

# CISTIČNA FIBROZA



**Mentor: Prof. dr. Borut Štrukelj**

**Pripravili: Petra Blažič  
Polona Bukovec  
Manja Hohler  
Lara Kandič  
Stane Pajk**

**Ljubljana, 12.1.2006**

# KAZALO

<b>UVOD</b> .....	<b>3</b>
<i>Predstavitev bolezni</i> .....	3
<b>ZGODOVINSKI PREGLED</b> .....	<b>4</b>
<i>TRIDESETA- prvi jasen opis CF</i> .....	4
<i>ŠTIRIDESETA- CF kot generalizirana genetska okvara</i> .....	4
<i>PETDESETA</i> .....	5
<i>ŠESTDESETA</i> .....	5
<i>SEDEMDESETA</i> .....	5
<i>OSEMDESETA</i> .....	5
<i>DEVETDESETA</i> .....	6
<i>21 STOLETJE</i> .....	6
<b>GENSKA OSNOVA BOLEZNI</b> .....	<b>7</b>
<i>CFTR</i> .....	7
<i>Žleze znojnice</i> .....	8
<i>Dihalne poti</i> .....	9
<i>Ostali organi:</i> .....	10
<i>Mutacije v CFTR genu in njihove posledice</i> .....	10
<b>DIAGNOSTICIRANJE IN GENETSKO TESTIRANJE</b> .....	<b>11</b>
<i>Odkrivanje in potrjevanje genskih sprememb</i> .....	12
<b>SEDANJE TERAPIJE CISTIČNE FIBROZE (CF)</b> .....	<b>14</b>
<i>ZDRAVILA</i> .....	14
<i>OPERACIJE</i> .....	17
<i>GENSKO ZDRAVLJENJE</i> .....	17
<b>SMERNICE RAZVOJA V ZDRAVLJENJU CISTIČNE FIBROZE</b> .....	<b>21</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>23</b>

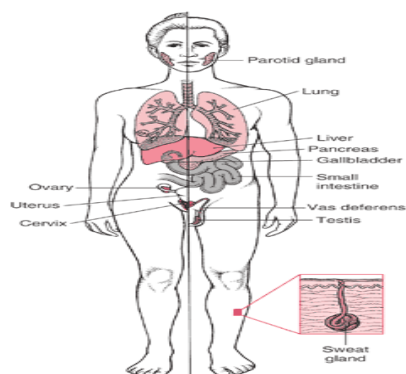
## Uvod

Cistična fibroza je dedna motnja, ki vpliva na mnoge telesne funkcije: dihanje, prebavo in razmnoževanje.

Ta doživljenjska bolezen se poslabša s starostjo in lahko prizadene tako moške kot ženske. Simptomi se razlikujejo med posamezniki. Večina pacientov ima tako respiratorne kot težave s prebavo, medtem ko imajo nekateri le težave z dihanjem.

Večina pacientov s cistično fibrozo je diagnosticiranih v otroštvu. Nekateri pacienti z blagimi ali neprepoznavnimi simptomi lahko ostanejo nediagnosticirani vse do obdobja odraslosti.

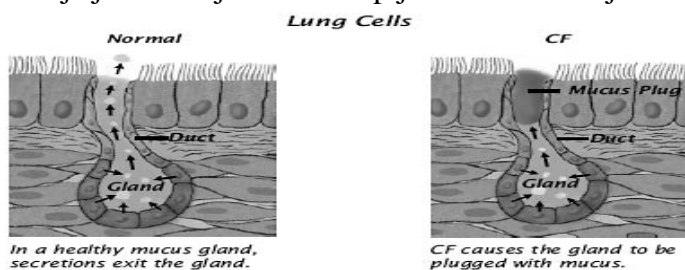
Pogosti simptomi so kronični kašelj, sopihanje, sinusne infekcije, nosni polipi, prekomerno nastajanje sluzi, ponavljajoče pljučnice, nezadostna rast, povečani konci prstov in slana koža. Zaenkrat še ne obstaja zdravilo za cistično fibrozo. Z zdravljenjem, s katerim nadzorujemo le simptome, izboljšamo dolžino in kvaliteto življenja. Tako se uporabljajo aerosoli za olajšanje dihanja, posturalna drenaža ali fizikalna terapija prsnega koša pa pomagata odstraniti sluz iz pljuč. Hospitalizacija je potrebna pri temeljitem odstranjevanju ali pri pljučnih infekcijah. Uživanje pankreatičnih encimov v sklopu obrokov pomaga pri prebavi hrane. Za vzdrževanje teže se priporočajo pogosti in visokokalorični obroki in prigrizki. Trenutno se za 50 % bolnikov pričakuje, da bodo dočakali 30 let.



Slika 1: Prikaz delov telesa, prizadetih pri cistični fibrozi

## Predstavitve bolezni

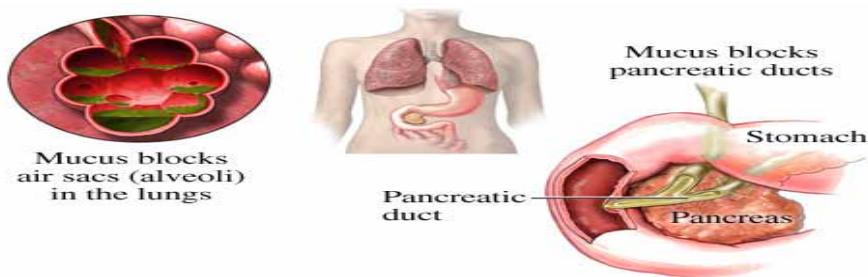
Cistično fibrozo povzroča gosta lepljiva sluz, ki se kopiči v dihalnih poteh, nosu, grlu, trebušni slinavki in črevesju. Sluz maši majhne zračne cevčice v pljučih (bronhiole), jih draži in sili na kašelj, otežuje dihanje in izčrpava celo telo. Mašenje bronhiol povzroča okvaro zračnih mešičkov (emfizem), zato pljuča izgubljajo prožnost, otrdevajo in se napihujejo (značilen sodčast prsni koš), zračne poti se zožujejo in deli pljuč se postopno sesedajo (atelektaza). Če se cistična fibroza ne zdravi, se pljuča zaradi kopičenja sluzi vse bolj mašijo, dihanje je vse bolj oteženo in pljuča se lahko trajno okvarijo.



Slika 2 : Zamašitev žleznih celic v pljučih z gosto sluzjo

Moški so ponavadi neplodni, pri ženskah pa je plodnost lahko zmanjšana zaradi gostih izločkov v reprodukativnem traktu.

V trebušni slinavki (pankreasu) gosta sluz maši mrežo drobnih vodov, ki se iztekajo v skupen pankreasov vod, slednji se izliva v žolčevod, ta v dvanajstnik in slednji v tanko črevo. Pankreas tvori encime, ki razkrajajo ogljikove hidrate, beljakovine in maščobe, zaradi sluzi pa je njihovo izločanje ovirano, zmanjšano in trebušna slinavka začne grudasto otekati, se brazgotiniti, krčiti in čez čas lahko neha delovati.



Slika 3 : Prikaz zamašitve alveolov in pankreatičnih vodov s sluzjo

Prebava je zaradi pomanjkanja prebavnih sokov iz slinavke vse bolj oslABLJENA in ovirana, povečuje se količina blata, ki smrdi, vsebuje veliko maščob in delno prebavljeno hrano. Zaradi pomanjkanja hranil začne telo kazati znake podhranjenosti, pri otrocih trebušček nabrekne, oboleli otrok pa začne hujšati in ima povečan tek.

Pri novorojencu je zaradi zamašitve pankreatičnih vodov in neizločanja encimov prebava oslABLJENA že, ko je bil še v materinem trebuhu. V takem primeru lepljiv gosti mekonij zamaši črevesje, pogosto na več mestih, in povzroča črevesni zastoj ali zožitev črevesja (mekonični ileum). Običajno se pojavlja pri 15 % novorojenčkov s cistično fibrozo; medicinsko se taka črevesna zožitev oz. prebavni zastoj odpravlja z operacijo.

## ZGODOVINSKI PREGLED

### TRIDESETA- prvi jasen opis CF

Dorothy Andersen je podala natančen opis obdukcije devetinštiridesetih pacientov s CF v trebušni slinavki. Primerjala je spremembe epitelijskega tkiva, ki so nastale pri CF, s spremembami epitelijskega tkiva pri pomanjkanju vitamina A. Domnevala je, da je pomanjkanje slednjega vitamina pripomoglo k nastanku bolezni.

