

Molekularna dijagnostika nasljedne hemokromatoze

Kenjeric, Nives

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:809895>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Nives Kenjeric

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

NASLJEDNE HEMOKROMATOZE

Završni rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Nives Kenjeric

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

NASLJEDNE HEMOKROMATOZE

Završni rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Saška Marczy

Ovaj rad sadrži 30 stranica, 3 slike i 8 tablica.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Saški Marczi na pomoći, sugestijama, potpori i strpljenju tijekom izrade završnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima, posebno roditeljima Manueli i Kruni, sestri Karli i Domagoju na podršci tijekom studiranja.

Ovaj rad posvećujem svome ocu!

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Metabolizam željeza | 1 |
| 1.1.1. Apsorpcija i prijenos željeza krvlju..... | 1 |
| 1.1.2. Unos željeza u stanicu i transferinski ciklus..... | 3 |
| 1.1.3. Skladištenje željeza | 4 |
| 1.2. Hemokromatoza..... | 4 |
| 1.2.1. Tipovi nasljedne hemokromatoze..... | 5 |
| 1.3. Mutacije gena <i>HFE</i> | 8 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 9 |
| 3. ISPITANICI I METODE | 10 |
| 3.1. Ustroj istraživanja | 10 |
| 3.2. Ispitanici..... | 10 |
| 3.3. Metode | 10 |
| 3.3.1. Izolacija DNA..... | 11 |
| 3.3.2. Mjerenje koncentracije i određivanje čistoće izolirane DNA | 12 |
| 3.3.3. Genotipizacija <i>HFE</i> metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu | 13 |
| 3.3.4. Statističke metode..... | 17 |
| 4. REZULTATI | 18 |
| 4.1. Osnovna obilježja ispitanika | 18 |
| 4.2. Učestalost alela za mutacije C282Y, H63D i S65C u genu <i>HFE</i> | 19 |
| 4.3. Učestalost genotipova za mutacije C282Y, H63D i S65C u genu <i>HFE</i> | 20 |
| 4.4. Učestalost genotipova <i>HFE</i> | 21 |
| 5. RASPRAVA | 23 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 6. ZAKLJUČAK | 25 |
| 8. SUMMARY | 27 |
| 9. LITERATURA | 28 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 30 |

POPIS KRATICA

| | |
|------------------|---|
| AD | autosomno dominantno |
| AR | autosomno recesivno |
| apo Tf | apotransferin |
| BMPs | koštani morfogeniski proteini, <i>engl. bone morphogenic proteins</i> |
| BMPR | receptor za koštane morfogenske proteinie, <i>engl. bone morphogenic protein receptor</i> |
| DMT1 | divalentni metalni transporter 1, <i>engl. divalent metal transporter 1</i> |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina |
| Fe | željezo |
| Fe ³⁺ | feri željezo |
| Fe ²⁺ | fero željezo |
| FPN1 | feroportin |
| HH | nasljedna hemokromatoza, <i>engl. hereditary hemochromatosis</i> |
| HJV | hemojuvelin |
| IL-6 | interleukin 6 |
| KBCO | Klinički bolnički centar Osijek |
| PCR | lančana reakcija polimerazom, <i>engl. polymerase chain reaction, PCR</i> |
| TIBC | ukupni kapacitet vezanja željeza, <i>engl. total iron-binding capacity</i> |
| TF | transferin |
| Tf-Fe | holotransferin |
| TfR | transferinski receptor |
| UIBC | nezasićeni kapacitet vezanja željeza, <i>engl. unsaturated iron-binding capacity</i> |

1. UVOD

1.1. Metabolizam željeza

Elementi u tragu esencijalni su za normalnu funkciju živih bića. Jedan od njih je i željezo (Fe) koje u organizam unosimo hranom. S obzirom na proces apsorpcije željeza i brojne čimbenike koji na njega utječu, nužno je unijeti količinu koja premašuje naše dnevne potrebe (1). Preporučeno je, dnevno, hranom unijeti 5-20 mg Fe (2). Količina željeza koje ljudsko tijelo sadrži je 3,5-4,5 g, a oko 2/3 te količine nalazi se u hemoglobinu unutar eritrocita, čija je osnovna funkcija distribucija kisika po organizmu (2).

1.1.1. Apsorpcija i prijenos željeza krvlju

Ključan korak u apsorpciji željeza je njegova pretvorba iz feri željeza - netopivi, trovalentni oblik (Fe^{3+}), koji se većinski nalazi u hrani u fero željezo - topivi, dvovalentni oblik (Fe^{2+}) koji se nakon pretvorbe apsorbira pomoću stanica mukoze (enterocita), uglavnom dvanaesnika, dijela tankog crijeva (1). Cijeli proces pripreme željeza za apsorpciju započinje uz djelovanje želučane, odnosno klorovodične kiseline, koja stvara kiselu sredinu za proces redukcije i vitamina C (2), koji djeluje kao reducens. U tankom crijevu se Fe^{3+} , uz djelovanje enzima feri reduktaza duodenalnog citokroma B, reducira u Fe^{2+} . Nakon redukcije se Fe^{2+} , pomoću enzima dvovalentni metalni transporter 1 (*engl. divalent metal transporter 1*, DMT1) (1), koji se nalazi na apikalnoj površini enterocita unosi unutar same stanice (3).

Za željezo koje se apsorbira u enterocite postoje dva moguća ishoda – ili će ostati unutar enterocita vezano na feritin ili će se izvesti izvan stanica u krv, vezati se na transferin (TF), te tako biti transportiran na ciljane mjesta za njegovo iskorištavanje (1). Željezo koje ostane zadržano unutar enterocita će, kada stanica na kraju svog životnog vijeka propadne i odljušti se, napustiti organizam probavom. Put izvoza željeza iz enterocita u cirkulaciju posredovan je transmembranskim proteinom bazolateralne membrane feroportinom (FPN1), pomoću kojeg se Fe^{2+} izvozi (3).

Nakon prijenosa željeza preko bazolateralne membrane enterocita dvanaesnika Fe biva vezano na transferin (TF), enzim zadužen za prijenos Fe krvlju do tkiva kojima je ono potrebno (4). Prije vezanja na TF neophodna je ponovna oksidacija Fe iz Fe^{2+} u Fe^{3+} oblik. Enzim koji omogućava taj proces je hefesin, membranski vezana feroksidaza (5). Transferin je glikoprotein plazme, molekularne mase 76 kDa sintetiziran u jetri, velikog afiniteta za vezanjem ferri željeza. Razlikujemo dva oblika TF koji je prisutan u tijelu, u ovisnosti o tome je li željezo na njega vezano ili ne. Tako se oblik transferina na kojem je vezano Fe naziva se holotransferin (Tf-Fe), dok se slobodna molekula transferina naziva apotransferin (apo-Tf). Pojam "serumsko željezo" odnosi se na količinu Fe koja se nalazi u plazmi vezana na TF (1). Koncentracija TF u plazmi iznosi približno iznosi oko 3000 mg/dL, a jedna njegova molekula veže oko 300 μ g Fe po dL plazme, što predstavlja ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC) u plazmi (4). Na molekuli TF prisutan je velik broj veznih mjesta za Fe, no u uvjetima normalne koncentracije u plazmi željezom je zasićena tek trećina tih mjesta. Ona vezna mjesta koja imaju pričuvenu ulogu izražavaju nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC) (4). TIBC i UIBC važan su pokazatelj razina željeza, te kriterij u dijagnozi poremećaja, uzrokovanih viškom ili manjkom Fe.

