

# **Polimorfizmi crvenih krvnih stanica i adaptacija na malariju**

---

**Puhović, Jasmina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:752133>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO- MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

SEMINARSKI RAD

**POLIMORFIZMI CRVENIH KRVNIH STANICA I ADAPTACIJA NA  
MALARIJU**

**RED BLOOD CELL POLYMORPHISMS AND ADAPTATION TO MALARIA**

**Jasmina Puhovi**  
**Preddiplomski studij biologije**  
**( Undergraduate Study of Biology )**  
**Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Pavlica**

**Zagreb, 2009.**

## **Sadržaj**

1.Uvod .....	1
2. Malaria .....	1
2.1. Životni ciklus plazmodija .....	2
2.2. Patogeneza malarije .....	3
3. Polimorfizmi crvenih krvnih stanica .....	5
3.1. Strukturne varijante hemoglobina: HbS, HbC, HbE .....	5
3.2. Talasemija .....	8
3.3. Ovalocitoza .....	9
3.4. Površina eritrocita .....	10
3.5. Enzimi crvenih krvnih stanica .....	11
4. Zaklju ak .....	12
5. Literatura .....	14
6. Sažetak .....	15
7. Summary .....	16

## **1.Uvod**

Malaria je najzna ajnija tropnska parazitska bolest i najja a sila prirodne selekcije poznata u novijoj povijesti ljudskog genoma. Najpoznatiji primjer djelovanja prirodne selekcije na pojedino geneti ko svojstvo je odnos srpaste anemije i maliarije. Sve je više spoznaja o raznim drugim genskim varijabilnostima u razli itim populacijama koje pružaju neku vrstu zaštite od maliarije. Naj eš e se radi o genima vezanim za crvene krvne stanice, to nije za hemoglobin, enzime i adheziju stanica. Prouavanje me uodnosa tih genskih varijabilnosti i maliarije važno je za otkrivanje interakcija izme u parazita i ljudskih stanica, što bi se u budu nosti moglo iskoristiti za stvaranje u inkovitog cjepiva protiv maliarije.

## **2. Malaria**

Malaria je bolest koju uzrokuje parazitski Protozoa, truskovac (skupina Apicomplexa ili Sporozoa) iz roda *Plasmodium*. Me u plazmodijima koji mogu zaraziti ljudi su naj eš e vrste: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*. *Plasmodium vivax* je najrasprostranjeniji, prisutan je u mnogim umjerenim geografskim podru jima, ali i u tropskim i suptropskim. *P. falciparum* je naj eš a vrsta u tropskim i suptropskim podru jima. *P. malariae* je mjestimi no prisutan na podru jima gdje i *P. falciparum*, ali je puno rje i. *P. ovale* je zastavljen u tropskoj Africi, a povremeno i na zapadnom Pacifiku ([www.chsr.ffa.am/malaria/eng/epidemiology.php](http://www.chsr.ffa.am/malaria/eng/epidemiology.php)).

Ljudi se obično zaraze malirijom kad ih ugrize ženka komaraca roda *Anopheles*, a mogu se i zaraziti i preko ljudske krvi, npr. preko kontaminiranog medicinskog pribora, no to se doga a rijetko. Ženka komarca pri ugrizu ispusti nešto sline u probušenu kožu, a ako je prethodno ugrizla ovjeka zaraženog malirijom, prenijet e parazita iji se spolni dio ciklusa odvijao u probavilu komarca. Na Zemlji živi oko 390 vrsta komaraca roda *Anopheles*, od kojih oko 60 vrsta mogu biti vektori za maliiju (Richer i Chudley 2005).

Godišnje se u cijelom svijetu zabilježi 350 do 500 milijuna kliničkih sluajeva malirijije, a procijenjeno je da maliaria uzrokuje oko milijun smrtnosti godišnje ([www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/index4.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index4.html)). Najve a je smrtnost me u djecom do pet godina, osobito u siromašnim ruralnim podru jima gdje je slaba dostupnost zdravstvene zaštite. Malaria uzrokuje velike gubitke ljudskih života, ali i ekonomske gubitke zbog poveanih zdravstvenih troškova i izgubljenih radnih dana. Inicijative za suzbijanje malirijije usmjerene su na poboljšanje dijagnoze i terapije te smanjenje populacija komaraca prijenosnika.