### ŠTIRIDESETA- CF kot generalizirana genetska okvara

V teh letih je bila CF spoznana kot generalizirana okvara in opisana kot mukoviscidoza (sinonim za neobičajno izločanje iz epitelijskega tkiva). Podoben pojav je bil prepoznani kot pokazatelj recesivne oblike dedovanja. Smatralo se je, da je za celotno ekspresijo genetske napake

potreben še dodatni faktor. Ta naj bi bil pomanjkanje vitamina A. Ugotovili so tudi, da je prisotnost infekcije, eden od bolj očitnih faktorjev, ki oslabi respiratorno funkcijo in poveča učinek genetske mutacije.

Dietno zdravljenje CF je v štiridesetih letih temeljilo na visoko proteinski dieti, na uživanju velikih odmerkov vitamina A in uživanju surovih pankreatičnih izvlečkov s hrano. Ti izvlečki so bili na voljo že od leta 1930. Njihovo uporabo pri pacientih s prirojeno pankreatično okvaro je raziskala Dorthy Andersen. Bolnikom je priporočala dieto z zelo malo maščobami in več proteini, z neomejeno količino sadja, zelenjave in sladkorja. Andersenova je tudi poudarila, da se mora dietna terapija pričeti čimprej, saj je učinkovitost zdravljenja odvisno od stopnje in tipa infekcije respiratornega trakta.

## **PETDESETA**

Diagnoze so bile osnovane na osnovi kliničnih simptomov in z znaki, ki so bili značilnost pankreatične insuficience. Ponavadi so diagnozo potrdili na osnovi progresivnega kliničnega poteka in hitre smrti.

Čeprav je bil pankreatin na voljo že v tridesetih, so v Londonu raziskovalci šele sedaj objavili prve objektivne dokaze o terapiji s pankreatičnimi encimi pri otrocih s CF.

## **ŠESTDESETA**

V tem času je bilo preživelih bolnikov s CF zelo malo. Večina otrok je umrla v otroštvu zaradi gnojne pljučne bolezni, ki so jo povezovali z nezadostno prehrano. Manj kot danes so poudarjali odnos med prehrano, imunološkim stanjem in preživetjem. V šestdesetih sta postali bolj splošno dostopni dve pomembni preiskavi- iontoforezni test znojenja s pilokarpinom in biopsija zgornjega tankega črevesa pri otrocih. Na osnovi teh dveh preiskav je bilo razvidno ali gre za trebušno bolezen ali za CF. Skozi desetletje je bilo mnogo pristopov, s katerimi so se borili proti prehrabnim posledicam neprizanesljivih prsnih infekcij. Pri bolnikih s terminalnim stadijem CF so velike doze anabolnih steroidov delovale dobrodejno. Navkljub njihovim očitnim stranskim učinkom so ostali še nekaj let del prehrane v klinikah, saj se je izkazalo, da so izboljšali kvaliteto življenja mnogih pacientov.

## **SEDEMDESETA**

Sedemdeseta so bila zaznamovana z naraščajočim interesom opazovanja resnosti in intenzivnosti prehrabnih problemov, medtem ko je preživetje stabilno naraščalo. Višina in teža otrok s CF sta takrat postali bistven kriterij zdravljenja in diagnoze. Tipičen prehraben nasvet za dojenčke in otroke s CF se je nagibal k bolj svobodni dieti in ne k striktno določeni prehrani. Starejšim otrokom s CF je bilo priporočeno 30-40 g maščob, 4-5g proteinov dnevno ter okrog 200 Kcal/kg dnevno.

## **OSEMDESETA**

Osemdeseta je zaznamoval izrazit znanstveni napredek. Leta 1989 so znanstveniki identificirali gen za CF na kromosomu 7. Ugotovili so, da sintetizira protein imenovan CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Ta protein transportira sol in vodo iz in v celice na površini pljuč in prebavnega sistema.

## **DEVETDESETA**

Precejšnje prehrambeno zanimanje v zgodnjih devetdesetih je bilo nekako zakrito z identifikacijo CF gena v letu 1989 in očitnim potencialom terapije nadomestnega gena. Osnovne zakonitosti prehrane so bile do tega trenutka že zelo dobro zasnovane. Zato so veliko pozornosti posvetili pacientom, ki so kljub pravilno postavljeni dieti še vedno imeli prehrabne težave. Pomembno je bilo tudi okoristiti vse paciente z novostmi, ki jih je prinesel pomemben prehrabni napredek iz osemdesetih.

### **Leto 1990**

Raziskovalci so naredili kopijo CF gena in ga uporabili za popravilo človeških CF celic v laboratoriju.

### **Leto 1992**

Znanstveniki so testirali in zasnovali različne nove metode genske terapije za dostavo normalnega gena v pljuča ljudi s CF.

### **Leto 1993**

V prvi objavljeni študiji o genski terapiji CF se je poročalo, da je mogoče celice s CF popraviti z gensko terapijo. Po tridesetih letih so tudi razvili prvo novo zdravilo za zdravljenje CF z imenom Pulmozyme. FDA ga je odobrila samo pet let potem, ko so ga naredili v laboratoriju.

### **Leto 1995**

Rezultati štiriletne klinične študije so pokazale, da ibuprofen v velikih odmerkih zmanjša vnetje v pljučih pri ljudeh s CF. Prvič so tudi uporabili liposome kot transportni sistem za vnos CF gena .

### **Leto 1997**

Znanstveniki so začeli strukturirati genom bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki je najbolj pogost povzročitelj pljučne infekcije pri CF. FDA je odobrila zdravilo TOBI ( raztopina tobramicina za inhaliranje) , ki je prav tako za zdravljenje pljučnih infekcij pri CF. Rezultati kliničnih študij so pokazali, da izboljšana verzija navadnega antibiotika popravi funkcijo pljuč pri bolnikih s CF in zmanjša število dni v bolnišnici.

### **Leto 1998**

Društvo za CF je ustvarilo razvojni terapevtski program, s čimer je vzpodbudila razvoj novih CF terapij. Ta program je preko terapevtsko razvojne mreže ( Therapeutics Development Network, TDN) sedmih specializiranih CF centrov zagotavljal infrastrukturo in sredstva, ki so bila potrebna za izvedbo kliničnih preiskav v zgodnjih fazah. Prvo uporabljeno zdravilo v teh preiskavah je bilo INS365. Zanj so dokazali, da preko povečanega prehoda kloridnih ionov v CF celice, izboljša izločanje v pljučih.

## **21 STOLETJE**

### **Leto 2001**

Izdelan je bil mikročip, ki je vseboval ves genetski zapis bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Leto 2002**

Klinične raziskave so pokazale, da se je pri pacientih, ki so jemali antibiotik azitromicin , funkcija pljuč značilno izboljšala, hospitalizacija pa se je zmanjšala skoraj za 50% .

### **Leto 2003**

Znanstveniki so določili tridimenzionalno strukturo bistvenega dela CFTR proteina. Sedaj so lahko načrtovali zdravila, s katerimi je bilo mogoče popraviti okvarjen CFTR protein.

## Genska osnova bolezni

Bolezen se deduje avtosomno recesivno. Pogostost te bolezni je 1/3000.

Geni se dedujejo v parih, po en gen od vsakega starša. Do cistične fibroze pride, ko sta oba pridobljena gena mutirana. Oseba s cistično fibrozo podeduje po en CF gen od vsakega od staršev. Starša otroka s CF nosita vsak po eno funkcionalno in eno nefunkcionalno kopijo gena. Starša sta tako prenašalca (imata en delujoč gen) in brez simptomov.

Največ prenašalcev cistične fibroze je med kavkazijskimi posamezniki s predniki iz severne Evrope.

### CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

Leta 1949 je Lowe ugotovil, da cistično fibrozo povzroči napaka v enem samem genu na kromosomu 7, zato je okvarjen tudi en sam protein, imenovan cistično fibrozni transmembranski regulator prevodnosti (CFTR).

CFTR protein spada glede na strukturo v družino ATP-az oz. družino ABC (ATP-binding cassette). Sestavljen je iz dveh ATP-hidrolizirajočih domen, ki jih imenujemo tudi nukleotid-vezavne domene, in dvanajstih transmembranskih alfa heliksov.

ABC proteini sodelujejo kot mediatorji transporta raztopljenih organskih snovi.

Ker CF kloridni kanali ne potrebujejo hidrolize ATP in ker ABC družina proteinov ni karakteristična za druge ionske transporterje, so sprva mislili, da CFTR protein indirektno regulira kloridno permeabilnost celic preko drugih poti in sam ne sodeluje kot kloridni kanal.

Welsh je dokazal, da je ekspresija CFTR v celicah brez kloridnih kanalov, povzročila pojav novih poti ki so omogočale kloridno permeabilnost. To pa še vedno ni razlikovalo ali CFTR deluje kot kloridni kanal ali kot regulator anionske prevodnosti. Nadaljnje raziskave so pokazale, da točkovne mutacije v CFTR genu povzročijo komaj opazne spremembe v ionski selektivnosti in prevodnosti kanalov, kar kaže na to, da CFTR deluje kot kloridni kanal.

