilo više od dvije usporedne skupine). Pojedine značajne razlike su prikazane Box i Whiskerovim plotovima (standardni prikaz: najmanja vrijednost, 25. centila, medijan, 75. centila, najveća vrijednost). *Outlieri* (vanjske vrijednosti na Box i Whiskerovim plotovima) su definirani kao vrijednosti koje odstupaju najmanje 1,5 interkvartilnog raspona od medijana te su označeni kružićem, dok su vrijednosti veće od 3 interkvartilna raspona označene zvjezdicom. Za usporedbu udjela AdoMet i AdoHcy iznad, unutar i ispod referentnog raspona u ispitivanoj skupini u odnosu na referentnu skupinu, korišten je test Fisher-Freeman-Halton.

Izračunati su Spearmanovi koeficijenti korelacije „rho“ između pojedinih metabolita i omjera metabolita u ispitivanoj skupini. Apsolutne vrijednosti koeficijenata korelacije veće od 0,600 smatrane su jakom korelacijom, od 0,300 do 0,599 srednje jakom, dok su vrijednosti manje od 0,300 smatrane slabom korelacijom (bilo da je ona pozitivna ili negativna).

Sve P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. U analizi i grafičkim prikazima koristila se programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Bolesnici s nedostatnom aktivnošću S-adenozilhomocistein hidrolaze u ispitivanoj skupini

U ispitivanoj skupini nismo otkrili bolesnike s nedostanom aktivnošću SAHH. Premda su koncentracije AdoMet i AdoHcy u nekih ispitanika značajno odstupale od vrijednosti u odnosu na ostale ispitanike i referentne vrijednosti, nisu zadovoljeni kriteriji dijagnosticiranja nedostatne aktivnosti SAHH. Navedeni kriteriji koje smo uzeli za procjenu su bili:

1. Klinička slika i rezultati učinjene kliničke obrade nisu se uklapali u dosadašnje spoznaje o fenotipskim obilježjima bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH: ispitanici nisu imali znakove zahvaćenosti središnjeg živčanog sustava (usporen psihomotorički razvoj, smanjene kognitivne sposobnosti, probleme s ponašanjem i pažnjom), koagulopatiju i znakove bolesti jetre.

2. Metilacijski potencijal u navedenih ispitanika nije bio niži u odnosu na referentnu skupinu i stoga nije upućivao na bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH.

3. Metilacijski potencijal u punoj krvi je u svih navedenih ispitanika bio viši nego što je bio u bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH, nakon što im se ukinula niskoproteinska dijeta. U tim okolnostima je metilacijski potencijal u bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH uvijek bio manji od 3. U većini slučajeva je i tijekom provođenja niskoproteinske dijetе omjer AdoMet/AdoHcy bio snižen (manji od 4), no u jednog bolesnika se restriktivnom dijetom u nekoliko navrata postigla normalna koncentracija AdoMet i AdoHcy u krvi, pa stoga i njihov omjer (metilacijski potencijal).

U skupini ispitanika su svi, osim jednog dječaka, imali metilacijski potencijal u punoj krvi veći od 5. U dječaka koji je imao metilacijski potencijal niži od 5 (4,84) učinjen je test opterećenja metioninom tijekom kojeg u punoj krvi nije došlo do porasta AdoMet i AdoHcy niti do sniženja metilacijskog potencijala. Stoga se isključila bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH. U istog ispitanika je naknadno, s obzirom na kliničku sliku koja je ukazivala na manjak ADK, učinjeno sekvenciranje gena *ADK*, no nije dokazano postojanje mutacije.

## 5.2. S-adenozilmetionin, S-adenozilhomocistein i metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini

### 5.2.1. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitanika i u referentnoj skupini

Izmjerali smo koncentracije AdoMet i AdoHcy u punoj krvi, ranije opisanom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, u 100 ispitanika uključenih u istraživanje i podatke dobivene mjerenjem usporedili s vrijednostima u ispitanika referentne skupine.

**Tablica 10 a.** Prikaz ispitanika i referentne skupine u odnosu na analizirane varijable: Mann-Whitney U-test.

		N	Min	5. centila	25. centila	Medijan	75. centila	95. centila	Max
Dob (godine)	Ispitanici	100	0,5	1,00	7,00	17,00	37,50	61,00	74,00
	Kontrola	49	0,1	0,10	0,30	4,00	34,00	63,00	69,00
AdoHcy	Ispitanici	100	11,1	19,97	49,71	106,65	213,75	768,56	1192,27
	Kontrola	58	12,1	20,30	30,00	64,50	97,00	137,00	193,00
AdoMet	Ispitanici	100	224,41	758,12	2010,97	2677,24	5505,98	18354,86	26498,67
	Kontrola	58	504	1142,00	1573,00	1823,50	2045,00	2484,00	3028,00
AdoMet/AdoHcy	Ispitanici	100	4,84	10,53	18,29	25,86	40,44	121,04	220,82
	Kontrola	58	2,96	11,36	20,83	30,51	56,31	105,64	129,42
CK (U/L)	Ispitanici	100	384	410,00	548,00	1307,00	3044,50	11316,50	35770,00
	Kontrola	0	-	-	-	-	-	-	-

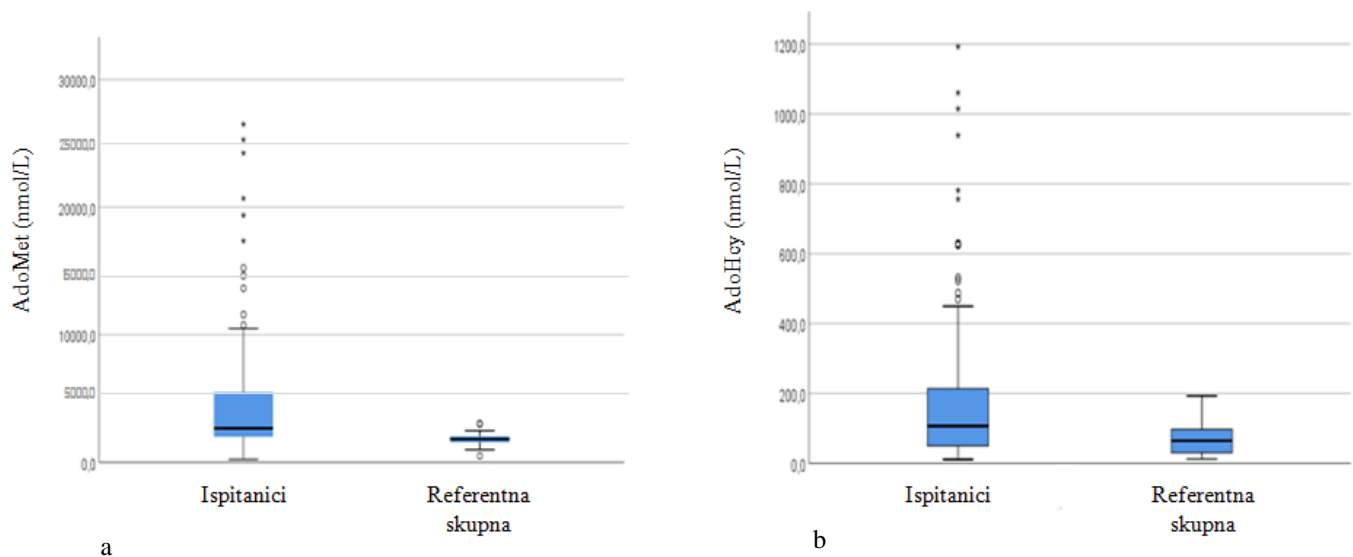
N = broj ispitanika, Min = najniža vrijednost, Max = najviša vrijednost.

Napomena: nemamo podataka o aktivnosti CK u krvi u referentnoj skupini (zdravi ispitanici), pa je prikazana raspodjela aktivnosti CK samo u ispitivanoj skupini.

**Tablica 10 b.** Razlike između skupina: rezultati Mann-Whitney U-testa iz tablice 10 a.

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob (godine)	1749,500	-2,832	0,005
AdoHcy	1684,000	-4,386	<0,001
AdoMet	1260,000	-5,916	<0,001
AdoMet/AdoHcy	2482,000	-1,508	0,132

Z = distribucija, P = razina značajnosti.

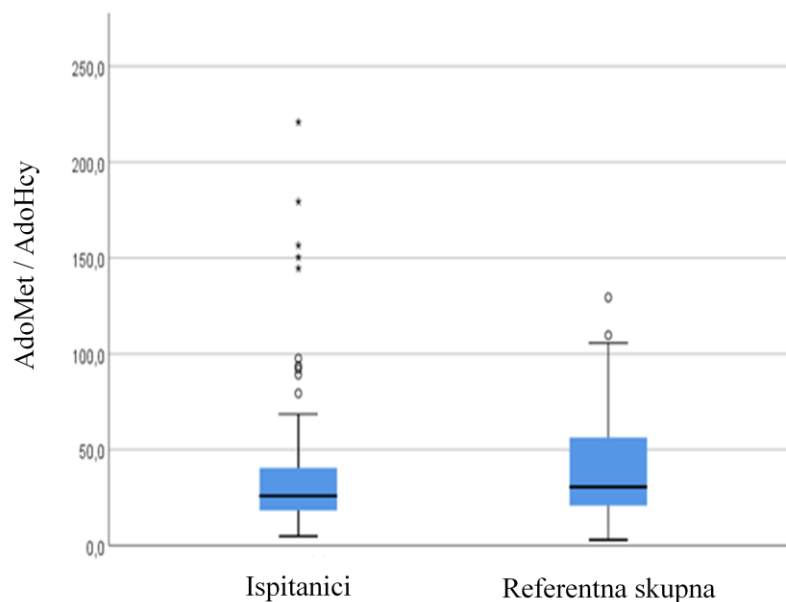


**Slika 15.** Usporedba koncentracija AdoMet i AdoHcy u ispitanika i referentnoj skupini.

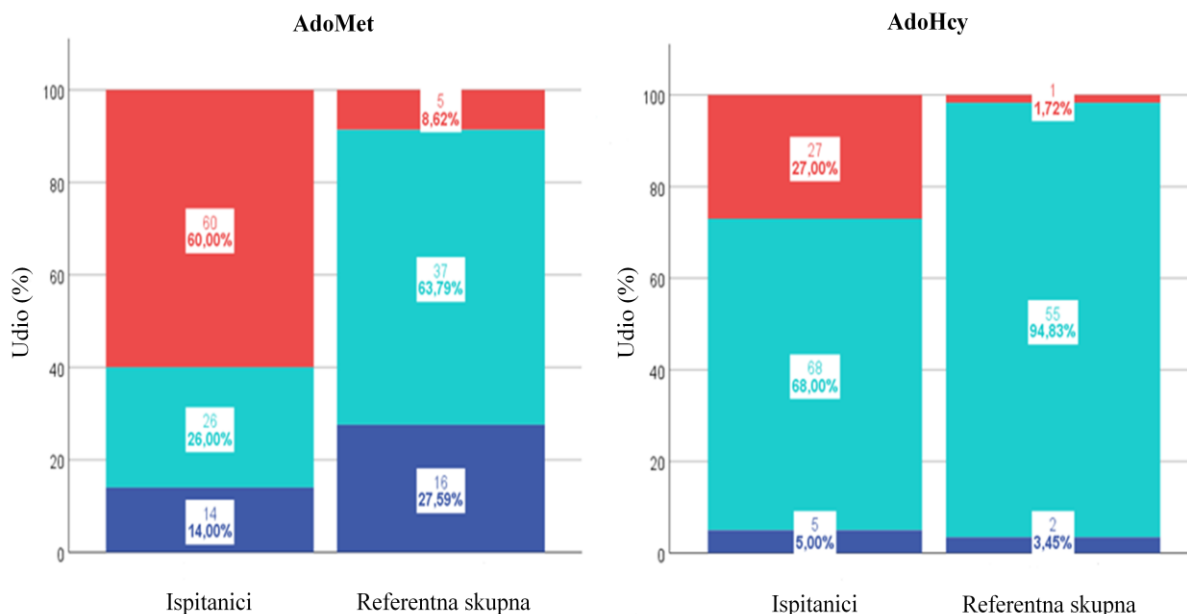
**15 a.** Usporedba koncentracija AdoMet u dvije skupine.

**15 b.** Usporedba koncentracija AdoHcy u dvije skupine.

Koncentracije AdoMet i AdoHcy su prikazane u apsolutnim vrijednostima. Na grafovima horizontalna deblja crna crta predstavlja medijan, plava polja interkvartilni raspon, rubovi plavog polja 25. i 75. centilu. Koncentracije AdoMet i AdoHcy koje su odstupale za najmanje 1,5 interkvartilnog raspona su označene su kružićem, dok su koncentracije više od tri interkvartilna raspona označene zvjezdicom.



**Slika 16.** Usporedba metilacijskog potencijala (AdoMet/AdoHcy) u ispitanika i referentnoj skupini. Na grafu deblja crna crta predstavlja medijan, plava polja inekvartilni raspon, rub plavog polja 25. i 75. centilu. Omjeri AdoMet/AdoHcy koji su odstupali za najmanje 1,5 interkvartilnog raspona su označeni kružićem, dok su omjeri veći od tri interkvartilna raspona označeni zvjezdicom.



**Slika 17.** Usporedba vrijednosti AdoMet i AdoHcy u dvije ispitivane skupine u odnosu na referentni raspon mjerenih analita. Plavom bojom je označen udio niži od donje granice referentnog raspona, svijetlo plavom bojom udio vrijednosti unutar referentnog raspona, a crvenom bojom udio viši od gornje granice referentnog raspona.

**17 a.** Usporedba udjela AdoMet u ispitanika i u referentnoj skupini koji je u odnosu na referentni raspon bio ispod, unutar ili iznad referentnog raspona. Fisher-Freeman-Haltonov test,  $P < 0,001$ .

**17 b.** Usporedba udjela AdoHcy koji je u ispitanika i u referentnoj skupini u odnosu na referentni raspon bio ispod, unutar ili iznad referentnog raspona. Fisher-Freeman-Haltonov test,  $P < 0,001$ .

Između ispitivane i referentne skupine postoji statistički značajna razlika u koncentracijama AdoMet i AdoHcy (Mann Withney U test,  $P < 0,001$ ). Ispitanici su, kao skupina, imali veće interkvartilne raspone za izmjerene vrijednosti oba metabolita, u odnosu na referentnu skupinu (slika 15). U pojedinim ispitanika su vrijednosti oba izmjerena metabolita značajno odstupale u odnosu na referentnu skupinu, ali i na većinu ispitanika u ispitivanoj skupini. Statistički značajno različit raspon koncentracija AdoMet i AdoHcy u ispitivanoj skupini se dijelom može objasniti njezinom heterogenošću, s obzirom na to da su se u ovoj skupini nalazili bolesnici s različitom etiologijom mišićne slabosti, odnosno povišene aktivnosti CK u krvi. Moguće je da ispitanici s višim koncentracijama izmjerenih metabolita, imaju u podlozi svojega stanja poremećaj koji nije nedostatna aktivnost SAHH, a zbog kojeg se mijenja koncentracija AdoMet i AdoHcy.