Hepcidin – regulator apsorpcije željeza

Glavni regulator izvoza željeza iz enterocita u cirkulaciju je hepcidin, hormon građen od 25 aminokiselina koji se sintetizira u jetri i iz nje izlučuje. Hepcidin inhibira izvoz željeza iz enterocita u ovisnosti o cirkulirajućim razinama Fe i količini željeza u hepatocitima jetre (1,5). Hepcidin se veže na FPN1, uzrokujući njegovo raspadanje i razgradnju unutar enterocita. Tako se sprječava izvoz dodatnih količina željeza u cirkulaciju, te ono ostaje u stanicama vezano za FPN1 sve dok enterociti ne propadnu. Na taj se način sprječava pretjerano nakupljanje željeza u organizmu.

Količina prisutnog hepcidina ovisi o mnogim čimbenicima, no ključan mehanizam regulacije njegove količine predstavlja regulacija na razini ekspresije gena. Hepatociti, pomoću receptora koji se nalaze na njihovim membranama, dobijaju informaciju o količini željeza u organizmu. Najčešći način na koji hepatociti dobivaju informaciju o potrebnim količinama hepcidina je putem kompleksa sastavljenog od transferinskih receptora TfR1 i TfR2 povezanih HFE proteinom, proteinom kodiranim genom *HFE* (5).

Protein HFE nalazimo na membrani stanice vezan na TfR1, gdje je u stalnom kompeticijskom odnosu sa holotransferinom (Tf-Fe), s kojim konkurira za vezanje na TfR1. Kada su razine Tf-Fe u cirkulaciji visoke, HFE protein disocira sa TfR1 te se Tf-Fe veže na taj receptor. Disocirani HFE protein se zatim veže na TfR2 stvarajući kompleks. Kompleks HFE-TfR2 učvršćen je Tf-Fe koji se paralelno sa HFE proteinom veže na TfR2. Kompleks pokreće unutarstaničnu kaskadnu reakciju koja za cilj ima aktivirati ekspresiju gena *HAMP*. Gen *HAMP* kodira sintezu hepcidina, a aktivacija njegove ekspresije potiče stvaranje samog hepcidina unutar jetre (5).

Količina hepcidina može biti ovisna i o prisutnosti koštanih morfogenskih proteina (engl. *bone morphogenic proteins*, BMPs). Njihovim vezanjem na koreceptor hemojuvelin (HJV) omogućuje se daljnje vezanje na stanični receptor (engl. *bone morphogenic protein receptor*, BMPR). Aktivirani kompleks BMPR-HJV potiče fosforilaciju unutarstaničnih signalnih proteina i tako aktivira ekspresiju gena *HAMP*.

Treći mehanizam regulacije količine hepcidina je posredovan citokinima, primjerice interleukinom 6 (IL-6), koji se stvara kao dio odgovora organizma na upalu. Kada se IL-6 veže na receptor, aktivira janus kinazu (JAK), koja će prevesti signal putem JAK-STAT puta i započeti pojačanu ekspresiju gena *HAMP*, a posljedično potaknuti sintezu hepcidina.

1.1.2. Unos željeza u stanicu i transferinski ciklus

Kako bi Fe vezano na TF na koncu bilo uneseno u stanicu kojoj je potrebno, nužno je da ta stanica na svojoj površini sadrži transferinski receptor (TfR). U ljudskom organizmu postoje dvije vrste transferinskih receptora: TfR1 i TfR2 (4). Na stanicama je najčešće izražen TfR1, dok je TfR2 izražen na hepatocitima, trombocitima te epitelnim stanicama Lieberkūnovih kripti duodenuma (6). TfR se nalaze u obloženim jamicama stanične membrane, te se, nakon vezivanja TF, te jamice uvijaju i odvajaju od stanične membrane, formirajući endosome (6). Promjene na molekuli TF, uzrokovane vezanjem na TfR i niskog pH unutar samog endosoma, uzrokuju odvajanje Fe^{3+} od TF. Odvojeno Fe ponovno biva reducirano u Fe^{2+} , uz djelovanje enzima ferireduktaza, nakon čega napušta endosom i izlazi u citoplazmu stanice pomoću DMT1. Nakon što je Fe napustilo endosome, kompleks TF-TfR vraća se na površinu stanice gdje se, pri neutralnom pH okruženju,

TF odvaja of TfR. Time TfR biva spreman za prihvaćanje nove molekule Fe, a TF u obliku apo TF spreman za ponovno vezanje Fe i njegov prijenos, što predstavlja transferinski ciklus (5).

1.1.3. Skladištenje željeza

Željezo putem krvi dopijeva do stanica retikuloendotelnog sustava, gdje se veže na feritin i u manjoj mjeri hemosiderin. Tim se procesom omogućava održavanje zaliha Fe u organizmu (5). Feritin, protein molekularne mase 440 kDa koji predstavlja primarno prisutan oblik uskladištenog Fe, najčešće možemo pronaći u jetri, slezeni, koštanoj srži i skeletnim mišićima. Jedna molekula feritina može vezati čak tri do četiri tisuće atoma Fe^{3+} (4). Njegova je uloga da osigura dovoljnu količinu željeza u hepatocitima i u makrofagima koštane srži i drugih organa. Uskladišteno željezo potrebno je za stvaranje hemoglobina i drugih proteina koji u svojoj strukturi sadrže prostetičku skupinu hem (2).

1.2. Hemokromatoza

Pojam hemokromatoza označava stanje u kojem je organizam preopterećen željezom. Mogući uzrok tome je poremećaj metabolizma željeza, odnosno njegova pretjerana apsorpcija, a posljedično i nakupljanje željeza u stanicama organa što uzrokuje propadanje organa i gubitak njihove funkcije (2). Temelje za otkriće ovoga poremećaja dao je njemački patolog von Recklinghausen koji je koncem 19. stoljeća utvrdio korelaciju između brončane boje kože pacijenata i pretjeranog nakupljanja željeza u njihovim tkivima, te je o tome i objavio rad pod nazivom *Hämochromatose*. Tim je radom prvi povezo abnormalnu pigmentaciju i brončanu boju kože (grč. *chróma*) s tvarima koje cirkuliraju krvlju, odnosno željezom (hem) (3,7).

Brojni čimbenici, poput kroničnog konzumiranja alkohola ili dugotrajnog i opetovanog konzumiranja suplemenata željeza, mogu uzrokovati hemokromatozu, u smislu kliničko – patološkog obilježja u kojem se željezo nakuplja (8). Upravo iz tog razloga vrlo je važno utvrditi uzrok tog metaboličkog poremećaja.

Hemokromatozu možemo klasificirati kao primarnu, nasljednu, koja je uzrokovana nasljeđivanjem genske mutacije, i sekundarnu, stečenu koja je nastala kao posljedica nekog drugog poremećaja ili vanjskog djelovanja, primjerice zbog ponovljenih transfuzija krvi (3).

1.2.1. Tipovi nasljedne hemokromatoze

Nasljedna hemokromatoza (HH) je izraz koji označava skupinu nasljednih poremećaja preopterećenja željezom zbog njegove povećane apsorpcije. Prilikom dugotrajnog preopterećenja Fe se skladišti u stanicama, uslijed čega dolazi do progresivnog propadanja stanica organa, poglavio jetre, gušterače i srca, te hipofize (3). Ovaj nasljedni poremećaj najčešće je posljedica nedostatka hepcidina, čiji uzrok leži u genskoj mutaciji (1). Postoji mogućnost da mutacijom bude zahvaćen i neki drugi protein uključen u metabolizam željeza.