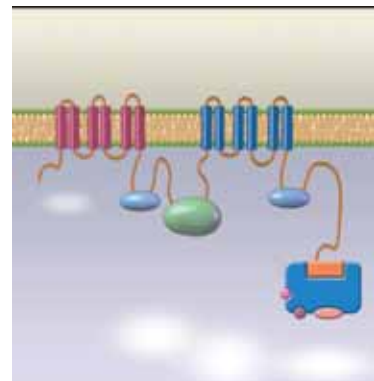
Bear je prvi sintetiziral CFTR protein in ugotovil, da čisti CFTR deluje kot ionski kanal, ki je reguliran preko cikličnega AMP, ta pa je reguliran preko protein kinaze A.

### Funkcije CFTR proteina

- Zmanjša transport natrijevih ionov predvsem v epiteljskih Na<sup>+</sup>kanalih
- Regulira od Ca<sup>2+</sup> odvisne Cl<sup>-</sup> in K<sup>+</sup> kanale
- Sodeluje pri eksocitozi in nastanku molekularnih kompleksov v plazemski membrani

### Struktura CFTR proteina

Protein je sestavljen iz 1480 aminokislin in večih globularnih in transmembranskih domen. Zadnje tri aminokisliline-TRL (treonin, arginin in levcin) so odgovorne za pritrnitev proteina na PDZ tip receptorjev, ki je v bližini ostalih membranskih receptorjev (npr. intracelularnih signalnih proteinov), ionskih kanalov in citoskeleta. Ti proteini vplivajo na različne funkcije CFTR, kot so prevodnost, regulacija ostalih kanalov, transdukcija signalov in lokalizacija na apikalni plazemski membrani.



Slika 4: struktura CFTR proteina

Protein kinaza A aktivira protein preko fosforilacije. Aktivnost kanala pa je regulirana z dvema globularnima nukleotid-vezavnima domenama, ki omogočata odprtost oz. zaprtost kanala.

Vsaka transmembranska globularna domena vsebuje šest alfa heliksov, ki prebadajo membrano, le te tvorijo pore, ki omogočajo prehod klorida.

Regulatorno domeno predstavlja del proteina, ki se fosforilira s protein kinazo A.

### Mutacije CFTR proteina

Mutacija CFTR gena onemogoča pravilo sintezo proteina, ki sodeluje v transmembranskem prenosu  $\text{Cl}^-$  ionov, zaradi česa se v telesu zadržuje prebitna količina NaCl in se tvori gost in lepljiv mukus ter preslan pot. Najbolj prizadete so žleze znojnice, pankreas, pljuča, srce (aritmije) in črevesje. Pride lahko do popolne azoospermije in neplodnosti, najpogostejši vzrok smrti pa so pljučne infekcije (*Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Aspergillus fumigatus*,...)

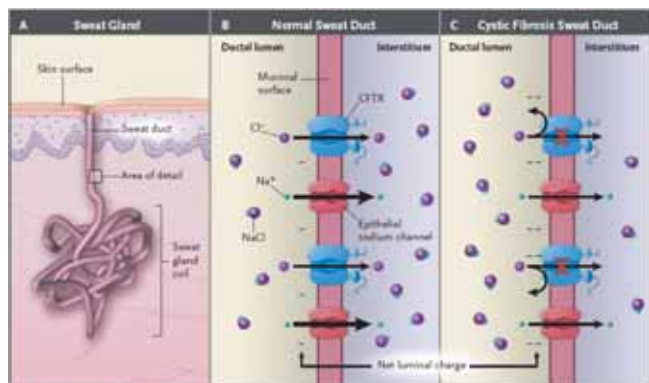
Pomanjkanje CFTR proteina vpliva na izražanje ostalih genskih produktov, predvsem proteinov, ki so pomembni pri vnetnih procesih, procesih razvoja, ionskem transportu in celičnem signaliziranju. Ti proteini so odgovorni za fenotip cistične fibroze in nam omogočajo razlikovanje med različno hudimi oblikami bolezni pri pacientih z enako mutacijo na CFTR genu.

### **Žleze znojnice**

Pri cistični fibrozi pride do napak v ionskem transportu in/ali v homeostazi soli, kar povzroči poškodbo različnih organov. Natančne molekularne osnove mehanizma bolezni še niso znane, dobro pa so raziskane spremembe v žlezah znojnicah pri pacientih s cistično fibrozo. Do obstrukcije znojnic pri CF ponavadi ne pride, prav tako ni vidnih večjih patoloških abnormalnosti, pojavijo pa se močno izražene abnormalnosti v homeostazi klorida.

### Mehanizem, ki razloži povečano koncentracijo soli v potu pacientov s CF:

V normalnih pogojih se klorid reabsorbira preden pride pot na površino kože. Najpomembnejša pot za reabsorpcijo klorida je preko CFTR proteina, ki leži v luminalni plazemski membrani celic, ki obdajajo izvodilo. Pri pacientih s CF pa pride do pomanjkanja funkcionalnega CFTR, tako pride do onemogočene reabsorpcije klorida. Ker se klorid učinkovito ne absorbira po nobeni drugi poti, za reabsorpcijo  $\text{Na}^+$  pa



obstajajo še druge poti, pride do povečanja razlike v transepitelne potencialu preko stene žleznega izvodila in lumen postane 2-3x bolj negativno nabit. Totalna količina reabsorbiranega  $\text{Na}^+$  se zmanjša. Posledica tega je zmanjšana reabsorpcija NaCl iz pota, kar povzroči povečanje količine soli v izločenem potu.



## Dihalne poti

### Modeli, s katerimi razlagamo razliko v transepiteltnem potencialu dihalnih poti pri CF

V normalnih pogojih se NaCl absorbira iz dihalnih poti preko luminalne (apikalne) membrane epitelnih celic dihalnih poti.

Negativno nabit lumen dihalnih poti je posledica relativne nepermeabilnosti membrane za klorid v primerjavi s permeabilnostjo za Na<sup>+</sup>.

Razliko v potencialu lahko razložimo z dvema modeloma:

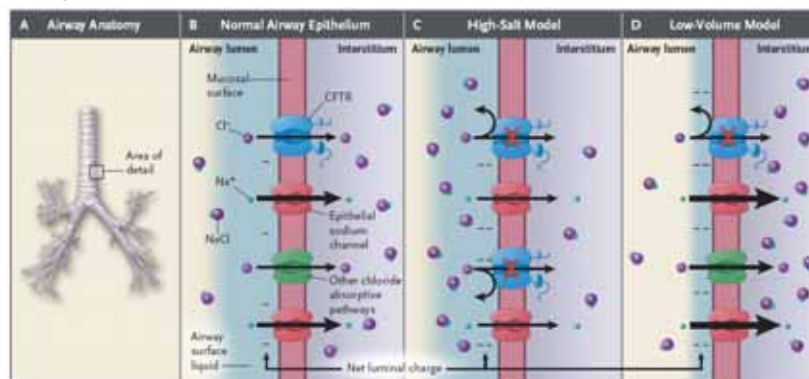
1. **High-salt model:** Mehanizem je tak kot v žlezah znojnicah. Zaradi pomanjkanja CFTR pride do zmanjšane reabsorpcije klorida iz tekočine na površini dihalnih poti. Ker pa se Na<sup>+</sup> še vedno lahko reabsorbira (preko Na<sup>+</sup> kanalov), dobi površina dihalnih poti (lumen) negativen naboj.

Kljub temu, da se Na<sup>+</sup> lahko reabsorbira, se totalna reabsorpcija NaCl zmanjša, ker se zmanjša reabsorpcija tistih Na<sup>+</sup> ionov, ki spremljajo Cl<sup>-</sup>.

Povečana količina NaCl v dihalnih poteh inaktivira protimikrobne peptide, kar poveča možnost bakterijskih infekcij pri pacientih s CF.

2. **Low-volume model:** Ta model vključuje tudi zmanjšano odvajanje tekočine iz površine dihalnih poti in tako razloži mukozno obstrukcijo dihalnih poti. Mehanizem je nasproten tistemu v žlezah znojnicah. Po tej teoriji pride do hiperabsorpcije Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup>. Dihalne poti pacientov s CF so nekoliko manj prepustne za kloridne ione kot za natrijeve, kar povzroči porast v razliki potencialov. V pljučih pa je možen transport klorida tudi po drugih poteh, zato pride do relativnega povečanja absorpcije Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> in tekočine. To povzroči dehidracijo dihalnih poti in okvarjen mukocilijarni transport.