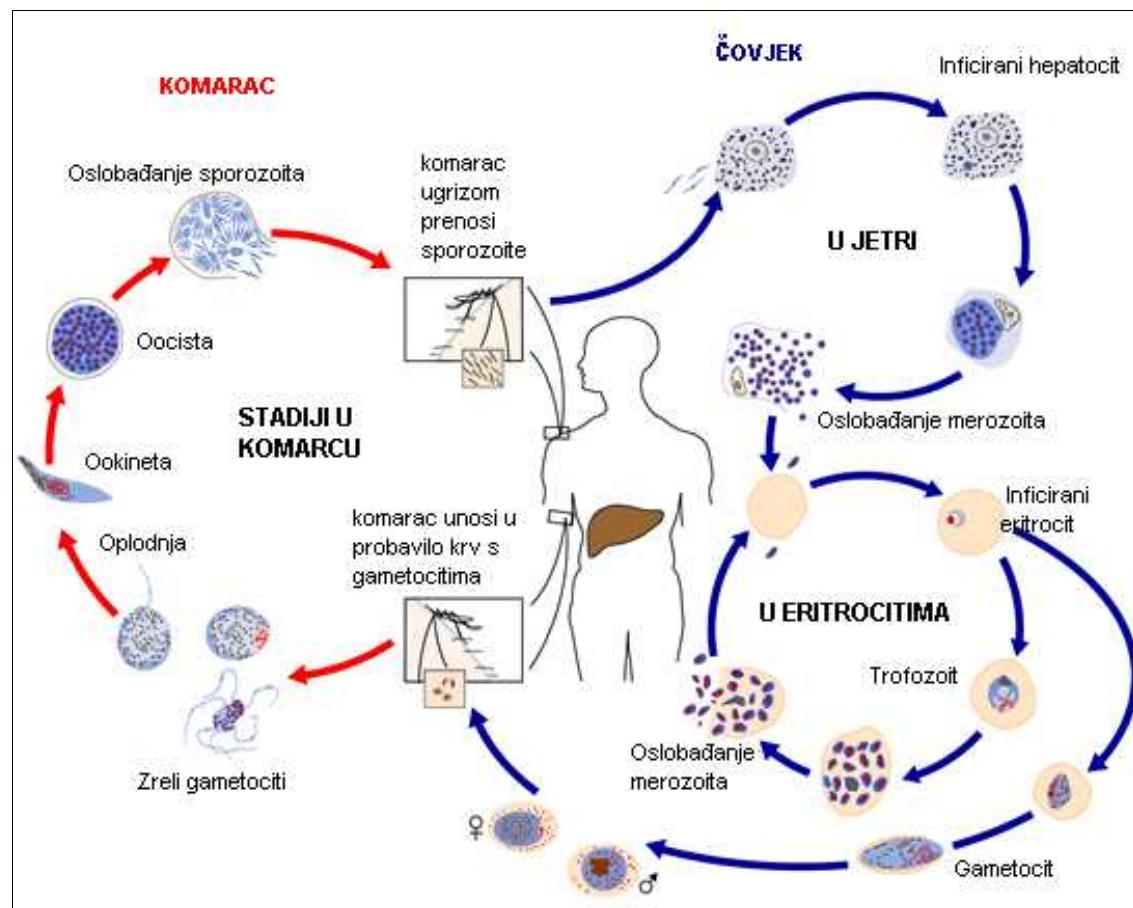
Endemi nost malarije je pojam kojim se oznaava stalna prisutnost malarije u nekom podruju ([www.chsr.ffa.ac.yu/malaria/eng/epidemiology.php](http://www.chsr.ffa.ac.yu/malaria/eng/epidemiology.php)). Za podruju u kojima dođe do periodi nog ili naglog porasta broja oboljelih od malarije koristi se pojam epidemijska malađica. Endemi na malađici postoji u većini afričkih zemalja južno od Sahare, u tropskim i suptropskim podruđima obje Amerike, isto nom Mediteranu, jugoistočnoj Aziji i na zapadnom Pacifiku. Ta podruju naseljava više od 2,4 milijarde ljudi. Ranije je malađica bila rasprostranjena na svim kontinentima osim Antarktike. Uporabom insekticida i isušivanjem močvara uništeni su komarci prenositelji u Australiji, Europi i SAD-u. U drugim dijelovima svijeta su staništa tih komaraca postala brojnija zbog stvaranja brana i navodnjavanja, krenju šuma i neplanskog razvoja velikih gradova, osobito u Africi i jugoistočnoj Aziji.

Simptomi malađice su groznica, glavobolja i povratak anje, a najčešće se pojavljuju 10 do 15 dana nakon ugriza. "Napadi" bolesti javljaju se svakih 48 do 72 sata. Ako se ne lijevi, malađica može postati opasna po život jer smanjuje prokrvljenost vitalnih organa. Može doći do akutnog zatajenja bubrega, cerebralne malađice i plućnog edema. *Plasmodium falciparum* najčešće uzrokuje teške oblike bolesti zbog sposobnosti adhezije na stjenke kapilara. Najugroženije skupine ljudi su mala djeca, trudnice i stranci bez adaptacije na malađicu koji dolaze u području s endemijom malađicom. Kod djece pogone teškim oblicima bolesti često dolazi do smrti u manje od 72 sata nakon pojave simptoma ([www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/index4.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index4.html)). Kod preživjele djece, teška malađica ima za posljedicu usporen fizički i psihički razvoj.

## 2.1. Životni ciklus plazmodija

Plazmodiji imaju složen životni ciklus koji uključuje dva domaća komarca roda *Anopheles* i ovjeka. Komarac koji se hrani krvlju zaraženog ovjeka unosi u probavilo i stadij gametocita plazmodija (Slika 1.). Gametociti u probavilu komarca postaju gamete i spajaju se te proizvode pokretne zigote, ookinete, koje ulaze u stijenu crijeva i postaju oociste. Iz oocista se oslobađaju brojni sporozoiti koji migriraju do žlijezda slinovnica gdje su spremni za prijelaz na drugog ovjeka pri ugrizu komarca. Sporozoiti iz slinice komarca tada ulaze u krvotok ovjeka i odlaze u jetru. Nakon 30 minuta od ugriza mogu već biti u jetri i po injekciji se nespolno razmnožavati u hepatocitima (izvaneritrocitna shizogonija) tijekom 6-16 dana, a kod parazita *P. vivax* i *P. ovale* u jetri može nastati mirujući stadij, hipnozoit, koji se može aktivirati tjednima ili godinama kasnije. Iz sporozoita u jetri nastaju deseci tisuća merozoita koji u krvotoku ulaze u eritrocite i u njima se nespolno razmnožavaju (eritrocitna shizogonija) i uzrokuju pucanje eritrocita kojim se oslobađaju novi merozoiti koji opet mogu

u i u nove eritrocite. Takvi ciklusi se oituju kao valovi groznicice koji se javljaju svakih 48 do 72 sata ili nepravilnije. Za parazite koji se nalaze u eritrocitima esto se koristi naziv trofozoiti, a za nezrele trofozoite naziv prstenasti stadij ([www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)). Neki merozoiti se diferenciraju u gametocite koji mogu zaraziti novog komarca.