HH je podijeljena u četiri osnovna tipa od kojih su neki dodatno klasificirani, u ovisnosti o tome na koji je protein uključen u metabolizam Fe utjecala mutacija gena, što je prikazano u Tablici 2.

Nasljeđivanje HH najčešće slijedi autosomno-recesivni (AR) obrazac nasljeđivanja, koji je prisutan u tipovima 1, 2 i 3 HH, dok se tip 4 HH nasljeđuje prema autosomno-dominantnom (AD) obrascu nasljeđivanja. Kod autosomno recesivnog obrasca nasljeđivanja za razvitak bolesti potrebno je da mutirani alel, bude prisutan u dvostrukoj dozi, odnosno da se naslijedi od oba roditelja (9). Aleli predstavljaju varijante gena koji se nalaze na istom mjestu ili lokusu na paru homolognih kromosoma, odnosno kromosoma koji kontroliraju istu osobinu, a u slučaju HH sineze nekog od proteina uključenog u metabolizam Fe. Oboljeli su homozigoti u pogledu prisutnosti mutacije. Osobe koje su heterozigoti, odnosno posjeduju jedan mutirani alel za ovaj poremećaj ne iskazuju kliničke simptome, ali “nose” mutaciju koju mogu prenijeti na svoje potomstvo, pa ih nazivamo nositeljima (9). Kod autosomno dominantnog nasljeđivanja za razvitak bolesti nije potrebno da mutirani alel bude prisutan u dvostrukoj dozi, već je dovoljano da je naslijeđen samo od jednog roditelja, a da potomak razvije bolest (9). U tom slučaju oboljeli, u pogledu prisutnosti mutacije, mogu biti homozigoti ili heterozigoti (9).

Tablica 1. Klasifikacija nasljedne hemokromatoze

| Tip HH | | Gen - pozicija gena (mutacija) | mutacija u proteinu | utjecaj na metabolički proces | Obrazac nasljeđivanja |
|--------|--------|----------------------------------|--------------------------|--|-----------------------|
| Tip 1 | Tip 1A | <i>HFE</i> - 6p21.3 (C282Y) | HFE protein | sinteza hepcidina, interakcija s TFR1 | AR |
| | Tip 1B | <i>HFE</i> - 6p21.3 (C282Y/H63D) | | sinteza hepcidina, interakcija s TFR1 | |
| | Tip 1C | <i>HFE</i> - 6p21.3 (S65C) | | | |
| Tip 2 | Tip 2A | <i>HJV</i> - 1p21 | hemojuvelin | sinteza hepcidina | |
| | Tip 2B | <i>HAMP</i> - 19q13 | hepcidin | regulacija izvoza željeza iz eritrocita | |
| Tip 3 | | <i>TFR2</i> - 7q22 | transferinski receptor 2 | sinteza hepcidina, interakcija s transferinom | |
| Tip 4 | | <i>SLC40A1</i> - 2q32 | feroportin | izvoz željeza iz duodenuma, rezistencija na hepcidin | AD |

HH – nasljedna hemokromatoza; *HFE* – gen za protein HFE; HFE – protein hereditarne hemokromatoze (engl. homeostatic iron regulator); *HJV* – gen za hemojuvelin; *HAMP* – gen za hepcidin; *TFR2* – gen za transferinski receptor 2; *SLC40A1* – gen za feroportin
Prilagođeno prema Knowdley KV i sur. (1).

Tip 1 nasljedne hemokromatoze

Tip 1 HH najčešći je nasljedni oblik preopterećenja željezom. Uzrokovan je mutacijom u genu *HFE* te je uzrok HH u 85% otkrivenih slučajeva (1). Obrazac nasljeđivanja je autosomno recesivni. Iako je bolest u oboljelih prisutna od rođenja, zbog postepenog nakupljanja željeza klinički simptomi ove bolesti počinju se ispoljavati oko 50. godine života, kada se bolest najčešće dijagnosticira. Kod žena se, zbog gubitaka željeza uslijed menstruacije, trudnoće, porođaja i dojenja, klinički simptomi bolesti kasnije se manifestiraju i bolest najčešće ima blaži početak i blaži klinički tijek (8). Liječenje nasljedne hemokromatoze temelji se na smanjivanju razine željeza u organizmu. Kod većine pacijenata najučinkovitiji način za smanjivanje zaliha željeza su

terapijske venepunkcije prilikom kojih se pacijentima ostranjuje 500 mL krvi u periodu od tjedan dana do određenih, prihvatljivih vrijednosti hematokrita i serumskog feritina. Novija alternativa u liječenju HH je fereza eritrocita, odnosno uklanjanje samo crvenih krvnih stanica iz cirkulacije. Eritrocitofereza skraćuje liječenje i pozitivno utječe na kvalitetu života pacijenata s obzirom na veće intervale između postupaka, no zbog cijene samog postupka, nije naišla na širu kliničku primjenu. Venepunkcija je zlatni standard u terapiji HH. Kod pacijenata kojima venepunkcija nije djelotvorna primjenjuje se kelacijska terapija. Kelatori željeza, najčešće lijek deferoksamin, vežu željezo i ono se na taj način uklanja iz organizma (10).

Tip 2 nasljedne hemokromatoze

Tip 2 HH podijeljen je na dva podtipa, tip 2A i tip 2B, u ovisnosti o tome koji je gen zahvaćen mutacijom. Poznato je kako ovaj tip hemokromatoze ima tendenciju uzrokovati najteži oblik primarnog preopterećenja željezom, poglavito u mlađih osoba (1). Tip 2A HH, također nazivan i juvenilna hemokromatoza, uzrokovan je mutacijom u genu *HJV* koji je odgovoran za sintezu hemojuvelina, koreceptora u regulaciji količine hepcidina (1). Tip 2B HH uzrokovan je mutacijom u genu *HAMP* koji kodira sintezu hepcidina (1).

Tip 3 nasljedne hemokromatoze

Tip 3 HH povezan je s mutacijama gena odgovornog za sintezu transferinskog receptora 2 (TfR2) (1). Opisano je šest tipova mutacija u genu *TFR2* koje uzrokuju pretjerano nakupljanje željeza u hepatocitima. One su vrlo rijetko uzrok nasljedne hemokromatoze, a uglavnom su prisutne u populacijama Europe i Japana (11).

Tip 4 nasljedne hemokromatoze

Tip 4 HH, također poznat i kao feroportinska bolest, povezan je s mutacijama gena *SLC40A1* koji kodira sintezu feroportina (FPN1). U ovom obliku bolesti nakupljanje željeza uzrokovano je smanjenom funkcijom FPN1 zbog smanjene osjetljivosti na hepcidin u procesu regulacije

apsorpcije željeza. Posljedično, željezo se zadržava i nakuplja u makrofagima, enterocitima i hepatocitima.

1.3. Mutacije gena *HFE*

Gen *HFE*, odgovoran je za sintezu proteina HFE. Smješten je na kratkom kraku kromosoma 6, na poziciji 21.3 (6p21.3). Posljedica mutacija u genu *HFE* jest izostanak sinteze hepcidina što dovodi do preopterećenja željezom zbog njegove prekomjerne apsorpcije iz duodenuma (5).

Tip 1 HH podijeljen je u tri podtipa: tip 1A, tip 1B i tip 1C, s obzirom na tri točkaste mutacije u genu *HFE* koje ju mogu uzrokovati (1).

Tip 1A HH prepoznat je kod pacijenata koji su homozigoti za točkastu mutaciju C282Y (rs1800562) koju karakterizira zamjena dušične baze gvanina adeninom na nukleotidu 845 u genu *HFE* (845G→A), što rezultira supstitucijom aminokiseline tirozina cisteinom na mjestu 282 (Cys282Tyr) u polipeptidnom lancu proteina. Posljedica točkaste mutacije C282Y je sinteza nefunkcionalnog proteinskog produkta (1).

