

## SYNDRÓM FRAGILNÉHO CHROMOZÓMU X: ANALÝZA DNA V RODINÁCH S FAMILIÁRNYM VÝSKYTOM MENTÁLNEJ RETARDÁCIE

POLÁKOVÁ H., <sup>1</sup>KHOURY L., <sup>1</sup>ČIERNA M.

### FRAGILE X SYNDROME: DNA ANALYSIS IN FAMILIES WITH FAMILIAL MENTAL RETARDATION

The fragile X syndrome, the most common form of inherited mental retardation, is characterized by unique genetic mechanisms, which include amplification of a CGG repeat and abnormal DNA methylation. Direct DNA analysis of fragile X mutations has already shown its clear superiority for postnatal and prenatal diagnosis of the disorder and for carrier detection. In this, paper the authors report on the results of DNA analysis in families with familial mental retardation. They present the various alternatives (probe/enzymes combinations) for Southern blot based diagnosis and protocols which gave optimal results for detection of patients segregating for fragile X syndrome. Totally, 36 members from 10 families were analyzed by Southern blotting, including 18 mentally affected patients. No CGG expansion was detected in 9 clinically affected patients of 5 families. Expansion of the CGG repeats was found in 9 clinically and cytogenetically affected males, in 5 unaffected carriers of premutation, and in 1 carrier of full mutation in the remaining 5 families. Carriers represented mothers of the patients. These results correlated with cytogenetic and clinical expression of fragile X syndrome. The application of the method for diagnosis of the disease is discussed. (Tab. 2, Fig. 3, Ref. 21.)

**Key words:** CGG repeat, premutation, methylation, DNA analysis, fragile X syndrome.

*Bratisl Lek Listy 1997; 98: 150–156*

Syndróm fragilného chromozómu X je po Downovom syndróme druhou najčastejšie sa vyskytujúcou geneticky podmienenou formou mentálnej retardácie. Je to dominantné X-chromozómovo dedičné ochorenie s neúplnou penetranciou pozorovanou u oboch pohlaví.

Syndróm fragilného X, najčastejšie sa vyskytujúca geneticky podmienená forma mentálnej retardácie, je výsledkom mutácií v FMR1 géne. Klonovanie tohto génu a identifikácia expanzie (CGG)<sub>n</sub> a abnormálnej metylácie v jeho DNA u pacientov so syndrómom fragilného X prispelo k vypracovaniu metód umožňujúcich jeho priamu DNA diagnostiku. V práci autori predkladajú prvé skúsenosti s analýzou DNA v rodinách s familiárnym výskytom mentálnej retardácie, s cieľom identifikovať pacientov so syndrómom fragilného X, ako aj prenášačov tohto ochorenia. Pri vyhľadávaní postihnutých jedincov pomocou Southernovej membránovej hybridizácie, použili kombinácie rôznych restriktčných enzýmov a hybridizačných sond. Optimálne pracovné postupy využili pri analýze DNA postihnutých pacientov a prenášačov ochorenia v rodinách s výskytom syndrómu fragilného X. Celkove analyzovali DNA u 36 jedincov s 18 mentálne postihnutými (14 mužov a 4 ženy), pochádzajúcich z 10 rodín. Prítomnosť expanzie tripletu (CGG)<sub>n</sub> pozorovali u postihnutých len v 5 rodinách, kde identifikovali 9 mužov nesúcich plnú mutáciu, 5 fenotypicky zdravých prenášačov premutácie a 1 klinicky nepostihnutú prenášačku plnej mutácie (matky postihnutých). Zároveň v práci autori poukazujú na možnosť využitia tejto metódy v zdravotníckej praxi pri postnatálnej ako aj prenatalnej diagnostike postihnutých a prenášačov tohto ochorenia. (Tab. 2, obr. 3, lit. 21.)

**Kľúčové slová:** expanzia (CGG)<sub>n</sub>, premutácia, metylácia, analýza DNA, Syndróm fragilného X.

*Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 3, s. 150–156*

Genetickou zvláštnosťou, neobvyklou pre ochorenia podmienené génmi v X-chromozóme, je výskyt mužov prenášačov a variabilná penetrancia u žien prenášačiek. Približne len 30 % z nich sú mentálne postihnuté, kým 20 % mužov je klinicky normálnych prenášačov ochorenia (Sherman a spol., 1985). Títo zdraví muži prenášači majú vždy zdravé dcéry, ich vnuci a pravnuci však nesú vysoké riziko mentálneho poškodenia (40 % a 50 %). Ich matky a sestry sú vždy klinicky zdravé, bratia majú malé riziko postihnutia (9 %). Toto pozorovanie je známe ako Shermanov paradox (Sherman a spol., 1985) (obr. 1).

Početnosť postihnutých mužov sa v literatúre udáva 1:1250 (medzi mužmi); normálnych mužov prenášačov 1:5000. Početnosť žien prenášačiek sa odhaduje na 1:700; postihnutých žien na 1:2000 (Webb a spol., 1986).

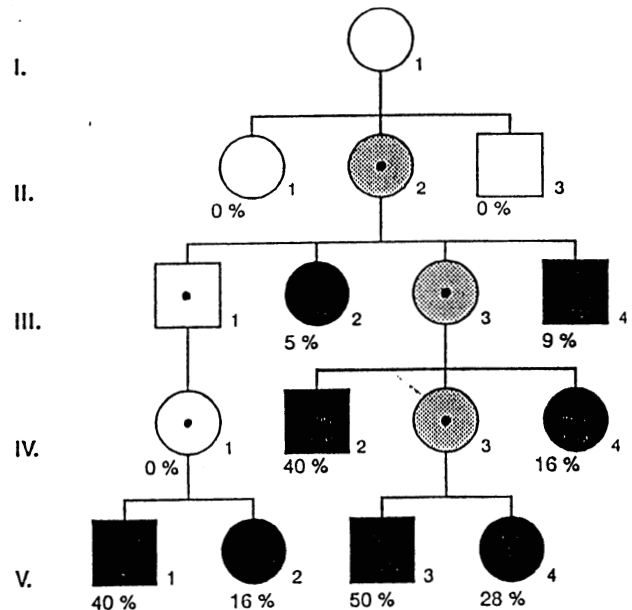
Laboratórium genetiky Ústavu molekulárnej fyziológie a genetiky Slovenskej akadémie vied v Bratislave a <sup>1</sup>Katedra molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave  
Institute of Molecular Physiology and Genetics, Laboratory of Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, and <sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava  
**Address for correspondence:** H. Poláková, RND, ÚMFG SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovakia  
Phone: +421.7.7966 37

Klinicky sa ochorenie u mužov prejavuje mentálnou retardáciou, predĺženou tvárou a vystupujúcim čelom, veľkými ušnicami, v dospelosti makroorchizmom a ďalšími znakmi spoločne označovanými ako Martinov—Bellov fenotyp. Postihnutí javia aj širokú škálu abnormálnych zmien v správaní sa, ako je hyperaktivita, nespôsobilosť, autizmus a podobne. U žien sú symptómy ochorenia menej časté a menej závažné. Cytogeneticky je ochorenie sprevádzané výskytom fragilného miesta na dlhom ramene X-chromozómu v oblasti Xq27.3 u všetkých postihnutých mužov, no len u 55 % žien prenášačiek (Sutherland a spol., 1991; Heitz a spol., 1992). Cytogenetická analýza, ktorá sa donedávna využívala ako jediná diagnostická metóda tohto ochorenia, však nestačí, aj keď je nevyhnutná, pretože neodhaľuje normálnych mužov prenášačov a ich dcéry ani všetky prenášačky. Pri prenatalnej diagnostike sa takisto ukázala nespoľahlivá.