Oba modela predvidevata, da pride v dihalnih poteh do zmanjšane sposobnosti sekrecije klorida skozi CFTR.



Slika 5: Modeli, ki razložijo razliko v potencialu

Pljuča so tisti organ, ki ga CF najbolj prizadene. V pljučnih alveolah zastaja sluz, ki je zelo gosta in prekrije veliko površino bronhiolov, to pa zelo zmanjša površino, preko katere se izmenjujejo plini. Oksigenacija krvi je zmanjšana (možna respiratorna acidoza). Hkrati pa mukus predstavlja ugoden medij za razvoj mikroorganizmov. Ob infekciji se aktivira pljučni imunski sistem, celice imunskega sistema pa sproščajo encime, ki poleg mikroorganizmov uničijo tudi celice pljuč. Kronične infekcije močno poškodujejo pljuča.

## Ostali organi:

Abnormalnosti v absorpciji klorida in protimikrobni funkciji s katerimi lahko razložimo disfunkcijo pljuč pri pacientih s CF pa niso vzrok za disfunkcijo ostalih organov, ki so prizadeti pri CF (pankreas, črevesje, jetra...). Pri teh tkivih reabsorpcija  $\text{Na}^+$  variira, reabsorpcija klorida preko CFTR in tekočine pa je v vseh tkivih okvarjena.

### Pankreas:

Pankreas normalno izloča preko svojih izvodil v tanko črevo lipaze, amilaze in proteaze, ki omogočajo prebavo hrane. Preko CFTR proteina prehaja poleg  $\text{Cl}^-$  v duktus tudi voda, ki spira te encime proti tankemu črevesu. Če je CFTR protein okvarjen,  $\text{Cl}^-$  ioni ne prehajajo, zato tudi ni vode, ki bi odplavila encime. Encimi zastajajo v izvodilu in začnejo razgrajevati proteine na površini pankreasnih celic. Posledice tega so nekroza, vnetje in zamašitev pankreasa z mukusom.

## Mutacije v CFTR genu in njihove posledice

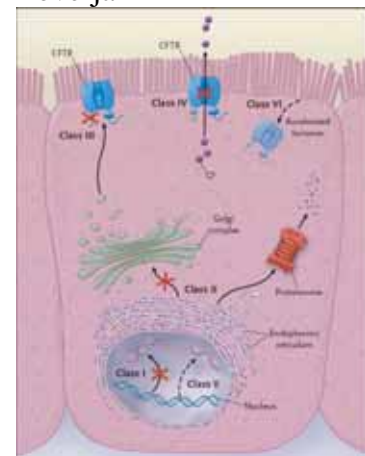
CFTR gen vsebuje okoli 180000 baznih parov na dolgi roki kromosoma 7. Poznanih je več kot 1000 mutacij, ki so povezane z nastankom bolezni. Mutacije klasificiramo glede na mehanizem po katerem pride do nastanka bolezni.

Mutacije v CFTR genu razdelimo v 6 razredov:

- **Razred I** – mutacije, katerih posledica je pomanjkljiva sinteza proteina
- **Razred II** – mutacije, zaradi katerih pride do okvarjenega razvoja proteina ali prezgodnje degradacije le-tega
- **Razred III** – mutacije, zaradi katerih pride do disorientirane regulacije proteina (npr. mutacija G551D, ki je vzrok za abnormalno funkcijo nukleotid-vezavne domene, ATP se zato nanjo ne mora vezati, ne pride do hidrolize)
- **Razred IV** – mutacije, zaradi katerih pride do okvarjene kloridne prevodnosti (npr. mutacija A455E, ki povzroči le delno prevodno aktivnost CFTR proteina, ta mutacija je povezana z manj hudo prognozo bolezni pljuč)
- **Razred V** – mutacije, zaradi katerih pride do zmanjšane števila CFTR transkriptov, ki so posledica abnormalnosti promotorja ali abnormalnosti pri splicingu
- **Razred VI** – mutacije, zaradi katerih pride do pospešenega turn-overja

Ena od 25 najpogostejših mutacij se imenuje  $\Delta\text{F508}$  in je prisotna pri približno 70% vseh okvarjenih alelov in pri 90% pacientov s CF v ZDA. Spada v razred II. Pri tej mutaciji pride do pomanjkanja fenilalanilnega preostanka na poziciji 508. Posledica mutacije je nastanek sicer funkcionalnega proteina, ki pa ga proteaze prezgodaj razgradijo, ker ga prepoznajo kot narobe zvitega.

5-10% mutacij je posledica prezgodnjega krajšanja ali nesmiselnih alelov.



Slika 6: Razredi mutacij

## Diagnosticiranje in genetsko testiranje



1. Prisoten mora biti vsaj en klinični znak:
  - motnje dihanja
  - motnje prebave in malabsorpcija
  - obstruktivska azoospermija
  - sindrom izgube soli



2. Poleg kliničnega znaka je potreben vsaj en dokaz o moteni funkciji CFTR
  - koncentracija  $\text{Cl}^-$  v znoju nad 60 mmol/l
  - abnormalna vrednost razlik v nazalnem transepitelijskem potencialu
  - mutacija gena CFTR

- **Testiranje znoja (Sweat test):** merjenje količine soli ( $\text{NaCl}$ ) v znoju. Naprava za zbiranje znoja se namesti na (otrokovo) kožo, poleg tega pa se aplicira brezbarvna snov, ki povzroči potenje. Ko se zbere dovolj znoja, se le ta analizira na  $\text{Na}^+$  in  $\text{Cl}^-$ . Za diagnozo CF je potrebnih več nenormalnih testov znojenja. Poleg tega pa obstajajo tudi druga stanja, ki kažejo povišane elektrolite v znoju.



Slika 7 : Izvajanje testa znojenja

- **Imunoreaktivni tripsinogeni test (IRT):** kri, ki se vzame 2-3 dni po rojstvu, se analizira na specifični protein tripsinogen. Pozitivni IRT test moramo potrditi s testom znojenja in drugimi. Test se uporablja tudi kot pomoč pri diagnosticiranju pankreatične insuficience pri otrocih in odraslih.
- **Drugi testi:** rentgen prsi (prsnega koša), test pljučne funkcije, pregled kultur sputuma, preiskava blata (za identifikacijo tipičnih prebavnih nenormalnosti).
- **Molekularno genetsko testiranje:** vključuje presejevanje (screening) prenašalcev in direktno DNA analizo. S trenutno dostopnimi testi ne moremo zaznati vseh od več kot 900 mutacij, tako da so ti testi le 80-85% zanesljivi.

Poznamo več vrst genetskih preiskav.

**Diagnostična genetska preiskava** s katero lahko dokončno potrdimo prisotnost predvidene dedne bolezni glede na prisotne simptome. DNA testiranje lahko izvedemo v katerikoli starosti, pogosto je potrebnih več genskih preiskav. Pri cistični fibrozi analiziramo 25 mutacij. **Napovedne genetske preiskave** izvajamo pri asimptomatskih osebah zaradi družinske anamneze.

Ko se v družini pojavi bolnik z dedno boleznijo ( cistično fibrozo ), lahko pri sorodnikih izvedemo *genetično testiranje prenašalcev*.

*Prenatalne genetske preiskave* vključujejo analizo zarodkove DNA. Izvajamo jih med 10. in 15. tednom nosečnosti, če obstaja povečano tveganje za prisotnost dedne napake pri zarodku. Ponavadi gre za invazivne postopke pridobivanja fetusove DNA, predhodno pa moramo potrditi mutacije pri bodočih starših.

*Presejalno genetsko testiranje novorojencev* ni diagnostično orodje, ampak nam pomaga identificirati posameznike za nadaljnje diagnostične posege.

## Odkrivanje in potrjevanje genskih sprememb

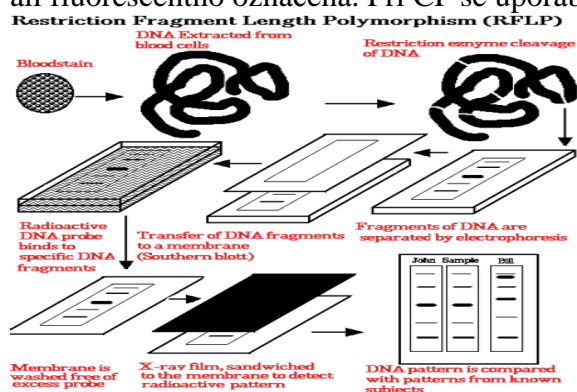
Tako pred presejalnimi kot pred metodami za določitev znanih mutacij najprej uporabimo reakcijo verižnega pomnoževanja (PCR), s katero del DNA pomnožimo do količin primernih za nadaljnjo manipulacijo.