Tip 1B prepoznat je kod pacijenata koji su složeni heterozigoti s dvama točkastim mutacijama, C282Y i H63D (rs1799945), s genotipom C282Y/H63D. Točkasta mutacija H63D karakterizirana je zamjenom dušične baze citozina gvaninom na nukleotidu 187 u genu *HFE* (187C→G), što rezultira supstitucijom aminokiseline histidina asparaginskom kiselinom na mjestu 63 (His63Asp) u polipeptidnom lancu proteinskog produkta. Pacijenti koji su homozigoti za točkastu mutaciju H63D mogu razviti nasljedni oblik preopterećenja željezom, no takvi slučajevi su u kliničkoj praksi rijetki (1).

Za tip 1C HH karakteristična je točkasta mutacija S65C (rs1800730) koju karakterizira zamjena dušične baze adenina timinom na nukleotidu 193 u genu *HFE* (193A→T). Posljedica zamjene baza je supstitucija aminokiseline serina cisteinom na mjestu 65 (Ser65Cys) u polipeptidnom lancu proteina. Kod bolesnika koji su homozigoti za točkastu mutaciju S65C moguće su povišene razine željeza u krvi, no željezo se u tim slučajevima ne akumulira u organima, pa se takav tip mutacije smatra polimorfizmom bez kliničkih manifestacija (1).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada su:

- Utvrditi učestalost alela i genotipova za mutacije C282Y, H63D, S65C i *HFE* genotipova u pacijenata sa sumnjom na hemokromatozu čiji su uzorci krvi bili testirani u rutinskom dijagnostičkom programu u Kliničkom bolničkom centru Osijek u vremenskom periodu od 2017. do 2021. godine.
- Ispitati razlike u učestalosti alela i genotipova za mutacije C282Y, H63D i S65C, te *HFE* genotipova s obzirom na spol.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je osmišljeno kao presječna studija (12).

3.2. Ispitanici

Ispitivana skupina sastoji se od 100 pacijenta sa sumnjom na dijagnozu HH, kojima je molekularna dijagnostika HH učinjena u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu KBC Osijek u periodu od 2017. do 2021. godine. Pacijenti nisu aktivno sudjelovali u istraživanju, a njihovi uzorci bili su popraćeni liječničkom uputnicom i pri dolasku u laboratorij pridružen im je jedinstveni 12-znamenkast broj. Podaci korišteni u svrhu istraživanja su anonimnog i agregiranog karaktera. Prikupljeni su pristupom u e-Delphyn, elektronsku bazu podataka Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

3.3. Metode

Iz uzoraka krvi pacijenata izolirana je deoksiribonukleinska kiselina (DNA) te je provedeno mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA. Nakon toga je učinjena genotipizacija tri najčešće točkaste mutacije u genu *HFE*: C282Y, H63D i S65C, primjenom metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real time PCR).

3.3.1. Izolacija DNA

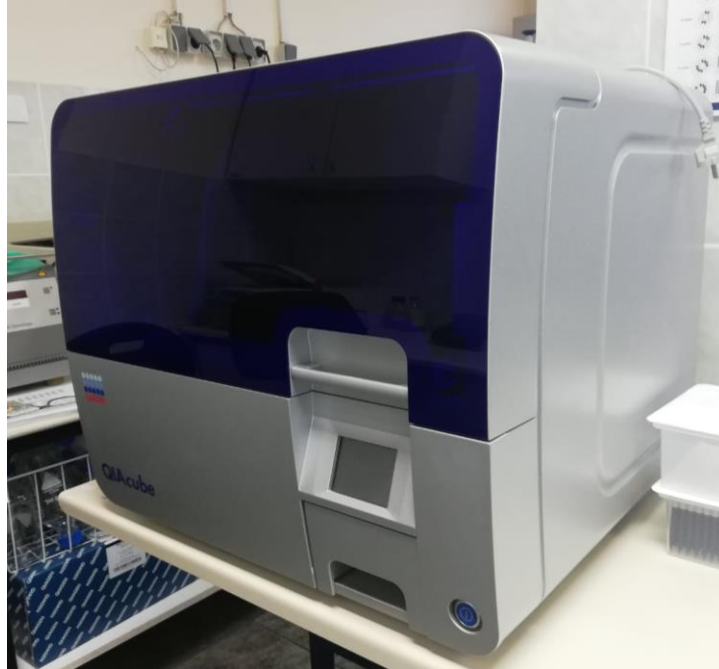
Pacijentima je uzorkovano 4 mL krvi u epruvete s podtlakom s antikoagulansom EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson), nakon čega je iz uzorka izolirana DNA. Izolacija je izvođena pomoću komercijalnog seta za izolaciju *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* na automatiziranom uređaju *QIAcube®* prema uputama proizvođača (13).

QIAamp® DNA Blood Mini Kit omogućuje izolaciju prosječno 6 µg DNA iz 200 µg uzorka pune krvi (14), a u kompletu se nalaze reagensi potrebni za izolaciju i kolone sa silika-membranama.

Izolacija DNA na automatiziranom uređaju *QIAcube®*, kao i manualna izolacija sastoji se od četiri koraka:

1. liza stanica
2. vezanje DNA na silika-membranu
3. pročišćavanje DNA puferima
4. eluiranje DNA

Liza stanica se izvodi u Eppendorf tubicama iz 200 µL uzorka krvi djelovanjem pufera i Qiagen Proteaze, uz konstantno miješanje. Djelovanjem enzima proteini staničnih membrana budu razgrađeni čime je omogućena ekstrakcija DNA. Tako pripremljena smjesa automatizirano se prenosi u tubicu za pročišćavanje sa silika-membranom u kojoj se odvija i vezanje DNA i njeno pročišćavanje puferima. DNA koju želimo izolirati vezati će se na silika-membranu i na njoj zadržati, dok će ostali sastojci smjese koji nam nisu od interesa, proći kroz njene pore. Sljedeći korak jest pročišćavanje vezane DNA. Ona će se pročišćavati djelovanjem pufera koji će uzrokovati promjenu ionske jakosti. Uvjeti visoke ionske jakosti uzrokuju da se DNA sve jače veže na kolonu, dok se sve nečistoće koje narušavaju čistoću DNA djelovanjem pufera ispiru. Posljednji korak izolacije je eluiranje. Tubica sa silika-membranom, prenosi se u tubicu za mikrocentrifugu gdje se djelovanjem pufera odvija postupak elucije, odnosno ispiranja vezane DNA sa silika-membrane djelovanjem pufera koji će uzrokovati cijepanje veza između DNA i silika-membrane. U eluatu se nalazi izolirana DNA, koja će se, nadalje, u svrhu detekcije polimorfizama gena *HFE* podvrgnuti metodi lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.



Slika 1. Uređaj *QIAcube*® (Qiagen, Hilden, Njemačka) (fotografiju snimila N. Kenjerić u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, KBC Osijek, travanj 2022.)

3.3.2. Mjerenje koncentracije i određivanje čistoće izolirane DNA

Koristeći spektrofotometar *SpectraMax*® *QuickDrop*™ (Molecular Devices LLC., San Jose, SAD) izmjerena je koncentracija i određena je čistoća izolirane DNA. Spektrofotometar je optički uređaj koji na temelju prolaska svjetlosti kroz uzorak, s obzirom na količinu apsorbancije koja nastaje prolaskom svjetlosti kroz uzorak i molekularni sastav samog uzorka određuje njegovu koncentraciju, pri čemu je ona proporcionalna količini apsorbancije. Uređaj nam omogućuje kako određivanje koncentracije, tako i određivanje čistoće DNA mjerenjem apsorbancije (15).