**Slika 1.** Životni ciklus plazmodija (prilagođeno prema [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx))

Paraziti su u eritrocitima i hepatocitima zašti eni od djelovanja imunološkog sustava, ali zaraženi eritrociti se uništavaju u slezeni. Da to izbjegnu, neke vrste plazmodija uzrokuju da se zaraženi eritrociti adhezivnim proteinima 'lijepe' za stjenke žila. To može dovesti do komplikacija kao što su za epljenje žila, koma, problemi u trudnoći.

## 2.2. Patogeneza maliarije

Period inkubacije, tj. vrijeme od zaraze do pojave prvih simptoma, može trajati nekoliko dana ili mjeseci, pa i godina. U prosjeku je do 20 dana za vrste *Plasmodium falciparum* i *P. ovale*, a do nekoliko mjeseci za vrste *P. vivax* i *P. malariae*. Do trenutka kad se paraziti mogu ući u perifernoj krvi, već ih ima nekoliko milijuna, a do pojave simptoma

u krvi ovjeka ve postoje milijarde parazita (Williams 2006). Glavni simptomi su periodi na groznica s porastom temperature do 41 °C koja traje 6 do 8 sati, gr evi i glavobolja, a nakon toga preznojavanje i vra anje na normalnu temperaturu, kad iscrpljeni bolesnik uglavnom spava; uklju eni su i simptomi nalik na gripu, npr. kašalj i bolovi u miši ima, a rje e povra anje i proljev. Napadaji groznice javljaju se periodi no, ovisno o dužini nespolnog umnožavanja plazmodija u eritrocitima i uskla enosti otpuštanja merozoita iz ertirocita. Napadaj se obi no javlja 3. dan nakon prethodnoga (48h) i to se naziva tercijarna malarija (*P. ovale* i *P. falciparum*) ili na 4. dan nakon prethodnog (72h) kod vrste *P. malariae*. Kod zaraze plazmodijem *P. falciparum* eš a je nepravilna izmjena dnevnih napadaja groznice. Malarija može uzrokovati i anemiju te pove anje slezene i jetre. Brojni zaraženi eritrociti obloženi s IgG se uništavaju u slezeni tijekom shizogonije, ali esto i intaktni eritrociti. Teška anemija koja zbog toga može nastati je najopasnija za djecu do dvije godine starosti i za trudnice.

Malarija uzrokovana parazitom *P. vivax* smatra se lakšim oblikom jer je smrtnost niska ([www.malaria.com/info/malaria-causes-symptoms.php](http://www.malaria.com/info/malaria-causes-symptoms.php)). Najprepoznatljiviji simptomi lakšeg oblika malarije su periodi na ponavljanja groznice. U nekim slu ajevima može do i do problema sa slezenom zbog poja anog uništavanja eritrocita ili reaktivacije miruju ih stadija, hipnozoita, kod neadekvatno lije enih bolesnika. Svi plazmodiji uzrokuju takav oblik malarije, a kod nekih ona prelazi u teži oblik.

Malarija koju uzrokuje *P. falciparum* može se razviti u teški oblik bolesti i ima najve u smrtnost. Teški oblik malarije se naj eš e razvija kod ljudi koji su došljaci u podru ja s endemi nom malarijom i koji nemaju adaptacije kakve esto postoje kod lokalnog stanovništva. Period inkubacije je esto produljen zbog imunološkog sustava, profilakse ili djelomi nog lije enja, a simptomi su nespecifi ni te ih se esto na po etku dijagnosticira kao gripu ili neku drugu bolest. Problem je i što se esto paraziti ne otkriju u krvnom razmazu jer se adheriraju u tkivima. Teška malarija može uklju ivati tešku anemiju i hemoglobinuriju (hemoglobin u urinu) zbog hemolize; plu ni edem (nakupljanje teku ine u plu ima), cerebralnu malariju, poreme aje u zgrušavanju krvi, a rje e i druge komplikacije kao što su akutno zatajenje bubrega, metaboli ka acidozna, hipoglikemija i hiperparazitemija (kada je više od 5% eritrocita inficirano plazmodijima). Metaboli ka acidozna bitno utje e na preživljavanje kod teške malarije i dovodi do sindroma otežane respiracije ('respiratory distress syndrome') kada u tkiva dolazi premalo kisika (Miller i sur. 2002). Laktatna acidozna nastaje iz više razloga: zbog pove ane proizvodnje laktata od strane parazita, smanjenog uklanjanja laktata u jetri i drugih faktora koji smanjuju dostavu kisika u tkiva. Zbog uništavanja krvnih stanica, anemija tako er pridonosi smanjivanju dotoka kisika u tkiva. *P.*

*falciparum* zbog sposobnosti adhezije na endotel moždanih mikrokapilara može uzrokovati cerebralnu malariju kod koje je smrtnost 15% ak i uz ispravno lije enje. Glavni simptom cerebralne malarije je smanjena svjesnost, neobično ponašanje ili napadaji, a može do i komice. Novija istraživanja upućuju da na slicu teškog oblika bolesti osim parazita utje u i oportunističke infekcije, druge bolesti, geni domaćina i ostali faktori koje još treba proučiti.

### **3. Polimorfizmi crvenih krvnih stanica**

Crvene krvne stanice, eritrociti, sudjeluju u najvažnijem dijelu životnog ciklusa plazmodija, jer opskrbljuju parazita hranom i kisikom i pružaju mu zaštitu. Taj dio ciklusa je najodgovorniji za sliku bolesti, koja ovisi o odnosima između inficiranih i neinficiranih eritrocita i ostalih tkiva. Ulazak plazmodija u eritrocite obuhvata više složenih interakcija između plazmodija i površine stanice. Na području s endemom malarijom kroz niz generacija došlo je do selekcije brojnih genskih varijacija koje na neki način pružaju zaštitu od malarije. To su najčešći polimorfizmi koji se odnose na gene koji utječu na strukturu ili funkciju eritrocita.