### Presejalne metode za odkrivanje mutacij

- *Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov* ( Restriction fragment length polymorphism, RFLP ) : uporaba specifičnih endonukleaz, ki cepijo na določenih mestih. Pri tem imamo dve možnosti:

- v primeru mutacije ne bo prišlo do cepitve ( mutacija odpravi restrikcijsko mesto ), dobili bomo le dolge, nerazcepljene fragmente;
- ob mutaciji lahko pride do nastanka restrikcijskega mesta in s tem do cepitve

Restrikcijski encimi prerežejo DNA na točno določenih mestih in tako naredijo zbirko fragmentov DNA, ki imajo točno definirano dolžino. Fragmente lahko ločimo z elektroforezo, ter enega ali več fragmentov vizualiziramo z uporabo sonde, ki je komplementarna določenemu zaporedju nukleotidov v enem ali več restrikcijskih fragmentih in je radioaktivno ali fluorescentno označena. Pri CF se uporablja mešanica sond za najbolj pogoste mutacije.

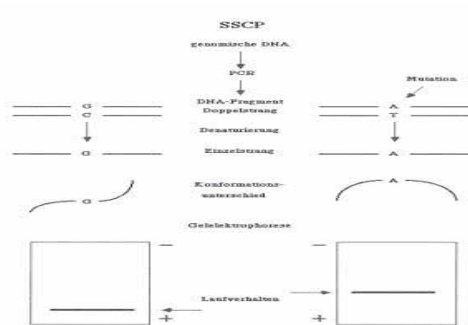


**Slika 8 :** Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov

- *Analiza polimorfizmov konformacij enoverižnih DNA* ( Single stranded DNA conformational polymorphism, SSCP )

Stopnje: denaturacija DNA (produktov PCR)  
elektroforeza enoverižnih DNA  
identifikacija lis

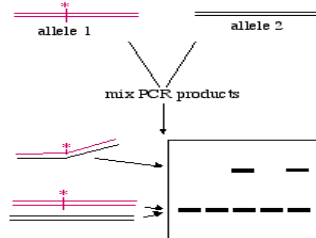
Princip je tak, da mutirana enoverižna DNA zavzame drugačno konformacijo, tako nastanejo razlike v potovanju pri elektroforezi.



Slika 9: Analiza polimorfizmov konformacij enoverižnih DNA

- *Heterodupleks analiza ( HA )*

Če vzorčni (mutirani) DNA dodamo enak del DNA z normalnim zaporedjem nukleotidov in zmes denaturiramo, bo pri renaturaciji prišlo do navzkrižnega kombiniranja enoverižnih DNA in nastali bodo t.i. heterodupleksi. Ti se po mobilnosti ločijo od homodupleksov z normalnim oz. mutiranim zaporedjem.



Slika 10: Prikaz principa heterodupleks analize

- *Metode za direktno sekveniranje DNA (DNA sequencing)*

Metode za določanje znanih mutacij

- *Hibridizacijske metode*

Zaporedje v vzorčni DNA potrdimo z DNA sondo. V primeru mutacije se sonda ne veže. Metode vključujejo naslednje korake:

1. denaturacija vzorčne DNA
2. izbira sonde
3. hibridizacija

V to skupino spadajo : Dot Blot hibridizacija, Sandwich hibridizacija, Southern prenos (Southern Blot analiza), ASO(Metoda z uporabo alelna specifičnih oligonukleotidov).

- *Metoda z uporabo alelna specifičnih oligonukleotidov (ASO)*

- *DNA mikromreže*

Gre za avtomatizirano metodo, ki omogoča detekcijo večih mutacij. Na polimerni nosilec so vezani oligonukleotidi- sonde, ki so nameščene na točno določena mesta (obstaja nek

koordinatni sistem). Zaporedje sonde poznamo (vemo, za katero mutacijo je sonda). Na mrežo nanese PCR produkt pacienta. Z vezavo enoverižne DNA na komplementarno zaporedje reagenčne lahko potrdimo prisotnost mutacij.

## **Sedanje terapije cistične fibroze (CF)**

Zaenkrat je možno izboljšati kakovost življenja bolnikov in družine le z zmanjševanjem simptomov in zakasnitvijo smrti, vzrok bolni pa ostaja v bolniku

Znana mutacija v le enem samem genu v teoriji pomeni, da je cistična fibroza (CF) ena prvih bolezni, kjer bi lahko uporabili pristop genskega zdravljenja. Bolnik prejme kopijo zdravega gena, izrazi se funkcionalen protein, vzrok odstranjen, somatsko zdravljenje uspelo. Še boljše, okvaro zatreti že v kali, zamenjati okvarjen gen že v zarodnih celicah! Vendar se v realnosti pojavijo številne ovire. Druga rešitev je uporaba zdravil, s katerimi kontroliramo okvarjen gen, vendar je do danes možno le zmanjšati in kontrolirati simptome. Do sedaj se je zvrstila široka zbirka antibiotikov, nadomestnih encimov (prebavni encimi trebušne slinavke, antitripsin  $\alpha_1, \dots$ ), bronhodilatatorji, kar seveda prinaša kombinacije neželenih učinkov zdravil. V skrajnem primeru je možna presaditev pljuč ali pljuč in srca.

Danes velja, da je CF genetska okvara, ki ne more biti preprečena. Bolniki za izboljšanje svojega življenja upoštevajo tudi naslednje napotke:

- Redna imunizacija, dodatno proti pnevmokokom in gripi
- Nekajenje in izogibanje pasivnemu kajenju
- Uporaba dodatnih tehnik čiščenja zračnih poti, kot so posturalna drenaža, vaje za globoko dihanje, ...
- Hranljivi, visoko kalorični obroki, visok vnos tekočine, poleti povečan vnos soli, ...
- Redni pregledi in pogosti testi, sledijo svojemu načrtu zdravljenja
- Fizične aktivnosti (šport, vaje)

## **ZDRAVILA**

1. Antibiotiki
2. Bronhodilatatorji
3. Antiholinergiki
4. DNAze
5. Mukolitiki
6. NSAR
7. Stabilizatorji membrane
8. Kortikosteroidi
9. Nadomestni encimi
10. Zdravila, ki vplivajo na CFRT

### **Ad 1) ANTIBIOTIKI**

Uporabljajo se predvsem v odvisnosti od povzročitelja infekcije pljuč:

- ciprofloksacin
- ofloksacin
- tobramicin
- gentamicin

- azitromicin
- cefaleksim
- piperacilim
- cefaklor
- imipenem

Farmacevtske oblike: tablete, aerosoli, intravensko. Raziskave so pokazale, da inhalirani antibiotiki, predvsem aminoglikozidi (tobramicin, gentamicin), kljub draženju na kašelj, imajo manj sistemskih stranskih učinkov.

#### Ad 2) BRONHODILATATORJI

Uporabljajo se za zvečanje prehodnosti dihalnih poti, olajšujejo izkašljevanje:

- bitilterol mezilat
- albuterol
- terbutalin sulfat

Aplikacija: inhaliranje, peroralna, injiciranje. Zadnji 2 aplikaciji sta namenjeni bolnikom, ki ne morejo inhalirati zdravila.

Uporaba salmeterola kot nadomestnega bronhodilatatorja se odsvetuje. Prav tako je priporočeno posvetovati se glede uporabe drugih bronhodilatatorjev ali zdravil, ki olajšujejo izkašljevanje.

#### Ad 3) ANTIHOLINERGIKI

Preprečujejo zoževanje bronhialnih poti, olajšajo dihanje, še posebej v kombinaciji z bronhodilatatorji, ne pa pri vseh bolnikih. Delovanje nastopi v 15 minutah, traja do 6 ur:

- ipratropijev bromid

Aplikacija: inhalanda, nebulizatorji. Potrebne še dodatne raziskave.

#### Ad 4) DNAze

Imunski sistem odgovarja na okužbo z aktivacijo celic bele krvne vrste, ki pa po odmrtnju povečajo gostoto mukusa (sproščena DNA). DNAza prispeva k utekočinjanju in redčenju mukusa:

- $\alpha$ -dronaza
- rhDNAza

Dostopna v obliki aerosola. Pri nekaterih povzroča draženje grla in laringsa.

#### Ad 5) MUKOLITIKI

Čeprav uporaba mukolitikov povečuje tvorbo mukusa, je le-ta redkejši in se lažje izkašljeuje. Deluje le pri nekaterih bolnikih:

- acetilcistein

#### Ad 6) NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI

Zmanjšujejo bolečino, predvsem pa vnetje tkiva (pljuča), kar zmanjšuje poškodbe in olajša boj proti okužbi:

- ibuprofen

#### Ad 7) STABILIZATORJI MEMBRANE

Zmanjšujejo vnetni odgovor s stabilizacijo membrane celic. Sicer se bolj uporabljajo v terapiji astme, vendar lahko učinkujejo tudi pri CF. Ni primerjalnih študij s kortikosteroidi.