Vrlo važna karakteristika uređaja jest da iz vrlo male količine uzorka, odnosno kapljice (engl. drop) možemo dobiti podatak o koncentraciji i čistoći same izolirane DNA.

Za određivanje koncentracije DNA apsorbancija se mjeri na 260 nm, pri čemu uređaj na temelju dobivene vrijednosti, koristeći program za analizu koncentracije DNA daje podatak o koncentraciji DNA u mjernoj jedinici $\mu\text{g/mL}$. Kod određivanja čistoće DNA mjeri se omjer apsorbancije na 260 nm i 280 nm. Omjer A_{260}/A_{280} nam daje informaciju o čistoći izolirane DNA, a prihvatljivim, dovoljno pročišćenim, izolatima smatraju se oni čiji omjer apsorbancija iznosi $\geq 1,8$, pri čemu nam

odstupanje od takve vrijednosti daje informaciju o prisutnosti nečistoća koje mogu imati utjecaja na daljnje analize (15).

3.3.3. Genotipizacija *HFE* metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda molekularne biologije koja za cilj ima kloniranje fragmenta DNA od interesa. Kod PCR reakcije dolazi do udvostručavanja ciljanog odsječka DNA molekule u svakom PCR ciklusu, što rezultira eksponencijalnim rastom količine dobivenog produkta te dobivjemo velike količine fragmenta DNA od interesa, što nam posljedično olakšava analizu. Metoda se temelji na j aktivnosti DNA polimeraze, enzima koji sudjeluje u procesu replikacije DNA. Nadalje, u reakcijskoj smjesi su prisutne i početnice (engl. primers) koje su komplementarne DNA sekvenci uz fragment DNA koji želimo umnožiti jer će upravo one biti ključne za poticanje reakcije na način da će izazvati vezanje DNA polimeraze i iniciranje same replikacije, kao i deoksinukleotide koji su potrebni kako bi se, na temelju jednostrukog lanca DNA koji služi kao kalup u PCR reakciji uspješno odvila replikacija same molekule DNA (9).

Denaturacija molekule DNA u PCR reakciji uzrokovana je povišenjem temperature što uzrokuje prekidanje veza između dva komplementarna lanca DNA molekule. Rezultat denaturacije čine dva jednostruka lanca DNA koji nam služe kao kalupi za daljnju replikaciju DNA. Nakon razdvajanja dolazi do vezanja početnica na kalup što potiče daljnju sintezu djelovanjem DNA polimeraze koja će polimerizirati deoksiribonukleotide (9). Kod real-time PCR-a kvantifikacija PCR produkata odvija se u stvarnom vremenu, nakon svakog PCR ciklusa, na način da se tijekom same analize koriste specijalno dizajnirane fluorescentno obilježene probe, koje se komplementarno vežu na fragment od interesu kalupu DNA. Odvajanje fluorescentne probe rezultira promjenom u fluorescentnom signalu, koja se bilježi tijekom same analize (9).

Reagensi

Genotipizacija tri najčešće mutacije gena *HFE* izvedena je pomoću komercijalnog seta *LightMix® in-vitro diagnostics HFE H63D S65C C282Y* (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Njemačka). Set se sastoji od parameter specifičnog reagensa (engl. *parameter-specific reagent*, PSR) koji čine početnice i fluorescentno obilježene probe potrebne za genotipizaciju, te DNA kontrole pozitivne na mutacije koje detektiramo (16). Za pripremu reakcijske smjese, uz set specifičan za mutacije u genu *HFE*, korišten je komercijalni set *LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe PLUS kit* (Roche Diagnostics Ltd., Švicarska), kojeg čine DNA polimeraza, deoksiribonukleotidi, Mg^{2+} i pufer.

Postupak

Reagensi su otopljeni u hladnom staklu. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 12 μ L po jednom uzorku potrebna za izvođenje PCR reakcije i genotipizaciju pripremljena je u staklenim kapilarama za uređaj LightCycler 1.2 (Roche Life Sciences, Basel, Švicarska) prema uputama proizvođača. Potrebni sastojci i volumeni prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Sastojci reakcijske smjese potrebni za genotipizaciju *HFE* metodom real time PCR

| SASTOJAK | VOLUMEN |
|--|---------------|
| H ₂ O PCR grade | 5,4 μ L |
| PSR (parameter specifični reagens) | 1,20 μ L |
| LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe ^{PLUS} | 2,40 μ L |
| DNA uzorka/kontrole | 3,00 μ L |
| ukupni volumen reakcijske smjese | 12,00 μ L |



Slika 2. Priprema reakcijske smjese (fotografiju snimila N. Kenjerić u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, KBC Osijek, travanj 2022.)

Genotipizacija *HFE* izvođena je pomoću uređaja *LightCycler® 1.2 Real time PCR System* (Roche Diagnostics Ltd., Švicarska) (Slika 3.).



Slika 3. Uređaj *LightCycler® 1.2* (Roche Diagnostics Ltd., Švicarska) (fotografiju snimila N. Kenjerić u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, KBC Osijek, travanj 2022.)

Protokol PCR analize za detekciju mutacija C282Y, H63D i S65C u genu *HFE* na uređaju LightCycler 1.2 sastoji se od četiri programska koraka (16):

1. Denaturacija uzorka – 1 ciklus
2. PCR amplifikacija - 45 ciklusa
3. Taljenje - identifikacija PCR produkata analizom krivulje taljenja – 1 ciklus
4. Hlađenje uređaja

Analiza krivulje taljenja

U svakom PCR ciklusu dva fragmenta *HFE* gena su istovremeno amplificirana. Identifikacija PCR produkata i određivanje genotipa izvedeno je pomoću tri fluorescentno obilježene probe posebno dizajnirane za simultanu detekciju svake od tri mutacije gena *HFE*.

U korištenom komercijalnom setu su dvije fluorescentno obilježene probe specifične za tri najčešća polimorfizma *HFE* gena:

1. SimpleProbe® 519 obilježena proba za detekciju mutacija H63D i S65C
2. LightCyclerRed 640 obilježena proba za detekciju mutacije C282Y

Fluorescentno obilježena proba veže se na dio fragmenta DNA koji obuhvaća poziciju potencijalne mutacije. Proba i fragment same DNA komplementarno se vežu, a svaka neusklađenost između baza rezultira destabilizacijom veza. Tijekom faze taljenja temperatura se postepeno povećava, a samo odvajanje probe od kalupa pri specifičnoj temperaturi uzrokuje smanjenje fluorescencije. Na temelju informacije o temperaturi prilikom koje se fluorescentna proba odvojila dobijamo informaciju o tome je li mutacija prisutna ili ne (16). Za mutacije H63D i S65C temperature taljenja se očitavaju na kanalu 530, za mutaciju C282Y temperature taljenja očitavaju se na kanalu 640. Interpretacija rezultata genotipizacije *HFE* vrši se pomoću tablice (Tablica 3.).

