

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. Malarija .....	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. Zaključak .....	12
5. Literatura .....	14
6. Sažetak .....	15
7. Summary .....	16

## 1.Uvod

Malarija je najznanija tropska parazitska bolest i najjača sila prirodne selekcije poznata u novijoj povijesti ljudskog genoma. Najpoznatiji primjer djelovanja prirodne selekcije na pojedino genetičko svojstvo je odnos srpaste anemije i malarije. Sve je više spoznaja o raznim drugim genskim varijabilnostima u različitim populacijama koje pružaju neku vrstu zaštite od malarije. Najčešće se radi o genima vezanim za crvene krvne stanice, to nije za hemoglobin, enzime i adheziju stanica. Proučavanje međusobnih odnosa tih genskih varijabilnosti i malarije važno je za otkrivanje interakcija između parazita i ljudskih stanica, što bi se u budućnosti moglo iskoristiti za stvaranje učinkovitog cjepiva protiv malarije.

## 2. Malarija

Malarija je bolest koju uzrokuje parazitski Protozoa, truskovac (skupina Apicomplexa ili Sporozoa) iz roda *Plasmodium*. Među plazmodijima koji mogu zaraziti ljude četiri su najčešće vrste: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*. *Plasmodium vivax* je najrasprostranjeniji, prisutan je u mnogim umjerenim geografskim područjima, ali i u tropskim i subtropskim. *P. falciparum* je najčešća vrsta u tropskim i subtropskim područjima. *P. malariae* je mjestimično prisutan na područjima gdje i *P. falciparum*, ali je puno rjeđi. *P. ovale* je zastupljen u tropskoj Africi, a povremeno i na zapadnom Pacifiku ([www.chsr.aua.am/malaria/eng/epidemiology.php](http://www.chsr.aua.am/malaria/eng/epidemiology.php)).

Ljudi se obično zaraze malarijom kad ih ugrize ženka komaraca roda *Anopheles*, a mogu se i zaraziti i preko ljudske krvi, npr. preko kontaminiranog medicinskog pribora, no to se događa rijetko. Ženka komarca pri ugrizu ispusti nešto sline u probušenu kožu, a ako je prethodno ugrizla uvijek zaraženog malarijom, prenijet će parazite koji 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 malariju (Richer i Chudley 2005).

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

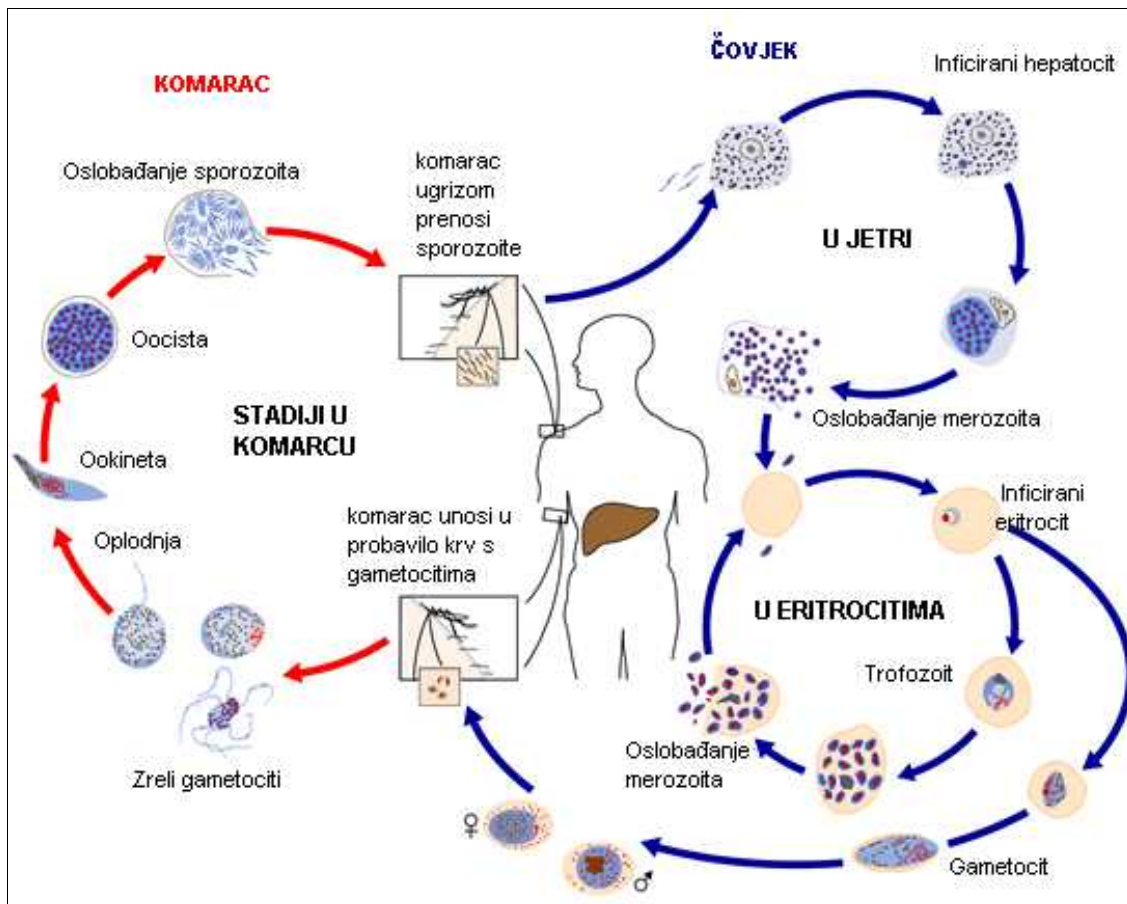
Endemičnost malarije je pojam kojim se označava stalna prisutnost malarije u nekom području ([www.chsr.aua.am/malaria/eng/epidemiology.php](http://www.chsr.aua.am/malaria/eng/epidemiology.php)). Za područja u kojima dođe do periodičnog ili naglog porasta broja oboljelih od malarije koristi se pojam epidemijaska malarija. Endemična malarija postoji u većini afričkih zemalja južno od Sahare, u tropskim i subtropskim područjima obje Amerike, istočnom Mediteranu, jugoistočnoj Aziji i na zapadnom Pacifiku. Ta područja naseljava više od 2,4 milijarde ljudi. Ranije je malarija 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, kretanja šuma i neplanskog razvoja velikih gradova, osobito u Africi i jugoistočnoj Aziji.