Rozhodný zvrät priniesli až metódy založené na analýze DNA. Roku 1991 sa podarilo z oblasti Xq27.3 izolovať a neskôr charakterizovať gén nazvaný FMR1 a objasniť podstatu mutácií zodpovedných za syndróm fragilného X (Oberlé a spol., 1991; Verkerk a spol., 1991; Yu a spol., 1991). Molekulárno-genetické štúdiá uvedených autorov dokumentujú, že okrem malých výnimiek (Wöhrlé a spol., 1992; Gedeon a spol., 1992) je fenotyp syndrómu fragilného X výsledkom zmnženia počtu kópií trinukleotidovej repetície (CGG)<sub>n</sub>, ktorá sa nachádza na 5' konci prvého exónu génu FMR1. Expanzia v počte kópií CGG je u pacientov asociovaná s metyláciou cytidín-fosfát-guanozínových dinukleotidov (tzv. CpG ostrovčekov), nachádzajúcich sa 250 párov báz (bp) od (CGG)<sub>n</sub> tripletu a má za následok inaktíváciu génu FMR1. Zaujímavým úkazom je somatická variabilita v počte opakovaní tripletu CGG (Fu a spol., 1991). Variabilita v počte kópií tripletu CGG je v normálnej populácii v rozmedzí 6—54 (čo predstavuje 18—162 bp inzert), s priemerným počtom 29 kópií. U fenotypicky normálnych a cytogeneticky negatívnych prenášačov sa počet kópií CGG zvyšuje do 200 (ca 600 bp inzert); v tomto prípade hovoríme o tzv. premutácii. Premutácia nie je asociovaná s abnormálnou metyláciou CpG ostrovčeka. Mentálne postihnutí muži aj ženy a niektoré mentálne normálne ženy s počtom kópií CGG presahujúcim 200 (1000—3000 a viac bp inzert) nesú tzv. plnú mutáciu spojenú s metyláciou CpG ostrovčeka a inaktíváciou génu FMR1. U 15—20 % pacientov sa pozoroval výskyt plnej mutácie, ako aj premutácie. Tento tzv. genotypový mozaicizmus, ktorého mechanizmus nie je celkom známy, sa pozoroval vo všetkých tkanivách takýchto pacientov. Fenotypicky sú neodlíšiteľní od postihnutých nesúcich len samu plnú mutáciu (Fu a spol., 1991; Oberlé a spol., 1991; Rousseau a spol., 1991).

Odhalenie kauzálnej príčiny syndrómu fragilného X viedlo k rýchlemu rozvoju diagnostických metód založených na analýze DNA, či už na Southernovej membránovej hybridizácii, alebo na metóde polymerázovej retazovej reakcie (PCR). Pomocou týchto metód možno jednoznačne identifikovať expanziu tripletu CGG (Fu a spol., 1991; Rousseau a spol., 1991; Pergolizzi a spol., 1992). Tieto metódy sú vhodné aj pri odhaľovaní normálnych mužov prenášačov, prenášačiek premutácie, ako aj plnej mutácie u tých, ktorí sú cytogeneticky negatívni. S určitými obmedzeniami ich možno využiť aj pri prenatalnej diagnostike tohto ochorenia.

DNA-diagnostika syndrómu fragilného X sa robí už niekoľko rokov na popredných svetových pracoviskách. Nie je však zatiaľ v štádiu, keď by sa mohol vo všetkých situáciách použiť rovnaký a rutinný metodický postup. Iný protokol sa využíva pri detekcii

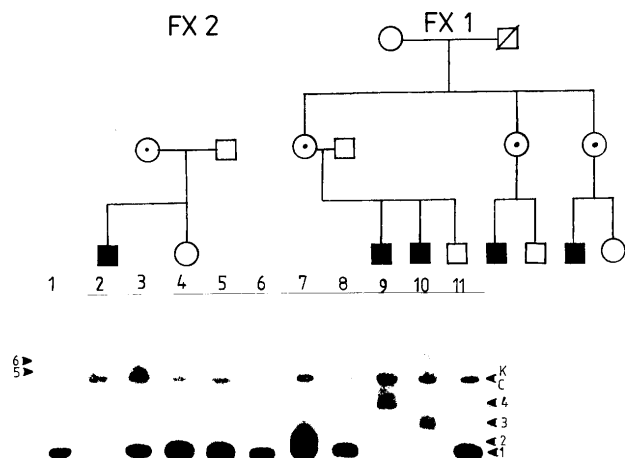


Obr. 1. Shermanov paradox. Príklad rodokmeňa zostaveného na základe údajov populačnej štúdie Shermana a spol. (1985) poukazujúceho na empirické riziko mentálnej retardácie (v %) na základe postavenia jedinca v rodinách so syndrómom fragilného X. (III/1 je normálny muž prenášač, II/2, III/3 a IV/1,3 sú zdravé prenášačky). Fig. 1. Sherman paradox. An example of pedigree with data taken from a population study of Sherman et al. (1985) showing the percentual risk of mental retardation based on the pedigree position of fragile X families. (III/1 is NTM, II/2, III/3, IV/1,3 are unaffected carriers).

pacientov v populácii mentálne postihnutých, iný, keď chceme identifikovať premutácie, ďalší pri vykonávaní prenatalnej diagnostiky z chóriových klkov alebo z amniocytov a zase iný, ak sa má stanoviť presný počet kópií CGG. Na Slovensku nie sú dosiaľ žiadne skúsenosti s jeho DNA-diagnostikou. Pokladáme preto za účelné uviesť a komentovať naše prvé skúsenosti a výsledky analýzy DNA v rodinách s familiárnym výskytom mentálnej retardácie pomocou Southernovej hybridizácie a diskutovať o možnostiach využitia tejto metódy v zdravotníckej praxi.