Tablica 3. Interpretacija rezultata genotipizacije *HFE* metodom real time PCR

| kanal 530 (H63D i S65C) Tm (°C) | | | kanal 640 (C282Y) Tm (°C) | | Genotip | | |
|---------------------------------------|----|------------------|---------------------------------|----|---------|------|-------|
| | | | | | H63D | S65C | C282Y |
| | 57 | | | 62 | HH | SS | YY |
| | 57 | 65 | 56 | 62 | HD | SS | CY |
| 52 | 57 | | 56 | 62 | HH | SC | CY |
| | 57 | | 56 | 62 | HH | SS | CY |
| | | 65 | 56 | | DD | SS | CC |
| 52 | | 65 | 56 | | HD | SC | CC |
| | 57 | 65 | 56 | | HD | SS | CC |
| 52 | | | 56 | | HH | CC | CC |
| 52 | 57 | | 56 | | HH | SC | CC |
| | 57 | | 56 | | HH | SS | CC |
| ΔT_m 5°C | | ΔT_m 8°C | ΔT_m 6°C | | | | |
| ΔT_m 13°C | | | | | | | |

ΔT_m – dopušteno odstupanje temperature taljenja

3.3.4. Statističke metode

Numerički podaci opisani su medijanom i interkvartilnim rasponom. Učestalosti alelnih varijanti i genotipova predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike u frekvencijama testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Sve *P* vrijednosti su dvostrane, a razina značajnosti postavljena je na $\alpha=0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program 2022 MedCalc Software Ltd (Ostend, Belgium, <http://www.medcalc.org>).

4. REZULTATI

4.1. Osnovna obilježja ispitanika

Ispitivana skupina sastojala se od ukupno 100 bolesnika od kojih je 67% muškaraca i 33% žena. Medijan dobi ispitanika, interkvartilni raspon i raspon dobi ispitanika prilikom genotipizacije *HFE* prikazani su u Tablici 4. Medijan dobi u skupini ženskih ispitanika veći je u odnosu na mušku skupinu.

Tablica 4. Ispitanici prema dobi i spolu

| | M | Ž | ukupno |
|---|-------------|-----------------|-----------------|
| broj ispitanika | 67 | 33 | 100 |
| raspon dobi (godina) | 7-79 | 14-72 | 7-79 |
| medijan dobi (godina) interkvartilni raspon (godina) | 40 23-54 | 55 40,5-63,5 | 48 28,5-57,5 |

M – muški spol, Ž - ženski spol

Prisutna je razlika u broju ispitanika prema spolu s obzirom na dobne kategorije. Za dob ispitanika između 51 i 70 godina starosti značajno je veći broj žena upućivan na genotipizaciju *HFE* u odnosu na broj muškaraca (Tablica 5.).

Tablica 5. Raspodjela ispitanika po dobnim kategorijama s obzirom na dob prilikom genotipizacije *HFE*

| Dob ispitanika (godina) | Broj (%) ispitanika | | <i>P</i> |
|----------------------------|---------------------|------------|----------------------------|
| | M | Ž | |
| 0 - 10 | 2 (3,0%) | 0 (0,0%) | 1,000 |
| 11 – 20 | 9 (13,4%) | 4 (12,1%) | 1,000 |
| 21 – 30 | 9 (13,4%) | 1 (3,0%) | 0,159 |
| 31 – 40 | 14 (20,9%) | 3 (9,1%) | 0,167 |
| 41 – 50 | 10 (14,9%) | 4 (12,1%) | 1,000 |
| 51 – 60 | 15 (22,4%) | 10 (30,3%) | 5,3x10⁻⁵ |
| 61 – 70 | 6 (9,0%) | 9 (27,3%) | 0,033 |
| 71 - 80 | 2 (3,0%) | 2 (6,1%) | 0,597 |

M – muški spol, Ž - ženski spol

4.2. Učestalost alela za mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*

Učestalosti alela G i A za mutaciju C282Y, alela C i G za mutaciju H63D i alela A i T za mutaciju S65C u ukupnoj skupini bolesnika te u podskupinama s obzirom na spol prikazane su u Tablici 6. Za mutaciju C282Y i u muškoj i u ženskoj podskupini zastupljeniji je alel G (282C). Za mutaciju H63D kod oba je spola zastupljeniji alel C (63H), a za mutaciju S65C u obje je podskupine zastupljeniji alel A (65S). Nema značajne razlike u raspodjeli alela za mutacije C282Y, H63H i S65C s obzirom na spol.

Tablica 6. Učestalost alela za mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*

| mutacija | alel | M | Ž | ukupno | P |
|----------|------|----------------|----------------|----------------|------|
| | | broj alela (%) | broj alela (%) | broj alela (%) | |
| C282Y | G | 114 (85,1) | 52 (78,8) | 166 (83,0) | 0,42 |
| | A | 20 (14,9) | 14 (21,2) | 34 (17,0) | 0,32 |
| H63D | C | 110 (82,1) | 55 (83,3) | 165 (82,5) | 0,84 |
| | G | 24 (17,9) | 11 (16,7) | 35 (17,5) | 1,00 |
| S65C | A | 133 (99,3) | 64 (97,0) | 197 (98,5) | 0,55 |
| | T | 1 (0,7) | 2 (3,0) | 3 (1,5) | 0,30 |

M – muški spol, Ž - ženski spol

4.3. Učestalost genotipova za mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*

Učestalosti genotipova GG, GA i AA za mutaciju C282Y, genotipova CC, CG i GG za mutaciju H63D, te genotipova AA, AT i TT za mutaciju S65C u ukupnoj skupini ispitanika te u muškoj i ženskoj podskupini prikazane su u Tablici 7. Kod oba je spola za mutaciju C282Y najzastupljeniji genotip GG, a za mutaciju H63D najzastupljeniji je genotip CC. U obje podskupine za mutaciju S65C najzastupljeniji je genotip AA. Nema statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova za mutacije C282Y, H63H i S65C s obzirom na spol.

Tablica 7. Učestalost pojedinačnih genotipova za mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*

| mutacija | genotip | M | Ž | ukupno | P |
|----------|---------|-----------|-----------|-----------|------|
| | | broj (%) | broj (%) | broj (%) | |
| C282Y | GG | 51 (76,1) | 23 (69,7) | 74 (74,0) | 0,63 |
| | GA | 12 (17,9) | 6 (18,2) | 18 (18,0) | 1,00 |
| | AA | 4 (5,9) | 4 (12,1) | 8 (8,0) | 0,43 |
| H63D | CC | 44 (65,7) | 24 (72,7) | 68 (68,0) | 0,51 |
| | CG | 22 (32,8) | 7 (21,2) | 29 (29,0) | 0,25 |
| | GG | 1 (1,5) | 2 (6,1) | 3 (3,0) | 0,25 |
| S65C | AA | 66 (98,5) | 31 (93,9) | 97 (97,0) | 0,25 |
| | AT | 1 (1,5) | 2 (6,1) | 3 (3,0) | 0,25 |
| | TT | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1,00 |

M – muški spol, Ž - ženski spol

4.4. Učestalost genotipova *HFE*

U istraživanoj skupini bolesnika prisutno je 8 genotipova s obzirom na mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*. Njihova raspodjela prikazana je u Tablici 8. U obje podskupine, muškoj i ženskoj, najzastupljeniji je genotip bez mutacija u genu *HFE*. Od prisutnih genotipova u muškoj skupini je najslabije zastupljen S65C heterozigot, dok je kod žena najslabije zastupljen H63D/S65C složeni heterozigot. Nema statistički značajne razlike u raspodjeli prisutnih *HFE* genotipova s obzirom na spol.