Simptomi malarije su groznica, glavobolja i povraćanje, a najčešće se pojavljuju 10 do 15 dana nakon ugriza. "Napadi" bolesti javljaju se svakih 48 do 72 sata. Ako se ne liječi, malarija može postati opasna po život jer smanjuje prokrvljenost vitalnih organa. Može doći do akutnog zatajenja bubrega, cerebralne malarije i plućnog edema. *Plasmodium falciparum* najčešće uzrokuje teške oblike bolesti zbog sposobnosti adhezije na stijenke kapilara. Najugroženije skupine ljudi su mala djeca, trudnice i stranci bez adaptacije na malariju koji dolaze u područja s endemičnom malarijom. Kod djece pogotovo 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 malarija ima za posljedicu usporen fizički i psihički razvoj.

## 2.1. Životni ciklus plazmodija

Plazmodiji imaju složen životni ciklus koji uključuje dva domadara- komarca roda *Anopheles* i čovjeka. Komarac koji se hrani krvlju zaraženog čovjeka unosi u probavilo i stadij gametocit plazmodija (Slika 1.). Gametociti u probavilu komarca postaju gamete i spajaju se te proizvode pokretne zigote, ookinete, koje ulaze u stijenku crijeva i postaju oociste. Iz oocista se oslobađaju brojni sporozoiti koji migriraju do žlijezda slinovnica gdje su spremni za prijelaz na drugog čovjeka pri ugrizu komarca. Sporozoiti iz sline komarca tada ulaze u krvotok čovjeka i odlaze u jetru. Nakon 30 minuta od ugriza mogu već biti u jetri i počinju se nespolno razmnožavati u hepatocitima (izvaneritocitna 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 a 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 o ituju kao valovi groznice 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). Neki merozoiti se diferenciraju u gametocite koji mogu zaraziti novog komarca.



**Slika 1.** Životni ciklus plazmodija (prilago eno prema 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 trudno i.