#### Materiál a metódy

**Pacienti.** V spolupráci s klinickými pracoviskami sme získali vzorky DNA od 14 mužských a 4 ženských pacientov pochádzajúcich z 10 rodín s familiárnym výskytom mentálnej retardácie. Na Centre lekárskej genetiky Fakultnej nemocnice v Bratislave, určili u týchto pacientov diagnózu syndrómu fragilného X chromozómu. Súčasťou vyšetrenia bola aj cytogenetická analýza prítomnosti fragilného X chromozómu u postihnutých jedincov. Zo 14 klinicky postihnutých mužských pacientov bolo 8 cytogeneticky pozitívnych, 1 suspektný v jednej mitóze a 5 cytogeneticky negatívnych. Mentálne postihnuté ženy (4) boli cytogeneticky negatívne. Súčasťou analýzy DNA bolo aj určenie prenášatstva premutácie alebo plnej mutácie u všetkých dostupných matiek pacientov (8), v jednom prípade starej matky a klinicky a cytogeneticky zdravých sestier postihnutých. Do analýzy DNA sme zahr-



Obr. 2. Analýza mutácií syndrómu fragilného X v rodinách s familiárnym výskytom mentálnej retardácie, po štiepení DNA s reštriktázou *EcoRI* a hybridizácii so sondou Ox 1.9. Normálne 5.2 kb fragmenty, ako aj fragmenty presahujúce 5.2 kb sú označené šípkami. U zdravých mužov a žien sa vyskytuje len 5.2 kb fragment-1 (dráhy 1, 4–6, 8 a 11). Zdravá prenášačka premutácie (5.2 a 5.4 kb — 1, 2) a jej postihnutí synovia (6.0 a 6.2 kb — 3, 4) sú v dráhach 7, 9 a 10. V 2. a 3. dráhe je postihnutý s plnou mutáciou (>6,6 kb — 6) a jeho matka, prenášačka plnej mutácie (5.2 a 6.4 kb — 5). V dráhach 1 a 6 sú kontrolné vzorky muža a ženy, K predstavuje konštantné fragmenty.

Fig. 2. Analysis of mutation in fra X families after *EcoRI* digests of DNA and hybridization to Ox 1.9 probe. The position of normal 5.2 kb and over 5.2 kb fragments are marked by arrows. Lanes 1, 4–6, 8 and 11 shows normal patterns seen in unaffected males and females. Healthy female carrier with premutation (5.2 and 5.4 kb — 1, 2) is seen in lane 7 and her two affected sons with fragments over 6.0 and 6.2 kb (3, 4) are seen in lanes 9 and 10. The lanes 3 and 2 display a carrier of full mutation with fragments 5.2 kb (1) and over 6.4 kb (5) and her affected son with more than 6.6 kb (6) fragment. Lines 1 and 6 represent male and female controls, C represents constant fragments.

nuli aj otcov a klinicky zdravých bratov postihnutých. Celkove sme analyzovali DNA u 36 jedincov.

**Metódy.** Genómovú DNA sme izolovali z leukocytov periférnej krvi štandardnou metódou (Kunkel a spol., 1977). Na reštrikčné štiepenie sme použili 6 µg vysokomolekulárnej DNA, ktorú sme štiepili vybranými reštriktázami a ich kombináciami uvedenými v tabuľke 1 a hybridizovali s nasledovnými sondami. Sonda pE5.1 predstavuje 5,2 kb dlhý *EcoRI* fragment génu FMR 1, klonovaný do plazmidu Bluescript SK+, Ox1.9 je 1,9kb dlhý fragment vyštiepený z distálnej časti *EcoRI* fragmentu reštriktázami *EcoRI/BamHI* a Ox0.55 je 0,6 kb *XhoI/PstI* fragment. Elektroforetická separácia fragmentov DNA prebiehala v 0,8 % agarózovom géli (po štiepení reštriktázami *EcoRI*, *BglII* a po dvojitom štiepení), resp. v 1 % géli (po štiepení reštriktázou *PstI*). Dĺžky reštrikčných fragmentov sme určovali pomocou Southernovej membránovej hybridizácie (Southern, 1975), po prenesení a zakotvení DNA na nylónovej membráne (Hybond N+) a hybridizácii s rádioaktívne značenými sondami. Rádioaktívne značenie sond sme uskutočňovali metódou náhodných hexanukleotidových primerov za použitia rádioaktívne značeného fosforu -P32dCTP metódou podľa Feinberga a Vogelsteina (1984).

Pri štiepení DNA reštriktázou *EcoRI* sme do analýzy zahrnuli vzorky DNA všetkých jedincov a hybridizovali so sondou pE5.1

Tab. 1. Reštrikčné endonukleázy, sondy a veľkosti reštrikčných fragmentov použitých pri Southernovej hybridizácii. Tab. 1. Enzymes used and fragment sizes detected with Southern blot analysis.

Allely Alleles	Reštriktázy a veľkosť reštrikčných fragmentov (kb) Restrictases and restriction fragment sizes (kb)				
	Sondy Probes				
pE5.1 Ox0.55 Ox1.9	Ox1.9	Ox0.55			pE5.1
<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI/SacII(EagI)</i> <i>HindIII/SacII</i>	<i>PstI</i>			<i>BglII</i>
	muži males	ženy females			
Normálna Normal	5,2	2,8	2,8+5,2	1,0	12,0
Premutácia Permutation	5,3-5,7	2,9-3,3	2,9-3,3 a/and 5,3-5,7	1,1-1,6	NO NR
Mutácia Mutation	>5,7	>5,7	>5,7	NO NR	>12,5

kb - kilobáza (1000 bázových párov)  
kilobase (1000 base pairs)

NO - neodporúča sa použiť

NR - not recommended

a po odmytí membrán rehybridizovali so sondami Ox1.9 a Ox0.55. Reštrikčné štiepenie reštriktázou *PstI* a hybridizáciu so sondou Ox0.55 sme uskutočnili len u istých alebo možných prenášačiek ako aj klinicky zdravých bratov postihnutých. Po zhodnotení výsledkov získaných pri použití opísanej reštrikčnej analýzy a hybridizácie sme do ďalšej analýzy zahrnuli len DNA pacientov a ich príbuzných z rodín s prítomnosťou plnej mutácie alebo premutácie (FX1-FX5). Uvedené vzorky DNA sme podrobili dvojitému štiepeniu za použitia nasledovnej kombinácie reštriktáz *EcoRI/SacII*; *EcoRI/EagI*; *HindIII/SacII* (reštriktázy *EcoRI* — *HindIII* a *EagI* — *SacII* sú si ekvivalentné) a hybridizovali so sondou Ox1.9.