Tablica 8. Učestalost genotipova triju najčešćih mutacija u genu *HFE*

| genotip | M | Ž | ukupno | <i>P</i> |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| | broj (%) | broj (%) | broj (%) | |
| nema <i>HFE</i> mutacija | 33 (49,3) | 13 (39,4) | 46 (46,0) | 0,39 |
| H63D heterozigot | 16 (23,9) | 6 (18,2) | 22 (22,0) | 0,61 |
| C282Y heterozigot | 7 (10,4) | 5 (15,2) | 12 (12,0) | 0,52 |
| C282Y mutirani homozigot | 4 (6,0) | 4 (12,1) | 8 (8,0) | 0,43 |
| C282Y/H63D složeni heterozigot | 5 (7,5) | 1 (3,0) | 6 (6,0) | 0,66 |
| H63D mutirani homozigot | 1 (1,5) | 2 (6,1) | 3 (3,0) | 0,25 |
| S65C heterozigot | 0 (0,0) | 2 (6,1) | 2 (2,0) | 0,11 |
| H63D/S65C složeni heterozigot | 1 (1,5) | 0 (0,0) | 1 (1,0) | 1,00 |

M – muški spol, Ž - ženski spol

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju su korišteni podatci o rezultatima molekularne dijagnostike nasljedne hemokromatoze tip 1, najčešćeg detektiranog oblika nasljednog preopterećenja željezom (10). Analizirani su podatci 100 pacijenata koji su tijekom rutinskog dijagnostičkog programa bili podvrgnuti genetskom testiranju s ciljem detekcije nasljednog poremećaja preopterećenja željezom povezanog s mutacijama u *HFE* genu. Analiza prisutnosti mutacija C282Y, H63D i S65C u genu *HFE* u pacijenata je učinjena prema preporuci liječnika specijalista, s obzirom na kliničke simptome bolesti koji se mogu povezati sa HH, te zbog obiteljske povijesti bolesti s ciljem otkrivanja genetske predispozicije prije razvitka kliničkih simptoma ili u sklopu genetičkog savjeta.

Analizom dobi ispitanika uočava se znatna razlika u medijanu dobi s obzirom na spol. U skupini ženskih ispitanika medijan dobi je za 15 godina veći (55 godina) u odnosu na medijan dobi muške skupine (40 godina). Raspodjela broja ispitanika po dobnim kategorijama pokazuje da je u dobnj skupini između 51. i 70. godine života statistički značajno veći broj žena upućen na genotipizaciju *HFE* u odnosu na broj upućenih muškaraca. Iako je u ovom istraživanju rađena statistička analiza dobi bolesnika prilikom genotipizacije *HFE* bolesnika sa suspektom (ne potvrđenom) dijagnozom nasljedne hemokromatoze, uzorak raspodjele bolesnika s obzirom na dob i spol u skladu je s literaturnim podacima koji navode da se klinički simptomi bolesti kod žena ispoljavaju kasnije u odnosu na mušku populaciju oboljelih (8).

Rezultati za učestalosti alela G (83,0%) i A (17,0%) za mutaciju C282Y, alela C (82,5%) i G (17,5%) za H63D, te alela A (98,5%) i T (1,5%) za S65C u ukupnoj skupini ispitanika u potpunosti se slažu s rezultatima istraživanja iz 2011. godine u kojem su Milić S. i suradnici analizirali *HFE* mutacije u hrvatskih pacijenata suspektih na HH (17). U njihovom je istraživanju učestalost alela A za C282Y 14,6%, alela G za H63D 23,7%, te alela T za S65C 1,4%. Suprotno tome, usporedbom naših rezultata s prevalencijom mutacija H63D (alel G 14,3%) i C282Y (alel A 0,17%) u Libijskoj populaciji oboljelih od HH (18) možemo uočiti znatne razlike u alelnim frekvencijama.

Uspoređujemo li rezultate našeg istraživanja s raspodjelom frekvencija alela u općoj populaciji Hrvatske (19) vidimo znatno manju učestalost mutacije tj. alela A za C282Y (alel A 3,3%) u općoj populaciji u odnosu na našu istraživanu skupinu suspektno oboljelih. Nadalje, usporedbom

genotipova u našoj se ispitivanoj skupini uočava znatno veća učestalost C282Y heterozigota (genotip GA 18,0%) i mutiranih homozigota (genotip A 8,0%) u odnosu na opću populaciju Hrvatske (genotip GA 6,5%, genotip AA 0%) (19).

U našoj ispitivanoj skupini suspektno oboljelih od HH nađeno je 8,0% mutiranih homozigota C282Y za razliku od istraživanja na općoj populaciji Hrvatske u kojoj je učestalost bila 0%. Ukoliko se radi o genotipizaciji *HFE* u svrhu određivanja dijagnoze genotip mutiranog homozigota (AA) za C282Y podupire dijagnozu nasljedne hemokromatoze povezane s genom *HFE* u prisutnosti dokumentiranog preopterećenja željezom, odnosno tip 1A nasljedne hemokromatoze. Ukoliko se molekularno testiranje *HFE* izvodi kao prediktivno ovakav nalaz ukazuje na genetski rizik od razvoja nasljedne hemokromatoze povezane s genom *HFE* (20).

Učestalost složenih heterozigota C282Y/H63D (genotip GA za C282Y, genotip CG za H63D, bez mutacije za S65C) u ispitivanoj skupini iznosi 6% za razliku od 1% učestalosti istog genotipa u općoj populaciji Hrvatske. Ovaj genotip složenog heterozigota C282Y/H63D prema klasifikaciji (1) ukazuje na tip 1B nasljedne hemokromatoze, a osobe s ovim genotipom nositelji su alelnih varijanti gena *HFE* povezanih s nasljednom hemokromatozom (20).

Rezultati našeg istraživanja rađenog na 100 bolesnika suspektnih na HH koji se liječe u KBC-u Osijek slažu se s ranije objavljenim rezultatima istraživanja rađenog u KBC-u Rijeka na 175 bolesnika suspektnih na HH. Rezultati su sukladni za sve složene genotipove triju najčešćih mutacija (C282Y, H63D i S65C) u genu *HFE* (17).

Molekularna dijagnostika je, uz kliničke simptome i biokemijske parametre, standardni dio dijagnostike HH. Osim za određivanje dijagnoze preporuča se učiniti genetsko testiranje na prisutnost mutacija u genu *HFE* i osobama koje su oboljelima od HH bliski srodnici u prvom koljenu (1).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U dobnoj kategoriji između 51 i 70 godina starosti značajno je veći broj žena upućivan na molekularnu dijagnostiku *HFE*
- U skupini od 100 ispitanika suspektno oboljelih od HH za mutaciju C282Y (aleli G i A) zastupljeniji je alel G (83,0%), za H63D (aleli C i G) zastupljeniji je alel C (82,5%), a za mutaciju S65C (aleli A i T) zastupljeniji je alel A (98,5%).
- Nema značajne razlike u raspodjeli alela za mutacije C282Y, H63D i S65C s obzirom na spol ispitanika.
- U obje podskupine ispitanika, i muškoj i ženskoj, za mutaciju C282Y najzastupljeniji je genotip GG (76,1%, odnosno 69,7%), za mutaciju H63D najzastupljeniji je genotip CC (65,7%, odnosno 72,7%), dok je za mutaciju S65C najzastupljeniji genotip AA (98,5%, odnosno 93,9%).
- Nema statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova za mutacije C282Y, H63D i S65C između skupina muškog i ženskog spola.
- U istraživanoj skupini bolesnika prisutno je 8 genotipova s obzirom na mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*. Najveća je učestalost genotipa bez *HFE* mutacija (46,0%).
- Učestalost genotipa povezanog s tipom 1A HH, C282Y mutirani homozigot, u skupini muškog spola iznosi 6%, a u skupini ženskog spola iznosi 12,1%.
- Učestalost genotipa povezanog s tipom 1B HH, C282Y/H63D složeni heterozigot, u skupini muškog spola iznosi 7,5%, a u skupini ženskog spola iznosi 3,0%.
- Nema značajne razlike u raspodjeli *HFE* genotipova između skupina muškog i ženskog spola.