- Na-kromolin
- Na-nedokromil

#### Ad 8) KORTIKOSTEROIDI

Zmanjšujejo vnetni odgovor, kontrolirajo zoževanje bronhialnih tubulov in zmanjšajo tvorbo mukusa. Uporabljajo se v manjši meri pri simptomih podobnih astmi zaradi širokega spektra stranskih učinkov.

- prednizon
- beklometazon dipropionat

Aplikacija: peroralna (tablete, raztopina), inhalanda (aerosol), injekcija. Priporočljiva je uporaba »spacer-ja«, vmesnika pri inhaliranju, ter izpiranje ust, da bo zmanjšali sistemske in stranske učinke.

#### Ad 9) NADOMESTNI ENCIMI

Nadomestni encimi trebušne slinavke izboljšajo presnovo vnesenih obrokov, kajti med ostalimi organi je prav tako prizadeto izločanje trebušne slinavke:

- pankrelipaza

Dostopni so v obliki gastrorezistentnih tablet, kapsul in praška.

- $\alpha$ 1 antitripsin antiproteaza

V obliki nebulizatorja (aerosol) vrača aktivnost nevtrofilcem v primeru okužbe.

- docosahexaenoic acid

Zaviralno na znake CF v trebušni slinavki, črevesju in pljučih deluje tudi maščobna kislina DHA, ki jo imajo bolniki s CF manj v primerjavi z zdravimi. Testirana je bila zaenkrat le na »knock-out« miškah.

#### Ad 10) Zdravila, ki vplivajo na CFRT

Sam funkcionalen CFTR protein se razgradi na poti do membrane celic, tako da njegova aplikacija ni smiselna. Raziskujejo zdravila, ki povečajo ekspresijo proteina. To deloma poveča njegovo učinkovitost oz. vsaj zmanjša nastajanje mukusa:

- fenilbutirat (=protein)

V raziskovalni fazi so terapijo »popravljanja« okvarjenega proteina oz. tudi terapija »asistence« proteinu, kjer bi zdravila omogočila, da okvarjen protein deluje bolj normalno in izloča vsaj manjše količine soli in vode iz celic.

Med obetajočimi možnostmi pristopi je tudi povečati količino abnormalnega CFTR, ki je že prisoten in sintetiziran v celicah ter izboljšati njegovo delovanje. Tako se v literaturi omenja:

*Correctors* – popraviljalci: učinkovine, ki izboljšajo transport mutiranega CFTR na zunanjo membrano celice.

*Potentiators* – ojačevalci, asistenti: učinkovine, ki izboljšajo funkcijo mutiranega CFTR, ko je že ne površini celice.

Možna pa je tudi kompenzacija kloridnega defekta preko drugih mehanizmov.



Nekaj možnosti za nove spojine vodnice:

Kurkumin, sestavina začimbe, pri miškah izboljša tako prenos soli (Cl<sup>-</sup>) kot gastrointestinalne težave, pogoste pri CF. Žal, študija ni pokazala ponovljivosti, upanje pa še vedno ostaja.

Toksini rdeče plime povzročajo pri ljudeh močno draženje respiratornega sistema in drugih sluznic. Antitoksina, sintezna spojina  $\beta$ -naftoilbrevetoksin in naravna spojina brevenal, blokirata učinke toksinov rdeče plime. Pomembno odkritje pa je da delujeta ti dve spojini podobno kot nekatera zdravila v terapiji CF. Namreč učinkovito izboljšata čiščenje dihalnih poti verjetno s stimulacijo ciliarnega gibanja in tanjšanjem mukusa, in to pri zelo nizkih koncentracijah. Morda bosta to novi spojini vodnici.

Ugotovili so da eden izmed toksinov *Vibrio cholerae* Ace (accessory cholera enterotoxin) stimulira sekrecijo kloridnih ionov pri od Ca<sup>2+</sup> odvisnih kloridnih kanalih, pri normalno delujočem CFTR proteinu, kakor tudi mutiranemu CFTR proteinu, kar naj bi bilo dokazano na modelu pljučnega epitelija in na CFTR mutirani pankreatični liniji.

S-nitrozoglutation, endogeni bronhodilatator, naj bi močno povečal količino CFTR – mutiranega proteina na celični membrani ter delno obnovil regulacijo in prehod kloridnih ionov, še po neznanem mehanizmu in v fizioloških koncentracijah. Od cAMP odvisni transport naj bi se po nekaterih raziskavah štirikrat povečal. Morda se obeta nov tip spojin in nov pristop v zdravljenju cistične fibroze.

Prav tako so ugotovili, da nekateri kemoterapevtiki kot je doksorubicin (Dox) iz družine antraciklinov, povečajo količino CFTR proteina na membrani celice. Podrobnejše raziskave so pokazale, da doksorubicin poveča ekspresijo CFTR najverjetneje tako, da izboljša zvijanje proteina ali stabilizira v membrani že prisotne proteine, ne izboljša pa aktivnosti proteina. Glede nato, da je Dox kemoterapevtik, je malo verjetno, da bo odtod prišla dobra sled.

## **OPERACIJE**

V primerih resnejših zapletov ali v poznejših fazah bolezni so več kot dobrodošli nekateri posegi:

- torakoskopija
- transplantacija pljuč ali pljuč in srca
- posegi v črevesju (odstranjevanje obstrukcij)
- abdominalni oz. perinealni posegi (rektalni prolaps)
- odstranjevanje nazalnih polipov

## **GENSKO ZDRAVLJENJE**

Poleg vseh etičnih vprašanj, ki jih zbuja genetsko spreminjanje posameznika (evgenika – ustvarjanje izbrancev, »superčloveka«), kulturoloških in verskih ovir, znanstvenike bolj pestijo težave z vnosom in ciljno dostavo, vgradnja v genom, izražanje vstavljenega gena, liza oz. degradacija ter eliminacija gena in dostavnega sistema, imunski odziv, pravilno odmerjanje...

DNA je negativno nabita molekula in nerada prehaja celično membrano. Sam vnos DNA še zdaleč ne zagotavlja vgrajevanje ali izražanja proteina: za to so potrebni še promotor in druge regulatorne regije, znani sestavni deli vektorja.

Najpopularnejši sistemi za dostavo vektorja so virusi, ki nimajo zmožnosti samopomnoževanja (replikacije). Geni za razmnoževanje virusa in sintezo virusnih proteinov so odstranjeni in zamenjani s transgensko ekspresijsko kaseto. Imajo zmožnost okužiti (tarčne?) celice, deloma se ognejo imunskemu odzivu in izražajo svoj genom v gostiteljski celici. Spadajo med retroviruse, lentiviruse, adenoviruse in adenovirusom sorodne viruse. Nevirusni sistemi za prenos genov uporabljajo kationski liposom-DNA kompleks za vnos mnogo večjih delov DNA in ne povzročajo nobenega imunskega odziva, ki se pojavlja pri virusnih sistemih.

Tudi direkten prenos gole DNA kot biolistika sta aktualna v raziskavah.

Zahteve za idealni vektorski sistem:

1. primerna velikost za prenos CFTR cDNA (4,45 kbp brez intronov) in promotorske sekvence (normalna človeška 3,9 kbp, minimalna 250 bp)
2. ni odziva imunskega sistema
3. ne povzročajo vnetja
4. varen za bolnike z že obstoječim vnetjem pljuč
5. dovolj učinkovit, da popravi CF fenotip
6. dolgotrajna ekspresija in možna varna readministracija

### Retrovirusni vektorji



Retrovirusi (retroviridae) vsebujejo enovijačni RNA genom (ssRNA). So najpogosteje uporabljeni virusni sistem v genski terapiji, najbolj znan pa je »Moloney murine leukemia« virus (MoMuLV). Imajo sposobnost integracije lastnega genoma v gostiteljev celični genom.

RNA polimeraza, virusna ovojnica, gag, pol in env virusni geni so odstranjeni, nadomeščeni s transgensko ekspresijsko kaseto. Rekombinantni virusni plazmid se vnese v celično linijo za

pakiranje, okuženo z divjim tipom retrovirusa, da zagotovimo vgradnjo DNA in pomnoževanje.

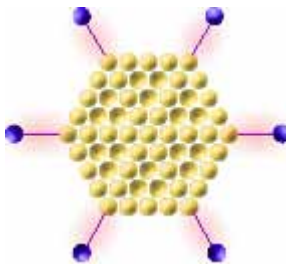
Ko virus z našim plazmidom vnesemo v telo, se genom prenese v celico s transdukcijo, virusna reverzna transkriptaza konvertira ssRNA genom v cDNA, ki je v nestabilni cirkularni obliki, kar pospeši naključno vgradnjo v celični genom.