## Výsledky a diskusia

X-chromozómovo dedičné formy mentálnej retardácie sa v ľudskej populácii vyskytujú s vysokou frekvenciou 1,83:1000, z ktorých 25–40 % predstavuje syndróm fragilného X (Heitz a spol., 1992). Avšak vďaka veľkej fenotypickej variabilite pri tomto ochorení je jeho klinická diagnóza nespoľahlivá. Ani cytogenetická detekcia fragilného X-chromozómu nie je dostatočne citlivá, pretože neodhaľuje prenášačov premutácie a približne 50 % prenášačiek plnej mutácie. Navyše, v tesnej blízkosti Xq28 boli nedávno identifikované ďalšie dve fragilné miesta FRAXE (Sutherland a Bakker, 1992) a FRAXF (Hirst a spol., 1993), ktoré môžu prispieť k mylnej interpretácii cytogenetického nálezu v rodinách so suspektným syndrómom fragilného X. Až objasnenie molekulárnej podstaty mutácií v géne FMR1, výsledkom ktorých je jeho inaktivácia a manifestácia fenotypu syndrómu fragilného X, umožní

nilo charakterizovať pacientov s týmto ochorením na molekulárnej úrovni. Ako vyplýva z literatúry, najčastejšou mutáciou, výsledkom ktorej je syndróm fragilného X, je variabilná amplifikácia tripletu CGG v FMR1 géne (inzert viac ako 600 bp), výsledkom čoho je predĺženie restriktčných fragmentov, detegovaných na autorádiograme bežnou metódou Southernovej hybridizácie (Oberle a spol., 1991; Verkerk a spol., 1991; Yu a spol., 1991)

V predloženej práci predkladáme výsledky analýzy DNA v rodinách s familiárnym výskytom mentálnej retardácie, s cieľom, v podmienkach nášho laboratória vypracovať optimálny protokol umožňujúci detegovať mutácie syndrómu fragilného X tak, aby ho bolo možné využiť pri prenatalnej a postnatalnej diagnostike tohto ochorenia, ako aj pri identifikácii prenášačov premutácie.

Ako vyplýva z tabulky 1, pri analýze DNA metódou Southernovej hybridizácie sme využili rôznu kombináciu hybridizačných sond, ako aj restriktčných enzýmov. Jednoznačne interpretovateľné výsledky sme dosiahli pri použití sond pE5.1 a Ox1.9 pri štiepení DNA restriktázami *EcoRI* a *BglII*, sondy Ox1.9 pri dvojitej kombinácii štiepenia a Ox0.55 pri použití restriktázy *PstI*. Sonda pE5.1 obsahuje vo svojej sekvencii okrem tripletu (CGG)<sub>n</sub> aj niektoré príbahlé centromerické sekvencie, ktoré sú vysoko repetetívne, preto je jej použitie technicky náročné. Jej využitie pri hybridizácii si vyžaduje prítomnosť nadbytku heterológnej DNA, avšak i napriek tomu, býva rádioaktívny signál často slabý a je niekedy ťažké detegovať heterogénne plné mutácie.

Pri vyhľadávaní pacientov so syndrómom fragilného X v populácii mentálne postihnutých, je podľa literatúry dostačujúce použiť štiepenie DNA restriktázou *EcoRI* a hybridizáciu s ktoroukoľvek zo sond opísaných v tabulke 1 (Oostra a spol., 1993). Preto sme v úvode nášho experimentu začali skrining pacientov za použitia štiepenia DNA restriktázou *EcoRI*. Do analýzy DNA sme zahrnuli vzorky 4 ženy a 14 mužov mentálne postihnutých, 8 matiek a 1 starú matku postihnutých a 4 klinicky zdravé možné prenášačky premutácie (sestry postihnutých). Ako kontrola slúžila DNA otcov a zdravých bratov pacientov (spolu 5). U 9 zo 14 postihnutých mužov sme detegovali prítomnosť plnej mutácie s fragmentmi dlhšími ako 6kb (obr. 2) (dráhy 2, 9 a 10), 5 klinicky a cytogeneticky zdravých prenášačiek premutácie (4 matky a 1 sestra pacientov nesúcich plnú mutáciu) s fragmentami dlhými 5,2 a 5,4kb (obr. 2) (dráha 7) a 1 cytogeneticky pozitívnu, avšak klinicky zdravú prenášačku plnej mutácie s fragmentami 5,2 a 6,4kb (obr. 2) (dráha 3). V ostatných vzorkách DNA, ktoré zahrňovali 5 mentálne postihnutých chlapcov a 4 mentálne postihnuté dievčatá, ako aj DNA zdravých jedincov sme detegovali len fragmenty normálnej dĺžky 5,2 kb (obr. 2) (dráhy 1, 4-6, 8 a 11). U postihnutých jedincov s plnou mutáciou sa fragmenty často javili ako šmuha vyplývajúca zo somatickej variability v počte opakovaní tripletu CGG. V takýchto prípadoch sme výsledok overili štiepením DNA restriktázou *BglII*, po ktorom sa zmes heterogénnych fragmentov kondenzovala do jedného 12,5 kb fragmentu (fragment normálnej dĺžky bol 12 kb dlhý). Týmto postupom sme v rodinách FX1-FX5 potvrdili prítomnosť syndrómu fragilného X, ako aj pozitívny cytogenetický nález u pacientov. Výsledky analýzy DNA v rodine FX1 dokumentujú výskyt 3 sestier, prenášačiek rovnako veľkej premutácie (inzert dlhý ca 200 bp), ktorá expandovala na plnú mutáciu s variabilnou dĺžkou fragmentov pozorovaných u ich 4 synov (6,6, 6,2 a 6kb) (obr. 2) (dráhy 7-11). U zdravých súrodencov, ako aj u starej matky sa vyskytovali fragmenty normálnej dĺž-



**Obr. 3.** Analýza mutácií syndrómu fragilného X v rodinách s familiárnym výskytom mentálnej retardácie, po štiepení DNA restriktázami *EcoRI/SacII* a hybridizácii so sondou Ox 1.9. Veľkosti fragmentov zodpovedajúce normálnemu aktívnemu (2,8 kb) a metylovanému inaktívnemu X-chromozómu (5,2 kb) sú označené šípkami. Fragmenty normálnej dĺžky u zdravej ženy sú v dráhe 7, u zdravého muža v dráhe 2. Postihnutí muži nesú metylované heterogénne fragmenty presahujúce veľkosť 6 kb (dráhy 1, 4 a 6). Zdravá prenášačka premutácie nesie kombináciu aktívnych X s fragmentmi 2,8 a 3,0 kb dlhými a neaktívnych X-chromozómov s fragmentmi dlhými 5,2 a 5,4 kb (dráha 3). U prenášačky plnej mutácie sa vyskytuje veľký metylovaný (>6 kb), ako aj slabý 5,2 kb fragment zodpovedajúci mutovanému a normálnemu inaktívnemu X-chromozómu (dráha 5), ako aj 2,8 kb fragment na aktívnom X.

**Fig. 3.** Analysis of fragile X mutation in families with mental retardation, detected by the probe Ox 1.9 after *EcoRI/SacII* digests of DNA. Sizes of fragments corresponding with normal active (2.8 kb) and the methylated inactive chromosomes (5.2 kb) are marked by the lower and upper arrows. A normal female pattern is seen in lane 7, a normal male pattern in lane 2. In affected males (lanes 1, 4 and 6) a heterogeneous pattern of methylated and mutated fragments are seen. A normal expressing carrier female (lane 3) shows bands from both methylated and unmethylated chromosomes (2.8 and 3.0 kb, 5.2 and 5.4 kb). A large and methylated insertion of over 6 kb with a little of 5.2 kb band corresponding with the normal inactive X, is seen in a female with full mutation (lane 5).

**Tab. 2. Prognóza fenotypu po analýze DNA.**

**Tab. 2. Phenotype prediction after DNA analysis.**

Výsledok DNA-analýzy	Fenotyp
Result of DNA analysis	Phenotype
Normálna Normal	Normálny Normal
Premutácia Premutation	Prenášači s normálnym fenotypom Carrier with normal phenotype
Plná mutácia Full mutation	Muži - vysoká pravdepodobnosť MR Males - high probability of MR Ženy - 50-75 % pravdepodobnosť MR 25-50 % prenášačky s normálnym fenotypom Females - 50-75 % probability of MR 25-50 % carrier with normal phenotype

MR - mentálna retardácia  
mental retardation

ky. Prítomnosť fragmentu normálnej dĺžky u starej matky dokazuje, že pôvodcom premutácie bol starý otec, normálny muž prenášač. Príkladom prenosu mutácie cez starú matku sú pozorovania v rodine FX2. Keďže v potomstve normálnych mužov prenášačov sa podľa literatúry nepozorovali dcéry s plnou mutáciou, je veľmi pravdepodobné, že plná mutácia u matky, ktorú preniesla na svojho syna, nie však na dcéru, pochádza od starej matky postihnuteho (obr. 2) (dráhy 2-5). Pretože sme nemali k dispozícii DNA starej matky, nedá sa určiť, či bola prenášačka plnej mutácie alebo premutácie. Nález dvoch súrodencov v rodine FX3 demonštroval prítomnosť plnej mutácie u postihnutého brata, kým u jeho sestry sa pozorovali fragmenty normálnej dĺžky (obr. 3) (dráhy 6 a 7). V rodine FX4 sa vyskytli 2 postihnutí s plnou mutáciou, ich matka, ako aj jej sestra boli prenášačky premutácie a v rodine FX5 sme mali k dispozícii len 1 postihnutého s prítomnosťou plnej mutácie. U ostatných klinicky postihnutých pacientov (5 mužov a 4 žien) z rodín FX 6-10 sme nepotvrdili prítomnosť plnej mutácie ani premutácie. Aj napriek tomu, že sme u týchto pacientov nepotvrdili prítomnosť expanzie CGG, ktorí boli aj cytogeneticky negatívni, nemôžeme u nich jednoznačne vylúčiť syndróm fragilného X. U týchto jedincov sa totiž môže vyskytovať aj iný typ mutácie zodpovednej za fragilný X-fenotyp. Z literatúry sú známe viaceré príklady fragilných X pacientov s deléciami FMR1 génu (alebo len jeho časťou), ako aj pacienti bez prítomnosti expanzie CGG, ale s výskytom bodových mutácií v kódujúcej oblasti tohto génu (Gedeon a spol., 1992; Wohrle a spol., 1992). Navyše títo jedinci môžu mať okrem delécií alebo bodových mutácií FMR1 génu, mutácie na niektorom inom lókuse, ktoré vyvolávajú rovnaký fenotyp, napr. na lókusoch FRAXE (Sutherland a Bakker, 1992) alebo FRAXF (Hirst a spol., 1992). Po odhalení podstaty mutácie v lókuse FRAXE (FMR2 gén) (Knight a spol., 1993) sa totiž ukázalo, že mnohí pacienti s klinickou diagnózou syndrómu fragilného X, ale bez očakávanej expanzie CGG, nesú mutáciu práve v tomto lókuse (Biancalana a spol., 1996). Mutácia v lókuse FRAXE je podobne ako v lókuse FRAXA, spojená s expanziou trinukleotidového tripletu (CCG), ale s ľahším stupňom mentálnej retardácie.

Pri štiepení DNA reštriktázou *EcoRI* a hybridizácii jednou z uvedených sond (tab. 1) je niekedy u pacientov bez klinických príznakov ťažko odlišiť alely s malou plnou mutáciou, od alel s veľkou premutáciou (v rozmedzí 500–700 bp). Neexistuje totiž presná hranica medzi najdlhšou alelou s premutáciou a najkratšou s plnou mutáciou. Pretože plné mutácie sú asociované s metyláciou CpG ostrovčeka vyskytujúceho sa v blízkosti CGG tripletu, v takýchto prípadoch pri odhaľovaní plných mutácií odporúča sa použiť štiepenie DNA v kombinácii s metylsenzitívnymi reštriktázami, ktoré hypermetylovanú DNA neštiepia a výsledkom je fragment abnormálnej dĺžky (Fu a spol., 1991; Oostra a spol., 1993). Preto sme DNA pacientov ďalej analyzovali za použitia štiepenia reštriktázami *EcoRI/SacII* a *EcoRI/EagI* a hybridizovali so sondou Ox1.9. Očakávané dĺžky reštriktčných fragmentov pri použití kombinácie štiepenia s metylsenzitívnymi reštriktázami sú uvedené v tabuľke 1. U zdravých mužov a žien sme pozorovali normálne 2,8 kb dlhé fragmenty na aktívnych a u žien aj 5,2 kb dlhé fragmenty na inaktívnych X-chromozómoch (obr. 3) (dráhy 2 a 7). Prítomnosť premutácie sa u žien manifestovala ako štyri reštriktčné fragmenty, ktoré predstavovali štyri možné kombinácie: aktívnych X-chromozómov nesúcich normálne a premutačné alely (2,8

a 3 kb) a inaktívnych X chromozómov s alelami normálnej dĺžky a s premutáciou (5,2 a 5,4 kb) (obr. 3) (dráha 3). Plné metylované mutácie sa javili ako fragmenty dlhšie ako 5, 2 kb u oboch pohlaví. U postihnutých mužov sme zaznamenali zmes heterogénnych fragmentov 6 kb dlhých (obr. 3) (dráhy 1, 4 a 6). No na rozdiel od mužov u prenášačky plnej mutácie sme okrem fragmentu dlhého 6 kb pozorovali aj fragmenty normálnej dĺžky vyskytujúce sa na aktívnych a inaktívnych X-chromozómoch s variabilnou relatívnou intenzitou (2,8 a 5,2 kb) (obr. 3) (dráha 5). Uvedeným postupom sme u všetkých postihnutých jedincov potvrdili prítomnosť plnej metylovej mutácie a u žien prenášačiek, prítomnosť premutácie. V rodine FX2 sme u prenášačky plnej mutácie, u ktorej bol výsledok po štiepení reštriktázou *EcoRI* diskutabilný, potvrdili prítomnosť plnej mutácie. U ostatných fenotypicky zdravých jedincov, ako aj mentálne postihnutých pacientov v rodinách FX6-FX10 sme pozorovali len fragmenty normálnej dĺžky (2,8 kb u mužov a 2,8 a 5,2 kb u žien). Výsledky analýzy DNA korelovali s cytogenetickým nálezom pacientov.