Hemoglobinopatije su poremećaji strukture ili proizvodnje hemoglobina. To su prve genetičke uvjetovane svojstva za koja je otkriveno da pružaju zaštitu od malarije. Linus Pauling i njegovi suradnici su 1949. dokazali da je uzrok srpske anemije mutacija u molekuli hemoglobina. To je bilo važno otkriće u molekularnoj biologiji jer tada je prvi put bolest povezana s mutacijom specifičnog proteina. Za neke hemoglobinopatije dokazano je da na različite načine utječu na malariju koju uzrokuje plazmodij *P. falciparum*. Još nisu potpuno razjašnjeni mehanizmi kojima tim polimorfizmi smanjuju utjecaj malarije na zaraženu osobu. Postoje hemoglobinopatije koje utječu na sintezu strukturalnih varijanti hemoglobina, tj. HbS, HbC i HbE. Druga vrsta hemoglobinopatija nastaje zbog poremećaja proizvodnje normalnih oblika ili podjedinica hemoglobina, to su -talasemija i -talasemija. Homozigoti za ta svojstva obično imaju ozbiljne simptome i povišena je smrtnost (npr. za HbS i -talasemiju), dok su heterozigoti najčešći samo nositelji mutiranog gena bez težih zdravstvenih problema.

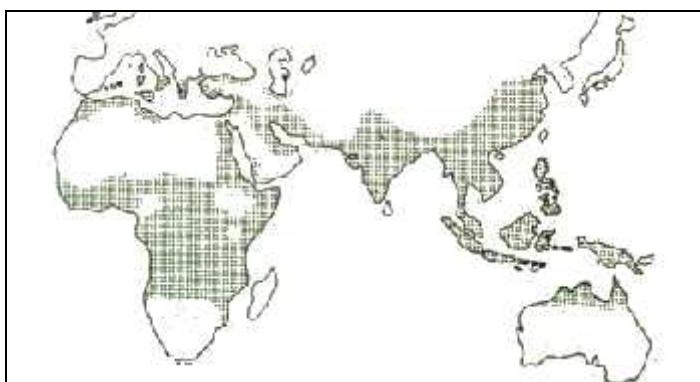
#### **3.1. Strukturne varijante hemoglobina: HbS, HbC, HbE**

Normalna varijanta hemoglobina kodirana je alemom HbA. Mutacijom HbA nastale su mnoge strukturne varijante, od kojih su najpoznatiji HbS, HbC i HbE. Najviše je podataka o zaštitnoj ulozi hemoglobina S (HbS). HbS nastaje testastom mutacijom gena za -lanac hemoglobina (*HBB*) zbog koje je na šestom mjestu glutaminska kiselina zamijenjena manje polarnom aminokiselinom valinom. To je uzrok bolesti nazvane srpska anemija. Pri niskoj

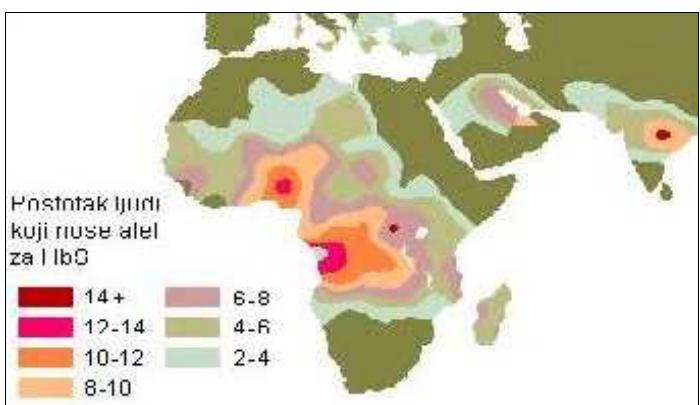
koncentraciji kisika dolazi do nekovalentne polimerizacije hemoglobina S, što mijenja normalan oblik eritrocita u srpasti i smanjuje njihovu elastinost. 'Srpasti' hemoglobin može oštetiti staničnu membranu pa može doći do dehidracije stanice, oksidativnih oštećenja i pojava ane adhezije na stjenke endotela, a sve to rezultira kada im životom eritrocita ili hemolizom ([www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=sickle](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=sickle)). Normalni eritrociti su elastični i to im omogućava da se izobliče kad prolaze kroz kapilare. Neelastični eritrociti sa HbS ne mogu se izoblikati kad prolaze kroz uske kapilare pa dolazi do zatoplivanja krvnih žila ili oštećenja. Kod oboljelih od srpske anemije dolazi do raznih komplikacija kao što su hemoliza, žutica i teška anemija, oticanje zglobova, umor, jaki bolovi, oštećenja organa, uključujući i mozak, a u najgorem slučaju do smrti.

Na području s endemijom malarijom u Africi liječnici su sredinom 20. stoljeća primijetili da osobe sa srpskom anemijom ili nositeljima rijetko pokazuju simptome malarije iako imaju plazmodije u krvi, a takođe nije uobičajeno da su frekvencije HbS alela neobično visoke. Budući da je HbS alel štetan za homozigote, očekivano je da je prirodna selekcija uklanjati taj alel iz populacija i održavati njegovu nisku frekvenciju. U mnogim dijelovima svijeta frekvencije tog alela su očekivano niske, ali na mnogim je geografskim područjima zapažena visoka frekvencija HbS alela, često i preko 10%. Ta se područja gotovo preklapaju sa rasprostranjenosti oblika malarije uzrokovane parazitom *Plasmodium falciparum* (slike 2. i 3.).