Retrovirusi imajo potencial za permanentno ekspresijo v somatskih celicah, vendar so omejeni z zahtevami za inficiranje replikacijskih celic. Večina kliničnih študij se je osredotočila na uporabo adenovirusov in kompleksov plazmid-liposom.



Slika 11: Virus HIV

## Adenovirusni vektorji



Adenovirusi (adenoviridae) so družina ikozaedričnih virusov brez ovojnice z linearno dvovijačno DNA (dsDNA, 36 kbp), ki povečini okužijo sesalce in ptiče. Okužijo nedeleče se celice z interakcijo s celično površino in vstopom z endocitozo. Večina virusnih proteinov se odstrani v citosolu, virusno jedro pa se prenese v jedrce. Sledi ekspresija virusnega genoma, ki pa ne more interagirati z gostiteljskim genomom. Zaradi tega bi dolgoročna terapija z adenovirusi zahtevala

redno in relativno pogosto aplikacijo, še posebej upoštevajoč življenjsko dobo prizadetih celic (120 dni, epitel pljuč). Za razliko od retrovirusov, lentivirusov in drugih virusnih sistemov, so že prišli v fazo kliničnega preizkušanja. Prednost imajo že v startu: njihova tarča so pljuča. Žal povzročajo vnetni odziv.

Na molekularnem nivoju je produkcija adenovirusnih vektorjev podobna kot pri retrovirusnih - zgodnji geni, E1a in E1b so esencialni za replikacijo, tako da so izbrisani in njihova funkcija nadomeščena z okuženo celično linijo pakirnih celic. Torej je namesto E1a vstavljena genska kasetna z nemutiranim genom in promotorjem za CFTR, prenos med ljudmi pa ni možen ravno zato, ker je odstranjena regija E1a.

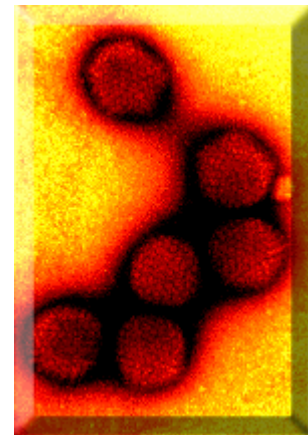
Le slabih 70% genske terapije v kliničnih poskusih se je pokazalo učinkovitih.

Predhodne in-vitro študije in živalski modeli so kazali na visoko stopnjo prenosa vektorja, kar je pripeljalo do kliničnih študij na nosnem epitelu.

Uporabili so različne promotorje (CMV z b-aktinom, E1a), da bi optimizirali izločanje proteina ali vsaj povečali prevodnost za Cl ione, vendar se kot omejujoč dejavnik pokazal čas kontakta in obstojnost vektorja v epitelu, in ne moč promotorjev.

Zaenkrat je razvoj usmerjen v podaljšanje časa zadrževanja virusa na sluznici.

Adenovirusom sorodni virusi (AAV adeno associated viruses) lahko prenašajo manjše količine DNA, vendar kljub 10% privzemu ni prišlo do ekspresije mRNA, najdena pa so protitelesa.



Slika 12 : Slika pod elektronskim mikroskopom

## Drugi virusni sistemi

Lenti virusi vstavijo svoj genom v gostiteljsko celico, vendar ni primernih receptorjev na epitelnih celicah. Tako so začeli razvijati lentiviruse, ki so na svoji površini izražali določene proteine virusa Ebole (proces imenovan pseudotyping). Rezultati so obetajoči.

Parainfluenca virus je v predkliničnih testiranjih pokazal veliko afiniteto do epitelnih celicah, v kolikor dostavljen skozi dihala, in zmožnost prenosa popravljenega CF gena. Rezultat je bil popravljen razmerje in količina soli in vode. Je v predkliničnem testiranju varnosti.

## Kompleks plazmid-liposom.

Kationski lipidni DNA kompleksi so najenostavnejša dostopna metoda za prenos genov v pljučne celice. Ne povzročajo imunskega odgovora in lahko prenašajo veliko večje dele DNA,

katere del se prenese do jedra, zato potrebujejo 100 do 1000 krat večjo količino DNA da bi dosegli enak učinek kot virusno vektorji.

Enostavnost in cenenost izdelave liposomov ter težave z licenciranjem virusnih vektorjev za človeško uporabo daje veliko prednost liposomskim kompleksom, čemur je sorazmerno tudi število kliničnih preizkušanj. Posebno zanimivi so zaradi možnosti dostave v pljuča z aerosolom.

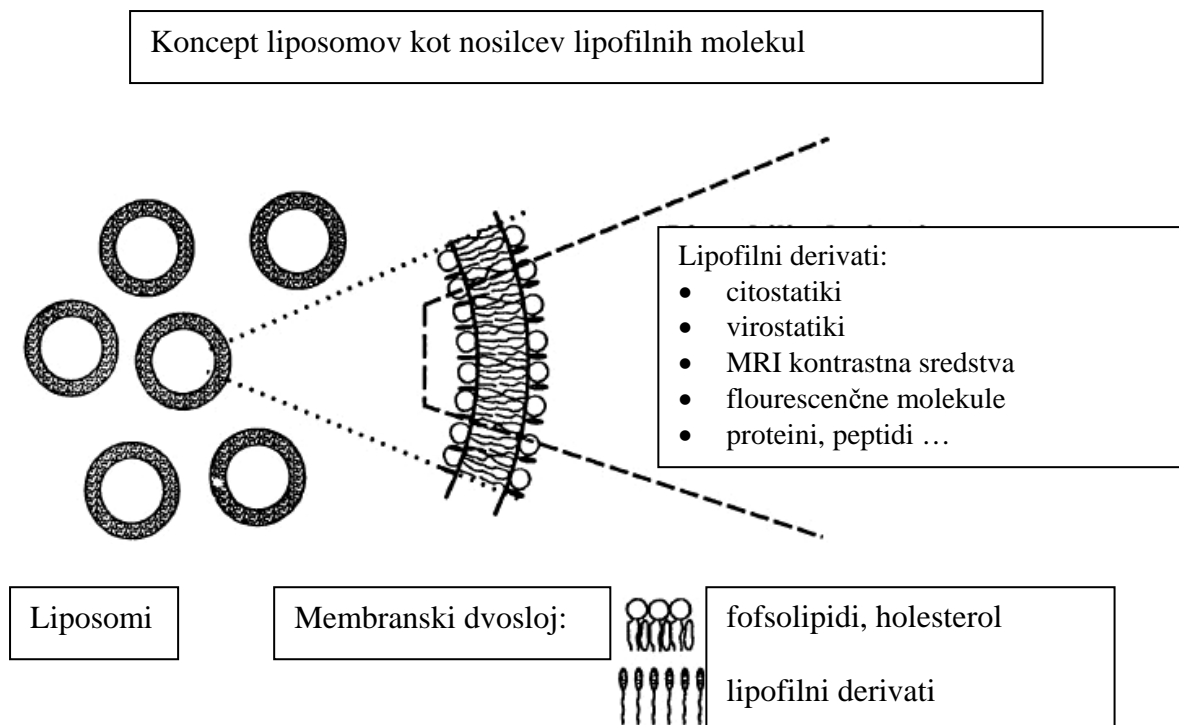
Študije na miškah brez CFTR kažejo, da plazmidno liposomski kompleksi lahko vzpostavijo stanje enako normalnemu pri zapletih s klorom in natrijem.

Vektor pTrial10 omogoča zadostno in učinkovito replikacijo v *E. coli* in je oblikovan tako, da ne povzroča sinteze bakterijskih proteinov v sesalskih celicah. V študiji na nosnem epiteliju ni izzval imunskega odziva. 6 od 8 bolnikov je imelo povišan CFTR. Težava je le v tem, da je odmerek, s katerim bi zagotovili zadosten prenos DNA, lahko toksičen.

Kationski lipid GL-67 je izzval vnetje v pljučih, kar postavlja novo nalogo – poiskati lipide z nižjo inflamatorno toksičnostjo

Primeri raziskovanih kompleksov:

- pTrial10-CFTR2 DNA kompleksiran s kationskim lipidom DC-Chol/DOPE
- GL-67<sup>TM</sup> liposome/DNA kompleks v primerjavi z golo DNA
- DOTAP liposome/DNA
- EDMPC-Cholesterol liposome/DNA



Kot alternativa liposomom se pojavljajo kombinacije poli-lisina z polietilenom, ki dobro ščiti gen za CF. Pokazal se je učinek, čeprav majhen. Zavedati se moramo za možnosti še zdaleč niso vse odkrite. Pa tudi tiste, ki so, so le odškrnjene.

## Smernice razvoja v zdravljenju cistične fibroze

Trenutna terapija cistične fibroze le blaži simptome: preprečuje infekcije, zmanjša količino in viskoznost sluzi v pljučih in izboljšuje dihanje in prebavo. Gensko zdravljenje pa nam ponuja rešitev problema, kljub temu da do sedaj še ni izpolnilo velikih (morda prevelikih) pričakovanj, ki so nastala ob odkritju gena CFTR in napak na njem, ki so odgovorne za bolezensko stanje, bo v prihodnosti zagotovo odigralo zelo pomembno vlogo.

Trenutno je pri genskem zdravljenju z uporabo virusnih vektorjev največji problem gostiteljev imunski odziv, ki ni zgolj moteč dejavnik za pacienta. Moramo upoštevati, da je življenjska doba celice epitelija pljuč, ki je tarčno tkivo virusnih vektorjev, okrog 120 dni in bi bilo treba terapijo ponavljati na nekaj mesecev. Z zgraditvijo imunske obrambe bi učinkovitost prenosa glede na prvo zdravljenje močno padla (to so potrdile tudi nekatere študije), ker bi imunski sistem odstranil oz. nevtraliziral vektor in močno zmanjšal učinkovitost. Primeren vektor bo moral zaobiti imunski sistem, možna pa je tudi sočasna terapija z imunosupresivi, seveda bodo ustreznost in primernost te kombinacije morale potrditi klinične študije.

Nevirusni vektorji, kot so kationski liposomi, v nasprotju z virusnimi nimajo težav z imunskim odzivom, pač pa imajo premajhno učinkovitost. Trud je usmerjen v iskanje rešitev, ki bi izboljšale vnos DNA v celice, transport DNA iz citoplazme v jedro in dovolj veliko ekspresijo, ki traja čim dlje. Da bi na primer izboljšali vnos v celico, tako preizkušajo možnost vgraditve proteina v steno liposoma, ki bi se specifično vezal na integrine tarčne celice.

Res je zaenkrat večina truda pri raziskavah genske terapije vložena na popravljanje genoma že diferencirane oz. deleče se epitelne pljučne celice, pravi preboj pa bi predstavljala genska terapija »zarodne pljučne celice«, kar bi najbolj omililo bolezen, saj so pljučni zapleti najnevarnejši in so največkrat vzrok smrti.

Če pogledamo še dlje v prihodnost, je zarodno gensko zdravljenje tisto, kar bo cistično fibrozo postavilo med izumrle bolezni. Res je to še daleč, a se že sedaj zelo veliko vlaga v raziskave o možnostih manipulacije zarodnih celic, tako je bila nedavno ustvarjena celična linija embrionalnih zarodnih celic z  $\Delta F508$  mutacijo na genu CFTR. To ne daje le možnosti raziskave za gensko terapijo, ki bi popravljen gen ponesla tudi na potomce, temveč v vmesnem času tudi za raziskave kako sama mutacija vpliva na celico in možnost preizkusa novih terapij.

Seveda bo do praktične in varne uporabe genskega zdravljenja cistične fibroze preteklo še kar nekaj časa. V vmesnem obdobju se vzporedni razvoj ukvarja z izboljšavami že obstoječih terapij in iskanjem novih tarč, kar omogočajo nova odkritja o biokemijskem ustroju povezanim z okvaro na genu CFTR.

Izboljšujemo sestavo diet, testiramo nove možnosti aplikacij (gre predvsem za inhalatorje z antibiotiki za boj proti vse pogostejšim in življenjsko ogrožajočim pljučnim infekcijam), bolj uporabnejše in pacientu prijaznejše encimske nadomestne terapije, novi zanesljivejši testi, svetovanje bolnikom ...

Od identifikacije gena CFTR se je zgodil velik napredek v razumevanju celične in molekularne funkcije gena CFTR, kakor tudi mehanizem disfunkcije. Vse to je dalo idejo, da bi mogoče z majhnimi molekulami popravili delovanje pokvarjenega proteina. Trenutno je opisanih že preko 1000 mutacij povezanih z cistično fibrozo, ki so bile razdeljene v šest razredov. I razred če je okvarjena produkcija proteina na stopnji translacije, II razred če je okvarjen intracelični prenos proteina, III razred če je okvarjena regulacija kloridnega transporta, IV razred če je okvarjen sam kloridni transport, vendar je v omejeni obliki še prisoten, V razred če je zmanjšana ekspresija proteina in VI razred mutacije, zaradi katerih pride do pospešenega turn-overja

Vendar je pri veliki večini (nad 90%) bolezenski vzrok mutacija  $\Delta F508$ , proteinu manjka fenilalanin na mestu 508. CFTR  $\Delta F508$  se obravnava kot mešan mutant z lastnostmi tipov II, III, IV. Kontrola kakovosti v ER prepozna napačno zvit protein, ga poveže z ubikvitinom in ga tako nameni za razgradnjo v proteosomu. CFTR  $\Delta F508$  še ima lastnosti ionskega kanala, vendar je verjetnost odprtega stanja nekajkrat nižja kot pri nemutiranem proteinu. Vzrok temu je lahko direkten vpliv spremembe primarne strukture ali pa gre sekundarni efekt ker je spremenjeno vezavno mesto za kinaze in fosfataze. Tisti proteini, ki pa pridejo do zunanje membrane, so bistveno manj stabilni, kot nemutirani proteini. Razpolovni čas je ocenjen na približno 4 ure in na 18-48 ur pri nemutiranem proteinu. Na vseh omenjenih spremembah se poskuša s majhnimi molekulami izboljšati stanje. Iščejo molekule, ki povečajo ekspresijo gena CFTR (butirat, 4-fenilbutirat, CPX), kar bi načeloma po zakonu o delovanju mas povečalo količino proteina na membrani. V razvoju so snovi, ki stabilizirale protein na membrani in mu podaljšale razpolovni čas, znanstveniki izhajajo iz že znanih nizkomolekularnih stabilizatorjev kot so polioli (sorbitol, glicerol, mioinozitol), aminov (betamin, trimetilamin-N-oksidi) in nekatera topila (DMSO). Predvidevajo da stabilizatorji olajšajo zvijanje in zmanjšajo degradacijo že zvitih molekul. Znane pa so tudi že kristalne slike CFTR  $\Delta F508$  proteina ter možnost in silico iskanja novih molekul, ki bi povečale verjetnost odprtega stanja proteina.

Zelo verjetno je, da bi s kombinacijo učinkovin, ki bi imela različna prijemališča, dosegli sinergistični učinek, pa čeprav bi vsaka posamezna molekula le malo izboljšala stanje. Zgoraj naštetе ideje temeljijo na izboljšanju delovanja pokvarjenega proteina, pojavila pa se je še drugačna ideja, ki pravi, da bi lahko s poznavanjem drugih mehanizmov in vplivom nanje, kompenzirali napake v ionskem transportu, ki so posledica mutacije gena CFTR. Obstaja namreč več tipov proteinov, ki služijo kot kloridni kanali in za nekatere že imamo spojine s katerimi vplivamo na funkcijo ionskega transporta in splačalo bi se z njimi poizkusiti popraviti ionski transport pri cistični fibrozi.

V vsakem primeru si želimo čim prej nova, učinkovitejša in varnejša zdravila.

## Literatura

1. [www.ygyh.org/cf/diagnosis.htm](http://www.ygyh.org/cf/diagnosis.htm)
2. [www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening\\_for\\_mutations.html](http://www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening_for_mutations.html)
3. [www.mgz-muenchen.de/pics/sscp.jpg](http://www.mgz-muenchen.de/pics/sscp.jpg)
4. [www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm](http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm)
5. [homepage.smc.edu/hgp/tools.htm](http://homepage.smc.edu/hgp/tools.htm)
6. [www.ncrr.nih.gov/newspub/jan01rpt/Cystic.asp](http://www.ncrr.nih.gov/newspub/jan01rpt/Cystic.asp)
7. [cystic-fibrosis-symptom.com](http://cystic-fibrosis-symptom.com)
8. [www.merck.com](http://www.merck.com)
9. [www.lpfch.org](http://www.lpfch.org)
10. [www.maagmedical.com](http://www.maagmedical.com)
11. [www.nejm.org](http://www.nejm.org)-Mechanisms of disease Cystic fibrosis, 12.5,2005
12. [www.cff.org](http://www.cff.org)-cystic fibrosis
13. [www.kel.ac.uk/phpnews](http://www.kel.ac.uk/phpnews)