Vďaka veľkej fenotypickej variabilite v počte opakovaní CGG pozorovanej v normálnej populácii takisto ťažko rozlíšiť hranicu medzi počtom opakovaní CGG, ktoré sú ešte normálne (meioticky stabilné) a tými, ktoré sú už meioticky nestabilné (premutácie). V niektorých prácach sa napríklad uvádza stabilita alel do 51 opakovaní CGG, kým nad 52 sú alely už nestabilné (Fu a spol., 1991). Snow a spol. (1993) uvádzajú, že v populácii sa vyskytuje cca 1 % nestabilných alel, ktoré expandujú na premutáciu. Preto je veľmi dôležité pri určovaní prenášačiek s hraničnými počtami opakovaní CGG (medzi 45–55) zahrnúť do analýzy DNA aj ostatných príbuzných vo vyšetrovaných rodinách, a tak dokumentovať meiotickú stabilitu. No pri takejto analýze, keď je nevyhnutné stanoviť presný počet opakovaní CGG, je metóda Southernovej hybridizácie málo citlivá a vyšetrenie sa odporúča doplniť analýzou založenou na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) podľa Fu a spol. (1991) alebo Pergolizzi a spol. (1992). Pretože sa nám nepodarilo pomocou PCR-analýzy podľa Pergolizzia a spol. (1992) jednoznačne určiť veľkosti alel u prenášačiek, sme analýzu DNA doplnili štiepením reštriktázou *PstI* a hybridizáciou so sondou Ox0.55, ktoré sa odporúča použiť pri odhaľovaní prenášačov malých premutácií (Oostra a spol., 1993). Prítomnosť fragmentov normálnej dĺžky (1–1,1 kb) u klinicky zdravých jedincov a normálnych a 1,2 kb dlhých fragmentov u prenášačiek, potvrdili výsledky predchádzajúcej analýzy.

Pri genetickej prognóze ochorenia je dôležité vedieť, aké je riziko expanzie premutácie na plnú mutáciu a ako koreluje veľkosť (CGG)<sub>n</sub> a prítomnosť metylácie s fenotypom. Aj napriek tomu, že mechanizmus spôsobujúci nestabilitu premutačnej alely nie je ešte celkom jasný, populačno-genetické štúdiá pacientov nasvedčujú, že riziko expanzie premutácie stúpa so stúpajúcou dĺžkou premutačnej alely, pričom záleží na pohlaví rodiča, u ktorého sa premutácia vyskytuje. Expanzia premutácie na plnú mutáciu nastáva len počas meiózy u ženy, čo dokumentuje aj skutočnosť, že všetky dcéry normálnych mužov prenášačov sú zdravé prenášačky premutácie (Oberle a spol., 1991). Na druhej strane, v potomstve žien nesúcich premutačnú alelu, riziko jej expanzie exponenciálne rastie s počtom kópií (CGG)<sub>n</sub> a výsledkom sú postihnutí muži, ale ich dcéry predstavujú dve nehomogénne skupiny: prenášačky premutácie alebo zdravé a postihnuté prenášačky plnej mutácie (Fu a spol., 1991; Heitz a spol., 1992; Snow a spol., 1993).

Z prehľadu výsledkov uvedených autorov možno zhrnúť nasledovné: pokiaľ je premutácia prenášaná ženou, je riziko jej expanzie pri počte kópií (CGG)<sub>n</sub> 40-nulové. V rozmedzí 40—70 kópií (CGG)<sub>n</sub>, je riziko 17—30 %. Už pri 70—90 kópiách (CGG)<sub>n</sub> je 50—70 % a pri počte >90 kópií je riziko 100 %. Ak počet kópií presiahne 200, sú alely aj mitoticky nestabilné, výsledkom čoho je často výskyt mozaiky. Ako vyplýva z našich výsledkov analýzy DNA u prenášačiek s veľkosťou premutácie ca 66—70 kópií CGG v rodinách FX1-FX5, riziko expanzie na plnú mutáciu bolo približne 30—50 %.

Pri sledovaní vzťahu prítomnosti mentálnej retardácie a veľkosti premutácie sa v literatúre neopisuje žiadna korelácia ani u mužov ani u žien. Ako sa pozorovalo u mužských pacientov s plnou metylovanou mutáciou, stupeň mentálnej retardácie silne koreloval s prítomnosťou metylácie CpG ostrovčeka. Na druhej strane u žien s plnou metylovanou mutáciou prítomnosť mentálneho postihnutia, ako aj jeho intenzity súvisel s pomerom metylovaných ku nemetylovaným fragilným X-chromozómom, ktorý je variabilný v dôsledku nerovnomernej inaktívácie normálnych a mutovaných X-chromozómov (Oberle a spol., 1991; Oostra a spol., 1993). Keďže plné metylované mutácie sa manifestujú nad 5,2 kb fragmentom, možno z nerovnakej intenzity 2,8 kb (nemetylovaných) a 5,2 kb (metylovaných) fragmentov určiť pomer aktívnych (nemetylovaných) a neaktívnych (metylovaných) X-chromozómov. Takýmto príkladom je prenášačka plnej mutácie vyskytujúca sa v našom súbore. Nepozorovali sa u nej zjavné známky mentálnej retardácie, no cytogenetický nález bol pozitívny. Ako vyplýva z obrázka 3 (dráha 5), intenzita jej normálnych nemetylovaných alel na aktívnom X (2,8 kb) je o niečo väčšia ako metylovaných na inaktívnom X (5,2 kb) chromozóme, čo znamená, že väčšina alel s plnou mutáciou sa nachádza na inaktívnom X-chromozóme. Táto skutočnosť môže zároveň vysvetliť jej normálny mentálny stav. Pri klinickom prejave ochorenia u žien majú dôležitú úlohu aj rozdiely v stupni inaktívácie X-chromozómu. Všeobecne sa v literatúre uvádza, že 50—75 % žien nesúcich plnú mutáciu sú mentálne postihnuté a 25—50 % sú fenotypicky normálne. Celkové zhodnotenie rizika výskytu mentálneho poškodenia v rodinách s výskytom syndrómu fragilného X po analýze DNA je zhrnuté v tabuľke 2 (Oostra a spol., 1993).

Pri prenatálnej diagnóze a prognóze výskytu mentálnej retardácie v potomstve je dôležité jasne odlíšiť premutáciu od plnej mutácie, hlavne u mužských plodov. I keď je prítomnosť metylácie CpG ostrovčeka dobrý marker fenotypu syndrómu fragilného X u mužov, nie je to marker celkom spoľahlivý, ak sa stanovuje v DNA z buniek chóriových klkov. Porovnávacie štúdie viacerých autorov dokumentovali prítomnosť plnej mutácie v bunkách chóriových klkov, ako aj v rôznych tkanivách plodu, no metylácia CpG ostrovčeka bola obmedzená len na fetálnu DNA (Hirst a spol., 1992; Oberle a spol., 1991; Sutherland a spol., 1991). Z výsledkov prác uvedených autorov vyplýva, že plná mutácia môže byť v bunkách chóriových klkov nemetylovaná, a teda mylne diagnostikovaná ako premutácia. Veľmi treba zdôrazniť aj situáciu, ak sa v bunkách chóriových klkov pozoruje premutácia. V dôsledku mitotickej nestability, ktorej mechanizmus a trvanie môžu byť iné v bunkách chóriových klkov ako v embryonálnych tkanivách, sa môže stať, že veľká premutácia, ktorá sa javí stabilnou v choriónoch, môže v skorých štádiách embryonálneho vývinu expandovať na plnú mutáciu sprevádzanú ďalej somatickou nestabilitou.

Preto sa pri prenatálnej diagnostike odporúča analýza DNA buniek plodovej vody alebo fetálnej krvi a vzhľadom na heterogenitu mutácií vo fetálnych tkanivách doplniť štiepením reštriktázou *Bgl*III (Oostra a spol., 1993). Všeobecne platí, že ak sa prenatálne diagnostikuje mužský plod s plnou mutáciou, riziko mentálnej retardácie je 100 %. Ak sa však prenatálne diagnostikuje ženský plod s plnou mutáciou, nedá sa s istotou predpovedať, či bude postihnutý alebo nie. Ak sa však vychádza zo skutočnosti, že prenatálne diagnostikované ženské plody s pozitívnym nálezom sa najčastejšie vyskytujú u matiek, ktoré už majú postihnuté deti a nesú obyčajne (nie však vždy) väčší inzert (CGG)<sub>n</sub> ako ich matky, tak riziko ich mentálnej retardácie je ca 50—75 % (tab. 2).

V predloženej práci sme demonštrovali niekoľko metodických postupov používaných pri prenatálnej, ako aj postnatálnej diagnóze syndrómu fragilného X. Pri metóde Southernovej hybridizácie sme použili kombináciu rôznych hybridizačných sond, ako aj reštrikčných enzýmov, ktoré sme aplikovali pri analýze DNA pacientov s familiárnym výskytom mentálnej retardácie. Naše výsledky dokumentujú, že použité postupy Southernovej membránovej hybridizácie sú vhodné pri detekcii mutácie zapríčínujúcej expanziu CGG tripletu u postihnutých so syndrómom fragilného X, ako aj pri ich odlíšení od pacientov s inou formou geneticky podmienenej mentálnej retardácie, prípadne s iným typom mutácií zodpovedných za toto ochorenie. Pomocou uvedenej metódy a za použitia reštrikčného štiepenia s metylsenzitívnymi reštriktázami možno jednoznačne identifikovať postihnutých nesúcich plnú mutáciu a pri hraničných počtoch (CGG)<sub>n</sub> odlíšiť prenášačky s plnou mutáciou od prenášačiek s premutáciou. No pri oddiferencovaní prenášačov s malou premutáciou od jedincov s normálnym počtom (CGG)<sub>n</sub>, keď je nevyhnutné stanoviť presný počet opakovaní CGG, sa odporúča doplniť vyšetrovanie analýzou založenou na polymerázovej refazovej reakcii (PCR) podľa Fua a spol. (1991) alebo Pergolizziho a spol. (1992).

Celkovo sme v našom súbore mentálne postihnutých jedincov (14 mužov, 4 ženy) identifikovali 9 postihnutých mužov nesúcich plnú mutáciu, 1 klinicky zdravú matku postihnutého s plnou mutáciou, 4 matky a 1 sestru postihnutých s premutáciami. V ostatných analyzovaných vzorkách DNA sme nepozorovali prítomnosť expanzie tripletu CGG. V našom súbore sa nevyskytol normálny muž prenášač. Takýmto postupom sme v 5 rodinách (z 10 analyzovaných) na základe prítomnosti expandovaného tripletu CGG u postihnutých pacientov potvrdili diagnózu syndrómu fragilného X. Veríme, že naše výsledky budú podkladom pri molekulárno-genetickej diagnóze syndrómu fragilného X a pri vyhľadávaní prenášačov tohto ochorenia a nájdu uplatnenie v zdravotníckej praxi.

## Literatúra

**Biancalana V., Taine L., Bouix J.C., Finck S., Chauvin A., De Verneuil H., Knight S.J.L., Stoll C., Lacombe D., Mandel J.L.:** Expansion and methylation status at FRAXE can be detected an EcoRI blots used for FRAXA diagnosis: Analysis of four FRAXE families with mild mental retardation in males. *Amer. J. Hum. Genet.*, 59, 1996, s. 847—854.

**Feinberg A.P., Vogelstein B.:** A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 1983, s. 6—13.

**Fu Y.H., Kuhl D.P.A., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Richards S., Verkerk A.J.M.H., Holden J.J.A., Fenwick R.G., Warren S.T., Oostra**

- B.A., Nelson D.L., Caskey C.T.:** Variation of the CGG repeat at the fragile X site. Results in genetic instability: Resolution of Sherman paradox. *Cell*, 67, 1991, s. 1047–1058.
- Gedeon A.K., Baker E., Robinson H., Partington M.W., Gross B., Manca A., Korn B., Poustka A., Yu S., Sutherland G.R., Mulley J.C.:** Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR 1 deletion. *Nature Genet.*, 1, 1992, s. 341–344.
- Heitz D., Devys D., Imbert G., Kretz Ch., Mandel J.L.:** Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J. Med. Genet.*, 29, 1992, s. 794–801.
- Hirst M.C., Barnicoat A., Flynn G., Wang Q., Daker M., Buckle V.J., Davies K.E. a spol.:** The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq 27-28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 1993, s. 197–200.
- Knight S.J.L., Flannery A.V., Hirst M.C., Campbell L., Christodoulou Z., Phelps S.R., Pointon J. a spol.:** Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell*, 74, 1993, s. 1–20.
- Kunkel L.M., Smith K.D., Bayer S.H., Borgaonkar D.S., Wachtel S.S., Miller O.J., Bregg W.R., Jones H.V., Rary J.M.:** Analysis of human Y-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1977, s. 1245–1249.
- Oberle I., Rousseau F., Heitz D., Kretz C., Devys P., Hanauer A., Boue J., Bertheas M.F., Mandel J.L.:** Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in Fragile X syndrome. *Science*, 252, 1991, s. 1097–110.
- Oostra B.A., Jacky P.B., Brown W.T., Rousseau F.:** Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. *J. Med. Genet.*, 30, 1993, s. 410–413.
- Pergolizzi R.G., Erster S.H., Goonewardena P., Brown W.T.:** Detection of full fragile X mutation. *Lancet*, 339, 1992, s. 271–272.
- Rousseau F., Heitz D., Biancalana V., Blumenfeld S., Kretz Ch., Boué J., Tommerup N., Hagen C., DeLozier-Blanchet C., Croquette M.F., Gilgenkrantz S., Jalbert P., Voelckel M.A., Oberlé I., Mandel J.L.:** Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Engl. J. Med.*, 325, 1991, s. 1673–1681.
- Sherman S.L., Jacobs P.O.A., Morton N.E., Froster-Iskenius U., Howard-Peebles, P.N., Nielsen K.B., Partington N.W., Sutherland G.R., Turner G., Watson M.:** Further segregation analysis of fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.*, 69, 1985, s. 3289–3299.
- Southern E.M.:** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 1975, s. 503–517.
- Sutherland G.R., Gedeon A., Kornman L., Donnelly A., Byard, R.W., Mulley J.C., Kremer E., Lynch M., Pritchard M., Yu S., Richards R.I.:** Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *New Engl. J. Med.*, 325, 1991, s. 1720–1722.
- Sutherland G.R., Baker E.:** Characterization of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum. Mol. Genet.*, 1, 1992, s. 111–113.
- Snow K., Doud L.K., Hagerman R., Pergolizzi R.G., Erster S.H., Thibodeau S.N.:** Analysis of a CGG sequence at the FMR 1 locus in fragile X families and in the general population. *Amer. J. Hum. Genet.*, 53, 1993, s. 1217–1228.
- Verkerk A.J.M.H., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P.A., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F., Eussen B.E., Ommen G.J.B., Blonden L.A.J., Riggins G.J., Chastian J.L., Kunst C.B., Nelson D.L., Oostra B.A., Warren S.T.:** Identification of a gene (FMR 1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65, 1991, s. 905–914.
- Webb T.P., Bunday S.E., Thake A.J., Todd J.:** Population incidence and segregation ratios in the Martin\_Bell syndrome. *Amer. J. Med. Genet.*, 23, 1986, s. 573–580.
- Wohrle D., Kotzor D., Hirst M.C., Manca A., Korn B., Schmidt A., Barbi G.:** A microdeletion of less than 250kb, including the proximal part of the FMR1 gene and the fragile X site, in a male with the clinical phenotype of fragile X- syndrome. *Amer. J. Hum. Genet.*, 51, 1992, s. 299–306.
- Yu S., Pritchard M., Kremer E., Lynch M., Nancarrow J., Baker E., Holman K., Mulley J.C., Warren S.T., Schlesinger, D., Sutherland G.R., Richards R.J.:** Fragile X genotype characterized by unstable region of DNA. *Science*, 252, 1991, s. 1179–1181.

Do redakcie došlo 13.12.1996.

## PREDSTAVUJEME NOVÉ KNIHY

**Ferenčík M. a spol.: Zápal — horúčka — bolesť.** Bratislava, Slovart GTG-SAP 1997, 215 strán.

Kniha podáva prehľad o základných morfológických a klinických príznakoch akútneho a chronického zápalu, ako aj o bunkových a molekulových mechanizmoch zúčastňujúcich sa na zápalovej reakcii. Ide pritom o integrujúci pohľad imunológa, patológa, patofyziológa a internistu.

Kniha je rozdelená do troch kapitol, ktorých názvy sa kryjú s názvom celej monografie. V prvej kapitole sa uvádza definícia zápalu, charakterizuje sa tekutý a bunkový exsudát, bunky a mediátory zúčastňujúce sa na zápale. Osobitne podrobne je spracovaná podkapitola o bunkových zložkách zápalového exsudátu. Okrem kľúčových výkonných a regulačných zápalových buniek (cytokíny, lysozomové enzýmy, voľné radikály odvodené od kyslíka a dusíka), obranných a poškodzujúcich funkcií, sa opisujú aj najnovšie poznatky o úlohe eozinofilov, žírnych buniek a bazofilov, T-lymfocytov, endotelových buniek ciev a trombocytov. Rozsiahla podkapitola sa venuje mediátorom zápalu. Sú v nej najnovšie údaje o fyziologických a patofyziologických účinkoch histamínu, sérotonínu, lipidových mediátorov (prostaglandíny, tromboxány, leukotriény, lipoxíny), zložkách a produktoch komplementového, hemokoagulačného, fibrinolytického a kinínového systému, o cytokínoch zúčastňujúcich sa na zápalových odpovediach, chemotaktických faktoroch a reaktantoch (proteínoch) akútnej fázy zápalu. V rámci tejto podkapitoly a uvádzajú aj najnovšie údaje o funkcii chemokínov, novej skupiny biologických mediátorov, ktoré okrem regulácie zápalových reakcií sa v súčasnosti intenzívne študujú aj v súvislosti s ich možným významom v patogenéze viacerých chorôb, vrátane AIDS.

V podkapitole o mechanizmoch migrácie leukocytov z postkapilárnych venúl do zapáleného tkaniva sú nielen inštruktívne úda-

je o tomto zložitom mechanizme na molekulovej úrovni, ale uvádzajú sa aj diagnostické a terapeutické možnosti využitia poznatkov o adhezívnych interakciách medzi cirkulujúcimi leukocytmi a endotelovými bunkami, ktoré sú spúšťacím mechanizmom každej zápalovej odpovede tak na infekčný, ako aj neinfekčný podnet. Typy zápalových reakcií vyvolaných imunopatologickými mechanizmami zakončujú túto rozsiahlu kapitolu. Sú tu základné údaje o alergickom (reagínovom) akútnom zápale, zápale s účasťou cytotoxických protilátok, zápale sprostredkovanom imunokomplexmi a o precitlivenosti oneskoreného typu (sprostredkovaného bunkami).

V druhej kapitole sa hovorí o regulácii a kontrole telesnej teploty, patogenéze horúčky, jej príčinách, priebehu a sprievodných symptómoch a o klinickom pohľade na horúčku. Horúčka sa tu správne chápe ako obranno-adaptačné zariadenie, ktoré však v určitých klinických súvislostiach môže mať aj negatívne následky.

Tretia kapitola sa venuje bolesti ako najčastejšiemu syndrómu v medicíne. Z pohľadu patofyziológa sa tu diskutuje o nocicepcii a bolesti, o účasti aferentných nervových vlákien pri priamom a nepriamom spojení medzi neurónmi, o teóriách vysvetľujúcich vznik bolesti, opiatovej analgézií a základných princípoch liečby bolesti.

Problém zápalu je aktuálny vo všetkých medicínskych disciplínach, preto kniha poslúži širokej lekárskej verejnosti. Priam encyklopedická obsažnosť tejto relatívne malej knihy významne poslúži aj študentom medicíny.

Ferenčík so spoluautormi predložil moderné dielo obsahovo aj formálne na veľmi dobrej úrovni. Technická redakcie SAP splnila očakávanú kvalitu práce na tejto publikácii.

*I. Ďuriš*