## 2.2. Patogeneza malarije

Period inkubacije, tj. vrijeme od zaraze do pojave prvih simptoma, može trajati nekoliko dana ili mjeseci, pa ak 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 uo iti u perifernoj krvi, ve ih ima nekoliko milijuna, a do pojave simptoma

u krvi uvijek 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 acidoza, hipoglikemija i hiperparazitemija (kada je više od 5% eritrocita inficirano plazmodijima). Metaboli ka acidoza 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 acidoza 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% čak i uz ispravno liječenje. Glavni simptom cerebralne malarije je smanjena svjesnost, neobično ponašanje ili napadaji, a može doći i do kome. Novija istraživanja upućuju da na sliku teškog oblika bolesti osim parazita utječu 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 obuhvaća više složenih interakcija između plazmodija i površine stanice. Na područjima s endemnom malarijom kroz niz generacija došlo je do selekcije brojnih genskih varijacija koje na neki način pružaju zaštitu od malarije. To su najčešće polimorfizmi koji se odnose na gene koji utječu na strukturu ili funkciju eritrocita.

Hemoglobinopatije su poremećaji strukture ili proizvodnje hemoglobina. To su prva genetički uvjetovana svojstva za koja je otkriveno da pružaju zaštitu od malarije. Linus Pauling i njegovi suradnici su 1949. dokazali da je uzrok srpaste 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 ti polimorfizmi smanjuju utjecaj malarije na zaraženu osobu. Postoje hemoglobinopatije koje utječu na sintezu strukturnih varijanti hemoglobina, tj. HbS, HbC i HbE. Druga vrsta hemoglobinopatija nastaje zbog poremećene proizvodnje normalnih oblika ili podjedinica hemoglobina, to su  $\alpha$ -talasemija i  $\beta$ -talasemija. Homozigoti za ta svojstva obično imaju ozbiljne simptome i povišena je smrtnost (npr. za HbS i  $\beta$ -talasemiju), dok su heterozigoti najčešće samo nositelji mutiranog gena bez težih zdravstvenih problema.

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

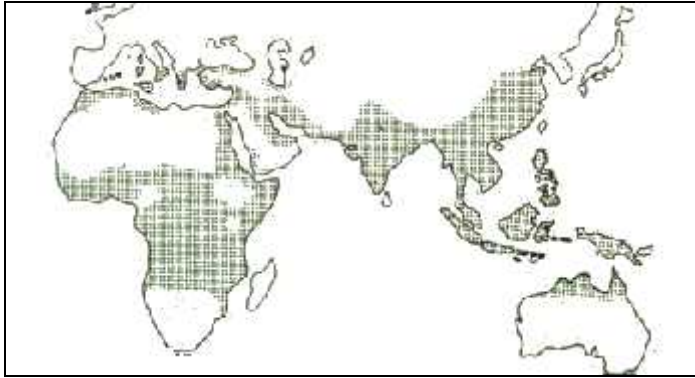
Normalna varijanta hemoglobina kodirana je alelom HbA. Mutacijom HbA nastale su mnoge strukturne varijante, od kojih su najpoznatiji HbS, HbC i HbE. Najviše je podataka o zaštitnoj ulozi hemoglobina S (HbS). HbS nastaje točnom mutacijom gena za  $\beta$ -lanac hemoglobina (*HBB*) zbog koje je na šestom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

koncentraciji kisika dolazi do nekovalentne polimerizacije hemoglobina S, što mijenja normalan oblik eritrocita u srpasti i smanjuje njihovu elastičnost. 'Srpasti' hemoglobin može oštetiti staničnu membranu pa može doći i do dehidracije stanice, oksidativnih oštećenja i pojačane adhezije na stijenke endotela, a sve to rezultira krajim 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 izobličiti kad prolaze kroz uske kapilare pa dolazi do začepljivanja krvnih žila ili oštećenja. Kod oboljelih od srpaste 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.

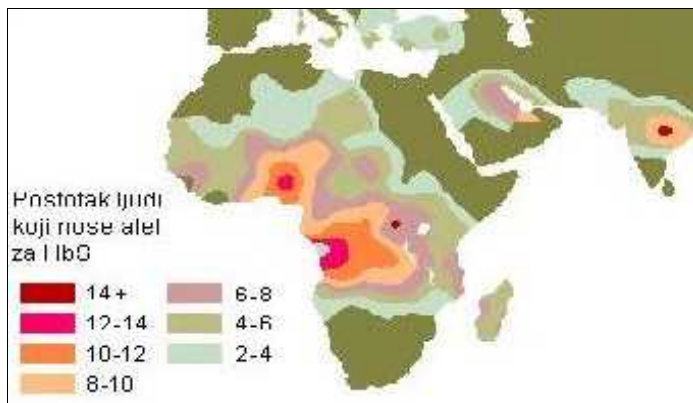
Na područjima s endemičnom malarijom u Africi liječnici su sredinom 20. stoljeća primijetili da osobe sa srpastom anemijom ili nositelji rijetko pokazuju simptome malarije iako imaju plazmodije u krvi, a također je uočeno da su frekvencije HbS alela neobično visoke. Budući da je HbS alel štetan za homozigote, očekivano je da će 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 rasprostranjenost u oblika malarije uzrokovane parazitom *Plasmodium falciparum* (slike 2. i 3.).

Osoba koja ima 2 HbS alela je recesivni homozigot i ima srpastu anemiju. Bez liječenja teško može doživjeti odraslu dob. 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 također mogu imati prednost protiv malarije, ali obolijevaju od srpaste anemije pa selekcija djeluje protiv njih i rijetko imaju potomke. 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 područjima 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 Afroamerikanaca u SAD-u niža nego u područjima 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 malarije (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 na čemu se temelji selektivna prednost heterozigota u područjima s malarijom. Smatra se da je zaštitna uloga povezana s ranim uklanjanjem inficiranih eritrocita, tijekom prstenastog stadija, vjerojatno preko oksidativnog oštećenja 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 osobe, što znači da mehanizam uključuje i imunološki sustav (Williams 2006). Smatra se da je to povezano s pojačanim vezanjem antitijela na površinske antigene inficiranih eritrocita.

Prema drugoj teoriji, tijekom nespolnog razmnožavanja u eritrocitima, merozoiti imaju vrlo aktivan metabolizam i troše puno kisika, eritrociti postaju srpasti. Kod heterozigota za srpstu anemiju, pola hemoglobina je HbS, te se eritrociti postaju srpasti kad se znatnije smanji koncentracija kisika. Srpaste stanice se brzo uklanjaju iz krvotoka u slezeni, zajedno s merozoitima. Neka istraživanja upućuju na to da se paraziti možda oštećuju 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 upućuje na to da im je metabolizam oštećen, a pri normalnim koncentracijama kisika ne dolazi do toga.

Hemoglobin C je zastupljen u nekim dijelovima zapadne Afrike, rjeđe nego HbS. Nedavno se pokazalo da relativno mali broj ljudi sa hemoglobinom C obolijeva od teškog oblika malarije. Smatra se da je selektivna prednost hemoglobina C najviše za homozigote i da više utječe na teški oblik malarije nego na blaži oblik. Istraživanje provedeno u državi Burkina Faso pokazalo je da je zaštitni u inakveći za homozigote nego za heterozigote (Williams 2006). Mehanizam zaštite se povezuje s povećanim 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 utječe na blaži oblik malarije. Homozigoti za HbC imaju manje zdravstvenih problema nego oni sa HbS, imaju relativno blagu hemolitičku anemiju, stoga postoje nagnanjanja da bi bez medicinske intervencije u liječenju malarije, HbC zamijenio HbS i postao dominantni antimalarijski hemoglobin (Carter i Mendis 2002).

Hemoglobin E je zastupljen u jugoistočnoj Aziji, najviše u određenim etničkim skupinama Kine i Malajskog poluotoka, u nekim populacijama postoji do 50% nositelja (Kwiatkowski 2005). Genetičke analize su pokazale da je mutacija nastala relativno nedavno i da je vrlo brzo došlo do porasta u frekvenciji alela, što ne bi bilo moguće bez pozitivne selekcije. Pretpostavlja se da i HbE štiti od teškog oblika malarije. Homozigoti zbog mutacije imaju uglavnom samo anemiju bez značajnih simptoma, pa je moguće da selekcija favorizira i homozigote i heterozigote. Primijećeno je da su eritrociti heterozigota relativno otporni na invaziju *P. falciparum* (Kwiatkowski 2005).

### 3.2. Talasemija

Talasemije se odnose na skupinu poremećaja koji smanjuju proizvodnju ili  $\alpha$ -lanca hemoglobina, pa postoji  $\alpha$ -talasemija i  $\beta$ -talasemija. Normalni hemoglobin A se sastoji od dva  $\alpha$ -lanca i dva  $\beta$ -lanca.  $\alpha$ -lanac kodiraju dva identična gena (*HBA1* i *HBA2*) na 16. kromosomu nastala duplikacijom, tj. osoba ima četiri alela za  $\alpha$ -lanac, stoga oboljeli od  $\alpha$ -talasemije mogu imati različite simptome, ovisno o tome koliko alela nosi mutaciju. Ako su sva četiri alela mutirana, razvija se teška anemija, od koje nositelji najčešće umiru još u maternici ili nekoliko sati nakon rođenja, a ako je samo jedan alel mutiran, gotovo da nema simptoma. Sinteza  $\beta$ -

lanca je određena jednim genom na 11. kromosomu, homozigoti za mutaciju pokazuju simptome  $\alpha$ -talasemije, a heterozigoti su nositelji, kod njih postoje samo manje promjene eritrocita. Ako je zbog  $\alpha$ -talasemije blokirana sinteza  $\alpha$ -lanca, nastajat će premalo HbA, a suvišni  $\beta$ -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 često potrebna transfuzija, a pri tome problem predstavlja suvišak željeza u krvi, pa se dodaju i helatori da se spriječe daljnje komplikacije.

$\beta$ -talasemija je jedna od najčešćih bolesti uzrokovanih poremećajem jednog gena. Osobito je česta u nekim dijelovima Mediterana, jugoistočne Azije i središnje Afrike. Njena učestalost u područjima s malarijom povezana je s adaptacijom na malariju, ali unatoč brojnim populacijskim dokazima o zaštitnom djelovanju, kliničkih je malo. Osobe s  $\beta$ -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  $\beta$ -talasemijom. Malo je dokaza da  $\beta$ -talasemija štiti od blagog oblika bolesti, pokazalo se da ne utječe na gustoću parazita kod osoba kod kojih se još nisu pojavili simptomi. Zanimljivo je za buduća istraživanja da ako se  $\beta$ -talasemija nasljeđuje zajedno sa HbS, nijedno od ta 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 selekcijsku prednost. To objašnjava visoku frekvenciju alela za ovalocitozu iako je za homozigote letalnost jako visoka, gotovo stopostotna, već u maternici (Carter i Mendis 2002).

Potvrđeno je da je zaštitni učinak ovalocitoze 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 također da eritrociti osoba s ovalocitozom koji su inficirani plazmodijem *P. falciparum* jače adheriraju na endotelni receptor CD36 kojega 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 reorijentacija, formiranje vrstog spoja i unutarstani na signalizacija. Za te procese bitan je apikalni kompleks (osobina koljena Apicomplexa) na prednjem dijelu plazmodija, koji sadrži roprije- vre 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 roprijima koji su zaštićeni od antitijela unutar apikalnog kompleksa, ali pronađeni su i na površini plazmodija. Kad se pomoću konoida uspostavi vrsti spoj između parazita i stanice, spoj se pomiče 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 zaštićen od djelovanja lizosoma. Za sada nije razjašnjeno koje površinske molekule na površini merozoita prepoznaju površinu eritrocita i potiču proces invazije.

Genetička istraživanja su pokazala da su osobe s Duffy negativnom krvnom grupom zbog nedostatka Duffy- antigena na površini eritrocita potpuno zaštićene 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 područjima Papua Nove Gvineje s endemnom 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* ('erithrocyte-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 putevi 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 proučavan CR1 ('complement receptor 1') jer su frekvencije polimorfizama tog receptora visoke u područjima s endemnom malarijom. Postoje polimorfizmi s promijenjenom kvantitativnom ekspresijom gena za CR1 i oni koji utječu na njegovu strukturu i određuju 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 čemu *in vitro* nastaju nakupine nazvane rozete, taj proces je vjerojatno povezan s teškom malarijom. Istraživanja područja s endemnom malarijom Papua Nove Gvineje povezuju polimorfizme koji smanjuju ekspresiju CR1 sa zaštitom od teške malarije koju uzrokuje *P. falciparum*. Swain-Langley Knops krvna grupa, određena *Sl2* alelom povezuje se sa zaštitom od cerebralne malarije. Odnos između 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 različitih domena inovih receptora i na različite dijelove pojedinog receptora. Kodiraju raznolika skupina *var* gena. Iako je kod pojedina nog parazita eksprimiran samo jedan od *var* gena, u populaciji plazmodija i u različitim fazama razvoja pojedinog plazmodija je eksprimiran velik broj različitih gena. Adhezija eritrocita na stijenke kapilara i razne vrste stanica domaćina sprječava da ih krvotok odnese u slezenu na razgradnju, a antigenska varijacija izbjegava prepoznavanje od strane antitijela. PfEMP1 uzrokuje i vezanje inficiranih eritrocita na dendritičke stanice i tako utječe 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. Unatoč brojnim varijacijama tog proteina, varijabilnost njegovih domena je ograničena funkcijom jer mora vezati određenu ciljnu molekulu pa su takva vezna mjesta potencijalne mete za cjepiva.

### **3.5. Enzimi crvenih krvnih stanica**

Geografski raspored područja povišene frekvencije gena koji uzrokuju nedostatak enzima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PD) upućuje na povezanost s adaptacijom na malariju. Nedostatak G6PD nasljeđuje se na X kromosomu, rezultat je nekoliko različitih

mutacija do kojih je došlo u zadnjih 10 000 godina i vjeruje se da su brzo dostigle dosta visoke frekvencije u populacijama zahvaljujući i pozitivnoj selekciji preko malarije (Williams 2006). Postoje brojni klinički 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 češće fagocitirani nego normalne stanice. Ako je G6PD odsutan, spojevi koji generiraju reaktivne kisikove radikale nakupljaju se u eritrocitima i dolazi do oštećenja membrane. Novija istraživanja otkrila su mutaciju koja utječe na proizvodnju enzima piruvat kinaze koja bi mogla biti na slici 1 povezana sa zaštitom od malarije.

#### 4. Zaključak

Dio ciklusa plazmodija koji se odvija u crvenim krvnim stanicama ima najveći i utjecaj na sliku bolesti. Otkrivanje zaštitnog djelovanja brojnih genskih varijabilnosti koje određuju promjene svojstava eritrocita potaknulo je brojna daljnja istraživanja. Vjerojatno postoje još mnogi antimalarijski geni čiji fenotipovi nisu lako uočljivi, te su zbog toga vrlo važna i populacijska istraživanja. Proučavaju se etničke razlike u otpornosti na malariju, a osobito su zanimljivi lokusi koji se razlikuju u odvojenim područjima gdje postoji isti plazmodij. Cilj je da se dozna više o međusobnom odnosu domaćina i parazita, kako bi se razvili učinkovitiji načini liječenja i sprejavanja bolesti. Na primjer, proučavanje 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 praktičnih 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 učinak i različiti interakcija u organizmu.

Osim proteina vezanih za eritrocite, postoje podaci o nekim genskim varijabilnostima vezanim za imunološki sustav koje pružaju zaštitu od malarije. Cilj se i na kontrolu komaraca prenositelja pomoću genetičkog inženjerstva tako što bi se uveli geni koji bi onemogućili razvoj plazmodija u njima (Richer i Chudley 2005). Otkrivene su genomske sekvence komarca *Anopheles gambiae* i plazmodija *P. falciparum*.

Unatoč dosadašnjem razvoju lijekova i drugim poboljšanjima u tretmanu simptoma malarije, smrtnost je i dalje visoka zbog slabe dostupnosti zdravstvene zaštite u područjima s endemnom malarijom. Neke od tih zemalja, osobito one u subsaharskoj Africi, spadaju među najsiromašnije države u svijetu. Postoje podaci da se u malarijnim područjima samo

53% djece s malarijskom groznicom liječi (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331814). U sprječavanju malarije važna je i edukacija stanovništva te poboljšanje ekonomske situacije u zemljama s endemičnom 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 način, npr. zbog siromaštva donirane mreže često preprodaju ili ih koriste za hvatanje ribe, umjesto da ih stave oko kreveta i tako se zaštite od komaraca noću, kada su ubodi najčešći. U nekim dijelovima svijeta problem predstavlja otpornost plazmodija na lijekove i otpornost komaraca na insekticide. Zbog toga je razvoj učinkovitog i dostupnog 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.siskiyous.edu/class/bio1/sicklecell.html](http://www.siskiyous.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

Malarija 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 si ljudi koji žive u područjima s endemnom malarijom često ne mogu priuštiti liječenje. Smatra se da je malarija najjača a sila prirodne selekcije poznata u novijoj povijesti ljudskog genoma. Pod selekcijskim pritiskom, u različitim populacijama endemnih područja nastale su brojne genske promjene koje pružaju neku vrstu zaštite od malarije, a najčešće sprečavaju razvoj teškog oblika bolesti. Najpoznatiji primjer je srpasta anemija, nasljedna bolest koja je raširena u područjima s endemnom 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 učinkovitih 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.