Usporedbom udjela AdoMet i AdoHcy koji su odstupali od referentnog raspona za navedene analite, pokazali smo da značajan udio ispitanika u ispitivanoj skupini ima

vrijednosti AdoMet i AdoHcy iznad gornje granice referentnog raspona, u odnosu na referentnu skupinu (slika 17). Koncentracije AdoMet više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 60% (60/100), a u referentnoj skupini 8.6% (5/58) ispitanika (slika 17 a). Koncentracije AdoHcy više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 27% (27/100), a u referentnoj skupini 1,72% (1/58) ispitanika (slika 17 b). Referentni rasponi su: za AdoMet 1600 – 2400 nmol/L, za AdoHcy 20 – 190 nmol/L (više u odlomku 4.2.2.1.).

Pojedinačno gledajući, najvišu koncentraciju AdoMet (26 498,7 nmol/L) i AdoHcy (1192,3 nmol/L) je imala djevojčica kojoj omjer ova dva analita, nije odstupao od referentne vrijednosti – (22,23). Jedini simptom koje je navodila je bila blaža mišićna slabost. U nje je postojala izrazito visoka aktivnost CK, približno 20 puta viša od gornje granice referentne vrijednosti, mioglobinurija i histološki nalaz mišića koji je upućivao na distrofiju.

Ostali ispitanici s najvišim izmjerenim koncentracijama AdoMet (pet ispitanika koji su imali AdoMet viši od 95. centile ispitivane skupine), su uz AdoMet imali i višestruko povišen AdoHcy (oba približno 5 - 10 puta u odnosu na gornje granice referentnih raspona), i pri tom su imali normalan metilacijski potencijal, 20 - 40. U većine ispitanika (4/5) kod kojih je postojalo značajno odstupanje AdoMet u odnosu na ostale ispitanike, CK je bio približno 10 puta viši od gornje granice referentnog raspona (u nekih i više od toga). U jedne je ispitanice (1/5) CK bila blago povišena (dva do dva i pol puta više od gornje granice referentnog raspona). Stoga, u ovoj subpopulaciji ispitanika s koncentracijom AdoMet višom od 95. centile u odnosu na cjelovitu ispitivanu skupinu, nema jasne korelacije povišene koncentracije AdoMet i aktivnosti CK u krvi.

Ispitanici koji su u krvnom srodstvu, neovisno o liniji srodstva (uspravna ili kolateralna) imali su približno sličnu koncentraciju AdoMet. Tako su i majka, i kćer, koje vjerojatno boluju od iste autosomno dominantno nasljedne, još nedefinirane oligosimptomatske mišićne bolesti, s trajno visokom aktivnošću CK, imale koncentraciju AdoMet među najvišim izmjerenima unutar ispitivane skupine (24231,6 nmol/L i 19357,8 nmol/L). Slično je zamijećeno i u ostalih srodnika u pojedinim obiteljima, bilo da se radilo o onima sa značajno povišenim koncentracijama AdoMet (brat i sestra su imali AdoMet 20 685,7 nmol/L i 17 351,9 nmol/L) ili s vrijednostima u području medijana ispitivane skupine (dva brata s koncentracijama AdoMet 1959,0 nmol/L i 2394,5 nmol/L; dvije sestre s



koncentracijama AdoMet 3459,4 nmol/L i 3212,6 nmol/L). Navedeno upućuje da su različite bolesti mišića, ovisno o njihovoj etiologiji, praćene sličnim koncentracijama AdoMet, u punoj krvi.

Nema statistički značajne razlike u vrijednostima metilacijskog potencijala između ispitanika i referentne skupine (slika 16). Veći raspon metilacijskog potencijala je imala ispitivana skupina, jednako kao i raspone koncentracija AdoMet i AdoHcy, u odnosu na referentnu skupinu. Vrijednosti metilacijskog potencijala u pojedinih ispitanika su značajno odstupale. Pet ispitanika je imalo metilacijski potencijal viši od 95. centile ispitivane skupine. Višu vrijednost pete centile metilacijskog potencijala (koja nam je dodatno zanimljiva zbog svrhe našeg istraživanja), imala je ispitivana skupina, no ta razlika, u odnosu na referentnu skupinu, nije značajna.

U subpopulaciji ispitanika s najnižim metilacijskim potencijalom, izdvojili smo petero ispitanika kojima je metilacijski potencijal bio manji od 10. Svi navedeni ispitanici su imali simptome slabosti mišića, a aktivnosti CK u krvi su im bile dva do pet puta više od gornje referentne vrijednosti. S obzirom na to da su svi imali metilacijski potencijal veći od pet, na temelju kriterija koji su raspravljani u odlomku 5.1., nije postojala indikacija za daljnjom obradom na bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH. Izuzetak je jedan ispitanik koje je imao metilacijski potencijal 4,84 (AdoMet 3780,3 nmol/L i AdoHcy 781,0 nmol/L). S obzirom na to da je imao povišenu koncentraciju AdoHcy i najniži metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini, učinjena je dodatna obrada, na temelju koje je isključeno da bi mogao imati prirođeni poremećaj metilacije, što uključuje i bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH (više u odlomku 5.1.).

## 5.2.2. Međusobni odnos koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina, metilacijskog potencijala i kreatin kinaze u ispitivanoj skupini

Analizirali smo međusobne odnose AdoMet, AdoHcy i njihovog omjera u ispitivanoj skupini, te u odnosu na aktivnost CK.

**Tablica 11.** Koeficijenti korelacije izmjerenih analita u ispitivanoj skupini.

			AdoHcy (nmol/L)	AdoMet (nmol/L)	AdoMet / AdoHcy	CK (U/L)
Spearmanov rho	AdoHcy (nmol/L)	Koeficijent korelacije	1,000	0,753	-0,521	-0,096
		P		<0,001	<0,001	0,343
		N	100	100	100	100
	AdoMet (nmol/L)	Koeficijent korelacije		1,000	0,079	-0,038
		P			0,437	0,706
		N		100	100	100
	AdoMet / AdoHcy	Koeficijent korelacije			1,000	0,078
		P				0,439
		N			100	100

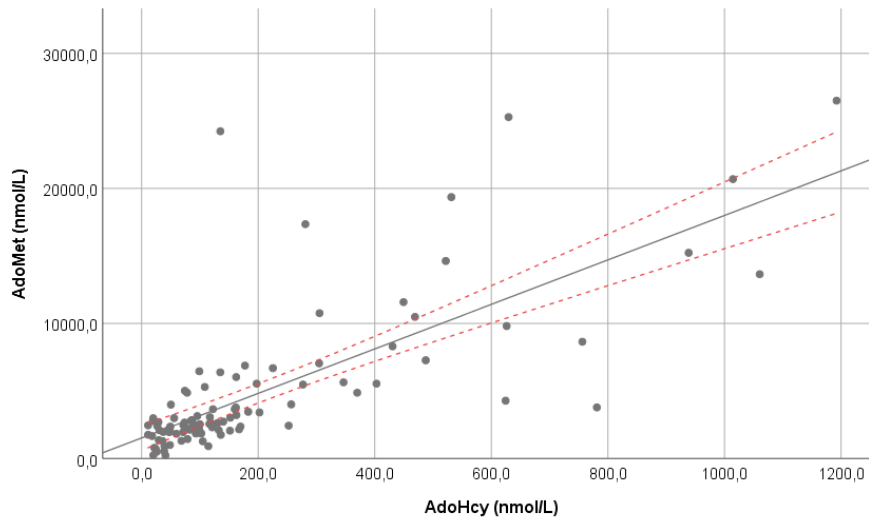
N = broj ispitanika, P = razina značajnosti, Rho = koeficijent korelacije.

Koeficijent korelacije veći od 0,6 upućuje na jaku korelaciju, od 0,3 do 0,599 srednje jaku, dok vrijednosti manje od 0,3 upućuju na slabu korelaciju, neovisno o predznaku.

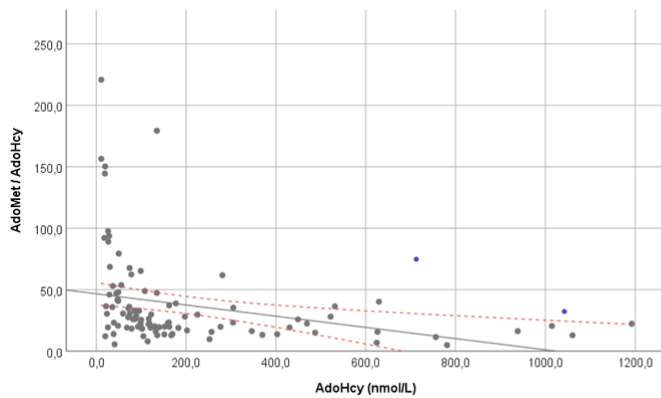
Iz rezultata prikazanih u tablici 11 se vidi da vrijednosti CK ne koreliraju s vrijednostima AdoMet, AdoHcy i metilacijskim potencijalom.

Očekivano, međusobna ovisnost AdoHcy i AdoMet (slika 18) je statistički značajna. U odnosu na metilacijski potencijal postoji statistički značajna povezanost s AdoHcy (slika 19 a) čiji porast korelira s padom vrijednosti metilacijskog potencijala. Ne postoji statistički značajna korelacija AdoMet i metilacijskog potencijala (Slika 19 b).

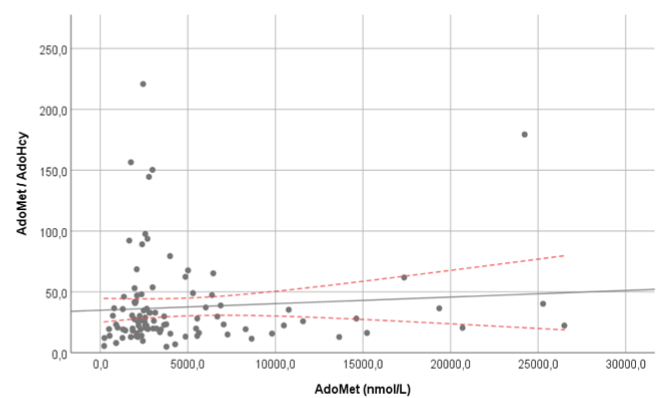
Pozitivna korelacija AdoMet i AdoHcy ukazuje na primjerenu stabilnost uzoraka i ne ukazuje na neenzimatski put razgradnje AdoMet (slika 18).



**Slika 18.** Korelacija AdoMet i AdoHcy u ispitivanoj skupini:  $\rho = 0,753$ ,  $P < 0,001$ . Koncentracije dva analita međusobno dobro koreliraju i raspodjela je gotovo linearna. Puna linija: regresijski pravac; isprekidane linije: 95% interval pouzdanosti regresijskog pravca.



a



b

**Slika 19.** Korelacija AdoHcy i AdoMet s metilacijskim potencijalom (AdoMet/AdoHcy).

**19 a.** Korelacija AdoHcy s metilacijskim potencijalom je dobra i raspodjela je gotovo linearna;  $\rho = -0,521$ ,  $P < 0,001$ .

**19 b.** Nema statistički značajne korelacije AdoMet s metilacijskim potencijalom,  $\rho = -0,079$ ,  $P < 0,437$ . Puna linija: regresijski pravac; isprekidane linije 95% interval pouzdanosti regresijskog pravca.

### 5.2.3. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na dob ispitanika

Ranije objavljena istraživanja u kojima su mjereni AdoMet i AdoHcy, u plazmi ili u punoj krvi, rađena su uglavnom na populaciji odraslih osoba. Rezultati naših (prethodnih) mjerenja kojima su dobivene referentne vrijednosti AdoMet i AdoHcy u punoj krvi, nisu pokazali značajnijih različitosti u koncentracijama ovih metabolita u odnosu na dob (uključena su novorođenčad, ostala dojenčad, djeca i odrasli). Ipak, kako bi se preciznije odredilo eventualno odstupanje u odnosu na dob, usporedili smo dobivene rezultate mjerenja u tri dobne skupine. Naime, zbog bržeg metabolizma i mijene tvari u razdoblju ubrzanog rasta i razvoja očekivano je da su i metilacijski procesi u organizmu intenzivniji. Osim toga, u ranom životnom razdoblju postoji pozitivna bilanca dušika i više se metionina ugrađuje u proteine, zbog čega manje ulazi u ciklus metionina, a to bi moglo izravno utjecati na manje stvaranje njegovih metabolita, AdoMet i AdoHcy.

**Tablica 12 a.** Usporedba koncentracija AdoHcy, AdoMet i metilacijskog potencijala (AdoMet/AdoHcy) u različitim dobnim skupinama testom Kruskal-Wallis.

Dob (skupine)	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
AdoHcy	≤10 godina	32	247,82	333,84	11,20	1192,27	47,39	87,77	274,88
	11-30 godina	31	188,33	204,08	21,73	756,11	49,20	105,02	169,67
	≥31 godina	37	170,14	173,01	11,10	938,43	65,69	130,00	199,85
AdoMet	≤10 godina	32	5736,67	6603,26	241,65	26498,67	2039,23	2675,48	6039,39
	11-30 godina	31	4232,03	5057,36	224,41	25283,91	1305,02	2362,37	5293,68
	≥31 godina	37	4551,33	4473,61	722,77	24231,58	2017,74	3016,94	5996,63
AdoMet / AdoHcy	≤10 godina	32	44,19	39,89	4,84	156,51	16,42	31,53	53,51
	11-30 godina	31	26,05	13,65	5,49	62,35	13,92	23,11	36,09
	≥31 godina	37	41,24	45,20	7,93	220,82	19,37	23,14	37,02

N = broj ispitanika, SD = standardna devijacija.

Min = najniža izmjerena vrijednost, Max = najviša izmjerena vrijednost.

**Tablica 12 b.** Rezultati testa Kruskal-Wallis iz Tablice 12 a.

Skupina	Kruskal-Wallis H	Df	P
AdoHcy	0,356	2	0,837
Ispitanici AdoMet	1,311	2	0,519
AdoMet/AdoHcy	2,790	2	0,248

df = stupnjevi slobode, P = razina značajnosti.

Usporedbom koncentracija AdoMet, AdoHcy te metilacijskog potencijala u ispitanika podijeljenih po dobi u tri skupine (do 10 godina, 11 – 30 godina, 31 godina i stariji) nije nađena statistički značajna razlika. Dobne skupine ne prate uvriježenu raspodjelu po životnim razdobljima, ali su u skladu s fiziološkim različitostima u odnosu na dob, a određene su na način da raspodjela prema broju ispitanika u pojedinoj skupini bude ujednačena.

Premda nismo pokazali statistički značajnu razliku koncentracija AdoMet i AdoHcy u odnosu na dob, vidljivo je da su srednje vrijednosti AdoMet i AdoHcy nešto više u najmlađoj skupini ispitanika, u kojoj je i raspon izmjerenih koncentracija analita također najveći.

#### 5.2.4. Usporedba S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na spol ispitanika

Zdrava muška populacija ima, zbog veće mišićne mase, višu aktivnost CK u krvi u odnosu na zdrave žene (tablica 3). Poznato je da su osobe muškog spola pod različitim okolnostima sklonije razvoju rabdomiolize (dijelom posljedice i vanjskih/okolišnih čimbenika), koja također pridonosi višoj aktivnosti CK u krvi u odnosu na osobe ženskog spola. Stoga smo provjerili postoje li razlike u koncentracijama AdoMet, AdoHcy i metilacijskog potencijala s obzirom na spol ispitanika. Usporedbom koncentracija AdoMet, AdoHcy i metilacijskog potencijala prema spolu korištenjem Mann-Whitney U-testa, nije dokazana statistički značajna razlika (tablica 13 a). Dobivene P vrijednosti su prikazane u tablici 13 b.

**Tablica 13 a.** Koncentracije AdoHcy, AdoMet i metilacijskog potencijala (AdoMet/AdoHcy) u odnosu na spol: Mann-Whitney U-test.

Spol	N	Aritmetička sredina	SD	Minimum	Maximum	Centile			
						25.	Medijan	75.	
AdoHcy	Muški	63	179,50	207,08	11,20	1060,41	47,04	101,90	225,21
	Ženski	37	236,63	296,16	11,10	1192,27	69,79	114,48	244,08
AdoMet	Muški	63	3862,01	3206,03	241,65	17351,90	1988,64	2697,10	5016,07
	Ženski	37	6482,67	7605,50	224,41	26498,67	1994,54	2657,38	8131,43
AdoMet/ AdoHcy	Muški	63	34,94	27,39	4,84	156,51	16,85	26,17	45,93
	Ženski	37	41,79	49,12	5,49	220,82	18,96	23,35	36,79

N = broj ispitanika, SD = standardna devijacija.

**Tablica 13 b.** Rezultati Mann-Whitney U-testa iz tablice 13 a.

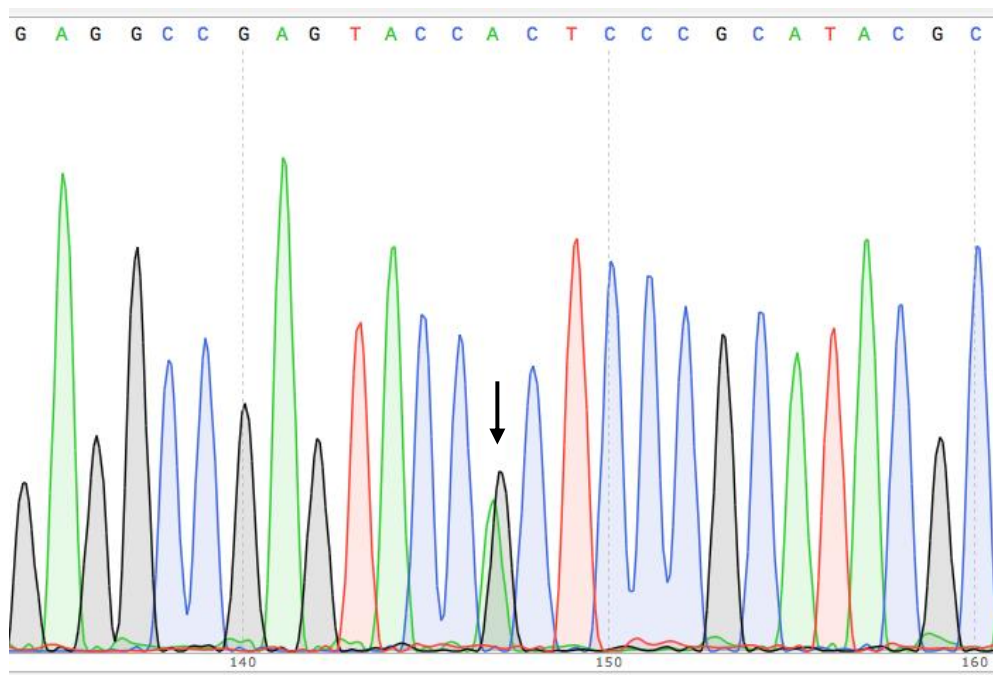
	<b>Mann-Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
AdoHcy	1062,00	-0,739	0,460
AdoMet	1066,00	-0,710	0,477
AdoMet/AdoHcy	1155,00	-0,075	0,940

Z = distribucija, P = razina značajnosti.

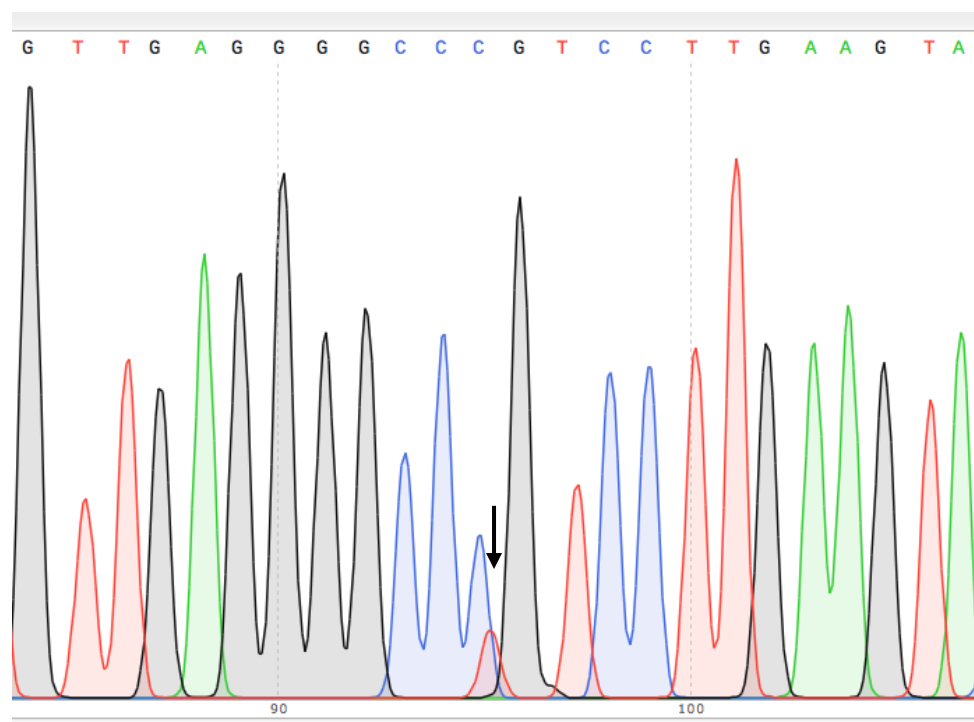
### **5.3. Učestalost polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena *AHCY* u ispitivanoj populaciji**

Kvaliteta genomske DNA izdvojene iz pune krvi zadovoljila je kriterij kvalitete za daljnu analizu u 77 ispitanika (77%).

U dva ispitanika (2/77) otkriveni su polimorfizmi rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A), u heterozigotnom obliku. S obzirom na to da je incidencija navedenih polimorfizama u populaciji zdravih osoba u Republici Hrvatskoj 3,2% (rs13043752), odnosno 0,6% (rs41301825) (78), Fischerovim egzaktnim testom nije dokazana statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ) u ispitivanoj skupini (uzevši u obzir pojedinačnu incidenciju polimorfizma rs13043752 ( $P = 0,135$ ) i polimorfizma rs41301825 ( $P = 0,571$ )), a niti uzevši u obzir incidenciju oba tražena polimorfizma u ispitivanoj populaciji, u odnosu na zdravu ( $P = 0,237$ ).



**Slika 20.** Kromatogram ispitanika koji je heterozgot (vidi se po preklapanju krivulja) za polimorfizam c.112 C>T (rs13043752) u egzonu 2, smjer 3' - 5'. Zamjena nukleotida je označena strelicom.



**Slika 21.** Kromatogram ispitanika koji je heterozgot za polimorfizam c.377 G>A (rs41301825) u egzonu 4, smjer 3' - 5'. Zamjena nukleotida je označena strelicom.

### **5.3.1. Kliničke i biokemijske osobitosti nositelja polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena *AHCY***

S obzirom da je skupina ispitanika heterogena u odnosu na simptome, stupanj povišenja aktivnosti CK i, vjerojatno, etiologiju bolesti, dodatno smo istražili kliničke i biokemijske osobitosti ispitanika za koje je potvrđeno da su nositelji ranije navedenih polimorfizama.

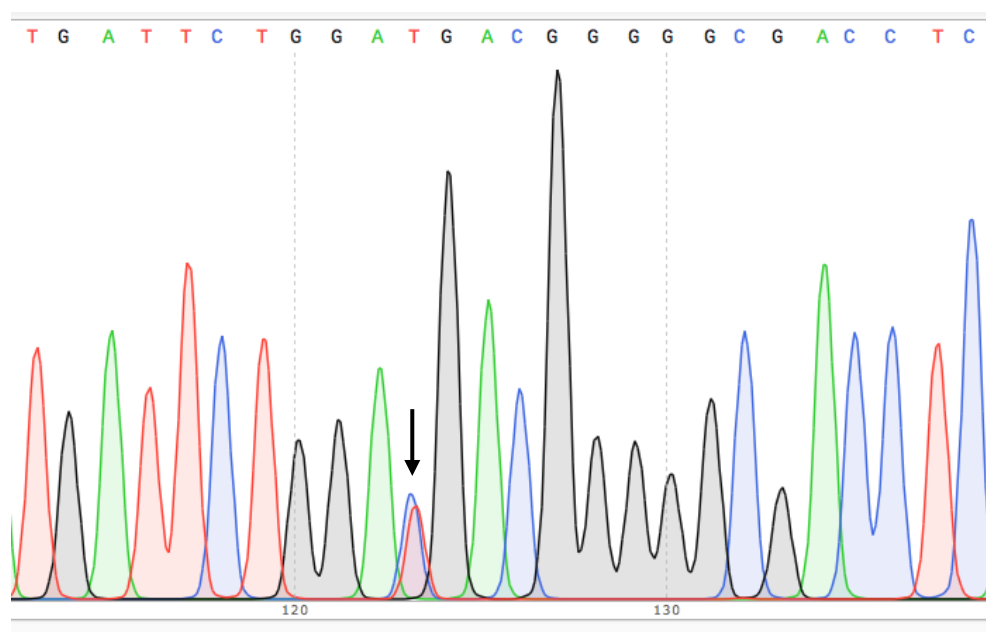
Nositeljica polimorfizma rs13043752 je imala jasne kliničke simptome mišićne slabosti, a histološkom analizom su se utvrdile miopatske promjene bez obilježja koja bi uputila na etiologiju bolesti. Aktivnost CK joj je najčešće bila povišena šest puta, a povremeno i do 26 puta, u odnosu na gornju prihvatljivu vrijednost. AdoMet je bio 2675,4 nmol/L, AdoHcy 73,6 nmol/L, a metilacijski potencijal 36,09. Iako je AdoMet bio blago iznad gornje granice referentnog raspona (2400 nmol/L, više u odlomku 4.2.2.5.), još uvijek je bio blizu medijana koncentracija za AdoMet i cjelokupne ispitivane skupine (medijan 2677,24 nmol/L; tablica 10 a), i podskupine ispitanica ženskog spola (medijan 2697,10 nmol/L; tablica 13 a). Stoga se ne može zaključiti da li je navedeni polimorfizam jednog alela, uzevši u obzir gore spomenute pokazatelje, promijenio metilacijske procese u stanici i tako pridonio razvoju simptoma i povišenoj aktivnosti CK u krvi ispitanice.

Nositelj polimorfizma rs41301825 je imao aktivnost CK u krvi približno 14 puta višu od gornje prihvatljive vrijednosti i jasne simptome mišićne slabosti, od dojenačke dobi. Koncentracije AdoMet i AdoHcy su mu bile značajno povišene (AdoMet 13645,5 nmol/L, AdoHcy 1060,4 nmol/L), dok je metilacijski potencijal bio 12,87. Ispitanik je bio unutar 10% ispitanika s najvišim izmjerenim AdoMet. Samo je dvoje ispitanika imalo viši AdoHcy, dok je metilacijski potencijal bio među 10% najnižih, unutar ispitivane skupine. Na temelju navedenog može se zaključiti da postoji mogućnost da je polimorfizam doveo do narušenih metilacijskih procesa unutar stanice i tako pridonio pojavi bolesti koja se očitovala i klinički, i višestruko povišenom aktivnošću CK.



### 5.3.2. Sekundarne spoznaje proizašle iz određivanja polimorfizama gena *AHCY*

Tijekom određivanja navedenih polimorfizama, u dvoje je ispitanika, brata i sestre, otkriven polimorfizam jednog nukleotida u egzonu 4, zbog kojeg dolazi do zamijene citozina u timin na poziciji 398 (c.398 C>T; p.D130). Ovaj polimorfizam je "nijem" što znači da nema zamijene aminokiselina i stoga nema posljedica na strukturu i funkciju proteina. Navedeni polimorfizam je opisan ranije (79), a tada nije detaljnije proučavan. Međutim, autori su zaključili da se ne može sa sigurnošću isključiti utjecaj na stabilnost molekule mRNA i preradu primarnog transkripta mRNA (engl. *splicing*) (79).



**Slika 22.** Kromatogram ispitanika koji je heterozigot za polimorfizam c.398 C>T (p.D130) u egzonu 4. Zamjena nukleotida je označena strelicom.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Postoje li u skupini bolesnika s miopatijom nerazjašnjene etiologije i/ili trajno povišenom aktivnošću kreatin kinaze osobe s nedostatnom aktivnošću S-adenozilhomocistein hidrolaze

Na početku istraživanja smo pretpostavili da postoji mogućnost se u skupini ispitanika (N = 100) s trajno povišenom CK nejasne etiologije (glavni kriterij za uključivanje u studiju), neovisno o prisustvu/odsustvu slabosti mišića, nalaze osobe s nedostatnom aktivnošću SAHH. Razlozi za navedenu pretpostavku su bili:

1. Na temelju rezultata istraživanja Kloor i suradnika se pretpostavilo da je nedostatna aktivnost SAHH jedan od češćih uzroka nasljednih miopatija (78).

2. Većina do sada opisanih bolesnika je imala višestruko povišenu aktivnost CK u krvi (1, 4-6, 8-11, 13).

Međutim, u ovom istraživanju nismo otkrili bolesnike s nedostatnom aktivnošću SAHH. Razlozi za to mogu biti: a) nedovoljno velik uzorak; b) niska incidencija bolesti.

Realno je uzorak bio i veći od 100, jer su ispitanici u kojih je tijekom daljnje obrade postavljena dijagnoza (druge) bolesti isključeni iz studije. Naime, tijekom prikupljanja i obrade bolesnika s različitim simptomima bolesti mišića i povišenom aktivnošću CK u krvi, a za potrebu ovog istraživanja, učinjenom smo obradom otkrili nekoliko bolesnika s različitim oblicima mišićnih distrofija ili metaboličkih miopatija. Za napomenuti je da smo na taj način, u naših bolesnika potvrdili druge rijetke bolesti (kao npr. Pompeovu bolest, Danonovu bolest, pojasnu mišićnu distrofiju tipa 2A, mitohondrijske miopatije, kongenitalnu mišićnu distrofiju zbog poremećaja O-glikozilacije). O navedenim sekundarnim spoznajama proizašlima iz ovog istraživanja biti će više riječi na kraju rasprave.

Što se tiče incidencije bolesti, moguće je da pretpostavljena incidencija od 1:30 000 ne odgovara stvarnoj slici. Naime, u gotovo 14 godina od kada je bolest opisana, do danas je u svijetu potvrđeno manje od 20 bolesnika (neki su opisani u literaturi, a za neke znamo osobnim kontaktima). Istina je da dijagnosticiranje bolesti biokemijskim metodama otežava činjenica vezana uz tehnički zahtjevno mjerenje AdoMet i AdoHcy u plazmi, koje je dostupno samo u rijetkim laboratorijima. No, treba imati na umu da je dostupnost analiza metodama

molekularne genetike posljednjih desetak godina postala pristupačnija (sekvenciranje cijelog egzoma ili genoma), što ipak nije rezultiralo većim brojem otkrivenih bolesnika (znamo za nekolicinu bolesnika u kojih je dijagnoza postavljena nakon sekvenciranja egzoma). S druge strane, razlog za tako malen broj otkrivenih bolesnika, a pod pretpostavkom da je predmnijevana incidencija ipak točna, može biti u tome što većina oboljelih ima slabije izražene simptome ili ih uopće nema (dobar primjer je sin bolesnice koja je umrla od hepatocelularnog karcinoma zbog manjka SAHH, a koji je u dobi od 7 godina bio bez kliničkih simptoma, iako je imao povišen CK (10)). Takve asimptomatske/oligosimptomatske osobe često niti ne traže liječničku pomoć. U našoj ispitivanoj skupini je velik broj ispitanika imao simptome (N = 79), a manji je broj onih koji su imali asimptomatski trajno povišenu aktivnost CK (N = 18). Za troje ispitanika nismo imali cjelovite kliničke podatke. Ispitanici s asimptomatski trajno povišenom aktivnošću CK su, u većini slučajeva, otkriveni tijekom laboratorijske obrade zbog nekog drugog zdravstvenog stanja.

Drugi potencijalni razlog za mali broj otkrivenih bolesnika metodama molekularne genetike je taj što gen *AHCY* najčešće nije uvršten u različite panele gena koji se danas često koriste u dijagnostici neuromišićnih bolesti.

Bez obzira što nismo otkrili osobe s nedostatnom aktivnošću SAHH, smatramo i nadalje opravdanim u svakog bolesnika s mišićnom slabošću i trajno povišenom aktivnošću CK, a u kojeg su isključene druge, češće bolesti mišića, izmjeriti AdoMet i AdoHcy kao siguran put do dijagnoze navedene bolesti. Pri tom se mogu otkriti i drugi poremećaji u kojima su AdoMet i/ili AdoHcy povišeni, bilo da se radi o drugim prirođenim poremećajima metilacijskog ciklusa (na primjer, manjak adenozin kinaze) ili nekim bolestima koje sekundarno mijenjaju koncentraciju AdoMet i AdoHcy te narušavaju procese metilacije. Navedeno je važno ne samo zbog ciljanog liječenja bolesnika, ukoliko je dostupno, nego i zbog spoznaje o eventualno prisutnim pro-karcinogenim metaboličkim procesima vezanim uz promjene u metilaciji makromolekula.

## 6.2. Odnos metilacijskog potencijala u dvije skupine ispitanika

Istraživanje smo započeli s pretpostavkom da ćemo u skupini ispitanika s trajno visokom aktivnošću CK izmjeriti metilacijski potencijal koji će se razlikovati od metilacijskog potencijala ispitanika u referentnoj skupini. Niži metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini upućivao bi na promjenu procesa metilacije u stanici, kao čimbenika koji pridonose slabosti mišića ili povišenoj aktivnosti CK u krvi. Nismo otkrili statistički značajnu razliku između ispitanika i referentne skupine. Unutar ispitivane skupine, koja je po simptomima i stupnju povišenja aktivnosti CK bila heterogena, 5% ispitanika s najnižim metilacijskim potencijalom imalo je omjer AdoMet/AdoHcy u punoj krvi niži od 10. Svih pet bolesnika je, uz povišenu aktivnost CK, imalo i simptome mišićne slabosti. Troje, od ovih petero bolesnika, imalo je i povišen AdoHcy. Kako ovi bolesnici nemaju obilježja bolesti zbog manjka SAHH (više u odlomku 5.1.) rasprava o patogenezi primarnih i sekundarnih procesa koji su doveli do bolesti prelazi okvire ove disertacije. Ipak, ova je podskupina ispitanika osobito zanimljiva za daljnja istraživanja, vezano uz uzroke sekundarno narušenih metilacijskih procesa te utjecaju tih promjena na primarni patološki proces i biološke procese u stanici općenito. Ova pretpostavka je donekle poljuljana time što su i neki zdravi ispitanici, unutar referentne skupine, imali slične, pa i niže vrijednosti metilacijskog potencijala, u odnosu na ispitanike. Ipak, moguće je da u zdravih ispitanika takve promjene procesa metilacije nemaju većih utjecaja na unutarstanični metabolizam i integritet mišićne stanice, zbog razvijenih kompenzatornih mehanizama, u stanici.

### **6.3. Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu**

Našli smo statistički značajno povišenu koncentraciju AdoMet i AdoHcy u ispitanika, u odnosu na referentnu skupinu ( $P < 0,001$ ). Dodatno, pojedini su ispitanici imali značajno više koncentracije oba metabolita u odnosu na zdrave ispitanike i većinu ispitanika uključenih u istraživanje. To je i očekivano, s obzirom na vrlo vjerojatno različitu patogenetsku osnovu bolesti u heterogenoj skupini ispitanika, kojima je glavno zajedničko obilježje trajno povišena aktivnost CK.

Uslijed različitih procesa koji oštećuju mišićnu stanicu, prirođenih i stečenih, dolazi do povećanja propusnosti stanične membrane i „curenja“ staničnih proteina, uključivo i CK (koji se smatra glavnim biokemijskim pokazateljem rabdomiolize). Za očekivati je da se jednako tako iz mišićne stanice, pod sličnim uvjetima, mogu u izvanstanični prostor otpustiti i druge molekule, pa tako i metaboliti AdoMet i AdoHcy. Stoga se tijekom rabdomiolize teoretski može očekivati i porast AdoMet i AdoHcy u plazmi. Navedeno je samo pretpostavka za koju ne znamo da li je točna, s obzirom na to da ovakva analiza još nije napravljena. Ipak, smatramo da je u našem istraživanju takav pozitivan odklon vrlo malo vjerojatan, upravo stoga što je mjerena koncentracija metabolita u punoj krvi (koja puno bolje odražava staničnu koncentraciju AdoMet i AdoHcy, osobito u eritrocitima). Ako se u osoba s miopatijom AdoMet i AdoHcy iz mišićne stanice pojačano otpuštaju u izvanstanični prostor, to ne bi trebalo imati značajniji utjecaj na koncentracije metabolita u punoj krvi, jer je njihova koncentracija u plazmi višestruko niža u odnosu na punu krv. Upravo stoga nije vjerojatno da bi to bio uzrok gotovo deseterostrukog povišenja koncentracija AdoMet i AdoHcy, koje su izmjerene u nekih ispitanika. Osim toga, protiv porasta AdoMet i AdoHcy kao posljedice izlaska iz mišićne stanice govori i nepostojanje korelacije između ta dva metabolita i CK. Također, nema pokazatelja koji bi upućivali na to da pojačana mišićna aktivnost pojedinih ispitanika može biti uzrok dobivenih vrijednosti.

Isključili smo nedostatnu aktivnost SAHH kao uzrok značajno povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy u nekih ispitanika. Razlozi povišenja mogli bi biti posljedica nekog drugog primarnog poremećaja metilacije, kao naprimjer manjka adenzin kinaze, ili posljedica sekundarno narušenih metilacijskih procesa. U oba slučaja povišeni AdoMet i AdoHcy, bez obzira na metilacijski potencijal koji je u granicama normale, mogu utjecati na metilacijske procese unutar stanica i pridonijeti patološkom procesu ili uzrokovati bolest. U daljnjem

tekstu ćemo se osvrnuti na patogenetske mehanizme kojima promijenjene koncentracije AdoMet i AdoHcy, uz očuvanu vrijednost metilacijskog potencijala, mogu nepovoljno djelovati na biološke procese u stanici i doprinijeti razvoju bolesti mišića.

### **6.3.1. Na koji način povišena koncentracija S-adenozilhomocistena može nepovoljno utjecati na biološke procese, neovisno o metilacijskom potencijalu?**

U uvodu je kratko razloženo na koji način povišena koncentracija AdoHcy i sniženje metilacijskog potencijala utječu na metilacijske procese unutar stanice. Navedeni patogenetski mehanizam je jasno obrazložen i potvrđen rezultatima brojnih istraživanja (20, 22, 28). Međutim, povišenje AdoHcy bez promjene metilacijskog potencijala također može narušiti neke metilacijske procese. Poznato je da su neke metiltransferaze posebno osjetljive na AdoHcy pa one mogu biti snažnije inhibirane s porastom koncentracije AdoHcy, bez postojanja promjene u metilacijskom potencijalu. Na promjenu koncentracije AdoHcy jako su osjetljive gvanin-N-1 tRNA metiltransferaza i L-izoaspartat (D-aspartat) metiltransferaza (3). Gvanin-N-1 tRNA metiltransferaza je uključena u metilaciju gvanina na položaju 37, u mitohondrijskoj tRNA (94). Mutacija gena *TRMT5* koji kodira navedenu metiltransferazu dovodi do višestrukog manjka aktivnosti kompleksa respiratornog lanca i kliničkih simptoma slabosti mišića. Tako je, od dvoje u literaturi opisanih bolesnika, jedna bolesnica imala intoleranciju na napor i mišićnu slabost, dok je drugi bolesnik, imao usporen psihomotorički razvoj, mišićnu hipotoniju i slabost te hipertrofičnu kardiomiopatiju (95).

Drugi enzim čija je aktivnost inhibirana već i blažim povišenjem AdoHcy je L-izoaspartat (D-aspartat) metiltransferaza. Enzim katalizira metilaciju L-izoaspartil i D-aspartil ostataka koje nastaju spontanom deaminacijom u peptidima i proteinima te omogućuje ponovnu pretvorbu u L-aspartil oblik, zbog čega ima važnu ulogu u popravku oštećenih proteina (96). Mutacije u genu *PCMT1*, koji kodira ovu metiltransferazu, povezuju se s demencijom, procesima starenja, tumorigenezom i teškim neurološkim oštećenjima (97).

S obzirom na kliničku sliku u dvoje opisanih bolesnika sa smanjenom aktivnošću gvanin-N-1 tRNA metiltransferaze i na vrlo važnu ulogu L-izoaspartat (D-aspartat) metiltransferaze u popravku proteina, jasno je da su povišene koncentracije AdoHcy, i bez

značajno narušenog metilacijskog potencijala, mogle pridonijeti simptomima slabosti mišića i porastu CK u ispitanika.

U prilog značajnijeg utjecaja koncentracije AdoHcy u odnosu na metilacijski potencijal, u određenim okolnostima, govore i rezultati istraživanja na egzokrinim stanicama gušterače miša, u kojem je dokazano da je za metilacijom posredovanu egzokrinu sekreciju AdoHcy bio važniji od metilacijskog potencijala (98).

Za očekivati je da su na porast koncentracije AdoHcy osobito osjetljiva tkiva koja nemaju eksprimiranu cistationin beta-sintetazu (CBS), enzim koji katalizira prvu reakciju pretvorbe Hcy u cistationin. U tim tkivima se stoga ne odvija transsulfuracija koja može „odteretiti” stanicu od viška Hcy, a time i AdoHcy. CBS je eksprimirana u jetri, gušterači, bubregu i mozgu, a odsustvo tog enzima u ostalim tkivima, uključivo i mišićnom, vjerojatno ih čini podložnijim toksičnim učincima nakupljenog Hcy i AdoHcy (22).

U ispitivanoj skupini je, uz ranije spomenutih troje ispitanika s nešto nižim metilacijskim potencijalom i višim AdoHcy, bilo i šestoro bolesnika koji su u odnosu na koncentracije AdoMet i AdoHcy značajno odstupali od ostalih (za više od tri interkvartilna raspona), pri čemu je u nekih AdoHcy bio za 10 puta viši od gornje granice raspona referentne skupine. Premda je u ovih ispitanika metilacijski potencijal bio normalan, a u nekih čak i viši, moguće je da koncentracija AdoHcy u stanici bila dostatno (kritično) visoka da inhibira djelovanje spomenutih i/ili nekih drugih važnih metiltransferaza, ili da utječe na neke druge biološke procese unutar stanice (kao što su pokazali Capdevila i suradnici na stanicama gušterače miša (98)). Jednako tako, u ovoj podskupini ispitanika je moguće da su visoke koncentracije AdoHcy i AdoMet sinergistički utjecale na narušavanje metilacijskih i drugih unutarstaničnih procesa.

### **6.3.2. Nepovoljan utjecaj povišene koncentracije S-adenozilmetionina na biološke procese unutar stanice**

Utjecaj povišene koncentracije AdoMet na unutarstanične procese metilacije može se povezati s rezultatima istraživanja kojima je pokazana neosjetljivost stanica neuroblastoma miša na SAHH-inhibitore. U navedenom istraživanju je dokazano da je u staničnoj liniji

rezistentnoj na SAHH-inhibitore koncentracija AdoMet višestruko povišena, kao posljedica pojačane ekspresije enzima metionin adenziltransferaze (MAT). Takav način prilagodbe omogućio je stanicama u rezistentnoj liniji preživljavanje usprkos nakupljanju AdoHcy (99). U skladu s tim su i novije spoznaje: promijenjena ekspresija gena koji kodiraju metionin adenziltransferaze (*MAT1A*, *MAT2A* i *MAT2B*), enzime koji kataliziraju stvaranje AdoMet, povezuje se s procesima tumorigeneze (100). U mišićnom tkivu je enzimska aktivnost MAT relativno niska u odnosu na gram proteina (101). Međutim, moguće je da u različitim patološkim okolnostima dolazi do pojačane ekspresije enzima ili pojačanja njegove enzimске aktivnosti, kao što je opisano u ranije navedenim istraživanjima, na drugim vrstama stanica (99, 100). To bi moglo objasniti izrazito povišene koncentracije AdoMet u punoj krvi nekih ispitanika (od kojih su svi imali simptome slabosti mišića), koje nisu bile izmjerene u referentnoj skupini. Ukoliko bi ta hipoteza bila točna i AdoMet se pod navedenim okolnostima sekundarno povišio, moguće je da i takvo sekundarno povišenje, koje mijenja metilacijske procese unutar stanice, dodatno pridonosi patološkom procesu u mišićnim stanicama.

Premda se AdoMet često spominje kao protektivni metabolit za hepatocite (51) njegova povišena koncentracija ne mora biti povoljna, a potencijalno može biti i štetna. Zannata i suradnici su opisali da AdoMet u stanicama mozga štakora povećava oksidacijski stres, u eksperimentalnim uvjetima (62). Spoznaje o potencijalnoj štetnosti povišenog AdoMet mogu se povezati s bolešću zbog nedostatne aktivnosti GNMT koja je karakterizirana povišenjem koncentracije AdoMet, a bez povišenja AdoHcy, i biokemijskim pokazateljima bolesti jetre (102). Enzim GNMT nije eksprimiran u mišićima (103) pa bi se moglo pretpostaviti da su mišićne stanice, zbog nedostatka regulatornog učinka GNMT na koncentraciju AdoMet, podložnije negativnim učincima AdoMet u odnosu na stanice u kojima je taj enzim ispoljen.

Povišen AdoMet uz normalan AdoHcy, vjerojatno sekundarno, opisan je u dvoje bolesnika sa sindromom deplecije mitohondrijske DNA zbog mutacija gena *MPV17* i *DGUOK* (104). U oba bolesnika su isključeni prirođeni poremećaji u ciklusu metilacije. Mudd i suradnici su pretpostavili da je disfunkcija mitohondrija rezultirala smanjenom utilizacijom AdoMet što je dovelo do inhibicije MAT te posljedičnog povišenja i metionina, a zbog izlaska metabolita iz stanica je njihova koncentracija u plazmi bila visoka (viša nego što bi se očekivalo s obzirom na stupanj disfunkcije jetre): AdoMet je bio povišen do 8,6, a metionin 15 do 22 puta, iznad gornje granice referentnog raspona. Autori su pretpostavili da, s



obzirom na to da mišićne stanice nemaju enzim GNMT, većina AdoMet u plazmi potječe iz mišića. Jedan od opisanih bolesnika koji je imao depleciju mitohondrijske DNA zbog manjka proteina MPV17 je u dobi od 7 godina obolio od hepatocelularnog karcinoma, što je u skladu sa spoznajama da promijenjeni metilacijski procesi, makar i sekundarno, dovode do karcinogeneze. Navedeni bolesnik je imao jasne simptome zahvaćenosti mišića, no teško je razlučiti koliko su oni bili posljedica mitohondrijske miopatije, a koliko su im mogli pridonijeti sekundarno narušeni procesi metilacije. Drugo dijete s homozgotnom patogenom mutacijom gena *DGUOK* je bilo hipotonično, vjerojatno zbog encefalopatije (iako se ne može isključiti primarna zahvaćenost mišića), a umrlo je u dobi od šest i pol mjeseci, od zatajenja jetre i bubrega (104).

### **6.3.3. Dodatni dokazi da povišene koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina imaju nepovoljan učinak na mišićne stanice**

Nepovoljne učinke povišenih koncentracija AdoMet i AdoHcy na mišićne stanice su potvrdili i rezultati istraživanja na mioblastima i miotubama naše istraživačke skupine koji su učinjeni u okviru disertacije naše suradnice (neobjavljeni rezultati). Mioblasti i miotube, dobiveni biopsijom mišića bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH i dvije zdrave kontrole, su, u mediju, opterećeni s AdoMet. To je rezultiralo sniženjem metilacijskog potencijala u odnosu na stanice bez opterećenja, s tim da je u zdravih kontrola metilacijski potencijal nakon opterećenja bio viši, a na stanicama s nedostatnom aktivnošću SAHH, niži od 10. Očekivano, promjena je bila i izraženija nakon što su se stanice opteretile s AdoHcy, pri čemu je pad metilacijskog potencijala također bio izraženiji u stanicama s nedostatnom aktivnošću SAHH. Morfološkom analizom stanica je zamijećeno da pod opterećenjem s AdoHcy dolazi do oštećenja stanične membrane, koja su bila izraženija na stanicama s nedostatnom aktivnošću SAHH. Nakon opterećenja s AdoMet, također je došlo do sličnih promjena u obje linije stanica, iako su bile slabije izražene nego nakon opterećenja s AdoHcy. U homogenatu stanica bolesnika je nakon pojedinačnog opterećenja s AdoMet i AdoHcy došlo do dvostrukog porasta CK, dok se u homogenatu stanica zdrave kontrole, po opterećenju s navedenim metabolitima, aktivnost CK nije značajnije promijenila (neobjavljeni rezultati).

Saznanja o bolesti zbog nedostatne aktivnosti ADK također potvrđuju da povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy mogu uzrokovati slabost mišića, neovisno o metilacijskom potencijalu. Naime, svi bolesnici s manjkom ADK imaju povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy u plazmi, pri čemu je omjer AdoMet/AdoHcy u plazmi u većine bolesnika unutar fizioloških granica (64). Bolesnici s nedostatnom aktivnošću ADK imaju jasne simptome slabosti mišića koji se očituju mišićnom hipotonijom i usporenim psihomotoričkim razvojem od prve godine života. Stoga je neupitno da povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy, koje su u bolesnika s nedostatnom aktivnošću ADK bile 2 - 20 puta, odnosno 5 - 30 puta više u odnosu na normalne vrijednosti, pridonose simptomima slabosti mišića (13, 64).

Zbog svih ovih činjenica, ispitanike koji imaju višestruko povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy, a nemaju bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH, treba dodatno obraditi s ciljem definiranja čimbenika koji su doveli do porasta koncentracija ovih metabolita. Jednako tako bi vrijedilo istražiti u kojoj mjeri narušeni metilacijski procesi stvarno pridonose patogenezi njihove bolesti. Moguće je da u navedenoj subpopulaciji ispitanika ima onih koji boluju od drugih prirođenih poremećaja metilacijskog ciklusa, iako se vjerojatnije radi o sekundarnim poremećajima metilacijskog ciklusa (kao što je opisano u bolesnika s deplecijom mitohondrijske DNA). Također je moguće da, uslijed narušenog staničnog metabolizma u sklopu osnovne bolesti, dolazi do nakupljanja nekih, nama nepoznatih, molekula koje djeluju kao inhibitori SAHH ili drugih enzima uključenih u trasmetilacijske procese. Isto tako, moguće je da uslijed primarnog patogenetskog procesa dolazi do pojačane ili smanjene acetilacije SAHH, za koju se predmnijeva da regulira enzimsku aktivnost SAHH (37).

Imajući na umu složene biološke procese koji uključuju međusobni odnos energetskih i drugih metaboličkih reakcija, epigenetičkih promjena, te njihovu spregu, jasno je da samo jedna molekula ne može biti odgovorna za kaskadu patoloških zbivanja. Stoga je vrlo vjerojatno da i koncentracije AdoMet i AdoHcy, kao i njihov međusobni odnos, utječu na metilacijski potencijal i održavanje homeostaze procesa metilacije unutar stanice. Zsigurno je da su u stanicama zbog nekog primarnog patološkog zbivanja koji sekundarno mijenja različite biološke procese, narušeni i procesi metilacije. Ova razmatranja nadilaze osnovnu temu i ciljeve ove disertacije, no nadamo se da će daljnja istraživanja donijeti odgovore barem na neka pitanja.

Zanimljivo je da su, unutar skupine ispitanika, prvi srodnici imali približno jednake koncentracije AdoMet, bilo da se radi o izrazito povišenim koncentracijama AdoMet ili koncentracijama koje su blizu vrijednosti medijana ispitivane skupine. U subpopulaciji

ispitanika s izrazito povišenim koncentracijama AdoMet je bilo dva para prvih srodnika (majka i kći; brat i sestra) što dodatno upućuje da neki patološki procesi, sekundarno, dovode do poremećaja procesa metilacije. Slično je potvrđeno u sindromu deplecije mitohondrijske DNA koji je praćen s povišenim AdoMet u plazmi (104).

Ukoliko navedene pretpostavke i nisu točne, moguće je da osobe koje imaju povišeni AdoMet i AdoHcy te trajno povišenu aktivnost CK imaju sličnu patogenetsku osnovu primarnog poremećaja.

#### **6.4. Čimbenici koji mogu utjecati na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala**

AdoMet i AdoHcy su metaboliti metionina i njihova koncentracija izravno ovisi o unosu metionina hranom. U stanjima katabolizma s pojačanom razgradnjom vlastitih proteina može se očekivati porast AdoMet i AdoHcy u plazmi. Upravo stoga smo krv za analizu AdoMet i AdoHcy u ispitanika uzorkovali približno 3 - 4 sata nakon obroka (na ovaj način se uzorkuje i krv za analizu metionina i ostalih aminokiselina). U dojenčadi koja ima pozitivnu bilancu dušika, odnosno ugrađuje većinu aminokiselina unesenih hranom u vlastite proteine, izmjerene vrijednosti navedenih metabolita mogu biti niže u odnosu na stariju djecu, odnosno - u slučaju bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH, blaže povišene. Primjer za to je i brat prvoopisanog bolesnika. On je nakon rođenja imao normalne vrijednosti metionina u plazmi, a AdoMet i AdoHcy su mu u novorođenačkoj dobi, kada je i potvrđena dijagnoza bolesti, bili znatno manje povišeni (AdoMet 1,7 puta, a AdoHcy 5 puta), u odnosu na prvoopisanog bolesnika, koji je pri postavljanju dijagnoze u dobi od oko godinu dana u plazmi imao AdoMet 30 puta, a AdoHcy 150 puta više od normalnih vrijednosti (1, 4). Navedena pretpostavka je potvrđena rođenjem slijedećeg djeteta s nedostatnom aktivnošću SAHH u istoj obitelji: dijete je imalo normalne vrijednosti metionina u plazmi, dok su AdoMet i AdoHcy bili umjereno povišeni (tablica 1).

Međutim, dio bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH može i u tako ranoj dobi imati hipermetioninemiju. Tako je bolesnik kojeg su opisali Buist i suradnici u novorođenačkoj dobi imao metionin približno četiri puta iznad gornje granice referentnog

raspona i bio je pozitivan na probiru novorođenačadi. Ovaj bolesnik je, kasnije u životu, povremeno imao značajno povišene koncentracije metionina, više nego u novorođenačkom razdoblju, što je vjerojatno odraz slabije ugradnje u vlastite proteine zbog sporijeg rasta, u odnosu na rano životno razdoblje intenzivnog rasta (5).

Zanimljivo je da u ispitivanoj skupini, kao i u referentnoj skupini zdravih ispitanika, nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama AdoMet i AdoHcy u odnosu na dob. Moguće je da su navedene okolnosti povezane s dobi značajne samo u situacijama teže narušenih transmetilacijskih procesa, kao što je to slučaj u bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH.

U ispitivanoj skupini nismo našli razlike u koncentracijama AdoMet, AdoHcy i metilacijskom potencijalu s obzirom na spol ispitanika. Navedeno je u skladu s rezultatima prethodnog istraživanja na zdravim ispitanicima, prema kojem se koncentracije AdoMet i AdoHcy u punoj krvi ne razlikuju s obzirom na spol (32).

Vitamin B<sub>12</sub> i folna kiselina su važni kofaktori u procesu remetilacije, a vitamin B<sub>6</sub> u procesu transulfuracije. Stoga nedostatan unos navedenih mikroelemenata može narušiti metilacijske procese i dovesti do promjene koncentracija AdoMet i AdoHcy te promijenjenog metilacijskog potencijala (105, 106). Dokazano je i da polimorfizmi gena koji kodiraju enzime uključene u procese remetilacije, zajedno s manjkom ranije spomenutih kofaktora, rezultiraju nakupljanjem AdoHcy u stanici što se povezuje s brojnim kroničnim bolestima (107, 108). No, ne mislimo da su količina spomenutih vitamina u tijelu naših ispitanika i/ili prevalencija polimorfizama gena uključenih u procese remetilacije drugačiji u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu.

Dobro je poznato da bolesnici s kroničnim zatajenjem bubrega imaju hiperhomocisteinemiju i zbog toga su skloniji vaskularnim komplikacijama (109). Danas se zna da u patogenezi komplikacija povezanih sa zatajenjem bubrega, osim hiperhomocisteninemije, značajnu ulogu ima porast AdoHcy i posljedično sniženje metilacijskog potencijala te narušeni metilacijski procesi u stanicama (110). Dokazano je da hiperhomocisteinemija koja prati kronično zatajenje bubrega i uzrokuje brojne komplikacije u bolesnika, uz smanjen klirens AdoHcy i tHcy nastaje zbog smanjene transulfuracije i remetilacije tHcy u bubrezima (111). Za razliku od kronične hiperhomocisteinemije, akutna

kratkotrajna hiperhomocisteinemija nema utjecaja na promjenu metilacijskog potencijala (31). Ispitanici uključeni u naše istraživanje nisu imali zatajenje bubrega tako da ne očekujemo da je funkcija bubrega ispitanika imala utjecaja na dobivene rezultate.

#### **6.5. Pouzdanost metode za mjerenje koncentracija S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u punoj krvi**

Premda je mjerenje AdoMet i AdoHcy u plazmi metodom tandemske spektrometrije masa zadnjih godina postalo standard u laboratorijima u kojima se AdoMet i AdoHcy određuju, mjerenje navedenih metabolita u punoj krvi metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koju smo koristili u našem istraživanju ima određenih prednosti. Ovaj način mjerenja je potencijalno bolji pokazatelj unutarstaničnih zbivanja. Upravo se Finkelstein u svom radu objavljenom 2006. osvrnuo na valjanost koncentracija AdoMet i AdoHcy u plazmi kao dobrog pokazatelja onoga što se zbiva u stanicama, i predstavlja li koncentracija u plazmi onaj udio metabolita koji ulazi u jetru, u kojoj se zbiva većina transmetilacijskih procesa u organizmu (u tom slučaju se transmetilacijske reakcije tek trebaju dogoditi), ili potječe iz jetre (u tom slučaju su produkt završenih transmetilacijskih procesa) (112). Navedeno je pogotovo značajno u svjetlu spoznaje da su koncentracije AdoMet i AdoHcy višestruko niže u plazmi od njihovih koncentracija u tkivima, ali i zbog klirensa navedenih metabolita bubrezima (29, 30). Stoga još uvijek ostaje otvoreno pitanje, koliko su, zapravo, koncentracije AdoMet i AdoHcy u plazmi precizan pokazatelj transmetilacijskih reakcija u tkivima.

Iako mjerenje AdoMet i AdoHcy u punoj krvi vjerojatno bolje odražava stanje unutar stanice, u odnosu na mjerenje njihovih koncentracija u plazmi, metoda ima puno pripremnih radnji (opisano u odjeljku 4.2.2.) pa je reproducibilnost nešto lošija, a dugo vrijeme pripreme po uzorku čini neprikladnom za rutinsku laboratorijsku analizu u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Našim dugogodišnjim praćenjem bolesnika s bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH, kojima smo višestruko mjerili koncentracije AdoMet i AdoHcy u punoj krvi, o vrijednosti navedene metode smo spoznali slijedeće:

1. Koncentracije AdoHcy u punoj krvi bolesnika su višestruko više od referentnih vrijednosti te je metoda dovoljno osjetljiva za probir na bolest zbog nedostatne aktivnost SAHH.

2. U bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH na dijeti je metilacijski potencijal najčešće bio snižen, između 2 i 3.

3. Koncentracije AdoMet i AdoHcy u punoj krvi bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH dobri su parametri za praćenje uspjeha niskoproteinske dijete.

4. U bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH, na strogoj niskoproteinskoj dijeti može se postići da koncentracije AdoHcy u punoj krvi budu unutar normalnih vrijednosti, uz normalan metilacijski potencijal, pri čemu su koncentracije metionina u plazmi na donjoj granici referentnog raspona ili ispod nje.

5. Nakon kratkotrajnog eksperimentalnog prekida niskoproteinske dijete jasno se mogao pratiti pad metilacijskog potencijala te porast AdoHcy i AdoMet, i u plazmi, i u punoj krvi.

U plazmi su AdoMet i AdoHcy stabilni, prema literaturnim podacima, do dvije godine (15). Tako se pokazalo da je u adekvatno pripremljenim uzorcima plazme, pohranjenima na -20°C, nakon razdoblja pohrane duljeg od dvije godine, došlo do značajnog pada koncentracije AdoMet, a višestrukog porasta AdoHcy i sniženog metilacijskog potencijala (15). O stabilnosti uzoraka pripremljenih za analizu metabolita iz pune krvi nema literaturnih podataka. Uzorci sakupljeni za potrebe ovog istraživanja analizirani su unutar dvije godine od uzorkovanja. Kada bi stabilnost uzoraka pune krvi bila kraća u odnosu na stabilnost uzoraka plazme, očekivali bismo da se uslijed neenzimske razgradnje smanji koncentracija AdoMet, a povisi koncentracija AdoHcy, te snizi metilacijski potencijal. Dobra pozitivna korelacija koncentracija AdoMet i AdoHcy u ispitanika, te linearnost korelacije prikazana grafom na slici 18, ne ukazuje na neenzimsku razgradnju analita. Stoga možemo zaključiti da su uzorci bili stabilni i da su izmjereni rezultati pokazatelj njihove primjerene kvalitete.

U istraživanju je bilo nekoliko parova prvih srodnika koji su imali približno slične koncentracije AdoMet (uključivo one s jako povišenim koncentracijama), što s jedne strane upućuje da je isti primarni patološki proces povezan s određenim koncentracijama AdoMet u punoj krvi, ali i potvrđuje točnost metode.

Zbog svega gore navedenog zaključujemo da je metoda mjerenja AdoMet i AdoHcy u punoj krvi, koju smo koristili u ovom istraživanju, ponovljiva i pouzdana za ispunjenje ciljeva ove disertacije.

#### **6.6. Učestalost polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena *AHCY* u ispitivanoj skupini**

U pokusima *in vitro* je dokazano da polimorfizmi rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena *AHCY* utječu na termalnu stabilnost enzima SAHH (80). Stoga smo pretpostavili da je njihov utjecaj značajan i u uvjetima *in vivo*, te da osobe koje su nositelji ovih polimorfizama imaju veći rizik za razvoj slabosti mišića, odnosno za povišenu aktivnost CK u krvi. Zbog toga smo ispitali učestalost navedenih polimorfizama u ispitanika s trajno povišenom aktivnošću CK nejasne etiologije (N = 77). Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti polimorfizama rs13043752 i rs41301825 gena *AHCY* u ispitivanoj skupini, u odnosu na zdrave ispitanike. Stoga zaključujemo da ovi polimorfizmi nisu češći u populaciji ispitanika sa slabošću mišića, odnosno trajno povišenom aktivnošću CK, u odnosu na zdrave osobe. S obzirom na to da je na prisustvo navedenih polimorfizama bio testiran relativno malen broj ispitanika (ukupno 77), za potvrdu ovih rezultata trebalo bi testirati veći broj ispitanika. Neovisno o tome, snaga statističkog testa ukazuje na to da je i ovaj broj ispitanika dovoljan za donošenje zaključka.

Premda navedeni polimorfizmi nisu češći u skupini bolesnika sa slabošću mišića, nije isključeno da njihovo prisustvo, s obzirom na ranije opisane učinke na promjenu aktivnosti i stabilnost enzima SAHH, samostalno ili u interakciji s primarnim poremećajem, utječe na patološke procese unutar stanice. To bi se moglo provjeriti daljnjim istraživanjem o učestalosti navedenih polimorfizama i njihovom utjecaju na kliničku sliku i biokemijske pokazatelje bolesti (npr. aktivnost CK) u skupini bolesnika s jasno definiranim bolestima mišića.

## 6.7. Sekundarne koristi i spoznaje proizašle iz ovog istraživanja

Ovom je studijom obrađeno ukupno 135 ispitanika. S obzirom na to da je poznata etiologija bolesti bila kriterij za isključivanje iz studije/obrade podataka, za zadovoljenje postavljenog cilja (obraditi 100 ispitanika), u istraživanje su uključene nove osobe s trajno povišenom aktivnošću CK. Zanimljivo je da smo među obrađenim osobama otkrili neke rijetke metaboličke bolesti mišića; otkrili smo dvoje bolesnika s mitohondrijskom miopatijom (jedan zbog mutacije gena *TK2* i drugi zbog mutacije mtDNA u genu za tRNA<sup>Trp</sup>). U dva brata je nađeno da boluju od Danonove bolesti (bolesti nakupljanja glikogena u lizosomima zbog manjka LAMP2-lizosomskog membranskog proteina), a kako se radi o X-vezanoj bolesti, ista je naknadno potvrđena i u njihove majke. U četiri osobe, dvije sestre - djevojčice i dvije sestre - odrasle žene, potvrđena je prirođena mišićna distrofija zbog poremećene O-manozilacije distroglikana uslijed mutacija gena *POMT1*.

U dvoje djece je otkrivena Pompeova bolest, bolest nakupljanja glikogena zbog nedostatne aktivnosti lizosomske kisele alfa-glukozidaze. Bolesnici s Pompeovom bolešću mogu imati slabost mišića koja se očituje kao pojasna mišićna distrofija, a u presimptomatskoj fazi mogu biti bez tegoba, iako imaju povišenu aktivnost CK. Stoga je većina pacijenata, koji su ujedno bili potencijalni kandidati za uključenje u studiju, bila testirana na Pompeovu bolest mjerenjem aktivnosti enzima iz suhe kapi krvi. Na ovaj su način otkrivene dvije oboljele djevojčice; jedna s ranim, infantilnim oblikom Pompeove bolesti i druga s kasnim oblikom bolesti. U oba je slučaja dijagnoza potvrđena dokazom dviju patogenih mutacija u genu *GAA*. Zanimljivo je da je u ispitivanoj skupini od 135 ispitanika s povišenom CK s ili bez simptoma slabosti mišića, Pompeova bolest potvrđena u dvoje, dakle u 1,5%, što je u skladu ili približno slično s prethodno objavljenim istraživanjem vezanim uz selektivni probir na Pompeovu bolest u osoba sa slabošću mišića i/ili trajno povišenom CK u nekim drugim europskim populacijama (113, 114).



## 7. ZAKLJUČCI

1. U skupini ispitanika s trajno povišenom aktivnošću CK nepoznate etiologije, s ili bez simptoma slabosti mišića, nismo dokazali postojanje bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH.
2. Nije nađena korelacija koncentracija AdoMet i AdoHcy u punoj krvi s dobi i spolom ispitanika.
3. Koncentracije AdoMet i AdoHcy u punoj krvi nisu korelirale s aktivnošću CK.
4. U skupini ispitanika nismo dokazali statistički značajnu razliku u vrijednostima metilacijskog potencijala, u odnosu na referentnu skupinu, iako je u 5% ispitanika metilacijski potencijal bio snižen (manji od 10).
5. U skupini ispitanika smo dokazali statistički značajnu razliku u koncentracijama AdoMet i AdoHcy u punoj krvi, u odnosu na referentnu skupinu. Povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy koje su izmjerene u ispitanika upućuju na narušene procese metilacije.
6. Polimorfizmi rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena *AHCY* nisu češći u ispitivanoj skupini u odnosu na zdrave ispitanike i najvjerojatnije nisu čimbenik rizika za razvoj bolesti mišića, odnosno povišenu aktivnost CK u krvi.

## 8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) je nasljedni poremećaj u ciklusu metabolizma metionina koji se, u do sada opisanih bolesnika, uglavnom očitovao psihomotoričkim zaostajanjem, zakašnjelom mijelinizacijom mozga, mišićnom slabošću, znakovima hepatopatije s koagulopatijom. Biokemijska obilježja bolesti su povišeni metaboliti ciklusa metionina S-adenozilmetionin (AdoMet) i S-adenozilhomocistein (AdoHcy), hipermetioninemija (koja ne mora uvijek biti prisutna), te trajno povišena aktivnost kreatin kinaze (CK). Enzim SAHH zbog uloge u razgradnji AdoHcy, glavnog inhibitora transmetilacijskih reakcija u stanicama, ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze procesa metilacije, jednog od najvažnijih epigenetskih fenomena u organizmu. AdoMet je u tim reakcijama donor metilne skupine. Upravo je bolest zbog nedostatne aktivnosti SAHH idealan biološki model za proučavanje posljedica narušenih transmetilacijskih reakcija.

U ovoj je disertaciji prva hipoteza bila da ćemo među osobama s etiološki nerazjašnjeno trajno povišenom aktivnošću CK, sa simptomima slabosti mišića ili bez njih, otkriti osobe s nedostatnom aktivnošću SAHH. Druga hipoteza je bila da će ispitanici imati različit metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu, a treća hipoteza je bila da će ispitanici imati različitu učestalost polimorfizama rs13043752 i rs41301825 gena *AHCY* u odnosu na zdrave ispitanike.

Da bismo provjerili hipoteze i ispunili ciljeve istraživanja okupili smo 100 ispitanika sa slabošću mišića nerazjašnjene etiologije i trajno povišenom aktivnošću CK, odnosno osobe s trajno povišenom aktivnošću CK, a bez simptoma, i u njih u punoj krvi izmjerili AdoMet i AdoHcy, te potom izračunali metilacijski potencijal (omjer AdoMet/AdoHcy).

Nismo otkrili bolesnike s nedostatnom aktivnošću SAHH. Također, nije nađena statistički značajna razlika u metilacijskom potencijalu između ispitanika i referentne skupine. Međutim, neki su ispitanici, gledano pojedinačno, imali snižen metilacijski potencijal (manji od 10). Snižen metilacijski potencijal u tih bolesnika je pokazatelj narušenih metilacijskih procesa, koji su moguće negativno utjecali na ekspresiju njihove bolesti, odnosno stanja.

Ispitivana skupina je imala statistički značajno viši raspon koncentracija i viši medijan AdoMet i AdoHcy u punoj krvi. Jedan dio ispitanika je imao višestruko povišene koncentracije oba metabolita, koje su vjerojatno dovele do narušenih metilacijskih procesa,

neovisno o tome što je metilacijski potencijal u tih ispitanika bio normalan. U disertaciji je obrazloženo na koji način povišene koncentracije AdoMet i AdoHcy mogu utjecati na metilacijske procese unutar stanice, neovisno o promjeni metilacijskog potencijala. Koncentracije AdoMet i AdoHcy su u ispitanika jasno korelirale, dok je samo koncentracija AdoHcy korelirala, i to negativno, s metilacijskim potencijalom. Nismo dokazali korelaciju koncentracije AdoMet, AdoHcy, niti metilacijskog potencijala s aktivnošću CK u krvi, dobi ispitanika niti sa spolom.

U svrhu ispunjenja zadnjeg cilja smo u skupini ispitanika ispitali učestalost polimorfizama rs13043752 i rs41301825 gena *AHCY* koji su povezani s promijenjenom funkcijom proteina u uvjetima *in vitro*. Na ova dva polimorfizma testirano je 77 ispitanika. Nije nađena statistički značajna razlika u prevalenciji navedenih polimorfizama, u odnosu na zdrave ispitanike. Zbog toga smo zaključili da polimorfizmi sami za sebe, u heterozigotnom obliku nisu povezani s češćom pojavom slabosti mišića, odnosno povišenom aktivnosti CK u krvi. Međutim, potencijalni utjecaj navedenih polimorfizma na težinu simptoma ili na aktivnost CK u krvi, ne možemo sa sigurnošću isključiti.

Tijekom ispunjavanja ciljeva ove disertacije i obrade ispitanika u nekih smo postavili dijagnozu rijetkih nasljednih bolesti mišića.

Zaključno, rezultati koje smo dobili ukazuju da dio osoba s mišićnom slabošću nejasne etiologije i trajno povišenom aktivnošću CK, te onih s izolirano trajno povišenom aktivnošću CK, ima narušene metilacijske procese. Daljnja istraživanja su potrebna da se utvrde točni patološki mehanizmi, stupanj poremećaja metilacije gena odgovornih za strukturu i funkciju mišića te dismetilacije proteina mišića u tih osoba, kao i utjecaj opisanih promjena na primarni patološki proces, odnosno ekspresiju same bolesti.

## 9. KRATKI SADRŽAJ I NASLOV NA ENGLLESKOM JEZIKU

### **S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency and the ratio S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine in patients with persistently increased activity of creatine kinase**

Danijela Petković Ramadža, Zagreb 2018.

S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) deficiency is a rare autosomal recessive methylation disorder. Clinical presentation includes psychomotor retardation, muscle weakness, delayed myelination of cerebral white matter, hepatopathy and coagulopathy. Biochemical hallmarks of this disease are increased S-adenosylmethionine (AdoMet), S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) and hypermethioninemia (which is not a constant finding). Great majority of patients had muscle weakness with permanently elevated activity of creatine kinase (CK). The SAHH hydrolyzes AdoHcy, which is the major inhibitor of various methyltransferases, and, as a consequence, represents an important regulator of cellular transmethylation reactions - keeping the ratio between AdoMet (an universal methyl donor) and AdoHcy, known as methylation potential, within the optimal range. The pathogenesis of SAHH deficiency is rather complex. However, the decreased AdoMet/AdoHcy ratio and inhibition of various methyltransferases probably contributes to this complexity. Therefore, this disease is a unique biological model for studying disturbed methylation processes.

The first hypothesis of this thesis was that we would be able to diagnose patients suffering from SAHH deficiency among subjects with myopathy of unknown origin with permanently elevated CK, or with asymptotically permanently elevated CK only. The second hypothesis was that this group of subjects would have changed methylation ratio when compared to referral group. The third hypothesis was that this group would have a different prevalence of the *AHCY* rs13043752 and rs41301825 polymorphisms, when compared to healthy subjects.

In order to reach goals of this study, we included 100 examinees with permanently elevated CK. The majority of them had muscle weakness, but some were asymptomatic. Known muscular disease or confirmed other condition which could cause elevated CK were

exclusion criteria. AdoMet and AdoHcy were measured in the whole blood, their ratio was calculated for obtaining the value of the methylation potential in order to compare it with the values obtained in the referral group.

We did not identify any patient with SAHH deficiency, in the group of examinees. There was no statistical significance in the difference between methylation potential between these two groups. However, certain examinees (5% of them) had low methylation potential, which is probably an indicator of disturbed methylation processes.

Statistically significant difference between these two groups was found in relation to concentrations of AdoMet and AdoHcy. We found that studied subjects had higher concentrations of AdoMet and AdoHcy. Certain examinees had significantly increased concentrations of both metabolites, which may be considered as an indicator of changed methylation reactions, unrelated to methylation potential. Evidences obtained from the literature and from our own unpublished data, were used for explaining how increased AdoMet and AdoHcy, even without changes in methylation potential, may disturb transmethylation processes within the cells, and how these processes can cause muscle pathology.

In our group of examinees, AdoMet and AdoHcy concentrations were in strong correlation, as was concentration of AdoHcy and methylation potential (that particular correlation was negative). There were no statistically significant correlations attributed to metabolites or methylation index with the activity of CK in the blood, nor was any correlation between the age or gender of the subjects.

In order to reach the last goal of this thesis, the prevalences of polymorphisms rs13043752 and rs41301825 of the *AHCY* gene were studied in examined group. We tested 77 subjects and didn't find higher prevalence of these polymorphisms, when compared to healthy subjects. Although the prevalences did not differ between the groups, we cannot exclude the possibility that this polymorphisms may be associated with the higher risk for muscle weakness or elevated CK in the blood.

During this study and clinical workup of the subjects we diagnosed several rare inherited muscular diseases.

In conclusion, our results show that, among subjects with myopathy of unknown origin with permanently elevated CK, or asymptotically permanently elevated CK, some subjects had disturbed methylation processes. Further studies are needed to elucidate

pathogenesis of those changes and consequences of disturbed methylation to the primary pathological processes, and expression of the disease.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Barić I, Fumić K, Glenn B, Ćuk M, Schulze A, Finkelstein JD, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4234-39.
2. Palmer JL, Abeles RH. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 1979;254:1217-26.
3. Clarke S, Banfield K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. U: Carmel R, Jacobsen DW, ur. *Homocysteine in health and disease*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press; 2001. Str. 63-78.
4. Barić I, Ćuk M, Fumić F, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, i sur. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:885-902.
5. Buist NRM, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, Stabler S, Allen RH, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year old man. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:538-45.
6. Ćuk M, Lovrić M, Fumić K, Vugrek O, Mudd SH, Sarnavka V, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: further evidence of congenital myopathy. 6th Conference on Homocysteine Metabolism World Congress on Hyperhomocysteinemia, Saarbruecken 2007, *Clin Chem Lab Med* 2007;45:43.
7. Barić I. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:459-71.
8. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:705-13.
9. Honzík T, Magner M, Krijt J, Sokolova J, Vugrek O, Belužić R. i sur. Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol Genet Metab* 2012;107:611-13.
10. Stender S, Chakrabarti RS, Xing C, Gotway G, Cohen JC, Hobbs HH. Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab* 2015;116:269-74.
11. Strauss KA, Ferreira C, Bottiglieri T, Zhao X, Arning E, Zhang S, i sur. Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab* 2015;116:44-52.
12. Brust P, Johannsen J, Gersting S, Muntau AC, Blom H, Lessel D. i sur. Reverse phenotyping of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency (SAHHD): new cases

illustrate phenotypical and clinical variability. 49<sup>th</sup> European Metabolic Group Conference, Zagreb 2017, knjiga sažetaka, str. 77-8.

13. Baric I, Stauffer C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grünert SC, i sur. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:5-20.

14. Gaull GE, Bender AN, Vulovic D, Tallan HH, Schaffner F. Methioninemia and myopathy: a new disorder. *Ann Neurol* 1981;9:423-32.

15. Gellekink H, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van Rooij A, Struys EA, den Heijer M, Blom HJ. Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma. *Clin Chem* 2005;51:1487-92.

16. Petrossian TC, Clarke SG. Uncovering the human methyltransferase. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M110.000976. doi: 10.1074/mcp.M110.000976

17. Katz JE, Dlakic M, Clarke S. Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:525-40.

18. Gall Trošelj K, Kujundžić Novak R, Grbeša I. Epigenetika i fiziologija gena. *Medicina* 2009;45:127-35.

19. Luka Z, Mudd HS, Wagner C. Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *J Biol Chem* 2009; 284:22507-11.

20. Fowler B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med* 2005;5:77-86.

21. Falnes PØ, Jakobsson ME, Davydova E, Ho A, Malecki J. Protein lysine methylation by seven- $\beta$ -strand methyltransferases. *Biochem J* 2016;473:1995-2009.

22. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157:40-4.

23. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Paradhasaradhi K, i sur. S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996;10:471-80.

24. Grillo MA, Colombatto S. S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids* 2008;34:187-93.

25. Lu i Mato. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol Rev* 2012;92:1515-42.

26. Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem* 1979;57:56-65.



27. Kloor D, Delabar U, Mühlbauer B, Luippold G, Osswald H. Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine. *Biochem Pharmacol* 2002;63:809-15.
28. Loehrer FM, Tschöpl M, Angst CP, Litynski P, Jäger K, Fowler B, i sur. Disturbed ratio of erythrocyte and plasma S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 2001;154:147-54.
29. Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Yi P, James SJ. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5 - phosphate concentrations. *Clin Chem* 2000;46:265–72.
30. Stabler SP, Allen RH. Quantification of serum and urinary Sadenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography–mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50:365–72.
31. Fux R, Kloor D, Hermes M, Röck T, Proksch B, Grenz A, i sur. Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation potential of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy male volunteers. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:786-92.
32. Mijić K. Referentni raspon S-adenozilhomocistein i S-adenozilmetionin u našoj populaciji. Zagreb: Zdravstveno veleučilište, Studij laboratorijske medicine; 2009.
33. Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism* 1980;29:707-20.
34. Nguyen TT, Hayakawa T, Tsuge H. Effect of vitamin B6 deficiency on the synthesis and accumulation of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in rat tissues. *J Nutr Sci Vitaminol* 2001;47:188-94.
35. Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 2000;33:101-25.
36. Prigge ST, Chiang PK. S-Adenosylhomocysteine hydrolase. U: Carmel R, Jacobsen DW, ur. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, str. 63-78.
37. Wang Y, Kavran JM, Chen Z, Karukurichi KR, Leahy DJ, Cole PA. Regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by lysine acetylation. *J Biol Chem* 2014; 289:31361–72.
38. Hu Y, Komoto J, Huang Y, Gomi T, Ogawa H, Takata Y, i sur. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry* 1999;38:8323-33.
39. Grbeša I, Kalo A, Belužić R, Kovačević L, Lepur A, Rokić F. Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution

and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein. *Eur J Cell Biol* 2017;96:579-90.

40. Miller MV, Duhl DM, Winkes BM, Arredondo-Vega F, Saxon PJ, Wolff GL, i sur. The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) gene. *EMBO J* 1994;13:1806–16.

41. Chianga PK. Biological Effects of Inhibitors of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Biological Effects of Inhibitors of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase *Pharmacol Ther* 1998;77:115-34.

42. Cai S, Li QS, Borchardt RT, Kuczera K, Schowen RL. The antiviral drug ribavirin is a selective inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* 2007;15:7281-7.

43. Lee JK, Kim KC. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438:647-52.

44. Aury-Landas J, Bazille C, Allas L, Bouhout S, Chesneau C, Leclercq S. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci Rep* 2017;7:6483.

45. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318-23.

46. Bolander-Gouaille C. How can hyperhomocysteinaemia be harmful. U: Bolander-Gouaille C, ur. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. Second ed. Pringer Verlage France 2002. Str. 32-68.

47. Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull* 2008;29:116-25.

48. Hermes M, Osswald H, Riehle R, Piesch C, Kloor D. S-Adenosylhomocysteine hydrolase overexpression in HEK-293 cells: effect on intracellular adenosine levels, cell viability, and DNA methylation. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:223-36.

49. Belužić, R., Vugrek, O. S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (*AHCY*) Deficiency: A natural model system for methylation research. *Rad Med Sci* 2010;35:77-92.

50. Motzek A, Knežević J, Switzeny OJ, Cooper A, Barić I, Belužić R, i sur. Abnormal hypermethylation at imprinting control regions in patients with S-adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) deficiency. *PLoS One* 2016;11:e0151261.

51. Frau M, Feo F, Pascale RM. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis. *J Hepatol* 2013;59:830-41.

52. Luka Z, Mudd HS, Wagner C. Glycine N-Methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *J Biol Chem* 2009;284:22507–11.
53. Petkovic Ramadza D, Majic Z, Cuk M, Prutki M, Brcic L, Zekusic M, i sur. Muscle disease in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: dystrophy as a consequence of dysmethylation? Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Lyon 2015, *J Inherit Metab Dis* 2015;38:129.
54. da Costa K, Kwock L, Hooker J, Zeisel S.H. Muscle dysfunction occurs in humans depleted of choline. *FASEB J* 2002;16:1023.
55. da Costa KA, Badea M, Fischer LM, Zeisel SH. Elevated serum creatine phosphokinase in choline-deficient humans: mechanistic studies in C2C12 mouse myoblasts. *Am J Clin Nutr* 2004;80:163–70.
56. Michel V, Singh RK, Bakovic M. The impact of choline availability on muscle lipid metabolism. *Food Funct.* 2011;2:53-62.
57. Bessman SP, Geiger PJ. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 1981;211:448-52.
58. Kolling J, Scherer EB, Siebert C, Marques EP, Dos Santos TM, Wyse AT. Creatine prevents the imbalance of redox homeostasis caused by homocysteine in skeletal muscle of rats. *Gene* 2014;545:72-9.
59. Tran UC, Clarke CF. Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 2007;7:62-71.
60. Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, Trevisson E, Salviati L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2015;38:145-56.
61. Strijbis K, Vaz FM, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life* 2010;62:357-62.
62. Zanatta Â, Cecatto C, Ribeiro RT, Amaral AU, Wyse AT, Leipnitz G, Wajner M. S-adenosylmethionine promotes oxidative stress and decreases Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex supernatants of adolescent rats: implications for the pathogenesis of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Neurobiol* 2017. doi: 10.1007/s12035-017-0804-z.
63. Bjursell M, Blom H, Cayuela JA, Engvall ML, Lesko N, Balasubramaniam S, i sur. Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. *Am J Hum Genet* 2011;89:507–15.
64. Staufner K, Lindner M, Dionisi-Vici C, Freisinger P, Dobbelaere D, Douillard C. Adenosine kinase deficiency: expanding the clinical spectrum and evaluating therapeutic options. *J Inherit Metab Dis* 2016;39:273-83.

65. Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. U: Scriver, Beaudet, Valle, Sly, Childs, Kinzler, Vogelstein, ur. The metabolic and molecular bases of inherited diseases, volume II, eighth edition, McGraw-Hill 2001. Str. 2007-56.
66. Kanwar YS, Manaligod JR, Wong PW. Morphologic studies in a patient with homocystinuria due to 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Pediatr Res* 1976;10:598-609.
67. Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist JF. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:21-48.
68. Sedic M, Pavelic SK, Cindric M, Vissers JP, Peronja M, Josic D. i sur. Plasma biomarker identification in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Electrophoresis* 2011;32:1970-5.
69. Tang Z, Qiu H, Luo L, Liu N, Zhong J, Kang K. i sur. miR-34b modulates skeletal muscle cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 2017;118:4285-95.
70. Schweinberger BM, Turcatel E, Rodrigues AF, Wyse AT i sur. Gestational hypermethioninaemia alters oxidative/nitrative status in skeletal muscle and biomarkers of muscular injury and inflammation in serum of rat offspring. *Int J Exp Pathol* 2015;96:277-84.
71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/255522814?report=genbank&to=38538>.
72. <https://www.uniprot.org/uniprot/P23526>
73. Feng Q, Pelleymounter LL, Moon I, Kalari KR, Eckloff BW, Wieben ED. i sur. Human S-adenosylhomocysteine hydrolase: common gene sequence variation and functional genomic characterization. *J Neurochem* 2009;110:1806–17.
74. Bissbort S, Bender K, Wienker TF, Grzeschk KH. Genetics of human S-adenosylhomocystein hydrolase. A new polymorphism in man. *Hum Genet* 1983;65:68-71.
75. Akiyama K, Nakamura S, Abe K. Gene frequencies of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in a Japanese population. *Hum Genet* 1984;68:191-2.
76. Scheil HG, Borner E. S-adenosylhomocystein-hydrolase (EC 3.3.1.1)-Phänotypen und Genfrequenzen in einer westdeutschen population. *Ärztl Lab* 1985;31:157–8.
77. Corbo RM, Palmarino R, Schiattarella E, Giannini MA, Scacchi R. Polymorphism of S-adenosylhomocysteine hydrolase in Italy. *Hum Hered* 1987;37:186-9.
78. Kloor D, Fumić K, Attig S, Tete M, Osswald H, Barić I, i sur. Studies of S-adenosylhomocysteine hydrolase polymorphism in a Croatian population. *J Hum Genet* 2006;51:21-4.

79. Gellekink H, den Heijer M, Kluijtmans LA, Blom HJ. Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *Eur J Hum Genet* 2004;12:942-8.
80. Fumić K, Belužić R, Čuk M, Pavkov T, Kloor D, Barić I, i sur. Functional analysis of human S-adenosylhomocysteine hydrolase isoforms SAHH-2 and SAHH-3. *Eur J Hum Genet* 2007;15:347-51.
81. Belužić R, Cuk M, Pavkov T, Barić I, Vugrek O. S-Adenosylhomocysteine hydrolase (AdoHcyase) deficiency: enzymatic capabilities of human AdoHcyase are highly effected by changes to codon 89 and its surrounding residues. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:30-6.
82. Vugrek O, Belužić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat* 2009;30:555-65.
83. Baynes JW, Kostek MC. Muscle energy metabolism and contraction. U: Baynes JW, Dominiczak MH, ur. *Medical Biochemistry* fourth edition, Saunders Elsevier 2014. Str 251-263.
84. Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF. Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J Nutr Metab* 2012;960363. doi: 10.1155/2012/960363.
85. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:164 – 80.
86. Morandi L, Angelini C, Prella A, Pini A, Grassi B, Bernardi G i sur. High plasma creatine kinase: review of the literature and proposal for a diagnostic algorithm. *Neurol Sci* 2006;27:303–311.
87. von Adel A, Tarnopolsky M. Metabolic myopathies: update 2009. *J Clin Neuromusc Dis* 2009;10:97–121.
88. Brosnan JT1, da Silva RP, Brosnan ME. The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* 2011;40:1325-31.
89. Rowland LP, Willner J, DiMauro S, Miranda A. Approaches to the membrane theory of Duchenne muscular dystrophy. U: Angelini C, Danieli GA, Fontanari D, ur., *Muscular dystrophy-advances and new Trends. Proceedings of an International Symposium on Muscular Dystrophy Research, Venice, Italy, 1980.*
90. Prella A, Tancredi L, Sciacco M, Chiveri L, Comi GP, Battistel A. Retrospective study of a large population of patients with asymptomatic or minimally symptomatic raised serum creatine kinase levels. *J Neurol* 2002;24:305–311.
91. Moghadam-Kia S, Oddis CV, Aggarwal R. Approach to asymptomatic creatine kinase elevation. *Cleve Clin J Med* 2016;83:37–42.

92. Bilić K, Lovrić M, Petković D, Kloor D, Fumić K, Barić I. Whole blood S-adenosylhomocysteine- reliable biomarker of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. Annual Symposium of Society for the study of Inborn Errors of Metabolism, Hamburg 4.-7. 9.2007. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:81.
93. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
94. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q32P41>
95. Powell CA, Kopajtich R, D'Souza AR, Rorbach J, Kremer LS, Husain RA i sur. TRMT5 mutations cause a defect in post-transcriptional modification of mitochondrial tRNA associated with multiple respiratory-chain deficiencies. *Am J Hum Genet* 2015; 97:319–28.
96. <http://www.uniprot.org/uniprot/P22061>
97. Juang C, Chen B, Bru JL, Nguyen K, Huynh E, Momen M i sur. Polymorphic variants of human protein l-Isoaspartyl methyltransferase affect catalytic activity, aggregation, and thermal stability: implications for the etiology of neurological disorders and cognitive aging. *J Biol Chem* 2017;292:3656-65.
98. Capdevila A, Decha-Umphai W, Song KH, Borchardt RT, Wagner C. Pancreatic exocrine secretion is blocked by inhibitors of methylation. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:47-55.
99. Hamre MR, Clark SH, Mirkin BL. Resistance to inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in C1300 murine neuroblastoma tumor cells is associated with increased methionine adenosyltransferase activity. *Oncol Res* 1995;7:487-92.
100. Maldonado LY, Arsene D, Mato JM, Lu SC. Methionine adenosyltransferases in cancers: Mechanisms of dysregulation and implications for therapy. *Exp Biol Med* 2018;243:107-117.
101. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Transsulfuration in mammals: Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway. *J Biol Chem* 1965;240:4382–92.
102. Barić I, Erdol S, Saglam H, Lovrić M, Belužić R, Vugrek O, i sur. Glycine N-methyltransferase deficiency: a member of dysmethylating liver disorders? *JIMD Rep* 2017;31:101-6.
103. Cook RJ, Wagner C. Measurement of a folate binding protein from rat liver cytosol by radioimmunoassay. *Arch Biochem Biophys* 1981;208:358–64.
104. Mudd SH, Wagner C, Luka Z, Stabler SP, Allen RH, Richard Schroer. Two patients with hepatic mtDNA depletion syndromes and marked elevations of S-adenosylmethionine and methionine. *Mol Genet Metab* 2012;105:228–36.

105. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:724–31.
106. Dominguez-Salas P, Moore SE, Cole D, da Costa KA, Cox SE, Dyer RA, i sur. DNA methylation potential: dietary intake and blood concentrations of one-carbon metabolites and cofactors in rural African women. *Am J Clin Nutr* 2013;97:1217-27.
107. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 2002;132:2361-6.
108. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:849–53.
109. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997;52:10-20.
110. van Guldener C, Stam F, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinaemia in chronic kidney disease: focus on transmethylation. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1026-31.
111. Stam F, van Guldener C, ter Wee PM, Kulik W, Smith DE, Jakobs C, i sur. Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:215-23.
112. Finkelstein JD. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *J Nutr* 2006;136:1750-54.
113. Musumeci O, la Marca G, Spada M, Mondello S, Danesino C, Comi GP, i sur. LOPED study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:5-11.
114. Lukacs Z, Cobos PN, Wenninger S, Willis TA, Guglieri M, Roberts M i sur. Prevalence of Pompe disease in 3,076 patients with hyperCKemia and limb-girdle muscular weakness. *Neurology* 2016;87:295–8.

# 11. PRILOZI

## Prilog 1. Anketni list za prikupljanje podataka o ispitanicima.

### Anketni list za istraživanje metaboličkih miopatija

Prezime i ime: .....

Prezime i ime roditelja (za djecu): .....

Datum rođenja: .....

Adresa: .....

Broj telefona: .....

Datum uzimanja uzorka: .....

Dob početka simptoma: .....

Ima li sličnih simptoma u obitelji? da  ne

Uzimate li lijekove? da  ne   
(ako da – koje?) .....

Simptomi i znakovi bolesti:

Slabost mišića ..... da  ne

Hipotonija mišića ..... da  ne

Nepodnošenje napora ..... da  ne

Grčevi u mišićima ..... da  ne

Bolovi u mišićima ..... da  ne

Odsutni tetivni refleksi ..... da  ne

Hiperaktivnost ..... da  ne

Manjak pažnje ..... da  ne

Otečeno tijelo pri rođenju ..... da  ne

Strabizam ..... da  ne

Nazalni govor ..... da  ne

Promjene na kosturu (skolioza, ....) ..... da  ne

Zaostatak u psihomotornom razvoju ..... da  ne

Zaostatak u mentalnom razvoju ..... da  ne

Pohađa redovitu školu ..... da  ne

Prohodao u dobi od ..... da  ne

Povremeno tamna mokraća ..... da  ne

Zatajenje jetre ..... da  ne

Dispneja ..... da  ne

Zatajenje disanja ..... da  ne

Povremeni gubitak svijesti ..... da  ne

Ostalo .....

Laboratorijski znakovi:

Povišena kreatin kinaza: trajno   
povremeno

Najviša vrijednost kreatin kinaze .....

Mioglobinurija da  ne

Povišene aminotransferaze: trajno   
povremeno

Ispunio: .....

Najviše vrijednosti aminotransferaza .....

Poremećaji zgrušavanja krvi da  ne   
ako da, navesti pokazatelje .....

Dokazana hipoglikemija da  ne   
ako da, najniža koncentracija .....

Hiperamonijemija da  ne   
ako da, najviša koncentracija .....

Homocistein - koncentracija .....

Metionin - koncentracija .....

Slikovne pretrage mozga

atrofija bijele tvari da  ne

zakašnjela mijelinizacija da  ne

ostalo .....

Biopsija mišića da  ne   
ako da – nalaz: .....

Biopsija jetre da  ne   
ako da – nalaz: .....

EKG uredan  patološki   
(ako patološki – kakav?) .....

UZV srca uredan  patološki   
(ako patološki – kakav?) .....

RTG srca uredan  povećana sjena

Elektromioneurografija uredna  patološka   
(ako patološka – kakva?) .....

Datum i mjesto: .....

Molimo Vas da ispunjeni formular vratite liječniku!



## Prilog 2.

Sekvenca PCR umnoška divljeg tipa za egzone 2 i 3 gena *AHCY*. Plavim podcrtanim slovima označena su mjesta za BsrBI, a crvenim za Bsp1286I. Zvezdicom je označeno mjesto polimorfizma rs13043752.

GTGGATCGGGGTCCATGCAGTGACCGCCCTCTTGGTTGGTGGGATGAGGGGACTCACGGAACTCC  
CACCTGTTTCCTCCCGTAGCCGACATCGGCCTGGCTGCCTGGGGACGCAAGGCCCTGGACATTGCT  
GAGAACGAGATGCCGGGCTGATGCGTATGCGGGAGCGG\*TACTCGGCCTCCAAGCCACTGAAGG  
GCGCCCGCATCGCTGGCTGCCTGCACATGACCGTGGAGACGGCCGTCCTCATTGAGACCCTCGTCA  
CCCTGGGTGCTGAGGTGAGGCCACAGCTGTATCACCCAGAGTCCTTGCCCTCCCTGGGTTCAGC  
CAGGGAAGAAGACGACTGTGCCAGGGTGGGGACCTTCCAGGTGTGGAGCTGACCGCGGGCCTGGA  
GGGTTCCCTCCCTCTACTCGTTCCTCCGTTTCCCAGTGCTGCCACCCCTTGTGGTGAGTGTTCTG  
CAGATTTTCTCCCTGGCTGGGAAGGTCACTGTTGGCTACCCTCAAGGCATCCTCCTGATGGATGCTC  
TGGCAGGAAAAATTCAACACCCATGTCTACTTAGTCTCTTAAGGGCCAGCTTGCCTTGGCCCTTCG  
GGGTCACAGGCCTACCCTGGACCCATCATGGCTGCTGGATGATGGCAGCTCTGATTGGTTCAGCC  
TGGGTCATGTGTGCCAATGATTAACAGCTCTCCTAAGGTCTCAGAGAGTCAAGAAGCAAGCTGGTT  
TCCCAAAGCAGGGTAGGGCAATGGAGCCAAAATCCACAGAGGGGCTCAGGGCTGAGTCCTTGA  
CCTCTTCTTTCTTTTCAGCATTCACTCTTGGCGGTCTGATTTTATAGCTTTAGACACTATCTGGTGAT  
GACTGTACATTTTTGTAAGCTAGCCTGGACTTCTCCTGGAAGTCAAGACTGGCATATCCAGGAGCGG  
GGGCGTTGACGCTCCCTGGAGGTCTAGTACTCATCTCAGGCAGAACGCGTTCAAACAGACTCAGGA  
TTTTCTGCCCCCTCTTCTTCCCAAAGCCTTCCCCACCTGAGTAAATGGAACCTCTGTTCCAGCCTTCT  
GGGTTCTCTCAATCACGAATCTGGGAGTCATCTCCTCCCCTCCCTTTCCTCCCCACTCCCAACTCCC  
TTTACTCCAACAACACTCATCCCTCTGCAAATCCTGTGAGTGCAGCCTTCCAGAGTAGACCCAGGATGTG  
ACAACTTCTCATCATCTCCACTGCTACTGTCATATTTCTTGTCTGGAGTCTTCTCCAACAGTCTCTGC  
AGTTGTCCCCTTGCTTCCACCCCTTCCCTTCCACACAGCACTGGAGTGAGGTTTTAAACCTGAGTT  
GGATCTCGCCCCTGCTCTGGCTCCCATCTGCCACCCAGCATCCCCAGCCTGTGATCCTAGAGCTTG  
CTGTGCCTAGATCCCAAGCCTCTCCCCACTACCCGAAGCTCTCCCTTTTCTCGCCCAGCGTCCCTG  
GTGCTTTTGAGCCATCAGTGACCAACAGCCTTGTGTTGATGGCTCTTCTAGGTGCAGTGGTCCAGCT  
GCAACATCTTCTCCACCCAGGACCATGCGGGCGGCTGCCATTGCCAAGGCTGGCATTCCGGGTAAGT  
CCTGCTTGCTTCTGAGACGTGGAATTTGTGAAGGGATTCTGCCCTCTTTGCTTCACTGACTGCTAGA  
GCAACAG

Sekvenca PCR umnoška za egzone 4 i 5 gena *AHCY*. Crvenim podcrtanim slovima su označena mjesta za Bsp1286I. Zvezdicom je označeno mjesto polimorfizma rs41301825.

CTGGAGCAGGTACCAGTTGGGAAGTCCAGGCCCTGATGTGCCACTCACCTCCAGTGTAT  
GCCTGGAAGGGCGAAACGGACGAGGAGTACCTGTGGTGCATTGAGCAGACCCTGTACTTCAAGGA  
**CGGGCC\***CTCAACATGATTCTGGACGACGGGGCGACCTACCAACCTCATCCACACCAAGTACC  
CGCAGCTTCTGCCAGGTGAGCAGGGCGGGGCAGGTGGGCTGGGTGCTGGTGGCTGGGTGGGGCC  
TGTTTGCCACATGATGGCCGCAGGCCTGGCAGGACTCCCATCACCTCAAGCAGCAGGATCTGGAA  
GATGGGAGGATGGCAGGCTCTGGCATTGCTGGGGCCTCCTGACTTCTGAGGGTGGCAGGCTAG  
GGCAGCTGAGCTGATGGCCCAAGGGCAGGCACAGACAGGGCCATGGTTGGGAATAGCTGGGAGGG  
AGCCAGCTTTGTTCAAAGCAGGTACGCAGAGTGCAGAGGCCCTGAGGCAGGAATGGCTGGAGTGT  
TCAGGAAACAGAAAAGAGGCCACAGGATAGCAGTGAGCAAAGGGAGCCTTCACTGCGGGTATGG  
TGTGAACTTCGTGAAGACCAGATGTGTCAGGGCCTAATAGGCCAATAGAAAAGTGTGTTGACCTGAT  
TTGCAGAGCAAGGGGAAATAACTGGAGGGCGTTGAGAAGATTTCTCTGAGAAGATAACATGTTAGA  
AATGGCTGCTGCATGGAGGATGGGTTGTGGTAGGGAGACTGGGAAGAAGCGACAGGGTCACGGAC  
TAGAGCAGCGGCAGTGAGAATAGAGAAGCTGGGAGTTGTTTCGGAGGCAGAGTCACTAGGCCTGGT  
GGTGGCTTCCCTGTAGGAGGGCGTTGGGGACTCCTCCCTCACGCGGGTCTGGGTGATTGGGGGGCC  
TGTGGGATCAGTCACAGAGATGGGAACCCAGAAAGAGGAATGGCTTTAGGGGGTAAAGATGAGGA  
ATTTGCAT**GAGCAC**AGGTGTGGCATCTCTGAGGCTTGTCCCTGTCCCCTCTTGTTTAGGCATCCGAGG  
CATCTCTGAGGAGACCACGACTGGGGTCCACAACCTCTACAAGATGATGGCCAATGGGATCCTCAA  
GGTGCCTGCCATCAATGTCAATGACTCCGTACCAAGGTGAGCCGAGGGGCAGTGACAGCTCCCGC  
TACAGTGGCTGCAGCTCA

## 12. KRATKA BIOGRAFIJA

Danijela Petković Ramadža je rođena 24. listopada 1979. u Šibeniku gdje je završila Gimnaziju Antuna Vrančića. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je diplomirala 2004. godine s odličnim uspjehom. Od 2005. do 2007. je bila znanstveni novak na Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Specijalizaciju iz pedijatrije je obavila od 2007. do 2012. godine. Od 2012. radi kao specijalist pedijatar u Zavodu za medicinsku genetiku i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Tijekom 2014. je tri mjeseca bila na specijalističkom usavršavanju iz bolesti metabolizma u Great Ormond Street Hospital u Londonu. Od listopada 2016. je na subspecijalističkom usavršavanju iz bolesti metabolizma u pedijatriji. U suradničkom zvanju asistenta na Katedri za pedijatriju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu je od siječnja 2017. Predavač je na poslijediplomskom studiju „Pedijatrija“. Kao autor ili suautor je publicirala više znanstvenih i stručnih radova od kojih je 15 indeksirano u bazi podataka *Current Contents*. Objavljeni radovi su citirani 430 puta. Uz domaće znanstvene projekte, sudjelovala je na nekoliko europskih projekata financiranih od strane Europske Unije, i to „Euroglycanet“, „E-IMD“, „E-HOD“ i „European galactosemia network“ kojeg je koordinator za Hrvatsku. Tajnica je Sekcije za bolesti metabolizma Hrvatskog pedijatrijskog društva. Udana je i majka dvoje djece.

**Danijela Petković Ramadža**

**DISERTACIJA**

**2018.**