Osoba koja ima 2 HbS alela je recesivni homozigot i ima srpsku anemiju. Bez liječenja teško može doživjeti odraslu dobu. HbS nije potpuno recesivan alel, pa heterozigoti (HbA/HbS) imaju osim zdravog hemoglobina i HbS, ali bez znakova bolesti. Heterozigoti imaju prednost u borbi s malarijom u odnosu na one s normalnim hemoglobinom. Homozigoti za HbS takođe mogu imati prednost protiv malarije, ali obolijevaju od srpske anemije pa selekcija djeluje protiv njih i rijetko imaju potomstvo. Pojava kad prirodna selekcija favorizira heterozigote više nego oba homozigota naziva se balansirani polimorfizam, nastoji se zadržati visoka frekvencija recesivnog mutiranog gena iako u homozigotnom obliku znatno povećava smrtnost. U populacijama na području bez malarije, npr. među Afroamerikancima u SAD-u, heterozigoti nemaju selekcijsku prednost, te bi selekcija bila usmjerena prema smanjivanju frekvencije HbS. Podaci potvrđuju da je frekvencija HbS u Afričkim Amerikanaca u SAD-u niža nego u području Afrike iz kojih su potekli i gdje je prisutna malarija ([www.click4biology.info/c4b/4/gene4.1](http://www.click4biology.info/c4b/4/gene4.1)).



Slika 2. Rasprostranjenost maliarije (prilagođeno prema [www.siskiyous.edu/class/bio1/sicklecell.html](http://www.siskiyous.edu/class/bio1/sicklecell.html))



Slika 3. Područja s visokom frekvencijom HbS (prilagođeno prema [www.click4biology.info/c4b/4/gene4.1](http://www.click4biology.info/c4b/4/gene4.1))

Postoji više teorija o tome našemu se temelji selektivna prednost heterozigota u područjima s maliarijom. Smatra se da je zaštitna uloga povezana s ranim uklanjanjem inficiranih eritrocita, tijekom prstenastog stadija, vjerojatno preko oksidativnog oštete enja membrane srpastih eritrocita. Pri formaciji polimera hemoglobina S nastaje hemin, koji se veže za membranu i može oksidirati membranske lipide i proteine. Istraživanja u jednoj populaciji pokazala su da zaštita raste sa starošću u osobe, što znači da mehanizam uključuje i imunološki sustav (Williams 2006). Smatra se da je to povezano s pojavom animiranim vezanjem antitijela na površinske antigene inficiranih eritrocita.

Prema drugoj teoriji, tijekom nespolnog razmnožavanja u eritrocitima, merozoiti imaju vrlo aktivnu metabolism i troše puno kisika, eritrociti postaju srpasti. Kod heterozigota za srpsku anemiju, pola hemoglobina je HbS, te će eritrociti postati srpasti kad se znatnije smanji koncentracija kisika. Srpaste stanice se brzo uklanjuju iz krvotoka u slezeni, zajedno s merozoitim. Neka istraživanja upućuju na to da se paraziti možda oštete uje ili ubijaju izravno u srpastim eritrocitima kad dođe do smanjenja koncentracije kisika ([www.springerlink.com/index/88212037J1462702.pdf](http://www.springerlink.com/index/88212037J1462702.pdf)). Pokazalo se da u srpastim stanicama

inkubiranim na niskim koncentracijama kisika esto dolazi do formiranja vakuola u parazitima, što upu uje na to da im je metabolizam ošte en, a pri normalnim koncentracijama kisika ne dolazi do toga.

Hemoglobin C je zastupljen u nekim dijelovima zapadne Afrike, rje i je nego HbS. Nedavno se pokazalo da relativno mali broj ljudi sa hemoglobinom C obolijeve od teškog oblika malarije. Smatra se da je selektivna prednost hemoglobina C najve a za homozigote i da više utje e na teški oblik malarije nego na blaži oblik. Istraživanje provedeno u državi Burkina Faso pokazalo je da je zaštitni u inak ve i za homozigote nego za heterozigote (Williams 2006). Mehanizam zaštite se povezuje s pove anim uklanjanjem inficiranih eritrocita od strane imunološkog sustava zbog promjena na površini eritrocita. Nova istraživanja povezuju HbS sa smanjenom ekspresijom PfEMP1 (*'Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1'*), što je najizraženije kod homozigota. Taj protein služi za adheziju eritrocita koja uzrokuje simptome težeg oblika malarije, stoga bi se time moglo objasniti zašto HbC manje utje e na blaži oblik malarije. Homozigoti za HbC imaju manje zdravstvenih problema nego oni sa HbS, imaju relativno blagu hemoliti ku anemiju, stoga postoje naga anja da bi bez medicinske intervencije u lije enju malarije, HbC zamijenio HbS i postao dominantni antimalariski hemoglobin ( Carter i Mendis 2002).

Hemoglobin E je zastupljen u Jugoisto noj Aziji, najviše u odre enim etni kim skupinama Kine i Malajskog poluotoka, u nekim populacijama postoji do 50% nositelja (Kwiatkowski 2005). Geneti ke analize su pokazale da je mutacija nastala relativno nedavno i da je vrlo brzo došlo do porasta u frekvenciji alela, što ne bi bilo mogu e bez pozitivne selekcije. Pretpostavlja se da i HbE štiti od teškog oblika malarije. Homozigoti zbog mutacije imaju uglavnom samo anemiju bez zna ajnih simptoma, pa je mogu e da selekcija favorizira i homozigote i heterozigote. Primije eno je da su eritrociti heterozigota relativno otporni na invaziju *P. falciparum* (Kwiatkowski 2005).

### **3.2. Talasemija**

Talasemije se odnose na skupinu poreme aja koji smanjuju proizvodnju ili -lanca hemoglobina, pa postoji -talasemija i -talasemija. Normalni hemoglobin A se sastoji od dva -lanca i dva -lanca. -lanac kodiraju dva identi na gena (*HBA1* i *HBA2*) na 16. kromosomu nastala duplikacijom, tj. osoba ima etiri alela za -lanac, stoga oboljeli od -talasemije mogu imati razli ite simptome, ovisno o tome koliko alela nosi mutaciju. Ako su sva etiri alela mutirana, razvija se teška anemija, od koje nositelji naj e umru još u maternici ili nekoliko sati nakon ro enja, a ako je samo jedan alel mutiran, gotovo da nema simptoma. Sinteza -

lanca je odre ena jednim genom na 11. kromosomu, homozigoti za mutaciju pokazuju simptome -talasemije, a heterozigoti su nositelji, kod njih postoje samo manje promjene eritrocita. Ako je zbog -talasemije blokirana sinteza -lanca, nastajat će premalo HbA, a suvišni -lanci kodirani 16. kromosomom nakupljat će se u krvi i koštanoj srži i utjecati na hemolizu i eritropoezu, što će na kraju uzrokovati anemiju. Za liječenje je esto potrebna transfuzija, a pri tome problem predstavlja suvišak željeza u krvi, pa se dodaju i helatori da se spriječe daljnje komplikacije.

-talasemija je jedna od najčešćih bolesti uzrokovanih poremećajem jednog gena. Osobito je esta u nekim dijelovima Mediterana, jugoistočne Azije i središnje Afrike. Njena učestalost u području s malarijom povezana je s adaptacijom na malariju, ali unatoč brojnim populacijskim dokazima o zaštitnom djelovanju, kliničkih je malo. Osobe s -talasemijom su zaštićene od teškog oblika malarije, to nije od teške malarijske anemije, o čemu postoje dokazi iz više populacija. Mogući mehanizam zaštite od malarije je smanjenje ekspresije CR1 ('complement receptor 1') povezano s -talasemijom. Malo je dokaza da -talasemija štiti od blagog oblika bolesti, pokazalo se da ne utječe na gusto u parazita kod osoba kod kojih se još nisu pojavili simptomi. Zanimljivo je za buduća istraživanja da ako se -talasemija nasljeđuje zajedno sa HbS, nijedno od tih dva svojstva ne pruža nikakvu zaštitu od malarije (Williams 2006).

### 3.3. Ovalocitoza

U jugoistočnoj Aziji, osobito na području Nove Gvineje i Solomonskih otoka primijećena je velika učestalost ovalocitoze, stanja koje može biti uzrokovano različitim genskim oštećenjima. Najčešći oblik je jugoistočnoazijska ovalocitoza koja nastaje zbog delecije u genu za strukturni protein eritrocitne membrane poznat kao 'band 3'. Ta delecija kod heterozigota uzrokuje stanje zvano ovalocitoza po obliku abnormalnih eritrocita. Navedena su područja zahvaćena malarijom, a heterozigoti imaju selektivnu prednost. To objašnjava visoku frekvenciju alela za ovalocitozu iako je za homozigote letalnost tako visoka, gotovo stopostotna, već u maternici (Carter i Mendis 2002).

Potvrđeno je da je zaštitni učinkovalocitoze specifičan za cerebralnu malariju. Istraživanja *in vitro* navode da ovalocitoza pruža zaštitu zbog otpornosti na invaziju nekih skupina parazita koji uzrokuju teški oblik malarije i tako će da eritrociti osoba s ovalocitozom koji su inficirani plazmodijem *P. falciparum* jačće adheriraju na endotelni receptor CD36 kojeg nema u endotelu žila u mozgu, a relativno su otporni na linije parazita koje mogu vezati ICAM-1, receptor za koji se pretpostavlja da je odgovoran za adheziju inficiranih

eritrocita u mozgu. Pretpostavlja se da je to mehanizam zaštite od cerebralne malarije. (Williams 2006).

### 3.4. Površina eritrocita

Da bi ušao u eritrocit, plazmodij se prvo mora vezati na membranu, zatim slijedi apikalna reorientacija, formiranje vrstog spoja i unutarstani na signalizacija. Za te procese bitan je apikalni kompleks (osobina koljena Apicomplexa) na prednjem dijelu plazmodija, koji sadrži roptrijske aste organele za sekreciju, mikroneme- nitaste organele ispunjene enzimima, konoid sastavljen od mikrotubula i polarni prsten s mikrotubulima. Receptori za ulazak u eritrocite pronađeni su u mikronemama i roptrijima koji su zašti eni od antitijela unutar apikalnog kompleksa, ali pronađeni su i na površini plazmodija. Kad se pomoć u konoida uspostavi vrsti spoj između parazita i stanice, spoj se pomije i plazmodij ulazi u stanicu na način sličan endocitozi (Miller i sur. 2002). Unutar stanice nalazi se okružen membranom nastalom od eritrocitne membrane i tako je zašti en od djelovanja lizosoma. Za sada nije razjašnjeno koje površinske molekule na površini merozoita prepoznaju površinu eritrocita i potiču u proces invazije.

Genetska istraživanja su pokazala da su osobe s Duffy negativnom krvnom grupom zbog nedostatka Duffy-antigena na površini eritrocita potpuno zaštiene od malarije koju uzrokuje *P. vivax*. Ta spoznaja je potakla razvoj novoga cjepiva protiv tog tipa malarije koje se sada testira. Nedostatak Duffy-antigena ne utječe na malariju koju uzrokuje *P. falciparum* jer ta vrsta plazmodija ulazi u stanicu koristeći više proteina. *P. vivax* ima samo jedan receptor iz skupine receptora nazvanih DBL ('Duffy-binding-like'). Ostali receptori iz te skupine pojavljuju se kod različitih vrsta plazmodija. Poznata je još i RBL ('reticulocyte-binding-like') skupina homolognih parazitskih receptora (Miller i sur. 2002).

Visoke frekvencije Gerbich- negativne krvne grupe na području Papua Nove Gvineje s endemom malarijom povezane su sa otpornošću na malariju *P. falciparum*. Osobe s Gerbich- negativnom krvnom grupom imaju deleciju eksona 3 u genu za glikoprotein C (*GYPC ex3*), što reducira vezanje na protein iz DBL skupine parazitskih receptora. Istraživanja in vitro potvrđuju da delecija štiti od skupine parazita koji koriste put invazije koji uključuje glikoprotein C i EBA-140- antigen merozoita plazmodija vrste *P. falciparum* ('erythrocyte-binding antigen' 140), ali nije dokazan nikakav utjecaj na gustoću parazita kod inficiranih osoba bez simptoma. Istraživanja su pokazala da je ta delecija i jedan od uzroka ovalocitoze. Otkriveni su još neki putovi invazije koji uključuju glikoproteine: glikoprotein A i

EBA-175 iz DBL skupine parazitskih receptora, glikoporin C/D i BAEBL33 iz iste skupine te RBL27 protein plazmodija *P. falciparum* i put invazije neovisan o tripsinu.

Od membranskih receptora za komplemente najviše je prou avan CR1 ('complement receptor 1') jer su frekvencije polimorfizama tog receptora visoke u podru jima s endemi nom malarijom. Postoje polimorfizmi s promijenjenom kvantitativnom ekspresijom gena za CR1 i oni koji utje u na njegovu strukturu i odre uju skupinu antigena Knops krvnih grupa (Williams 2006). CR1 je važan receptor jer kod osoba inficiranih plazmodijem *P. falciparum* sudjeluje u procesu adheriranja nezaraženih eritrocita na zaražene pri emu *in vitro* nastaju nakupine nazvane rozete, taj proces je vjerojatno povezan s teškom malarijom. Istraživanja podru ja s endemi nom malarijom Papua Nove Gvineje povezuju polimorfizme koji smanjuju ekspresiju CR1 sa zaštitom od teške malarije koju uzrokuje *P. falciparum*. Swain-Langley Knops krvna grupa, odre ena *Sl2* alelom povezuje se sa zaštitom od cerebralne malarije. Odnos izme u CR1 i malarije je vrlo složen i zbog kontradiktornih rezultata iz nekih populacija, potrebna su daljnja istraživanja.

PfEMP1, tj. '*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1', je protein koji je izložen na površini eritrocita inficiranih plazmodijima. Pojedini PfEMP1 protein sadrži više regija za adheziju koje sadrže nekoliko tipova DBL domena i može se vezati na više razli itih doma inovih receptora i na razli ite dijelove pojedinog receptora. Kodira ga raznolika skupina *var* gena. Iako je kod pojedina nog parazita eksprimiran samo jedan od *var* gena, u populaciji plazmodija i u razli itim fazama razvoja pojedinog plazmodija je eksprimiran velik broj razli itih gena. Adhezija eritrocita na stjenke kapilara i razne vrste stanica doma ina sprje ava da ih krvotok odnese u slezenu na razgradnju, a antigenska varijacija izbjegava prepoznavanje od strane antitijela. PfEMP1 uzrokuje i vezanje inficiranih eritrocita na dendriti ke stanice i tako utje e na imunološki sustav (Miller i sur. 2002). Nakupljanje adheriranih inficiranih eritrocita u kapilarama, vezanje na neinficirane eritrocite (nastaju rozete), na trombocite i na receptore još nekih tipova stanica dovodi do komplikacija i teškog oblika malarije. Unato brojnim varijacijama tog proteina, varijabilnost njegovih domena je ograni ena funkcijom jer mora vezati odre enu ciljnu molekulju pa su takva vezna mjesta potencijalne mete za cjepiva.

### 3.5. Enzimi crvenih krvnih stanica

Geografski raspored podru ja povištene frekvencije gena koji uzrokuju nedostatak enzima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PD) upu uje na povezanost s adaptacijom na malariju. Nedostatak G6PD naslje uje se na X kromosomu, rezultat je nekoliko razli itih

mutacija do kojih je došlo u zadnjih 10 000 godina i vjeruje se da su brzo dostigle dosta visoke frekvencije u populacijama zahvaljuju i pozitivnoj selekciji preko malarije (Williams 2006). Postoje brojni klini ki dokazi o zaštiti koju nedostatak G6PD pruža protiv malarije, no mehanizam nije potpuno razjašnjen. Najvjerojatnije je da su eritrociti s nedostatkom G6PD koji su inficirani plazmodijima eš e fagocitirani nego normalne stanice. Ako je G6PD odsutan, spojevi koji generiraju reaktivne kisikove radikale nakupljaju se u eritrocitima i dolazi do ošte enja membrane. Novija istraživanja otkrila su mutaciju koja utje e na proizvodnju enzima piruvat kinaze koja bi mogla biti na sli an na in povezana sa zaštitom od malarije.

#### **4. Zaklju ak**

Dio ciklusa plazmodija koji se odvija u crvenim krvnim stanicama ima najve i utjecaj na sliku bolesti. Otkrivanje zaštitnog djelovanja brojnih genskih varijabilnosti koje odre uju promjene svojstava eritrocita potaknulo je brojna daljnja istraživanja. Vjerojatno postoje još mnogi antimalarijski geni iji fenotipovi nisu lako uo ljivi, te su zbog toga vrlo važna i populacijska istraživanja. Prou avaju se etni ke razlike u otpornosti na malariju, a osobito su zanimljivi lokusi koji se razlikuju u odvojenim podru jima gdje postoji isti plazmodij. Cilj je da se dozna više o me uodnosu doma ina i parazita, kako bi se razvili u inkovitiji na ini lije enja i sprje avanja bolesti. Na primjer, prou avanje utjecaja malarije na osobe s Duffy-negativnom krvnom grupom dovelo je do razvoja potencijalnog cjepiva protiv malarije koju uzrokuje *Plasmodium vivax*. Iako se radi na razvoju 30- ak vrsta cjepiva, do sada je ipak razvijeno malo prakti nih rješenja ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814)).

Problem predstavlja velika genska varijabilnost plazmodijskih antigena koja otežava izbor ciljne molekule za cjepiva. Zapreka je i složenost mehanizama kojima se ostvaruje zaštitni u inak i razli itih interakcija u organizmu.

Osim proteina vezanih za eritrocite, postoje podaci o nekim genskim varijabilnostima vezanim za imunološki sustav koje pružaju zaštitu od malarije. Cilja se i na kontrolu komaraca prenositelja pomo u geneti kog inženjerstva tako što bi se uveli geni koji bi onemogu avali razvoj plazmodija u njima (Richer i Chudley 2005). Odre ene su genomske sekvene komarca *Anopheles gambiae* i plazmodija *P. falciparum*.

Unato dosadašnjem razvoju lijekova i drugim poboljšanjima u tretmanu simptoma malarije, smrtnost je i dalje visoka zbog slabe dostupnosti zdravstvene zaštite u podru jima s endemi nom malarijom. Neke od tih zemalja, osobito one u subsaharskoj Africi, spadaju me u najsiromašnije države u svijetu. Postoje podaci da se u malari nim podru jima samo

53% djece s malarijskom groznicom lije i ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814)). U sprje avanju malarije važna je i edukacija stanovništva te poboljšanje ekomske situacije u zemljama s endemi nom malarijom. Iako WHO i mnoge humanitarne organizacije dopremaju insekticide i insekticidima tretirane mreže za zaštitu od komaraca i daruju ih ili prodaju po povoljnim cijenama, lokalno stanovništvo ih rijetko koristi na ispravan na in, npr. zbog siromaštva donirane mreže esto preprodaju ili ih koriste za hvatanje ribe, umjesto da ih stave oko kreveta i tako se zaštite od komaraca no u, kada su ubodi naj eš i. U nekim dijelovima svijeta problem predstavlja otpornost plazmodija na lijekove i otpornost komaraca na insekticide. Zbog toga je razvoj u inkovitoga i dostupnoga cjepiva važan prioritet globalnoga javnog zdravstva.

## Literatura

- Carter R, Mendis KN, 2002. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria.  
*Clinical microbiology reviews* **15**(4): 564-594.
- Kwiatkowski DP, 2005. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *The American Journal of Human Genetics* **77**(2): 171–192.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**: 673-679.
- Richer J, Chudley AE, 2005. The hemoglobinopathies and malaria. *Clinical Genetics* **68**: 332-336.
- Williams TN, 2006. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Current opinion in microbiology* **9**: 388-394.
- [www.chsr.aua.am/malaria/eng/epidemiology.php](http://www.chsr.aua.am/malaria/eng/epidemiology.php)
- [www.click4biology.info/c4b/4/gene4.1](http://www.click4biology.info/c4b/4/gene4.1).
- [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)
- [www.malaria.com/info/malaria-causes-symptoms.php](http://www.malaria.com/info/malaria-causes-symptoms.php)
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=sickle](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=sickle)
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814)
- [www.siskiyou.edu/class/bio1/sicklecell.html](http://www.siskiyou.edu/class/bio1/sicklecell.html)
- [www.springerlink.com/index/88212037J1462702.pdf](http://www.springerlink.com/index/88212037J1462702.pdf)
- [www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/index4.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index4.html)

## **Sažetak**

Malaria je zarazna bolest koju uzrokuju paraziti iz roda *Plasmodium*, a prenose je komarci iz roda *Anopheles*. Mortalitet je dosta visok unatoč postojanju lijekova protiv malarije jer su ljudi koji žive u područjima s endemičnom malarijom esto ne mogu priuštiti liječenje. Smatra se da je mala rija najjača sila prirodne selekcije poznata u novijoj povijesti ljudskog genoma. Pod selekcijskim pritiskom, u različitim populacijama endemičnih područja nastale su brojne genske promjene koje pružaju neku vrstu zaštite od malarije, a najčešće sprječavaju razvoj teškog oblika bolesti. Najpoznatiji primjer je srpska anemija, nasljedna bolest koja je raširena u područjima s endemičnom malarijom, a heterozigoti nemaju simptome bolesti niti malarije. Crvene krvne stanice, eritrociti, sudjeluju u najvažnijem dijelu životnog ciklusa plazmodija, jer opskrbljuju parazita hranom i kisikom i pružaju mu zaštitu. Zaštitni polimorfizmi najčešće se odnose na gene koji utječu na strukturu ili funkciju eritrocita. To su npr. strukturne varijante hemoglobina: HbS, HbC, HbE; talasemija, ovalocitoza, promjene enzima crvenih krvnih stanica, npr. nedostatak G6PD, i antigeni na površini eritrocita kao što su Duffy-antigen, glikoproteini, receptori za komplemente i PfEMP1. Proučavanje tih genskih varijabilnosti važno je za otkrivanje interakcija između parazita i ljudskih stanica, što bi se u budućnosti moglo iskoristiti za stvaranje uinkovitih i dostupnih cjepiva ili lijekova protiv malarije.

## **Summary**

Malaria is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* and it is transmitted by mosquitoes of the genus *Anopheles*. Although there are antimalarial drugs, mortality levels are very high because drug treatments are often too expensive for people living in malaria endemic areas. Malaria is probably the greatest selective pressure on the human genome in recent history. This pressure has resulted in number of genetic variants that confer some kind of protection against the malaria, they are mostly protective against severe form of the disease. The most-studied condition is the sickle-cell disease, a hereditary blood disease present in malaria-endemic regions. Heterozygotes have no symptoms of the disease nor severe malaria. Red blood cells are involved in the most important part of plasmodium life cycle because they provide the parasite with food, oxygen and shelter. Malaria resistance genes are mostly those that determine the red blood cell structure or function. Red blood cell polymorphisms associated with some protection are the structural haemoglobin variants like sickle cell trait or disease, HbC and HbE; thalassemia, ovalocytosis, changes in red blood cell enzymes like G6PD deficiency and red blood cell surface antigens like Duffy antigens, glycoproteins, complement receptors and PfEMP1. Studying those genetic variants is important because it can teach us about protective relationship between human cells and malaria. In the future, that knowledge might be used for the development of effective and affordable vaccines or anti-malarial drugs.