7. SAŽETAK

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Utvrditi učestalost alela i genotipova za mutacije C282Y, H63D, S65C, genotipova *HFE*, te razlike u učestalosti alela i genotipova s obzirom na spol ispitanika.

NACRT STUDIJE: Presječna studija.

ISPITANICI I METODE: Ispitivana skupina sastoji se od 100 pacijenta suspektnih na HH kojima je molekularna dijagnostika HH učinjena u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku KBC-a Osijek u periodu od 2017. do 2021. godine. Iz uzoraka pune krvi s antikoagulansom izolirana je genomski DNA te je provedeno mjerenje koncentracije i čistoće DNA. Genotipizacija mutacija C282Y, H63D i S65C u genu *HFE* učinjena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu i analizom krivulje taljenja. Podaci o rezultatima genotipizacije *HFE* prikupljeni su pretraživanjem elektronske baze podataka e-Delphyn.

REZULTATI: U skupini ispitanika za mutaciju C282Y najzastupljeniji je genotip GG (74,0%) i alel G (83,0%), za mutaciju H63D najzastupljeniji je genotip CC (68,0%) i alel C (82,5%), a za mutaciju S65C najzastupljeniji je genotip AA (97,0%) i alel A (98,5%). U istraživanoj skupini bolesnika prisutno je 8 genotipova s obzirom na mutacije C282Y, H63D i S65C u genu *HFE*. Najveća je učestalost genotipa bez *HFE* mutacija (46,0%).

ZAKLJUČAK: U dobnoj kategoriji između 51 i 70 godina starosti značajno je veći broj žena upućivan na molekularnu dijagnostiku *HFE*. Nema statistički značajne razlike u raspodjeli alela i genotipova za mutacije C282Y, H63D i S65C, niti u raspodjeli *HFE* genotipova između skupina muškog i ženskog spola.

KLJUČNE RIJEČI: nasljedna hemokromatoza, molekularna dijagnostika, *HFE*, C282Y, H63D, S65C

8. SUMMARY

Molecular diagnostics of hereditary hemochromatosis

OBJECTIVES: The aim of this study is to determine the frequency of alleles and genotypes for mutations C282Y, H63D, S65C, *HFE* genotypes, and differences in the frequency of alleles and genotypes with regard to the sex of the subjects.

STUDY DESIGN: Cross-sectional study.

SUBJECTS AND METHODS: The studied group consists of 100 patients suspected of HH. Patients underwent molecular diagnostics in the Laboratory for Molecular and HLA Diagnostics of the Clinical Hospital Center in Osijek in the period from 2017 to 2021. Genomic DNA was isolated from whole blood samples with anticoagulant, and DNA concentration and purity were measured. Genotyping of the C282Y, H63D and S65C mutations in the *HFE* gene was performed using real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. Data on HFE genotyping results were collected by searching the e-Delphyn electronic database.

RESULTS: In the group of subjects for the C282Y mutation, the most represented genotype is GG (74.0%) and allele G (83.0%), for the H63D mutation, the most represented genotype is CC (68.0%) and allele C (82.5%), and for the S65C mutation, the most common genotype is AA (97.0%) and allele A (98.5%). In the studied group of patients, there are 8 genotypes due to mutations C282Y, H63D and S65C in the *HFE* gene. The highest frequency is the genotype without HFE mutations (46.0%).

CONCLUSION: In the age category between 51 and 70 years of age, a significantly larger number of women were referred for molecular diagnosis of *HFE*. There is no statistically significant difference in the distribution of alleles and genotypes for mutations C282Y, H63D and S65C, nor in the distribution of HFE genotypes between male and female gender groups.

KEY WORDS: hereditary hemochromatosis, molecular diagnostics, HFE, C282Y, H63D, S65C

9. LITERATURA

1. Kowdley KV, Brown EK, Ahn J, Sundaram V. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. *Am J Gastroenterol.* 2019; 114:1202–1218.
2. Štraus B, Petrik J. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.:394-400.
3. Harrison SA, Bacon BR. Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J Hepatol.* 2003; 38: 14-23.
4. Rodwell VW, Bender DA, Kenelly PJ, Weil PA i sur. *Harper's Illustrated Biochemistry.* New York: McGraw-Hill Education. 2018; 31: 1541-1555.
5. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; 19:164-74.
6. Belovari T, Kibel A, Kostović-Knežević Lj. Transferin u zdravlju i bolesti. *Med Vjesn.* 2006; 38(1-4): 21-24.
7. Adams P. Hemochromatosis: ancient to the Future. *Clin Liver Dis.* 2020; (16): 83-90.
8. Eva Rombout-Sestrienkova E, van Kraaij MGJ, Koek GH. How we manage patients with hereditary haemochromatosis. *Br. J. Haematol.* 2016; 175: 759–770.
9. Turnpenny PD, Ellard S i sur. *Emeryjeve osnove medicinske genetike.* Zagreb: Medicinska naklada; 2011: 110-111.
10. Murphree C, Nguyen N, Raghunathan V, Olson S, DeLoughery T, Shatzel J. Diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *Vox Sang.* 2020; 115: 255–262.
11. Alexander J, Kowdley K. Hereditary Hemochromatosis: Genetics, Pathogenesis, and Clinical Management. *Ann Hepatol.* 2005; 4(4): 240-247.
12. Lukić IK, Sambunjak D. Vrste istraživanja. U: Marušić M, urednik. *Uvod u znanstveni rad u medicine.* Zagreb: Medicinska naklada; 2013; 5: 41.
13. QIAcube User Manual. QIAGEN. Dostupno na adresi: <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=f7d77c6e-0479-4b2b-a2e0-5ca747114e34&lang=en>. Datum pristupa: 20.5.2022.
14. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. QIAGEN. Dostupno na adresi: <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>. Datum pristupa: 20.5.2022.

15. SpectraMax QuickDrop UV-Vis Spectrophotometer User Guide. Molecular Devices LLC. Dostupno na adresi: https://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/2020-12/QuickDrop_user_guide.pdf. Datum pristupa: 23.5.2022.
16. LightMix in-vitro diagnostics kit HFE H63D S65C C282Y. TIB Molbiol. Dostupno na adresi: <https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/ch/de/dienstleistungen/bestellformulare/ch-en-dl-lightmix-product-list.pdf>. Datum pristupa: 23.5.2022.
17. Milić S., Ristić S., Starčević-Čizmarević N. i sur. Low frequency of HFE gene mutations in Croatian patients suspected of having hereditary hemochromatosis. *Med Sci Monit.* 2011; 17(10): CR552-556.
18. Elghawi LM. i sur. Prevalence of H63D and C282Y Mutations in Hereditary Hemochromatosis (HFE) Gene in Tripoli Region of Libya. *Libyan J Med Sci.* 2022; 5(2): 49-55.
19. Ristić S. i sur. Hemochromatosis gene mutations in the Croatian and Slovenian populations. *Clin Genet.* 2003; 64: 444–446.
20. Porto G, Brissot P, Swinkels DW, Zoller H, Kamarainen O, Patton S i sur. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur J Hum Genet.* 2016; 24:479–495.

10. ŽIVOTOPIS

Nives Kenjeric

Datum i mjesto rođenja:

- 17. srpnja 2000. godine, Virovitica

Obrazovanje:

- 2007. – 2015. Osnovna škola Antunovac, Antunovac
- 2015. – 2019. Zdravstvena gimnazija pri Medicinskoj školi Osijek
- 2019. – 2022. Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika