

# Uvođenje metode za genotipizaciju mutacija H63D, S65C i C282Y u genu HFE

---

Načkar, Albina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:696048>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Albina Načkar

**Uvođenje metode za genotipizaciju  
mutacija H63D, S65C i C282Y u genu *HFE***

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Albina Načkar

**Implementation of a method for genotyping  
H63D, S65C and C282Y mutation in *HFE*  
gene**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Sveti Duh, pod mentorstvom doc. dr. sc. Lore Dukić, te komentorstvom prof. dr. sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Lori Dukić, komentorici prof. dr. sc. Petri Korać i dr. sc. Hrvoju Galić na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljicama na divnim zajedničkim trenucima tijekom studija i najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ljubavi koju su mi pružali na ovom putu.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Uvođenje metode za genotipizaciju mutacija H63D, S65C i C282Y u genu *HFE*

Albina Načkar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hemokromatoza je nasljedna bolest koja se manifestira prekomjernim nakupljanjem željeza u tkivima. Može biti nasljedna i stečena ali njen najčešći uzrok su mutacije u genu *HFE* koje onemogućuju sintezu hepcidina, proteina odgovornog za regulaciju iskorištavanja željeza. Najčešće mutacije koje uzrokuju hemokromatozu su mutacije C282Y, H63D i S65C. Kako bi se neka mutacija mogla koristiti u dijagnostičke svrhe, kao marker pojedinih stanja, potrebno je verificirati protokol kojim se ona dokazuje. Verifikacijski protokol za uvođenje metode za detekciju mutacija povezanih s pojavom hemokromatoze podrazumijevao je procjenu usporedivosti, ponovljivosti i točnosti metode. Ispitivanje usporedivosti učinjeno je pomoću 26 uzoraka za mutaciju C282Y, 25 za mutaciju H63D i 17 za mutaciju S65C. Uspoređeni su rezultati dobiveni analizom tih uzoraka i rezultati koji za te uzorke postoje u laboratoriju KBC-a Zagreb. Preciznost istraživane metode utvrđena je korištenjem tri uzorka. Svaka mutacija opetovano je određivana u istom uzorku te su ti podaci međusobno uspoređeni. Parametar točnosti prikazan je kao sličnost rezultata četiri ispitivana uzorka i uzoraka referentne vrijednosti vanjske ustanove Reference Institute for Bioanalytics. Svaki od istraživanih parametara pokazao je 100% podudaranje, međutim zbog mnogih ponavljanja PCR-analiza zbog neuspjelog umnažanja pojedinih uzoraka u prvotnim analizama PCR, istraživana metoda za genotipizaciju mutacija H63D, S65C i C282Y nije uvedena kao dijagnostička metoda u laboratorij bolnice KB Sveti Duh.

Ključne riječi: hemokromatoza, verifikacija, molekularna dijagnostika  
(58 stranica, 23 slika, 13 tablica, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Lora Dukić  
Komentor: prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenitelji:  
prof. dr. sc. Petra Korać  
prof. dr. sc. Inga Urlić  
prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 5. 9. 2024.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

## Implementation of a method for genotyping H63D, S65C and C282Y mutation in *HFE*

Albina Načkar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hemochromatosis is an inherited disease characterized by excessive accumulation of iron in tissues. It can be hereditary or acquired, but its most common causes are mutations in the *HFE* gene, which impair the synthesis of hepcidin responsible for regulating iron utilization. The most common mutations causing hemochromatosis are C282Y, H63D, and S65C mutations. In order for a mutation to be used as a biomarker for diagnostic purposes it is necessary to verify the protocol by which it is detected. The verification protocol for introducing new method for detection of mutations associated with the onset of hemochromatosis involved assessing the comparability, repeatability, and accuracy of the method. Comparability testing was done using 26 samples for the C282Y mutation, 25 samples for the H63D mutation, and 17 samples for the S65C mutation testing. Results gained using the new method were compared with already known results provided by the Clinical Hospital Center Zagreb. Precision testing used three samples. Similarity of results was assessed by repeated measurements of the same sample under the same conditions, and the accuracy parameter showed the similarity of the result of four tested samples and reference samples from the External Quality Control Reference Institute for Bioanalytics. Each of the parameters matched in 100 %. However, due to many repetitions of PCR analysis because of failed amplification of some samples in the initial PCR analyses, the method for genotyping mutations H63D, S65C, and C282Y was not introduced as a diagnostic method at the laboratory in Clinical Hospital Sveti Duh.

Keywords: hemochromatosis, verification, diagnostics  
(58 pages, 23 figures, 13 tables, 70 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Asst. Prof. Lora Dukić  
Co-mentor: Prof. Petra Korać

### Reviewers:

Prof. Petra Korać, PhD  
Prof. Inga Urlić, PhD  
Prof. Maja Matulić, PhD



Thesis accepted: 5. 9. 2024.

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Homeostaza željeza u organizmu</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Gen HFE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Regulacija koncentracije željeza ovisna o proteinu HFE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. Hemokromatoza</b> .....	<b>8</b>
1.4.1. Hemokromatoza tipa 1 .....	10
1.4.2. Hemokromatoza tipa 2 .....	10
1.4.3. Hemokromatoza tipa 3 .....	11
1.4.4. Hemokromatoza tipa 4 .....	11
1.4.5. Laboratorijska obrada pacijenata sa sumnjom na hemokromatozu.....	11
1.4.6. Liječenje hemokromatoze.....	12
<b>1.5. Verifikacija laboratorijskih metoda</b> .....	<b>13</b>
1.5.1 Usporedivost, preciznost i točnost verificirane metode.....	14
1.5.3. Upotreba verificiranih metoda .....	14
<b>2. Cilj istraživanja</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materijali i metode</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Izolacija DNA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Verifikacija značajki metode</b> .....	<b>18</b>
3.2.1. Usporedivost .....	18
3.2.2. Preciznost .....	19
3.2.2. Točnost.....	20
<b>4. Rezultati</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. Izolacija DNA iz pune krvi pacijenata</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2. Usporedivost</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3. Preciznost</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4. Točnost</b> .....	<b>45</b>
<b>5. Rasprava</b> .....	<b>49</b>
<b>6. Zaključak</b> .....	<b>51</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>52</b>

**Životopis..... 58**

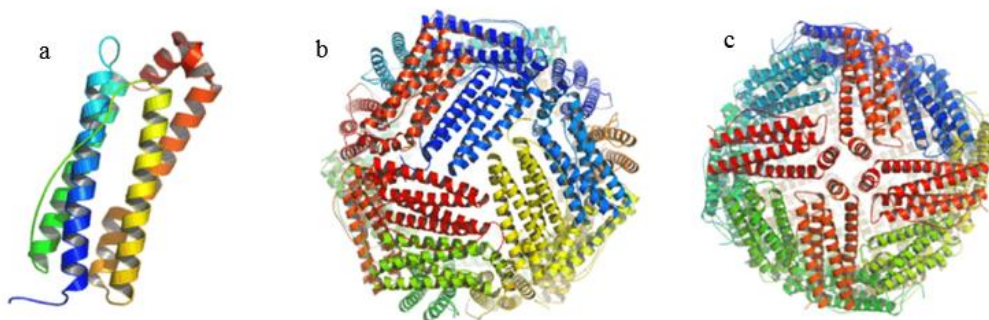
# 1. Uvod

## 1.1 Homeostaza željeza u organizmu

Željezo je esencijalni element u tragu koji je potreban organizmu za provedbu mnogih staničnih procesa i pravilno funkcioniranje organa. Ono je najzastupljeniji prijelazni metal koji doniranjem ili primanjem elektrona u redoks-reakcijama katalitički sudjeluje u procesu transporta kisika krvotokom, respiraciji koja se odvija u mitohondrijima te intermedijarnom i ksenobiotskom metabolizmu. U procesu replikacije nukleinskih kiselina sudjeluje kao kofaktor enzima DNA-polimeraza i helikaza, dok se tijekom imunosne obrane organizma preraspodjeljuje u makrofage kako bi se smanjila koncentracija izvanstaničnog željeza. Istovremeno se s preraspodjelom obustavlja apsorpcija željeza iz hrane čime se onemogućuju rast i proliferacija siderofilnih bakterija (Coffey i Ganz 2017 i Carter i sur. 2022). Ljudskom organizmu je na dnevnoj bazi potrebno oko 25 mg željeza. Veći dio dnevnog unosa, čak 80 %, koristi se za eritropoezu, a preostalih 20 % se troši na potrebe ostalih stanica i organa. Dnevni gubitak željeza iznosi 1-2 mg, odvija se gubitkom krvi i ljuštenjem endometrija te za razliku od unosa, nije reguliran. Promjene u količini željeza u organizmu mogu biti ili akutne promjene u plazmi ili promjene količine željeza u tkivima (Coffey i Ganz 2017). Najveći dio željeza u organizmu čovjeka, čak 65 %, nalazi se u hemoglobinu, 2-5 % željeza je u sastavni dio mioglobina i različitih enzima kao što su katalaze, peroksidaze i citokromske oksidaze, a ostatak (30 %) je pohranjen u obliku feritina u hepatocitima i stanicama retikuloendotelnog sustava (Mrzljak i Pulanić 2022). Željezo u organizam ulazi preko hrane, pića i suplemenata koji su bogati željezom, ali se i oslobađa iz retikuloendotelnih makrofaga koji razgrađuju „stare“ eritrocite. Unosom iz hrane organizam osigurava 1-2 mg željeza, a raspadom eritrocita dobiva 20-25 mg željeza (Mackenzie i sur. 2008). Dobiveno željezo može biti pohranjeno u oblicima različite reaktivnosti; unutar feritina, klastera željezo-sulfida i sličnih funkcionalnih grupa, ovisno o procesu u kojem će biti iskorišteno (Mladenka i sur. 2005).

Željezo se iz hrane apsorbira iz duodenuma pomoću enterocita. Apsorpcija počinje na apikalnoj membrani enterocita gdje dolazi do redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  djelovanjem ferireduktaze i prijenosnika dvovalentnog metalnog transportera 1 (DMT1, od engl. *divalent metal-ion transporter 1* ,). Nakon ulaska u enterocite, dio  $\text{Fe}^{2+}$  oksidira u  $\text{Fe}^{3+}$  i pohranjuje se u obliku

feritina (Collins i sur. 2018) iz kojeg se može brzo i lako otpustiti ukoliko je potrebno organizmu (Anderson i Frazer 2017). Mehanizam nije još u potpunosti razjašnjen, ali prema Anderson i Frazer (2017), u tom procesu sudjeluju lizosomske proteaze koje razgrađuju proteinski kompleks unutar kojeg je željezo skladišteno. Feritin je unutarstanični globularni proteinski kompleks koji se sastoji od 24 podjedinice. Svaka podjedinica je sastavljena od 5  $\alpha$ -zavojnica. Zavojnica A, B, C i D formiraju snop, a zavojnica E, koja je kratka C-terminalna  $\alpha$ -zavojnica, proteže se od unutrašnjosti prema vanjskoj strani (Slika 1). Postoje tri različite vrste podjedinica ovisno o njihovoj molekulskoj masi: lake (L, od engl. *light*), srednje (M, od engl. *medium*) i teške (H, od engl. *heavy*). Podjedinice feritina stvaraju omotač oko šupljine u koji se pohranjuje 4.500 atoma željeza. Nakon ulaska željeza u omotač, srednje teške i teške podjedinice kataliziraju oksidaciju dvovalentnog željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) u trovalentno ( $\text{Fe}^{3+}$ ) koristeći molekularni kisik i vodikov peroksid. Oksidirano željezo se skladišti u obliku topivog kristalnog minerala ferihidrita. Ovakva kontrolirana oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  je potrebna kako u organizmu ne bi došlo do spontane oksidacije slobodnog  $\text{Fe}^{2+}$  čiji su nusprodukti netopivi  $\text{Fe}^{3+}$  i reaktivni kisikovi radikali (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) koji oštećuju stanice i tkiva u kojima se nalaze (Anderson i Frazer 2017).



Slika 1. Prikaz (a) jedne podjedinice feritina: zavojnica A obojena je plavom bojom, zavojnica B zelenom, zavojnica C žutom, zavojnica D narančastom i zavojnica E crvenom, (b) površine feritina i (c) unutrašnjosti feritina. (Preuzeto i prilagođeno prema: Li i sur. 2021.)

Ostatak željeza se transportira na bazolateralnu stranu enterocita pomoću feroportina (FPN1, od engl. *ferroportin 1*). FPN1 je transportni protein sastavljen od 12 domena organiziranih u dva reznja koji formiraju centralnu šupljinu koja sadrži mjesto vezanja metala (Collins i sur. 2018). Nakon transportiranja se željezo oksidira transmembranskom ferooksidazom HEPH (engl. *hephaestin*) te nanosi na nosač apotransferin u plazmi. Vezanjem željeza na nosač apotransferin, on postaje transferin (TF, od engl. *transferrin*) (Coffey i Ganz 2017). Transferin je glikoprotein sačinjen od dva reznja kojeg čine po dvije domene  $\alpha$ -zavojnica

i  $\beta$ -ploča obavijenih s tri lanca ugljikohidrata. Svaki režanj može na sebe vezati jedan atom  $\text{Fe}^{3+}$  (Gomme i McCann 2005). Tako vezano željezo krvotokom dolazi do ciljanih stanica te se pomoću transferinskih receptora 1 (TfR1, od engl. *transferrin receptor protein 1*) i transferinskih receptora 2 (TfR2, od engl. *transferrin receptor protein 2*) veže za njih. Vezanjem transferina s receptorima nastaje kompleks transferin-TfR koji ulazi u stanicu endocitozom posredovanom klatrinom tijekom koje se oslobađa željezo i daje na korištenje stanici (Ponka i sur. 1998). Prilikom otpuštanja željeza iz stanica koje nisu hepatociti, oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$  se događa djelovanjem ferooksidaze ceruloplazmina (engl. *ceruloplasmin*). Ceruloplazmin je glikoprotein (Collins 2020) čija je glavna uloga transport bakra u organizmu (Sintusek i sur. 2019). Prije vezanja bakrovih iona naziva se apocerulazmin, a vezanjem šest iona bakra on postaje holoceruloplazmin (Sintusek i sur. 2019). Upravo holoceruloplazmin djeluje na metabolizam željeza zbog redoks-potencijala bakrovih iona (Harris 2019 i Roeser i sur., 1970). Osim spomenutih uloga ceruloplazmin može oksidirati aromatske amine te djeluje kao antioksidans (Sintusek i sur. 2019)..

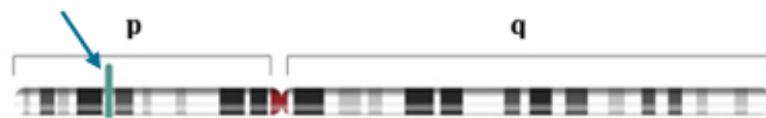
Jetra je glavni organ za regulaciju količine željeza u organizmu. U jetri se sintetizira hepcidin, hormon sastavljen od 25 aminokiselina, koji inducira endocitozu i razgradnju FPN1 nakon što razina željeza u organizmu, odnosno koncentracija željeza u serumu, prijeđe vrijednost  $8,5 \mu\text{mol/L}$  kod muškaraca, odnosno  $8,2 \mu\text{mol/L}$  kod žena i na taj način smanjuje apsorpciju željeza iz probavnog trakta i njegovo otpuštanje iz mjesta pohrane (Chambers i sur. 2023). Interakcija N-terminalnog kraja hepcidina i centralne šupljine FPN1 daje signal za ubikvitinaciju nekoliko lizinskih ostataka iz citoplazmatske petlje FPN1 što dovodi do razgradnje FPN1 (Hawula i sur 2019). Hepcidin krvotokom dopijeva do ostalih stanica te će, ukoliko je koncentracija željeza u serumu optimalna ili povišena, njegova sinteza biti povećana. Ukoliko je potrebno povećati apsorpciju željeza, u jetri se stvara eritropoetin (EPO, od engl. *erythropoietin*). Eritropoetin potiče eritropoezu stvaranjem hormona eritroferona (ERFE, od engl. *erythroferrone*) koji inhibira proizvodnju hepcidina (Hilton i sur. 2023).

Oslobađanje željeza iz „starih“ eritrocita provode makrofagi. Proces se odvija u retikuloendotelnom sustavu gdje dolazi do fagocitoze eritrocita i njihove razgradnje u fagolizosomima. Tijekom fagocitoze djeluje enzim hem-oksigenaza 1 (HO-1, od engl. *heme oxygenase 1*) koja katalizira razgradnju molekule hema na  $\text{Fe}^{2+}$  i ugljikov monoksid koji se recikliraju u organizmu te biliverdin koji djelovanjem biliverdinske reduktaze prelazi u bilirubin i izlučuje se u obliku fecesa (Beaumont i Delaby 2009). Željezo preko FPN1 izlazi u

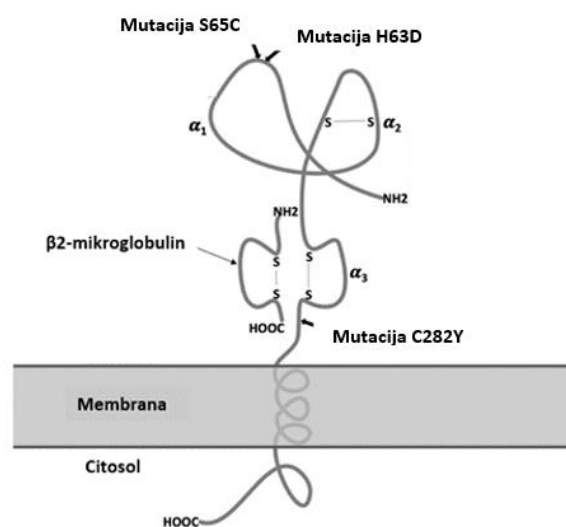
plazmu u trovalentnom obliku, veže se za apotransferin te se skladišti, ovisno o potrebama organizma, ili kao feritin ili kao hemosiderin (Sukhbaatar i Weichhart 2018).

## 1.2. Gen *HFE*

Gen *HFE* nalazi se na p-kraću kromosoma 6 (Slika 2), na poziciji 22.2 i kodira protein homeostatskog regulatora željeza (HFE, od engl. *homeostatic iron regulation*) (Porter i Rawla 2023). Protein HFE (Slika 3) je transmembranski protein tipa 1 koji svojom strukturom nalikuje na molekule MHC-1 (engl. *major histocompatibility complex class I*). Sastoji se od alfa-zavojnice koja je podijeljena na tri domene ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$ ), od čega dvije stvaraju peptidni zavoj ( $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ ). Protein HFE se  $\alpha_3$ -domenom veže za  $\beta_2$ -mikroglobulin na površini stanice (Danilowicz-Szymanovicz i sur. 2021), ali se i kompetitivno veže za TfR1 (Hanson i sur. 2001).



Slika 2. Kromosom 6 (na slici je tirkiznom strelicom označen položaj gena *HFE* (6p22.2), a crvenom bojom centromera). (Preuzeto i prilagođeno prema: Katsarou i sur. 2019.)



Slika 3. Shematski prikaz strukture proteina HFE;  $\alpha$ 1- i  $\alpha$ 2-domene stvaraju peptidni zavoj, a  $\alpha$ 3-domena je u interakciji s  $\beta$ 2-mikroglobulinom. (Preuzeto i prilagođeno prema: Danilowicz-Szymanowicz i sur. 2021.)

Mutacije u genu *HFE* mogu dovesti do poremećaja u djelovanju proteina HFE koji može rezultirati obolijevanjem od hemokromatoze (Asberg i sur. 2002).

Danas je poznato 37 alelnih varijanti ovog gena (Pointon i sur. 2000), a prema Nasrullah i sur. (2022), jedino su homozigoti za alel C282Y pokazali značajne promjene u parametrima ključnim za detekciju hemokromatoze. Učestalost homozigota za taj alel u populacijama država Europe iznosi između 0,5 % i 10,0 % (Alvarez i sur. 2001), Složeni heterozigoti, C282Y/H63D i C282Y/S65C, ne uzrokuju nužno promijenjeni fenotip, ali ih se smatra rizičnom skupinom za oboljenje od hemokromatoze (Asberg i sur. 2004).

Do nastanka alela C282Y dolazi tranzicijom gvanina u adenin u nukleotidu 845. Posljedica tranzicije je zamjena cisteina tirozinom na poziciji 282 u  $\alpha$ 3-domeni proteina HFE zbog koje nastaju promjene u strukturi proteina. Točnije, prekidaju se disulfidne veze zbog čega je onemogućeno pravilno formiranje tercijarne strukture proteina i dolazi do gubitka njegove funkcije (Gao i sur. 2008). Zbog promijenjene strukture proteina HFE onemogućena je njegova interakcija s  $\beta$ 2-mikroglobulinom i transport na površinu stanice (Feder i sur. 1997) te interakcija s TfR1 (Hanson i sur. 2001). S obzirom da su protein HFE i transferin u konkurenciji za TfR1, zbog nedostatka njihove interakcije smanjuje se sinteza hepcidina i neregulirano povećava apsorpcija željeza (Lebron i sur. 1998). Ova mutacija je učestala u bijelaca te se javlja u omjerima 1:200 do 1:300, ali ima nisku prodornost. Ujedno je i najčešća mutacija - prema Sohal i Kowley (2024) se javlja u 80-85 % slučajeva.

Druga mutacija po zastupljenosti je H63D. Ona nastaje transverzijom citozina u gvanin na 187. nukleotidu, što dovodi do zamjene histidina asparaginskom kiselinom na poziciji 63  $\alpha$ 1-domene proteina HFE. Točan mehanizam koji dovodi do promjene u regulaciji i unosu željeza kod ove mutacije nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da se mutirani protein HFE veže s  $\beta$ 2-mikroglobulinom, ali zbog promijenjene strukture proteina dolazi do drugačijeg vezanja za TfR1 (Lebron i sur. 1998). Posljedica promijenjenog vezanja za TfR1 je njegov smanjen afinitet za transferin (Kelly i sur. 1998) zbog čega se smanjuje sinteza hepcidina, te poremećena regulacija željeza. Iako je regulacija željeza poremećena, ova mutacija jako rijetko uzrokuje hemokromatozu. Nosioci mutacije imaju povišene koncentracije feritina i transferina



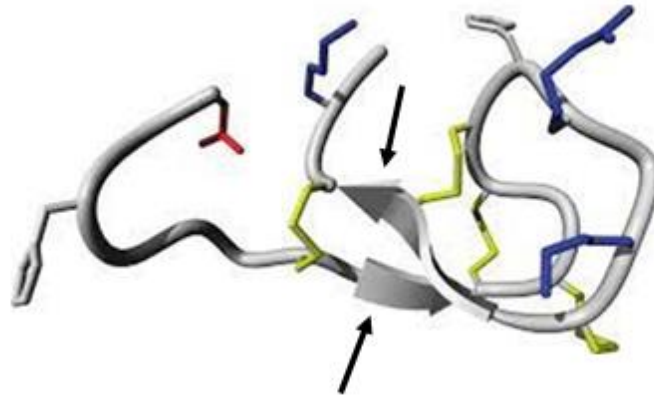
(Nasrullah i sur. 2022), ali prema istraživanju koje su proveli Kelley i sur. (2014), samo kod tri pacijenta od njih 170 je uočeno nakupljanje željeza u organima i njihovo teže oštećenje.

Alel za koji se smatra da ne uzrokuje kliničku sliku, osim u kombinaciji s alelom C282Y, je alel S65C. On nastaje zamjenom serina cisteinom na poziciji 65  $\alpha$ 1-domene proteina HFE (Shahbaaz i sur. 2017). Mehanizam kojim djeluje još je uvijek nepoznat, ali primijećene su povišene koncentracije serumskog feritina i/ili transferina u pacijenata koji su ili homozigoti ili složeni heterozigoti. Ukoliko je ovaj alel prisutan samo u jednoj kopiji, koncentracije feritina i transferina neće biti povišene (Holmstrom i sur. 2002).

Vežanje HFE za TfR1 važno je u regulaciji koncentracije željeza u organizmu. Transferin iz krvi se veže za TfR1 na površini stanica s kojima stvara kompleks Tf/TfR1. Nastankom kompleksa Tf/TfR1 započinje formiranje endosoma iz kojeg se, zbog niskog pH, otpušta željezo iz transferina. Kada je koncentracija transferina u krvi unutar fiziološkog intervala, HFE se veže za TfR1 umjesto transferina i onemogućuje ulazak željeza u stanice, odnosno njegovo prekomjerno nakupljanje (Asberg i sur. 2002).

### 1.3. Regulacija koncentracije željeza ovisna o proteinu HFE

Hepcidin se danas smatra glavnim regulatorom koncentracije željeza u organizmu. To je jetreni hormon kodiran genom *HAMP* (engl. *human hepcidin gene*). *HAMP* se nalazi na poziciji 19q13.12 te kodira prepro-hepcidin koji se sastoji od 84 aminokiseline. Iz prepro-hepcidina razgradnjom prvo nastaje prohepcidin od 60 aminokiselina, a potom hepcidin koji se sastoji od 25 aminokiselina (Cocciolillo i sur. 2020). Hepcidin, prikazan na Slici 4, u trodimenzionalnom prostoru zauzima oblik ukosnice koju čine  $\beta$ -ploče stabilizirane s četiri disulfidne veze (Hunter i sur. 2002). Hepcidin vezanjem za ferroportin uzrokuje njegovu ubikvitinaciju, internalizaciju i degradaciju ligazama zbog čega je daljnja apsorpcija željeza u krvotok onemogućena.



Slika 4. Prikaz tercijarne strukture hepcidina: crnim strelicama su prikazane  $\beta$ -ploče, žutom bojom disulfidne veze, plavom bojom pozitivno nabijene aminokiseline na C-kraju i crvenom bojom negativno nabijene aminokiseline na N-kraju proteina. (Preuzeto iz: Kroot i sur. 2011.)

Dva najvažnija faktora koji utječu na ekspresiju hepcidina su koncentracija željeza i upalni signali (Sangkhathai i Nemeth 2017). Kada su u organizmu prisutni upalni signali uzrokovani infekcijom, upalni citokin IL-6 veže se za receptore na hepatocitima. Ovo vezanje aktivira Janus kinaze 1 i 2 (JAK, od engl. *Janus kinase*), koje fosforiliraju transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (STAT3, od engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) koji se potom translocira u jezgru i potiče transkripciju hepcidina. Ovakva regulacija je potrebna kako ne bi došlo do nakupljanja viška željeza u organizmu te kako ga potencijalni patogeni ne bi mogli iskoristiti za vlastite procese. Kada je koncentracija željeza u serumu povišena, pokreće se sinteza hepcidina kako bi se zaustavila daljnja apsorpcija željeza iz hrane i onemogućilo gomilanje željeza (Ganz 2013). Kontrola ekspresije hepcidina je u takvim uvjetima regulirana signalnim putem BMP-SMAD (engl. *bone morphogenetic protein/ small mother against decapentaplegic*). Prilikom zasićenja transferina dolazi do sekrecije koštanog morfogenetskog proteina 6 (BMP6, od engl. *bone morphogenetic protein 6*) i koštanog morfogenetskog proteina 2 (BMP2, od engl. *bone morphogenetic protein 2*) u endotelnim stanicama jetre. Vezanje transferina za TfR1 te BMP6 i BMP2 na BMP receptore tipa I i II potiče fosforilaciju SMAD1/5/8. Fosforilirani SMAD1/5/8 se veže na SMAD4 i uzrokuje njihovu translokaciju u jezgru (Andriopoulos i sur. 2009). U jezgri se kompleks veže na hepcidinski promotor i inducira njegovu transkripciju. Za uspješnu regulaciju potrebna je prisutnost proteina HFE i koreceptora hemojuvelina (HJV, od engl. *hemojuvelin*). Kada je prisutna visoka koncentracija željeza u organizmu, HFE se s TfR1 premješta na TfR2 kako bi

na TfR1 oslobodio mjesto vezanja za transferin (Goswani i Andrews 2006). Interakcija proteina HFE i TfR2 potiče vezanje HJV za ligande BMP koji tada olakšano stvaraju aktivni signalni kompleks s receptorima. U slučaju manjeg zasićenja transferina pojačava se transkripcija matriptaze 2 s gena *TMPRSS6* (engl. *transmembrane serine protease 6*). Matriptaza 2 je membranska serinska proteaza koja inducira cijepanje HJV. Istovremeno dolazi do destabilizacije TfR2 te se HFE veže za TfR1 i ne dolazi do aktivacije signalnog puta BMP-SMAD (Zhao i sur. 2013). Promjenu transkripcije hepcidina mogu uzrokovati hipoksija i eritropoeza, ali kroz druge signalne putove (Zhao i sur. 2013). Dobiveno željezo može ili biti otpušteno u krvotok i dano drugim organima na korištenje ili pohranjeno u obliku feritina u samoj stanici za njene potrebe.

#### 1.4. Hemokromatoza

Hemokromatoza je poremećaj rada organa koji nastaje nakupljanjem viška željeza u organizmu čovjeka. Ljudski organizam nema sposobnost izlučivanja viška željeza te se ono može nakupljati u bilo kojem organu, ali najčešće je zahvaćena jetra. Hemokromatoza se razvija kada je u organu, ili više njih, prisutna patološka koncentracija željeza koja može dovesti do njegovog propadanja (Porter i Rawla 2023). Upravo se zato simptomi najčešće javljaju tek u odrasloj dobi, između 40. i 60. godine života (Barton i Parker 2000), iako to ovisi o vrsti hemokromatoze od koje pacijent boluje. Simptomi uvelike ovise o zahvaćenim organima, ali gotovo uvijek kreću pojavom letargije, umora i artralgijske. S obzirom na nespecifičnost simptoma sve dok ne dođe do ozbiljnijeg oštećenja pojedinog organa, dijagnoza hemokromatoze često bude previđena u pacijenata koji nemaju obiteljsku anamnezu (Hanson i sur. 2001). Međutim, praćenjem osoba s većim rizikom od oboljevanja, pravovremenom dijagnostikom i liječenjem hemokromatoze, životni vijek pacijenta ne mora nužno biti skraććen (Sonagra i Zubair 2023). Željezo se može nakupljati i u gušterači, srcu, zglobovima i hipofizi zbog čega hemokromatoza potiče razvoj patofizioloških stanja vezanih uz te organe, poput ciroze jetre, dijabetesa, artropatije, kardiomiopatija, hipogonadizma, hiperpigmentacija i hipotiroidizma. Posljedica hemokromatoze može biti i smanjena imunost organizma. Smanjena imunost je posljedica pretjeranog fagocitiranja eritrocita makrofazima. Fagocitiranjem se smanjuje broj vijabilnih eritrocita u organizmu te se oslobađa dodatna količina željeza za nakupljanje (Porter i Rawla 2023).

Hemokromatoza se, prema etiologiji, dijeli na primarnu i sekundarnu (Porter i Rawla 2023). Hemokromatoza uzrokovana mutacijama u genu *HFE* poznata je pod nazivima hemokromatoza tipa 1 ili klasična hemokromatoza te spada u skupinu primarne ili nasljedne hemokromatoze. U skupinu nasljedne hemokromatoze spadaju i hemokromatoza tipa 2a uzrokovana mutacijom u genu *HFE2* koji kodira hemojuvelin, 2b uzrokovana mutacijom u genu *HAMP* odgovornom za sintezu hepcidina, 3 uzrokovana mutacijom u genu *TfR2* koji kodira istoimeni protein i 4a i 4b uzrokovane mutacijom u genu *SLC40A1* koji kodira feroportin (Porter i Rawla 2023) (Tablica 1). Kod svih tipova nasljedne hemokromatoze do povećanja koncentracije željeza dolazi neovisno o njegovoj unesenoj količini, zbog mutacije u nekom od gena koji sudjeluje u metabolizmu i transportu željeza. Sekundarna, odnosno stečena, hemokromatoza javlja se kao posljedica nekog drugog stanja ili bolesti. Najčešće su to nepravilna eritropoeza, opetovane, masivne transfuzije krvi, talasemija, anemija, nasljedna sferocitoza, x-vezana sideroblastoza i poremećaj djelovanja piruvatne kinaze. U ovom slučaju dolazi do apsorpcije velike količine željeza jer pacijent ili stvara ili razara velik broj eritrocita. Na taj se način oslobađa hemoglobin iz eritrocita i nakuplja u retikuloendotelnim stanicama u organizmu (Sonagra i Zubair 2023).

Tablica 1. Prikaz tipova nasljedne hemokromatoze i gena čije mutacije se smatraju njeim uzrokom

Tip nasljedne hemokromatoze		Mutirani gen
<b>1</b>		<i>HFE</i>
<b>2</b>	<b>a</b>	<i>HFE2</i>
	<b>b</b>	<i>HAMP</i>
<b>3</b>		<i>TFR2</i>
<b>4</b>	<b>a</b>	<i>SLC40A1</i>
	<b>b</b>	

Tipovi hemokromatoze 2a, 2b, 3 i 4 su globalno rasprostranjeni, dok se tip 1 najvećim dijelom razvija kod ljudi podrijetlom iz sjeverne Europe (Porter i Rawla 2023). Bijelci imaju šest puta veću vjerojatnost da razviju hemokromatozu u odnosu na pripadnike crne rase, a prema Porter i Rawla (2023) od nasljedne hemokromatoze boluje jedna u 300-500 osoba.

Muškarci su dva do tri puta rizičnija skupina za razvoj ove bolesti u usporedbi sa ženama (McDonnel i sur. 1999) zbog čega simptomi kod oboljelih žena nastupaju kasnije, u šezdesetim godinama, a kod muškaraca u pedesetima (Porter i Rawla 2023). Žene tijekom života gube krv mjesečnicom, u trudnoći povećavaju volumen krvi kako bi bio dostatan i za trudnicu i za dijete, a dok doje gube dio željeza za potrebe stvaranje mlijeka (Basrowi i sur. 2024).

#### 1.4.1. Hemokromatoza tipa 1

Ovaj tip hemokromatoze uzrokovan je mutacijom u genu *HFE* (6p22.2). Li i sur. (2024) opisuju tri podtipa: hemokromatoza C282Y (1a), hemokromatoza C282Y/H63D (1b) i hemokromatoza s prisutnim alelom S65C (1c). Hemokromatoza tipa 1, tzv. klasična hemokromatoza je autosomno recesivna nasljedna bolest. Rasprostranjena je globalno, ali primijećena je veća pojavnost u ljudi podrijetlom iz sjeverne Europe. Frekvencija pojavljivanja homozigota za mutaciju C282Y iznosi 0,41 %, za mutaciju H63D 14 % te 0,5 % za mutaciju S65C (*EASL Clinical Practice Guidelines on haemochromatosis*).

#### 1.4.2. Hemokromatoza tipa 2

Drugi tip hemokromatoze poznat je još pod nazivom juvenilna hemokromatoza jer se simptomi najčešće javljaju u dječjoj dobi, između 2 i 11 godina starosti, a bolest se razvija do tridesete godine (Li i sur. 2024). Ovaj se tip hemokromatoze u većini slučajeva manifestira kao problem sa srcem i zglobovima te niskom razinom spolnih hormona koja u pubertetskoj dobi može uzrokovati amenoreju kod djevojčica ili kasniji ulazak u pubertet kod dječaka (Kelly i sur. 1998). Ovisno o genu u kojem je došlo do mutacije razlikuju se tipovi 2a i 2b (Porter i Rawla 2023).

Hemokromatoza tipa 2a razvija se kao posljedica mutacije u genu *HFE2* (od engl. *hemochromatosis type 2 protein*). On se nalazi na q-kraku kromosoma 1 (1q21.1) i kodira HJV (NCBI 2024). HJV je koreceptor, membranski protein, u signalnom putu BMP6 koji je uključen u regulaciju ekspresije hepcidina. Mutacijom gena *HFE2* dolazi do smanjenja aktivnosti puta BMPR-HJV-SMAD, što nizvodno smanjuje transkripciju gena *HAMP* (Andriopoulos i sur. 20109). Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno (Kelly i sur. 1998).

Drugi podtip hemokromatoze tipa 2 javlja se zbog mutacije u genu *HAMP* koji kodira hepcidin. On se nalazi na q-kraku kromosoma 19 (19q13), a njegova mutacija uzrokuje smanjenu sintezu hepcidina ili čak njegov potpuni izostanak (Roetto i sur. 2002). Bolest se javlja u ranim godinama zbog značajno promijenjene količine sinteze hepcidina. Nasljeđuje se

autosomno recesivno (Lescano i dr. 2017). Ovo je najrijeđi tip hemokromatoze čija frekvencija patogenih alela iznosi 20/10 000 (Turshudzhyan i sur 2023).

#### 1.4.3. Hemokromatoza tipa 3

Uzrok hemokromatoze tipa 3 je mutacija u genu *TFR2*. Do bolesti mogu dovesti različite vrste mutacija poput delecija p.AVAQ 594-597del i zamjena p.Glu60Ter, p.Met172Lys, p.Tyr250Ter, p.Asp680Tyr, p.Gln672Ter, i p.Trp781Ter na kromosomu 7q22 (Girelli i sur. 2002 i Hernandez i sur. 2002). *TFR2* je, uz HFE i HJV, odgovoran za održavanje homeostaze željeza u organizmu zbog uloge u moduliraju ekspresije proteina hepcidina (Schmidt i sur. 2008). U najvećoj je količini prisutan u hepatocitama u jetri, a na površini eritrocita djeluje s receptorima eritropoetina te veže i apsorbira transferin. Njegova transkripcija nije regulirana količinom željeza. Zbog mutacije dolazi do promjene interakcije kompleksa željeza i transferina s receptorom koja utječe na signalni put ERK/MAPK (od engl. *extracellular-signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase*) (Poli i sur. 2010) što dovodi do smanjene ekspresije hepcidina. Obolijevaju homozigoti, a nasljeđivanje je autosomno recesivno (Barton i Parker 2000).

#### 1.4.4. Hemokromatoza tipa 4

Do ovog tipa hemokromatoze dolazi zbog mutacija gena *SLC40A1* (od engl. *solute carrier family 40 member 1*). Sam gen kodira FPN1, a mutacijom se ili smanjuje ili gubi njegova osjetljivost za hepcidin. Za razliku od ostalih tipova bolest se javlja i kod heterozigota, odnosno nasljeđuje se autosomno dominantno (Sonagra i Zubair 2023). Unutar ovog tipa hemokromatoze razlikuju se dva podtipa; podtip A u kojem dolazi do gubitka funkcije feroportina te podtip B koji nastaje zbog pojačane aktivnosti feroportina koji se ne razgrađuje u procesu posredovanom hepcidinom (Majore i sur. 2018).

#### 1.4.5. Laboratorijska obrada pacijenata sa sumnjom na hemokromatozu

S obzirom na to da je hemokromatoza asimptomatska u ranom stadiju, svim pacijentima kod kojih je povišena razina zasićenja transferina i koncentracija feritina u krvi trebalo bi analizirati mutacije gena koje uzrokuju hemokromatozu. Isti je postupak preporučen i za odrasle osobe koje ne moraju nužno pokazivati simptome hemokromatoze, ali u bliskom srodstvu ili prvom koljenu imaju zabilježenu hemokromatozu. Kod pacijenata čiji nalazi biopsije ili magnetske rezonancije (MRI, od engl. *magnetic resonance imaging*) jetre pokazuju povišenu koncentraciju željeza, za početak se preporučuje napraviti nalaze zasićenja transferina i

koncentracije feritina u krvi. Ako su nalazi pozitivni, preporučuje se genetsko testiranje (*EASL Clinical Practice Guidelines on haemochromatosis* 2022).

Laboratorijska obrada pacijenta sa sumnjom na hemokromatozu obuhvaća mjerenje zasićenja serumskog transferina i koncentracije feritina. Do povećanog zasićenja serumskog transferina dolazi prije pojave simptoma te u slučaju sumnje na hemokromatozu ono mora iznositi više od 45 % kod žena, odnosno 50 % kod muškaraca. Ukoliko pacijent ima hemokromatozu, i koncentracija feritina će biti povišena te će biti veća od 200 µg/L kod žena, odnosno 300 µg/L kod muškaraca (*EASL Clinical Practice Guidelines on haemochromatosis* 2022). Nakon pozitivnog rezultata jedne ili obje laboratorijske pretrage, pacijente se upućuje na genetsko testiranje kako bi se dijagnoza potvrdila jer nalaz mjerenja zasićenja seruma transferinom ne mora nužno biti povišen kod sekundarne hemokromatoze, dok koncentracija feritina može biti povišena u nekim drugim stanjima poput malignih tumora. Testiranje uključuje genotipizaciju gena *HFE* metodama lančanom reakcijom polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) ili energetski transfer fluorescencijskom rezonancijom (FRET, od engl. *fluorescence resonance energy transfer*) s obzirom na to da 95 % slučajeva hemokromatoze čine genotipovi koji su homozigoti za C282Y i složeni heterozigoti C282Y/H63D (Sonagra i Zubair 2023).

Detekcija i potvrda zahvaćenosti organa može se provesti radiografijom, magnetskom rezonancijom ili analizom biopsije tkiva. Radiografija se najčešće koristi u slučaju kardioloških simptoma, magnetska rezonancija kao neinvazivna metoda za određivanje količine hemosiderina u jetri, a biopsija kao najosjetljivija i najspecifičnija metoda kojom je moguće odrediti prisutnost hemosiderina i razinu oštećenja jetre. Obzirom na invazivnost biopsije, provodi se isključivo kod pacijenata s dijagnosticiranom hemokromatozom i povišenim jetrenim enzimima i u slučaju koncentracije feritina veće od 1000 µg/L (Porter i Rawla 2023).

#### 1.4.6. Liječenje hemokromatoze

Nasljedna hemokromatoza može se liječiti venepunkcijom ukoliko oštećenje organa još nije nastupilo (Porter i Rawla 2023). Liječenje je doživotno i provodi se u dvije faze. Prva faza traje do normalizacije koncentracije feritina (< 50 µg/L) i najčešće podrazumijeva odlazak na jedan do dva tretmana tjedno (Porter i Rawla 2023). Druga faza nastupa nakon normalizacije koncentracije feritina te joj je cilj održati stečenu koncentraciju pa se na tretmane odlazi tri do četiri puta godišnje. Ova terapija pokazuje dobru uspješnost kod pacijenata u kojih je hemokromatoza rano otkrivena (Porter i Rawla 2023).

Sekundarnu hemokromatozu moguće je liječiti helirajućim agensima (Kontogiorghes i sur. 2016). Postoje intravenozni lijekovi poput Deferoxamina ili oralni poput Deferipronea i Deferasiroxa (Mobara i sur. 2016). U nekim slučajevima kombiniraju se flebotomija i eritropoietin za održavanje koncentracije hemoglobina i mobilizaciju željeza (Porter i Rawla 2023).

### 1.5. Verifikacija laboratorijskih metoda

Verifikacija kvalitativne metode prije njenog provođenja u dijagnostičkom laboratoriju standardni je korak kojim se osigurava njena ispravna implementacija (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*). Provodi se kada se u laboratorij uvodi nova metoda, validirana od strane proizvođača. Verifikacijski protokol u laboratorijskoj praksi označava provjeru pouzdanosti metode koja se uvodi u rutinski rad, a podrazumijeva procjenu značajki metode – u prvom redu usporedivosti, preciznosti i točnosti na referentnim uzorcima. Prije početka provođenja verifikacije potrebno je poznavati analitički sustav i definirati kriterije prihvatljivosti za pojedinu značajku metode propisanu od strane proizvođača. Kriterij prihvatljivosti definiran je ovisno o vrsti metode koja se verificira te laboratorij može definirati kriterije koji su stroži od onih propisanih (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*).

Tijekom verifikacije potrebno je koristiti pozitivne i negativne kontrole dobivene od strane proizvođača. Pozitivne i negativne kontrole koriste se kako bi se potvrdila ispravnost protokola metode isključivanjem utjecaja vanjskih faktora na sam protokol. Pozitivna kontrola je ona od koje se očekuje da će dati pozitivan rezultat jer u svom sastavu sadrži tvar koju se ispituje dok će negativna kontrola dati negativan rezultat zbog neprisustva tvari od interesa u svom sastavu. Tijekom provedbe metode važno je pridržavati se uputstva te poštovati graničnu vrijednost koju je proizvođač propisao te koja se ujedno smatra optimalnom (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*). Smanjenjem granične vrijednosti metoda može dati lažno pozitivne rezultate, a povećanjem lažno negativne rezultate. Kontrolni uzorci trebali bi biti što sličniji uzorcima pacijenata te stabilni u različitim uvjetima pohrane (Hrvatska komora medicinskih biokemičara 2013).



### 1.5.1 Usporedivost, preciznost i točnost verificirane metode

Usporedivost je značajka metode kojom se procjenjuje sličnost rezultata mjerenja u uzorcima ili kontrolnim materijalima na analitičkim sustavima (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*). Prilikom ispitivanja usporedivosti metode uzorci se ispituju u duplikatima te se dobiveni rezultati međusobno uspoređuju. (Hrvatska komora medicinskih biokemičara 2013). Preciznost iskazuje sličnost rezultata dobivenih opetovanim mjerenjem istog uzorka u istim uvjetima i na istom mjernom instrumentu u kratkom periodu (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*). Verifikacija preciznosti metode trebala bi se provoditi kroz pet uzastopnih dana tijekom kojih je ista serija uzoraka testirana u triplikatu (Hrvatska komora medicinskih biokemičara 2013). Točnost metode iskazuje sličnost prosječnog rezultata mjerenja vanjske kontrole i njene referentne vrijednosti (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*). Na uzorcima se provodi mjerenje u tri do pet serija u duplikatima (Hrvatska komora medicinskih biokemičara 2013).

### 1.5.3. Upotreba verificiranih metoda

Kvalitativne metode koje zadovolje verifikacijski protokol u zdravstvenom se sustavu mogu koristiti kao brzi testovi u sklopu probira (npr. serološki test na sifilis), kao dijagnostički testovi (nalaz krvi), testovi kojima se potvrđuje sumnja na određenu dijagnozu (npr. fluorescentna apsorpcija antitijela na treponemu, FTA-ABS) te testovi kojima se prati određeno stanje pacijenta (npr. progresija bolesti) (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*).

## **2. Cilj istraživanja**

Cilj ovog rada je verifikacija metode za detekciju mutacija H63D, S65C i C282Y u genu *HFE* u populaciji pacijenata kod kojih postoji sumnja na hemokromatozu. Verifikacijom molekularnog testa na hemokromatozu procijeniti će usporedivost, ponovljivost i točnost metode, čime se osigurava pouzdanost rezultata.

### 3. Materijali i metode

Verifikaciju sam provela tijekom lipnja i srpnja 2023. godine te je ona obuhvaćala procjenu usporedivosti, preciznosti (ponovljivosti) i točnosti metode za alele C282Y, H63D i S65C gena *HFE*. Istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo KB Sveti Duh.

Analizu mutacija gena provela sam lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (Q-PCR, od engl. *quantitative polymerase chain reaction*) na uređaju Rotor-Gene™ Q (Qiagen, Hilden, Njemačka) koristeći komercijalne setove kemikalija GENETIC HFE (C282A, H63D, S65C) kit (REF3208-025 – 1.2,11.1.2017. i REF3208-050 -1.2, 11.1.2017., Generi Biotech s.r.o., Hradec Kralove, Trebeš, Češka). Tijekom provođenja PCR-analize koristila sam tri vrste pozitivne kontrole iz pripadajućeg seta kemikalija GENETIC HFE (Generi Biotech, Trebeš, Češka) za svaku mutaciju, odnosno kontrolne uzorke divljeg tipa C282Y, H63D i S65C, kontrolne uzorke heterozigota C282Y, H63D i S65C te kontrolne uzorke mutacija C282Y, H63D i S65C i negativnu kontrolu PCR Water (Generi Biotech, Trebeš, Češka) prema preporukama proizvođača. Uzorci za PCR dobiveni su miješanjem 16 µL MasterMix-a iz komercijalnog seta kemikalija GENETIC HFE (Generi Biotech, Trebeš, Češka) i 4 µL uzorka.

U istom periodu sam iz ostatne pune krvi pacijenata s dijagnosticiranom hemokromatozom, uzorkovane u spremnik s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA, izolirala DNA pomoću seta kemikalija GeneProof PathogenFree DNA (Gene Proof, Brno, Češka). Uzorkovanje je provedeno tijekom prve polovice 2023. godine u Hematološkoj ambulanti Dnevne bolnice KB Sveti Duh. Neposredno nakon uzorkovanja, uzorci su dopremljeni u Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku gdje su bili pohranjeni u ledenici na -20 °C do trenutka izolacije. Izoliranoj DNA izmjerila sam koncentraciju i čistoću (A<sub>260/280</sub> i A<sub>260/230</sub>) pomoću spektrofotometra NanoPhotometer N60 (Implen, München, Njemačka).

#### 3.1. Izolacija DNA

DNA sam izolirala iz pet nasumično odabranih uzoraka ostatne pune krvi pacijenata s dijagnosticiranom hemokromatozom sakupljenih na KB Sveti Duh. Uzorkovanje je provedeno u epruvetu s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA. Alikvoti uzetih uzoraka volumena 1 mL su pohranjeni u ledenici Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku na -20°C uz kontinuirano praćenje temperature računalom povezanim s ledenicom. Izolaciju sam provela pomoću seta kemikalija GeneProof PathogenFree DNA (Gene Proof, Brno, Češka) prikazanih u Tablici 2 prema uputama proizvođača. U mikroeprevetu volumena 1,5 mL sam dodala 200 µL uzorka i 25 µL proteinaze K. Nakon toga sam dodala 200 µL pufera za lizu i smjesu promiješala na mješaču

(engl. *vortex*) 10-20 sekundi. Promiješanu smjesu sam stavila u grijaču ploču koju sam na početku podesila na 70°C i inkubirala ih 30 minuta. Nakon inkubacije sam u uzorak dodala 210 µL 96-100% etanola i opet promiješala 10-20 sekundi na mješaču. Tako pripremljeni uzorak prebacila sam na kolonu za vezanje DNA u epruvetu od 2 mL i centrifugirala 1 minutu na 11 000 x g. Nakon centrifugiranja sam dvaput isprala kolonu za vezanje DNA na način da sam ju smjestila u novu epruvetu od 2 mL i prvi put dodala 500 µL nekoncentriranog pufera za ispiranje BW, a drugi put 600 µL pufera B5. Između ispiranja sam centrifugirala uzorak na 11 000 x g u trajanju od 1 minute. Nakon dva ispiranja kolone, istu sam posušila prebacivanjem u novu epruvetu od 2 mL i centrifugiranjem na 11 000 x g u trajanju od 1 minute. Nakon sušenja sam kolonu prebacila u novu mikroeprevetu od 1,5 mL i dodala elucijski pufer BE zagrijan na 70°C. Dobivenu smjesu sam inkubirala na sobnoj temperaturi 1 minutu pa nakon toga centrifugirala kao u prijašnjim postupcima. Postupak elucije ponovila sam još jednom. Opisani postupak izolacije provela sam na svih 5 nasumično odabranim uzoraka. U 10 µL izolata izmjerila sam koncentraciju DNA i čistoće pomoću omjera  $A_{260/280}$  i  $A_{260/230}$  spektrofotometrom NanoPhotometer N60 (Implen, München, Njemačka) u programu Nucleic Acids. Prije mjerenja izmjerila sam slijepe probe dodavši 10 µL pufera za eluciju BE na prozorčić za mjerenje. Nakon uspješnog mjerenja slijepe probe, izmjerila sam koncentraciju i čistoću izolata. Na kraju sam iz preostalog izolata provela PCR-analizu. PCR-uzorci su, kao i kod verifikacije, dobiveni miješanjem 16 µL MasterMix-a iz komercijalnog seta GENETIC HFE (Generi Biotech, Trebeš, Češka) i 4 µL ispitivanog uzorka. PCR-analizom testirala sam svaki od uzoraka za sva tri istraživana alela i usporedno provela analizu kontrolnog materijala (tri pozitivne i jedna negativna kontrola) prema uputama proizvođača (Generi Biotech, Trebeš, Češka). Rezultate sam po završetku PCR-a analizirala pomoću postavke alelne diskriminacije (engl. *allelic discrimination*) u HEX/IOE/VIC/ („žutom“) i FAM („zelenom“) kanalu uz uključene opcije *Dynamic Tube*, *Slope Correct* i *Auto-Scale*. Kanal HEX/IOE/VIC prepoznaje pobuđenu pripadajuću fluorescentnu boju u primeru i emitira svjetlost kada je prisutan alel za divlji tip. Kanal FAM funkcionira na identičan način kao „žuti“ kanal, ali emitira svjetlost kada je prisutan mutirani alel. U slučaju heterozigota će oba kanala biti pobuđena zbog čega će signali biti vidljivi na oba kanala. Također sam postavila graničnu vrijednost tako da kontrole zadovoljavaju genotip kojem pripadaju. Genotip određenog uzorka sam odredila prema izgledu i nagibu krivulje u odnosu na graničnu vrijednost kao što je prikazano u Tablici 3.

Tablica 2. Popis reagensa korištenih za izolaciju DNA iz uzoraka ostatne pune krvi pacijenata sa sumnjom na hemokromatozu.

Reagens	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
pufer za eluciju (BE)	50
koncentrirani pufer za ispiranje (B5)	600
proteinaza K	25
etanol	210
pufer za lizu	200
(nekoncentrirani) pufer za ispiranje BW	500

Tablica 3. Legenda za očitavanje genotipa ispitivanih uzoraka nakon PCR-a s uključenom postavkom alelne diskriminacije (oznake „krivulja iznad“ i „krivulja ispod“ se odnose na položaj u odnosu na *graničnu* vrijednost).

Genotip	Zeleni kanal	Žuti kanal
divlji tip	prisutan (krivulja iznad)	bez signala (krivulja ispod)
mutant	bez signala (krivulja ispod)	prisutan (krivulja iznad)
heterozigot	prisutan (krivulja iznad)	prisutan (krivulja iznad)

## 3.2. Verifikacija značajki metode

### 3.2.1. Usporedivost

Za procjenu usporedivosti koristila sam uzorke izolirane DNA pacijenata iz pune krvi uzorkovane na antikoagulans EDTA, koji su dobiveni iz suradne ustanove KBC Zagreb. Uzorci su bili označeni brojevima od 1 do 43. Zbog prevalencije pojedinih alela u populaciji i dostupnosti uzoraka u suradnoj ustanovi analizu za alel C282Y provela sam na 10 uzoraka divljeg tipa, 10 uzoraka heterozigota i 6 uzoraka mutanta, za alel H63D na 10 uzoraka divljeg tipa, 10 heterozigota i 5 mutanta, a analizu za alel S65C na 10 uzoraka divljeg tipa i 7 uzoraka heterozigota.

Sve sam uzorke obradila kroz četiri PCR-analize. Usporedno s ispitivanjem uzoraka pacijenata, ispitivala sam i kontrolne uzorke (tri pozitivne kontrole za svaku vrstu mutacija i jednu negativnu kontrolu), u skladu s pravilima dobre laboratorijske prakse i uputama proizvođača Generi Biotech, Trebeš, Češka. Usporedbu sam provela prema smjernici *CLSI*

EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance. Iz vrijednosti prikazanih u kontingencijskim tablicama (Tablica 4 i 5) izračunala sam postotak pozitivnog slaganja (PPA, od eng. percent positive agreement) pomoću izraza  $PPA = \frac{a}{a+c} \times 100$  pri čemu a označava broj uzoraka heterozigota/mutanta dokazanih i ispitivanom i komparativnom metodom, a c broj uzoraka heterozigota/mutanta dokazanih komparativnom metodom koji su ispitivanom metodom pokazani kao divlji tip. Izračunala sam i postotak negativnog slaganja (NPA, od eng. percent negative agreement) pomoću formule  $NPA = \frac{d}{d+b} \times 100$  pri čemu d predstavlja broj uzoraka divljeg tipa dokazanih i ispitivanom i komparativnom metodom, a b broj uzoraka divljeg tipa dokazanih komparativnom metodom koji su ispitivanom metodom pokazano kao heterozigot/mutant.

Tablica 4. Kontingencijska tablica usporedivosti za homozigotni tip mutacije.

Ispitivana metoda	Komparativna metoda		
	Homozigot	divlji tip	ukupno
<b>homozigot</b>	a	b	a+b
<b>divlji tip</b>	c	d	c+d
<b>ukupno</b>	a+c	b+d	

Tablica 5. Kontingencijska tablica usporedivosti za heterozigotni tip mutacije.

Ispitivana metoda	Komparativna metoda		
	Heterozigot	divlji tip	ukupno
<b>heterozigot</b>	a	b	a+b
<b>divlji tip</b>	c	d	c+d
<b>ukupno</b>	a+c	b+d	

Definirani kriterij prihvatljivosti za sva tri alela izračunat na temelju PPA i NPA iznosi 100%.

### 3.2.2. Preciznost

Preciznost sam odredila provođenjem uzastopnih analiza slijeda nukleotida u istom uzorku homozigota, heterozigota i divljeg tipa za svaku od testiranih mutacija. Iz grupe uzoraka izolirane DNA pacijenata opisanih u odlomku usporedivost, nasumično sam odabrala po jedan

uzorak za divlji tip, heterozigot i mutant za svaku mutaciju. Napravila sam dva ponavljanja za svaki alel (Tablica 4 i 5). Usporedno sam provela analizu kontrolnih uzoraka (tri pozitivne kontrole za svaku vrstu mutacija i jednu negativnu kontrolu) koju, sukladno pravilima dobre laboratorijske prakse i uputama proizvođača, propisuje Generi Biotech, Trebeš, Češka. Kriterij za verifikaciju metoda molekularne dijagnostike propisan je smjernicom *CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance* te su na isti način definirani PPA i NPA kao kod provedbe analize usporedivosti.

Kriterij prihvatljivosti i ovdje iznosi 100% za sva tri alela.

### 3.2.2. Točnost

Parametar točnosti ispitala sam na liofiliziranim uzorcima izolirane DNA vanjske kontrole kvalitete organizatora Reference Institute for Bioanalytics (RfB). Za svaku od mutacija koristila sam četiri uzorka: MG1\_1/22, MG1\_2/22, MG2\_1/22 i MG2\_2/22 (Tablica 6). Parametar točnosti ispitala sam u skladu sa smjernicom *CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance* (Tablica 1 i 2) te sam dobivene rezultate usporedila s rezultatima definiranim od strane organizatora RfB.

Tablica 6. Popis uzoraka za ispitivanje parametara točnosti i njihovih rezultata propisanih od strane vanjske kontrole kvalitete organizatora Reference Institute for Bioanalytics (RfB).

Uzorak	Rezultat RfB		
	C282Y	H63D	S65C
<b>MG1_1/22</b>	divlji tip	divlji tip	divlji tip
<b>MG1_2/22</b>	divlji tip	heterozigot	divlji tip
<b>MG2_1/22</b>	divlji tip	divlji tip	divlji tip
<b>MG2_2/22</b>	heterozigot	divlji tip	divlji tip

PPA i NPA izračunati su kao što je prethodno objašnjeno te definirani kriterij prihvatljivosti i ovdje iznosi 100%.

## 4. Rezultati

### 4.1. Izolacija DNA iz pune krvi pacijenata

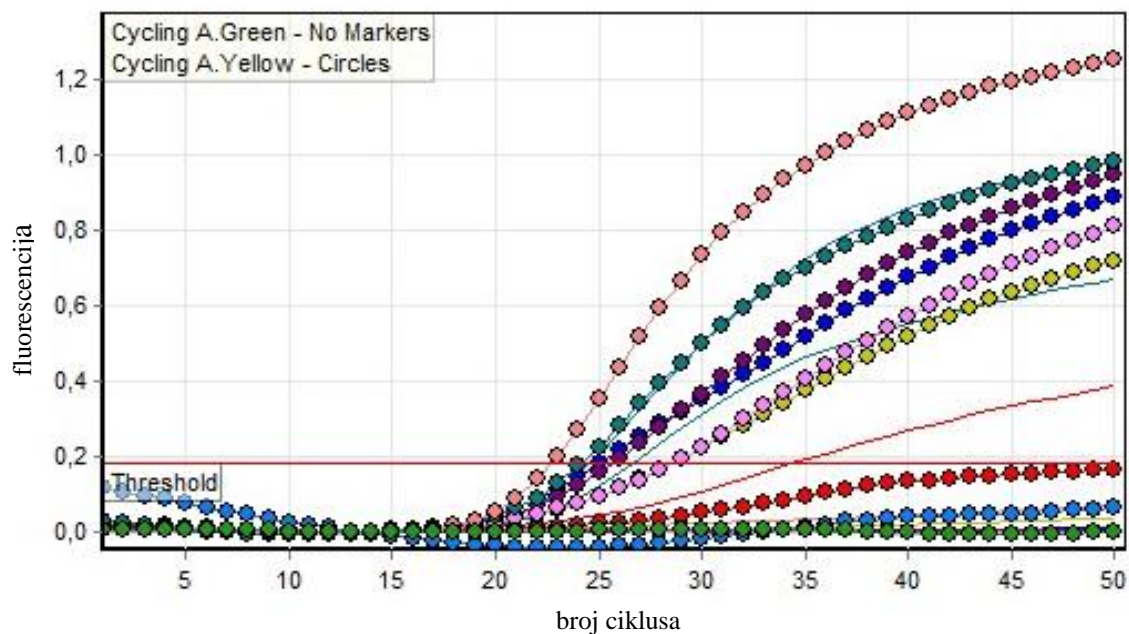
Kod većine uzoraka sam izmjerila koncentraciju u skladu s rasponom propisanim od strane proizvođača kompleta za izolaciju DNA GENETIC HFE (Generi Biotech, Trebeš, Češka) koji iznosi 40-60 ng/ $\mu$ L. Iznimke su bili uzorci 9D i 10D kod kojih je koncentracija iznosila 36,65 (uzorak 9D) i 20,30 (uzorak 10D) kao što je prikazano u Tablici 7. Ponovila sam izolaciju i mjerenje koncentracije za ta dva uzorka, ali su rezultati bili isti. Čistoća izolirane DNA je bila najveća kod uzoraka 6D i 8D, a najmanja kod uzorka 10D (Tablica 8) koji je imao i nisku koncentraciju.

Tablica 7. Koncentracija, apsorbancija i čistoća DNA izolirane iz uzoraka pacijenata.

Identifikacijski broj uzorka	Koncentracija DNA (ng/ $\mu$ L)	A (260/230)	A (260)	A(260/280)
6D	58,6	2,071	1,154	1,84
7D	43	1,92	0,834	1,781
8D	62,1	1,896	1,191	1,767
9D	36,65	1,491	0,671	1,654
10D	20,30	1,10	0,331	1,494

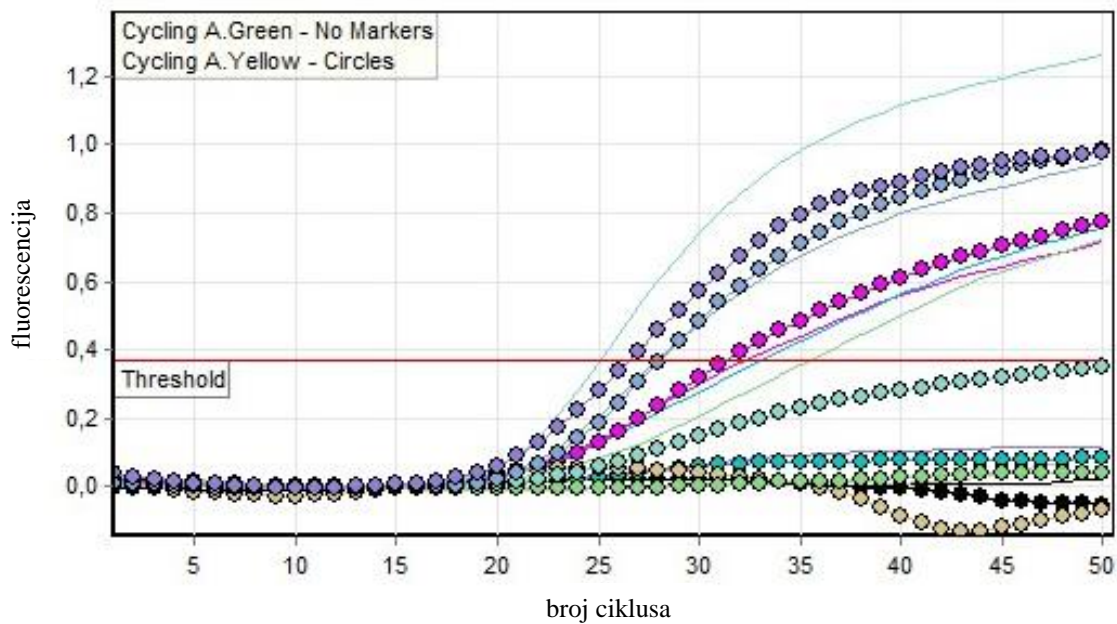
Rezultati PCR-a u kojem sam dokazivala prisutnost alela C282Y su pokazali da je uzorak 6D divlji tip, odnosno da niti jedan od alela nije C282Y, dok su ostali uzorci (7C-10C) imali mutacije, odnosno imaju oba alela C282Y (Slika 5). PCR za alel H63D pokazao je da uzorak 6D jedini ima alel H63D i to u heterozigotnom obliku, dok su ostali uzorci divlji tip i ne sadrže niti jednu kopiju tog gena (Slika 6 i Slika 7). Alel S65C nije prisutan niti u jednom uzorku (Slika 8). Svi su uzorci divlji tip za testirani alel.





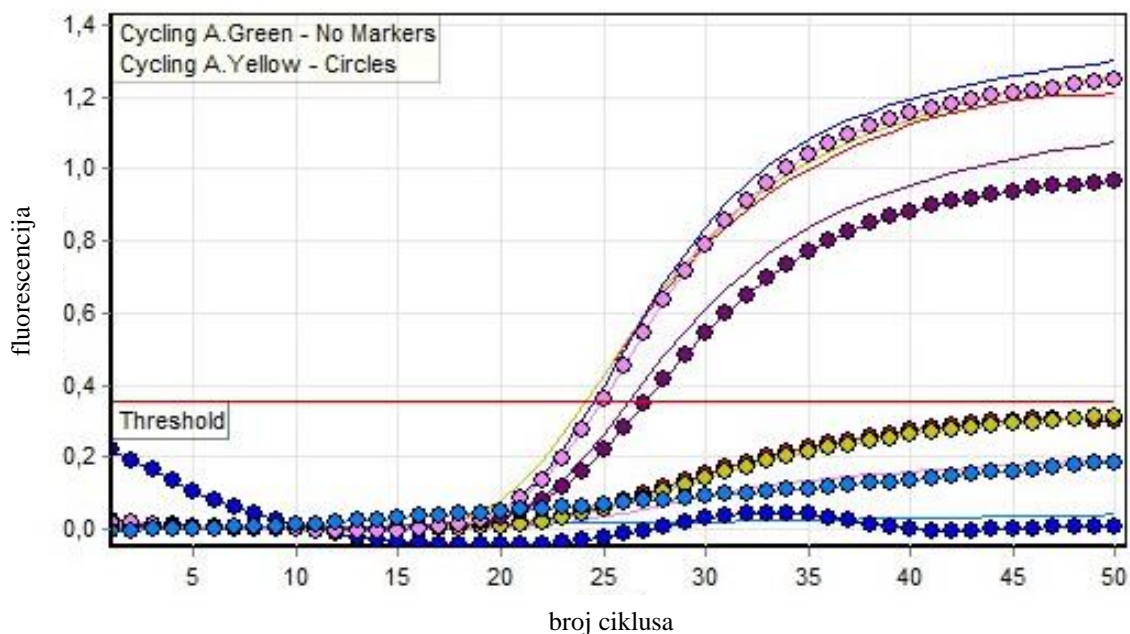
Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
<span style="color: red;">■</span>	6D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<span style="color: yellow;">■</span>	7D	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<span style="color: blue;">■</span>	8D	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<span style="color: purple;">■</span>	9D	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<span style="color: pink;">■</span>	10D	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
<span style="color: lightblue;">■</span>	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<span style="color: teal;">■</span>	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<span style="color: lightcoral;">■</span>	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<span style="color: green;">■</span>	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 5. Rezultati PCR-analize za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uredaja RotorGene™ Q za uzorke 6D-10D, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



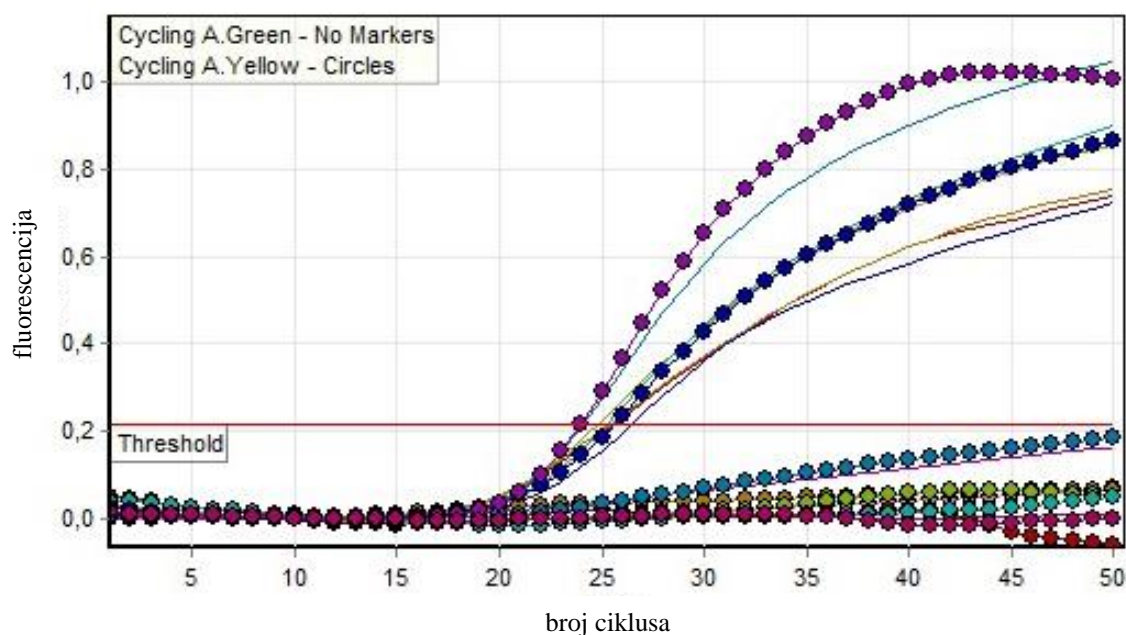
Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	6D	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	7D	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	8D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	9D	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	10D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje

Slika 6. Rezultati PCR-analize za alel H63D dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 6D-10D, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	7D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	9D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 7. Rezultati ponovljene PCR-analize za alel H63D dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 7D i 9D, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	6D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	7D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	8D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	9D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	10D	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 8. Rezultati PCR-analize za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 6D-10D, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).

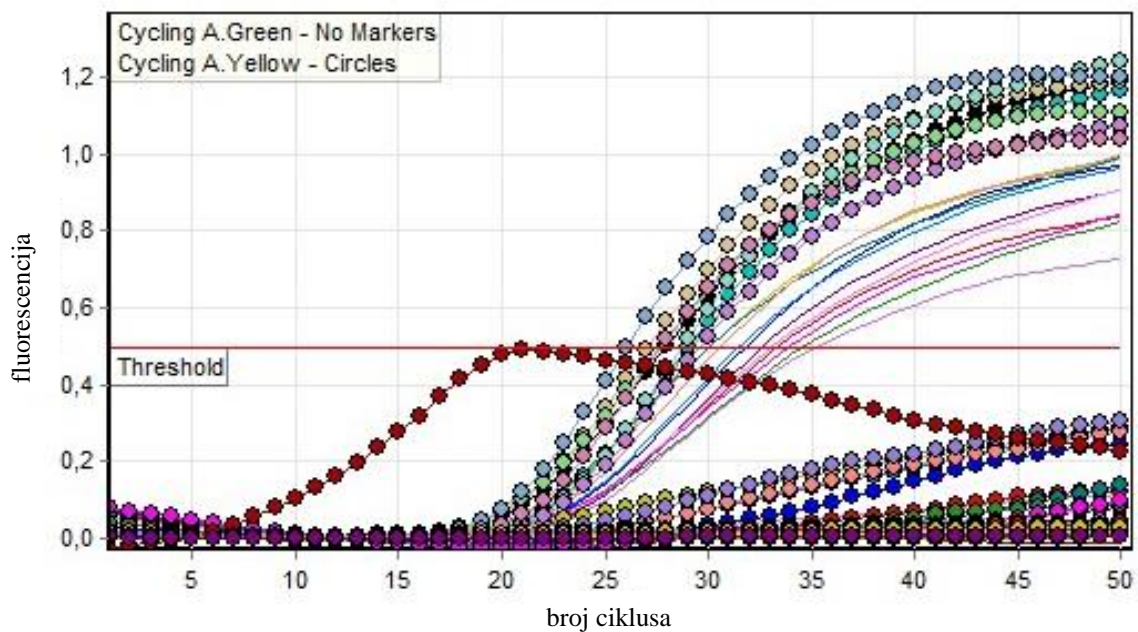
Tablica 8. Prikaz uzoraka 6D-10D i njihovih genotipova prema rezultatima PCR-analize.








<b>Identifikacijski broj pacijenta</b>	<b>Genotip</b>
<b>6D</b>	HFE/H63D
<b>7D</b>	C282Y/C282Y
<b>8D</b>	C282Y/C282Y
<b>9D</b>	C282Y/C282Y
<b>10D</b>	C282Y/C282Y

#### 4.2. Usporedivost

Za ispitivanje usporedivosti provela sam PCR-analizu na sva tri genotipa (divlji tip, heterozigot i mutant) za sva tri alela (C282Y, H63D i S65C). Uz uzorke sam koristila pozitivne kontrole za sva tri genotipa te negativnu kontrolu. Zadovoljavajući rezultat podrazumijevao je 100% poklapanje rezultata koje sam dobila u laboratoriju Zavoda za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku KB Sveti Duh s rezultatom KBC Zagreb koji je ustupio uzorke za verifikaciju.

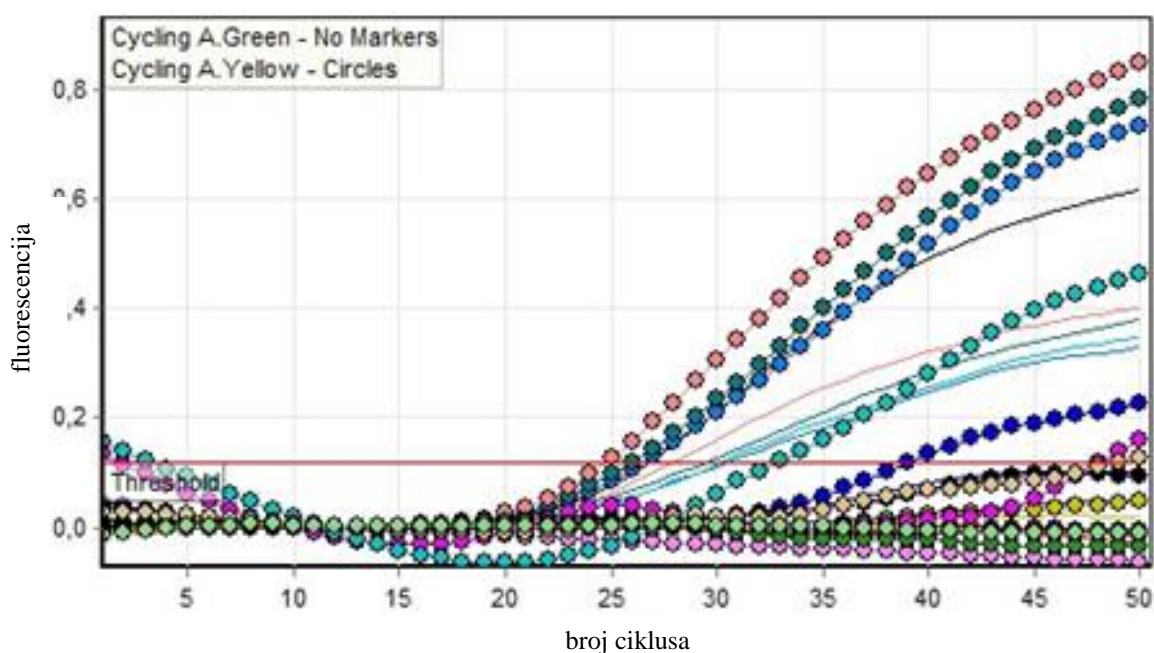
Alel C282Y ispitan je na 10 uzoraka divljeg tipa, 10 uzoraka heterozigota te 6 uzoraka mutanta (Slika 9 i Slika 10). Tijekom jedne od analiza rezultati PCR-a za uzorke 11, 14, 15, 19, 21, 28 i 29 (Slika 10) nisu se podudarali s genotipovima dobivenim u laboratoriju u KBC Zagreb te sam tu analizu ponovila s novootvorenom reakcijskom smjesom. Rezultati ponovljenog PCR-a (Slika 11) su bili zadovoljavajući te sam analizom usporedivosti pokazala 100% podudaranje ispitivanih uzoraka (Tablica 9).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	1	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	2	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	3	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	4	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	5	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	6	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	9	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	10	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	33	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	35	mutant	bez umnažanja	umnažanje

	39	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	40	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	42	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	43	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 9. Rezultati PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 33, 35, 39, 40, 42 i 43, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).

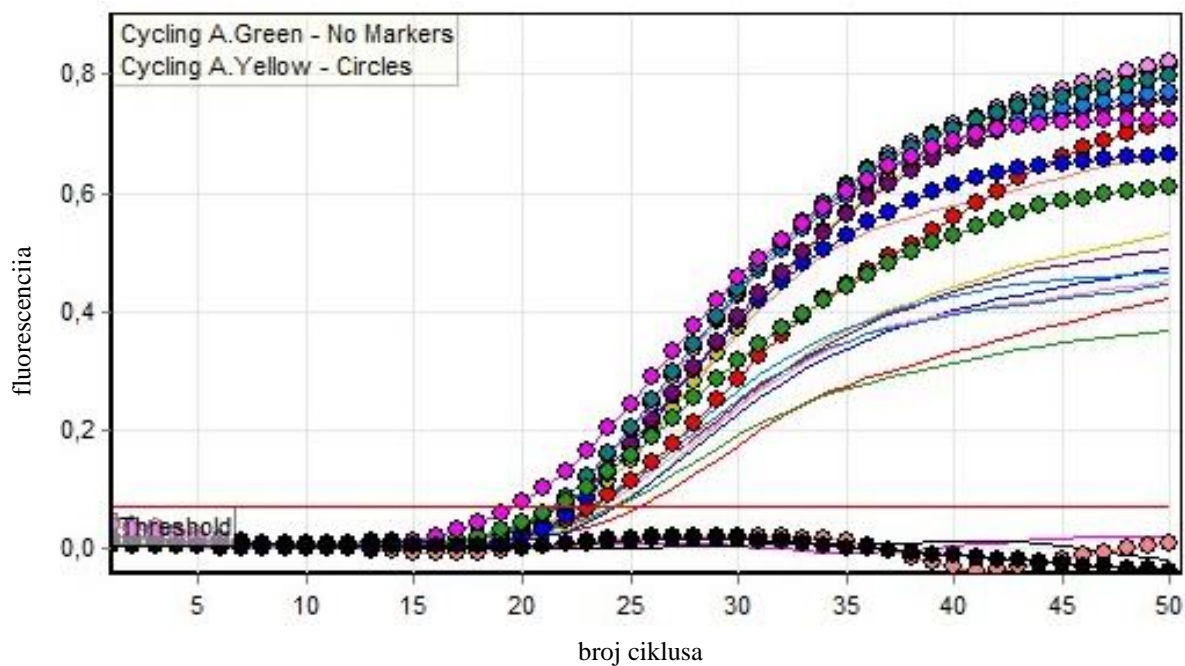


Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
------	--------	---------	----------------	--------------

	11	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	14	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	15	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	19	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	21	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	24	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	25	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	26	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	28	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	29	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 10. Rezultati PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 11, 14, 15, 19, 21, 24, 25, 26, 28, 29, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).





Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	11	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	14	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	15	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	19	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	21	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	28	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	29	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

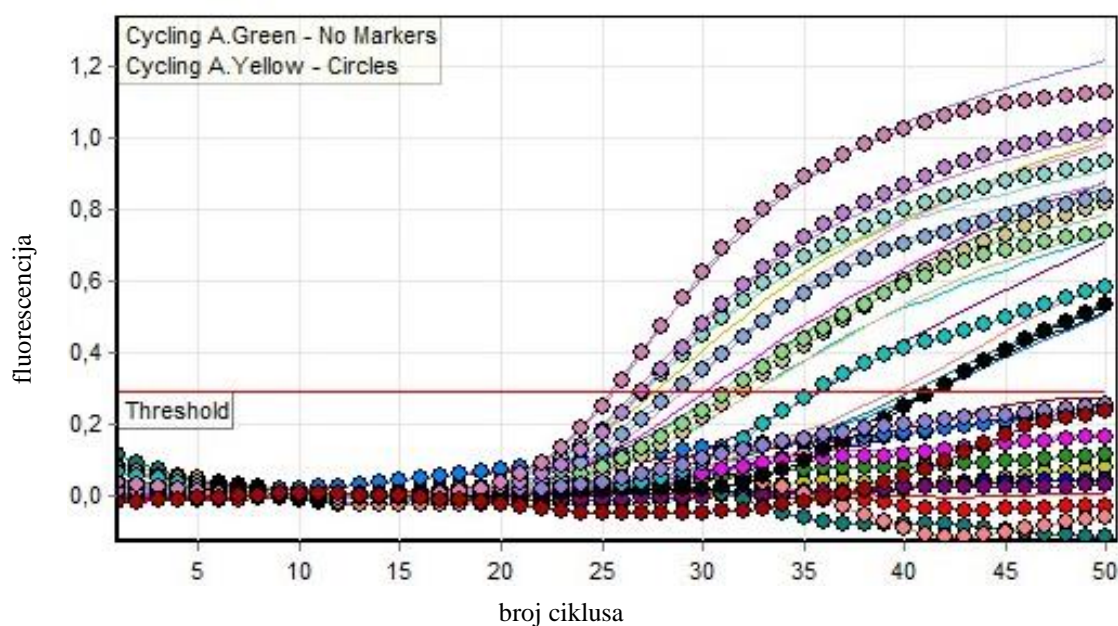
Slika 11. Rezultati ponovljene PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 11, 14, 15, 19, 21, 28 i 29, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).







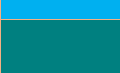
Tablica 9. Prikaz usporedbe genotipova uzoraka dobivenih s KBC Zagreb i rezultata dobivenih PCR-analizom prilikom ispitivanja usporedivosti za alel C282Y na ZMLD, KB Sveti Duh.

<b>Uzorak (KBC Zagreb)</b>	<b>Rezultat (KBC Zagreb) C282Y</b>	<b>Rezultat (ZMLD, KB Sveti Duh) C282Y</b>
1	divlji tip	divlji tip
2	divlji tip	divlji tip
3	divlji tip	divlji tip
4	divlji tip	divlji tip
5	divlji tip	divlji tip
6	divlji tip	divlji tip
7	divlji tip	divlji tip
8	divlji tip	divlji tip
9	divlji tip	divlji tip
10	divlji tip	divlji tip
11	heterozigot	heterozigot
14	heterozigot	heterozigot
15	heterozigot	heterozigot
19	heterozigot	heterozigot
21	heterozigot	heterozigot
24	heterozigot	heterozigot
25	heterozigot	heterozigot
26	heterozigot	heterozigot
28	heterozigot	heterozigot
29	heterozigot	heterozigot
33	mutant	mutant
35	mutant	mutant
39	mutant	mutant
40	mutant	mutant

42	mutant	mutant
43	mutant	mutant

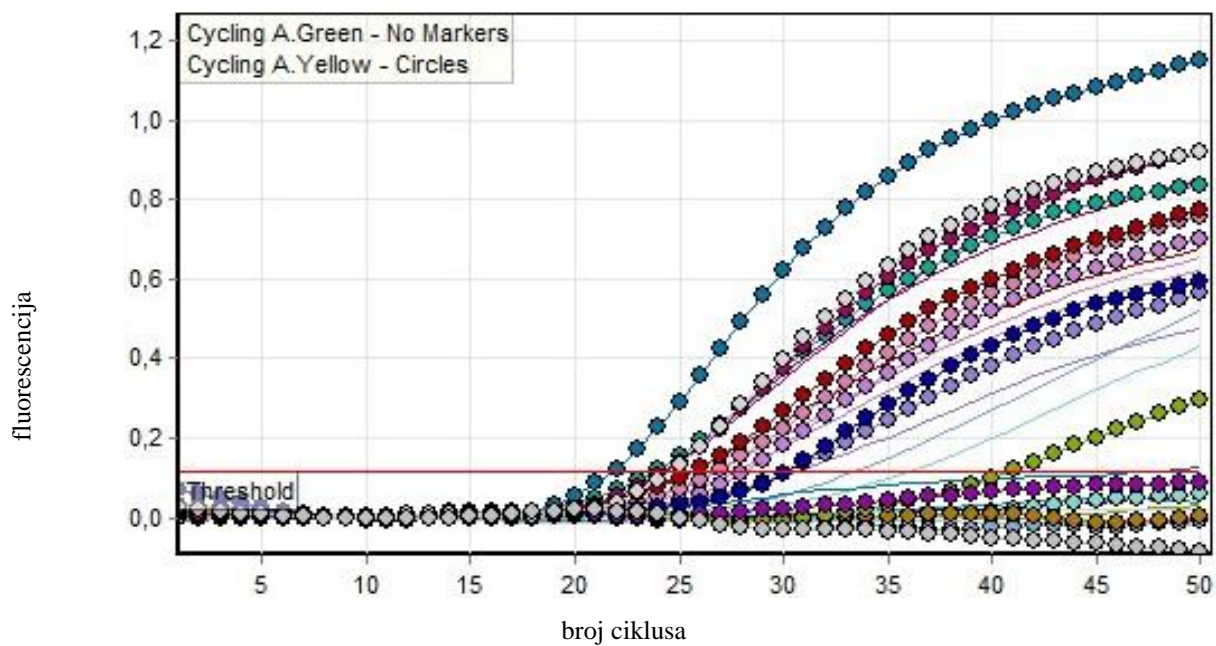
U svrhu ispitivanja usporedivosti za alel H63D ispitala sam po 10 uzoraka divljeg tipa, 10 uzoraka heterozigota i 5 uzoraka mutanta (Slika 12 i Slika 13). Uzorak 34 nije se umnožio niti na jednom kanalu tijekom provedbe PCR-a iako je prema genotipovima dobivenim s KBC Zagreb trebao biti mutant pa je PCR ponovljen. Rezultati nakon ponavljanja PCR-a su pokazali 100% podudaranje s uzorcima s KBC Zagreb (Slika 14, Tablica 10).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	1	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	2	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	3	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	4	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	5	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	6	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja

	8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	9	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	10	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	12	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	14	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	16	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	17	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	18	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	19	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	Mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

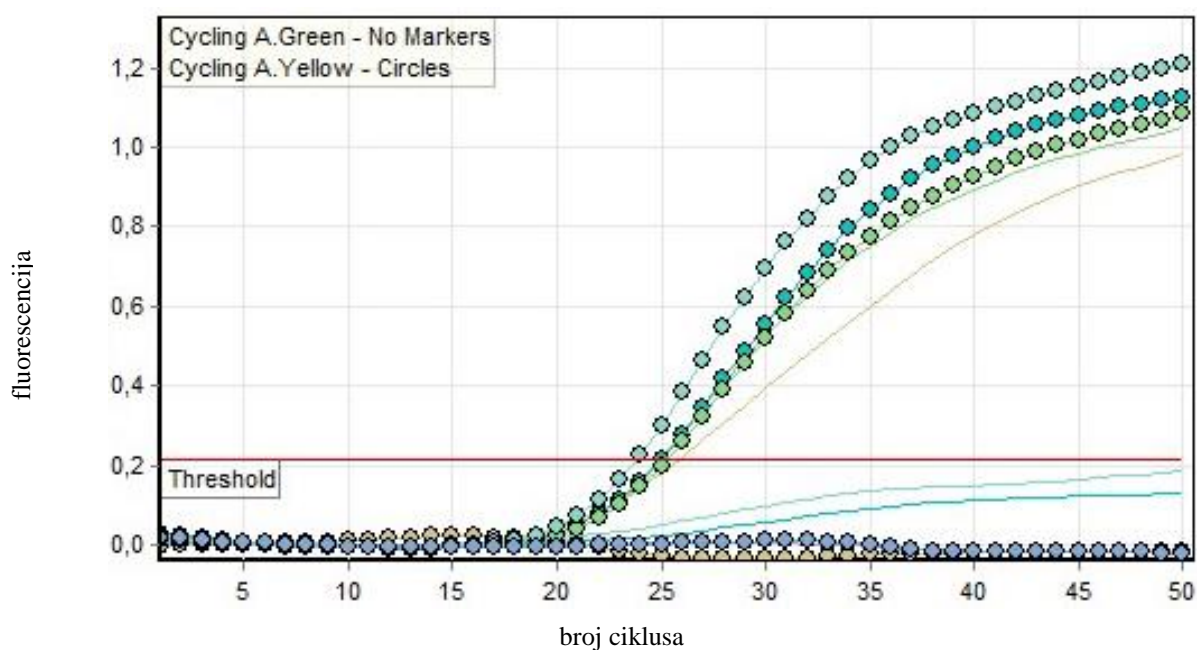
Slika 12. Rezultati PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel H63D dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 18 i 19, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	1	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	3	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	23	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	24	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	25	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	26	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	34	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	36	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	37	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	38	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	41	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja

	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 13. Rezultati PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel H63D dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 1, 3, 23, 24, 25, 26, 34, 36, 37, 38 i 41, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	34	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

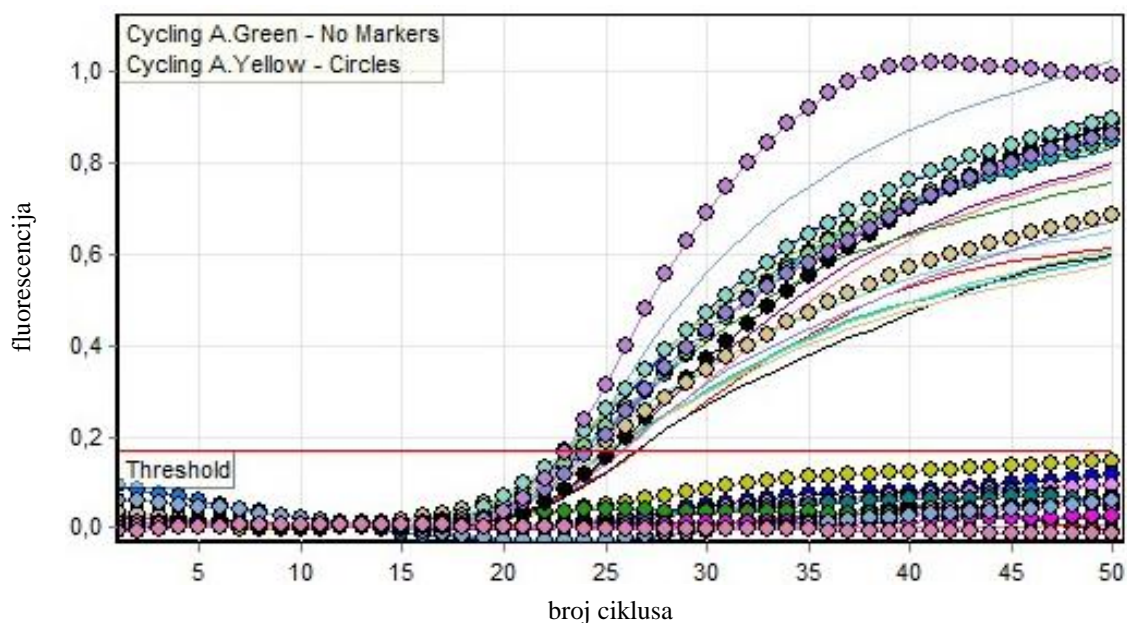
Slika 14. Rezultati ponovljene PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel H63D dobiveni u programu PCR-uredaja RotorGene™ Q za uzorak 34 te njihove pozitivne i negativnu kontrolu.









Tablica 10. Prikaz usporedbe genotipova uzoraka dobivenih s KBC Zagreb i rezultata dobivenih PCR-analizom prilikom ispitivanja usporedivosti za alel H63D na ZMLD, KB Sveti Duh.

<b>Uzorak (KBC Zagreb)</b>	<b>Rezultat (KBC Zagreb) H63D</b>	<b>Rezultat (ZMLD, KB Sveti Duh) H63D</b>
<b>1</b>	divlji tip	divlji tip
<b>2</b>	divlji tip	divlji tip
<b>3</b>	divlji tip	divlji tip
<b>4</b>	divlji tip	divlji tip
<b>5</b>	divlji tip	divlji tip
<b>6</b>	divlji tip	divlji tip
<b>7</b>	divlji tip	divlji tip
<b>8</b>	divlji tip	divlji tip
<b>9</b>	divlji tip	divlji tip
<b>10</b>	divlji tip	divlji tip
<b>12</b>	heterozigot	heterozigot
<b>14</b>	heterozigot	heterozigot
<b>16</b>	heterozigot	heterozigot
<b>17</b>	heterozigot	heterozigot
<b>18</b>	heterozigot	heterozigot
<b>19</b>	heterozigot	heterozigot
<b>23</b>	heterozigot	heterozigot
<b>24</b>	heterozigot	heterozigot
<b>25</b>	heterozigot	heterozigot
<b>26</b>	heterozigot	heterozigot
<b>34</b>	mutant	mutant
<b>36</b>	mutant	mutant
<b>37</b>	mutant	mutant

<b>38</b>	mutant	mutant
<b>41</b>	mutant	mutant

Usporedivost alela S65C sam ispitivala na 10 uzoraka divljeg tipa i 7 uzoraka heterozigota (Slika 15). Kod ove se analize uzorak 31 nije umnožio (Slika 16) te sam ponovila PCR. Ponovljeni PCR pokazao je rezultat koji odgovara genotipu dobivenom u KBC Zagreb (Slika 17) te je i ovdje dokazano 100% podudaranje ispitivanih uzoraka (Tablica 11).

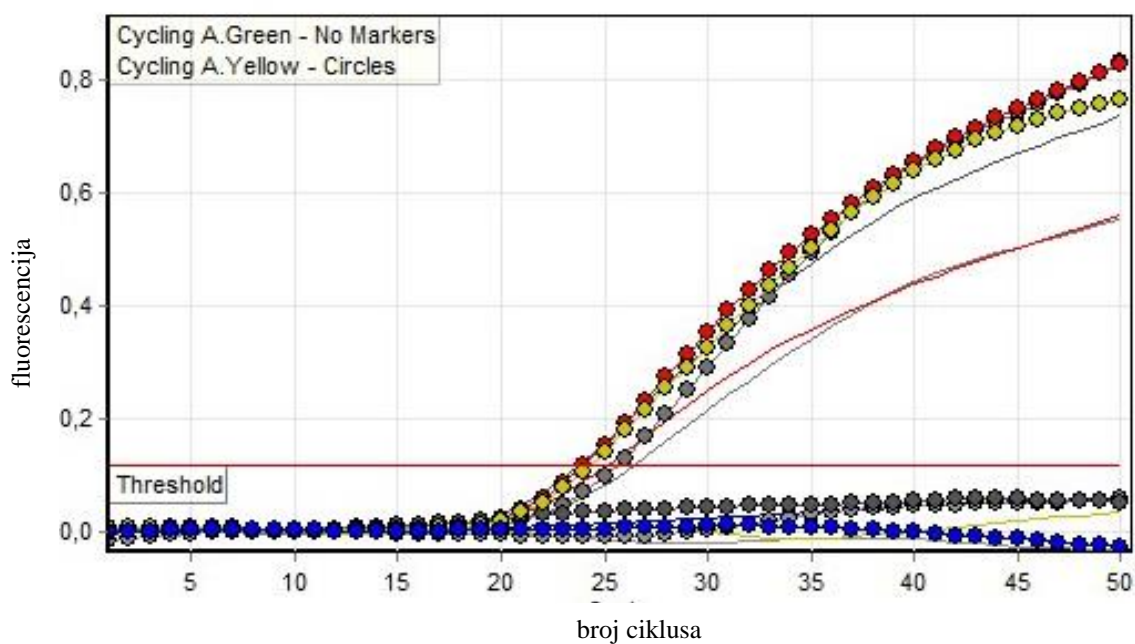


Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	1	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	2	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	3	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	4	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	5	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	6	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja



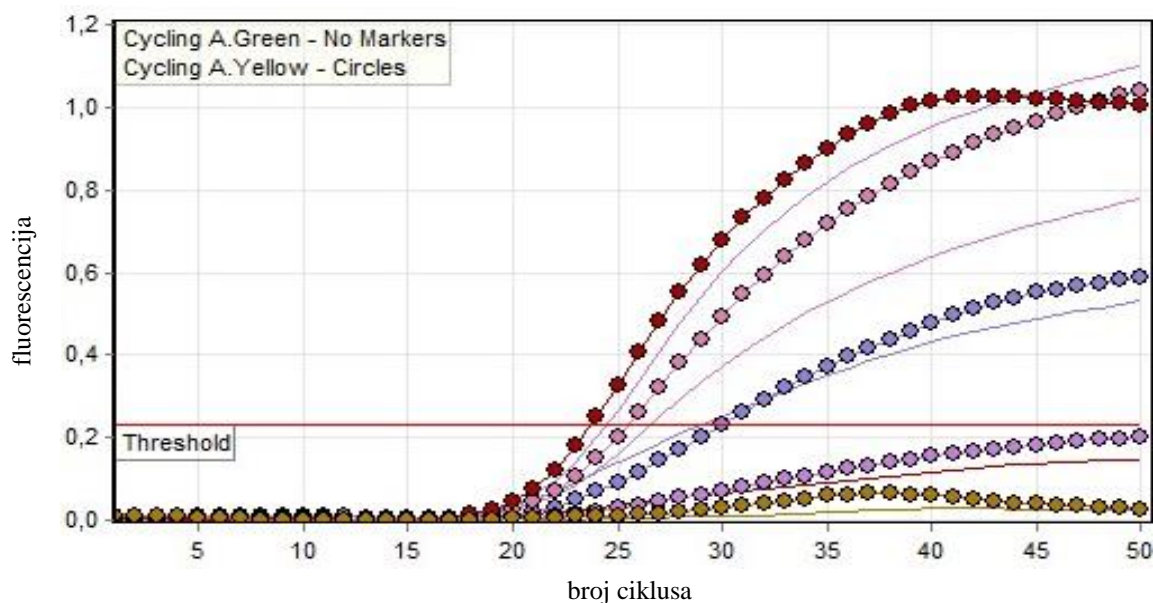
	9	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	10	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	13	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	20	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	22	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	27	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	30	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolne reakcije</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	Mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 15. Rezultati PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel S65C dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 20, 22, 27 i 30, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	31	-	bez umnažanja	bez umnažanja
	32	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolne reakcije</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	Mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 16. Rezultati PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel S65C dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 31 i 32, njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	31	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja

	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 17. Rezultati ponovljene PCR-analize ispitivanja usporedivosti za alel S65C dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorak 31, njegove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).

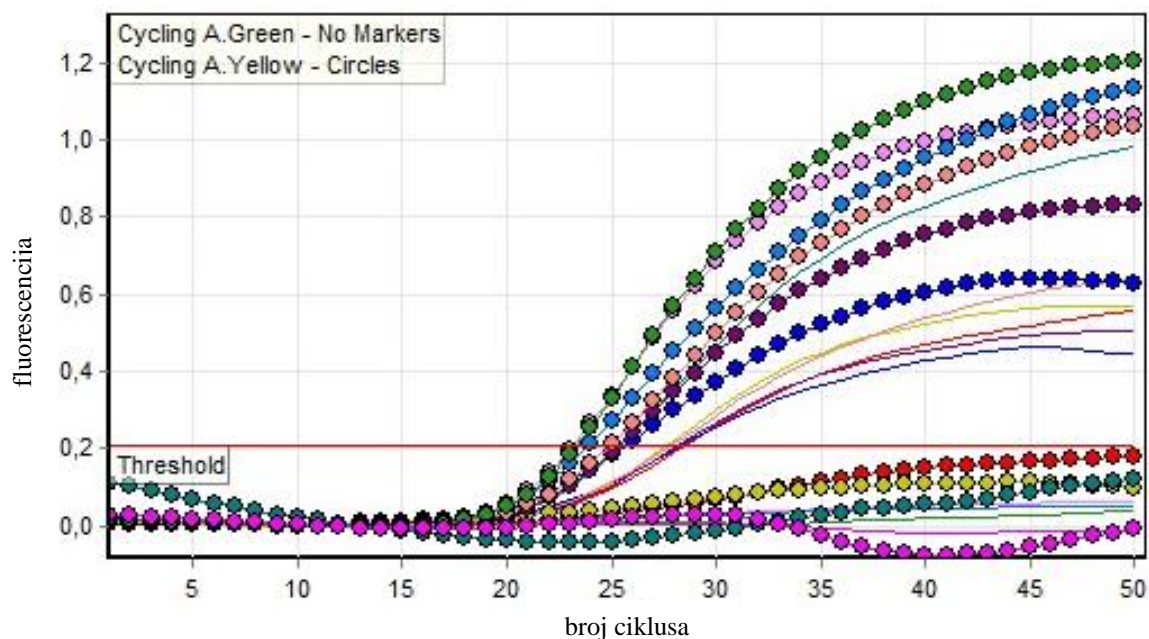
Tablica 11. Prikaz usporedbe genotipova uzoraka dobivenih s KBC Zagreb i rezultata dobivenih PCR-analizom prilikom ispitivanja usporedivosti za alel S65C na ZMLD, KB Sveti Duh.

<b>Uzorak (KBC Zagreb)</b>	<b>Rezultat (KBC Zagreb) S65C</b>	<b>Rezultat (ZMLD, KB Sveti Duh) S65C</b>
1	divlji tip	divlji tip
2	divlji tip	divlji tip
3	divlji tip	divlji tip
4	divlji tip	divlji tip
5	divlji tip	divlji tip
6	divlji tip	divlji tip
7	divlji tip	divlji tip
8	divlji tip	divlji tip
9	divlji tip	divlji tip
10	divlji tip	divlji tip
13	heterozigot	heterozigot
20	heterozigot	heterozigot
22	heterozigot	heterozigot
27	heterozigot	heterozigot
30	heterozigot	heterozigot
31	heterozigot	heterozigot
32	heterozigot	heterozigot

### 4.3. Preciznost

U sklopu ispitivanja preciznosti provedene su dvije uzastopne analize. Za svaki od alela je ispitan po jedan uzorak divljeg tipa, heterozigota i mutanta.

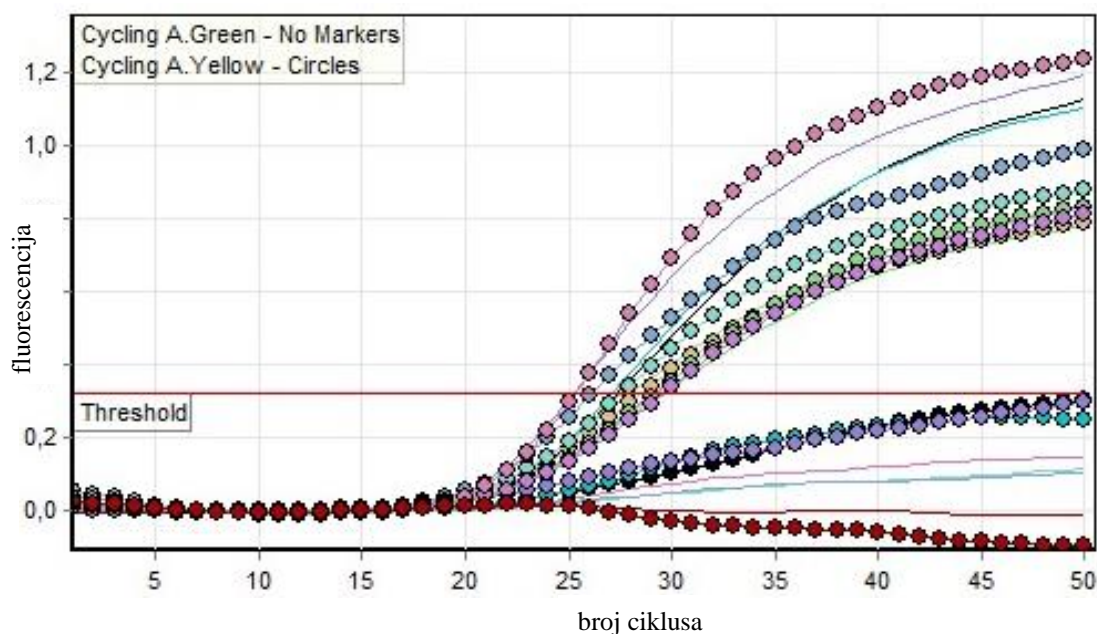
Za procjenu preciznosti za alel C282Y ispitivala sam uzorak 5 kao divlji tip, uzorak 25 kao heterozigot i uzorak 33 kao mutant (Slika 18). U istu svrhu, ali za alel H63D, sam ispitala i uzorak 4 divljeg tipa, uzorak 23 heterozigota i uzorak 38 (Slika 19) te za alel S65C uzorak 6 divljeg tipa i 13 heterozigota (Slika 20). PCR je bio uspješno proveden i dobiveni rezultati genotipova su se 100% podudarali međusobno i s referentnim uzorkom dobivenim s KBC Zagreb (Tablica 12).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
crvena	5	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
zeleno-žuta	5	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
plava	25	heterozigot	umnažanje	umnažanje
ljubičasta	25	heterozigot	umnažanje	umnažanje
ružičasta	33	mutant	bez umnažanja	umnažanje

	33	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

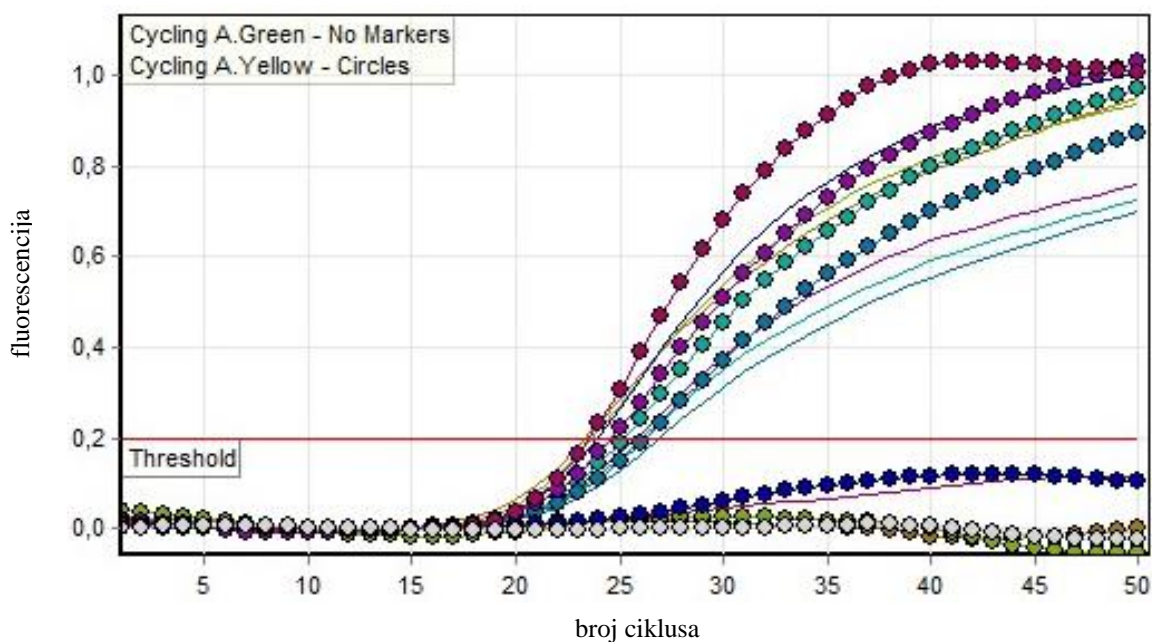
Slika 18. Rezultati PCR-analize ispitivanja preciznosti za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 5 (divlji tip), 25 (heterozigot) i 33 (mutant), njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	4	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	4	divlji ti	umnažanje	bez umnažanja
	23	heterozigot	umnažanje	umnažanje

	23	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	38	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	38	mutant	bez umnažanja	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 19. Rezultati PCR-analize ispitivanja preciznosti za alel H63D dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 4 (divlji tip), 23 (heterozigot) i 38 (mutant), njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	„Zeleni“ kanal	„Žuti“ kanal
	6	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja

	6	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	13	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	13	heterozigot	umnažanje	umnažanje
<b>Kontrolna reakcija</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 20. Rezultati PCR-analize ispitivanja preciznosti za alel S65C dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke 6 (divlji tip) i 13 (heterozigot), njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).

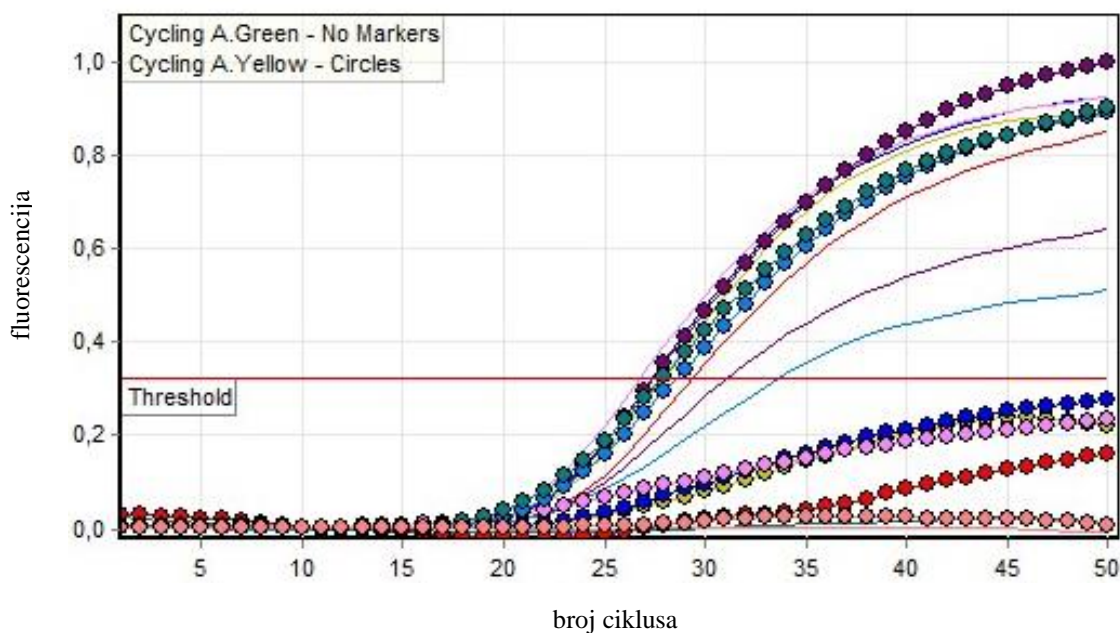
Tablica 12. Prikaz usporedbe genotipova uzoraka dobivenih s KBC Zagreb i rezultata dobivenih PCR-analizom prilikom ispitivanja preciznosti na ZMLD, KB Sveti Duh.

<b>Uzorak (KBC Zagreb)</b>	<b>Testirani alel</b>	<b>Rezultat (KBC Zagreb)</b>	<b>Rezultat (ZMLD, KB SvetiDuh)</b>
5	C282Y	divlji tip	divlji tip
5	C282Y	divlji tip	divlji tip
4	H63D	divlji tip	divlji tip
4	H63D	divlji tip	divlji tip
6	S65C	divlji tip	divlji tip
6	S65C	divlji tip	divlji tip
25	C282Y	heterozigot	heterozigot
25	C282Y	heterozigot	heterozigot
23	H63D	heterozigot	heterozigot
23	H63D	heterozigot	heterozigot
13	S65C	heterozigot	heterozigot

13	S65C	heterozigot	heterozigot
33	C282Y	mutant	mutant
33	C282Y	mutant	mutant
38	H63D	mutant	mutant
38	H63D	mutant	mutant

#### 4.4. Točnost

Prilikom ispitivanja točnosti analizirala sam po četiri uzorka vanjske kontrole kvalitete za svaki od alela. Za alel C282Y ispitivani su uzorci divljeg tipa C22/7, C22/8 i C23/7 te uzorak heterozigota C23/8 (Slika 21), za alel H63D uzorci divljeg tipa H22/7, H23/7 i H23/8 te uzorak heterozigota H22/8 (Slika 22) i za alel S65C sva četiri uzorka divljeg tipa S22/7, S22/8, S23/7, S23/8 (Slika 23). U sva tri PCR-a sam dobila genotipove koji odgovaraju genotipovima vanjske kontrole kvalitete, odnosno točnost je potvrđena 100% (Tablica 13).

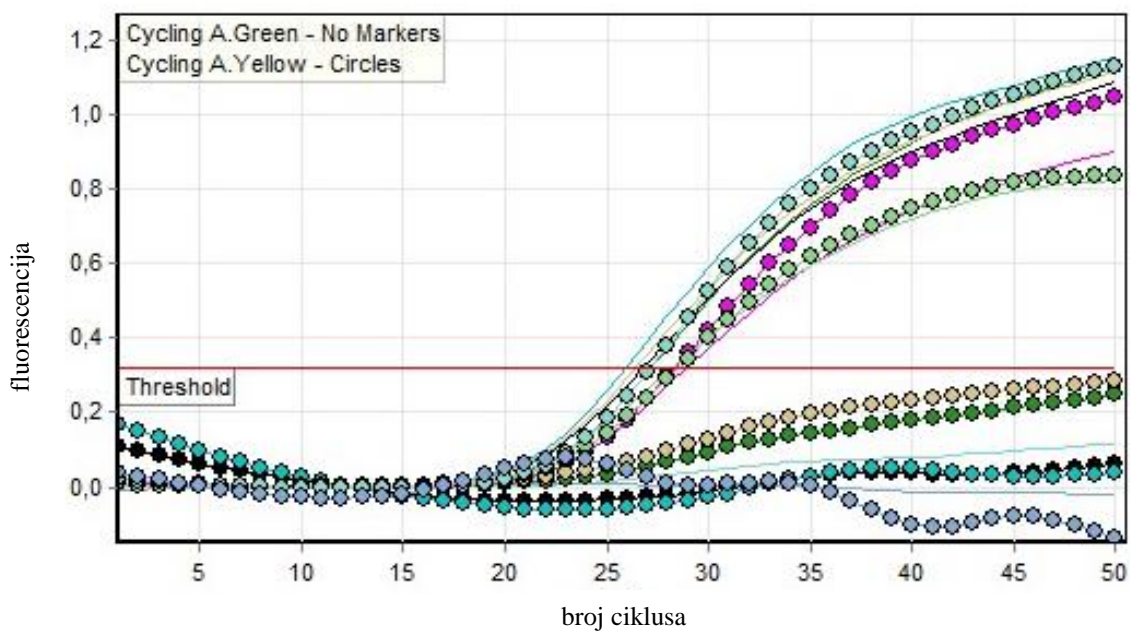


Boja	Uzorak	Genotip	Zeleni kanal	Žuti kanal
<span style="color: red;">■</span>	C22/7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<span style="color: gold;">■</span>	C22/8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<span style="color: blue;">■</span>	C23/7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja



	C23/8	heterozigot	umnažanje	Umnažanje
<b>Kontrolne reakcije za gen C282Y</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

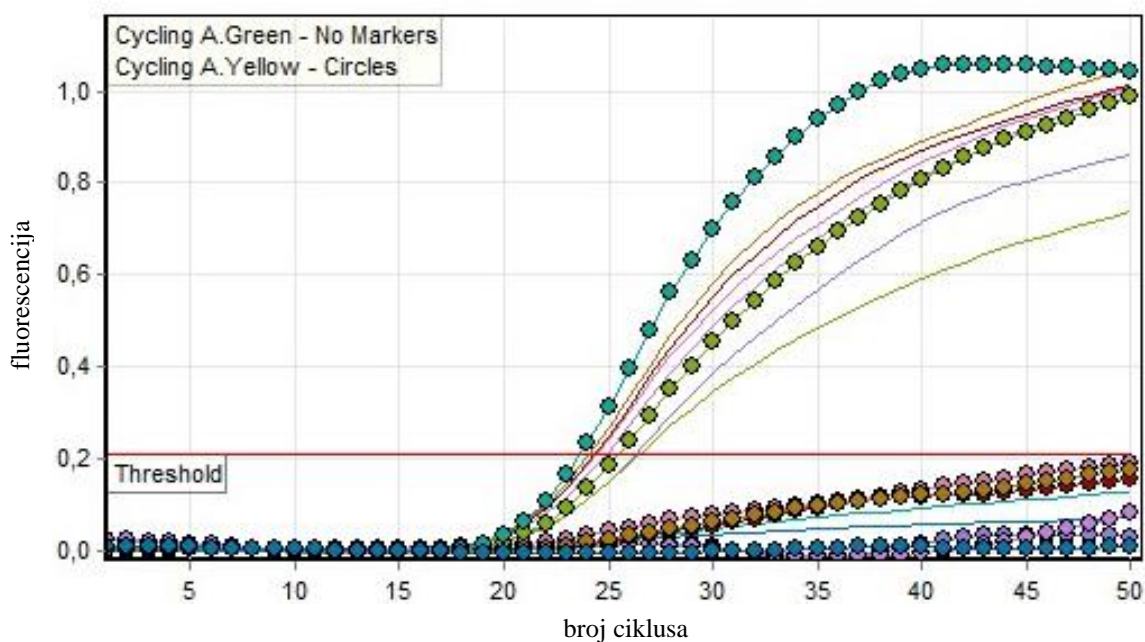
Slika 21. Rezultati PCR-analize ispitivanja točnosti za alel C282Y dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke C22/7, C22/8, C23/7 (divlji tip) i C23/8 (heterozigot), njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	Zeleni kanal	Žuti kanal
	H22/7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	H22/8	heterozigot	umnažanje	Umnažanje
	H23/7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	H23/8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja

<b>Kontrolne reakcije za gen H63D</b>				
	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 22. Rezultati PCR-analize ispitivanja točnosti za alel H63D dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke H22/7, H23/7, H23/8 (divlji tip) i H22/8 (heterozigot), njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).



Boja	Uzorak	Genotip	Zeleni kanal	Žuti kanal
	S22/7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	S22/8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	S23/7	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	S23/8	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
<b>Kontrole za gen S65C</b>				

	divlji tip	divlji tip	umnažanje	bez umnažanja
	heterozigot	heterozigot	umnažanje	umnažanje
	mutant	mutant	bez umnažanja	umnažanje
	PCR Water	-	bez umnažanja	bez umnažanja

Slika 23. Rezultati PCR-analize ispitivanja točnosti za alel S65C dobiveni u programu PCR-uređaja RotorGene™ Q za uzorke S22/7, S22/8, S23/7 i S23/8 (divlji tip), njihove pozitivne i negativnu kontrolu te pripadajuća legenda (ispod grafa).

Tablica 13. Prikaz usporedbe genotipova uzoraka dobivenih od organizatora vanjske kontrole kvalitete (VKK, RFB) i rezultata dobivenih PCR-analizom prilikom ispitivanja točnosti na ZMLD, KB Sveti Duh.

Uzorak (VKK, RFB)	Rezultat (VKK, RFB)			Rezultat (ZMLD, KB Sveti Duh)		
	C282Y	H63D	S65C	C282Y	H63D	S65C
MG1_2/22, uzorak 7, 22/7	divlji tip	divlji tip	divlji tip	divlji tip	divlji tip	divlji tip
MG1_2/22, uzorak 8, 22/8	divlji tip	heterozigot	divlji tip	divlji tip	heterozigot	divlji tip
MG1_1/23, uzorak 7, 23/7	divlji tip	divlji tip	divlji tip	divlji tip	divlji tip	divlji tip
MG1_/23, uzorak 8, 23/8	heterozigot	divlji tip	divlji tip	heterozigot	divlji tip	divlji tip

## 5. Rasprava

Svi su ispitivani uzorci pokazali 100%-tno podudaranje neovisno o alelu za koji su bili ispitivani. Međutim, dio uzoraka kod sva tri ispitivana alela nije dao amplifikacijsku krivulju te sam na njima ponovila PCR. Ponovljeni PCR je bio uspješan i ti uzorci su dali očekivane rezultate. S obzirom na to da tijekom prve PCR-analize nije došlo do umnažanja kontrola, najvjerojatnije objašnjenje je da je kit za provedbu PCR-analize bio nesipravan. Ovakvi su rezultati naposljetku dokazali preciznost ispitivane metode, odnosno potvrdili da laboratorij može provesti metodu i dobiti rezultate koji se podudaraju s rezultatima kontrolnih uzoraka (*CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*). Međutim, ponavljanje analize toliko puta nije idealno prilikom uvođenja nove metode u laboratorij. Verifikacijom se utvrđuje potpuna funkcionalnost i točnost metode koja će kasnije biti korištena kao dio laboratorijske obrade pacijenta te kao takva može imati velik utjecaj na određivanje dijagnoze, terapije, odnosno daljnji život pacijenta (Friedecky i sur. 2004). Iz tog razloga nije prikladno uvesti metodu čiji rezultati analize nisu kontinuirano zadovoljavajući, već fluktuiraju ovisno o industrijskom broju kompleta.

S obzirom na to da je prema *EASL Clinical Practice Guidelines on hemochromatosis* (2022) otprilike 80 % Europljana oboljelih od hemokromatoze homozigotno za alel C282Y, očekivano je da će najviše uzoraka dostupnih za analizu biti upravo za alel C282Y (sveukupno 26). Prema istoj smjernici očekivano je da će veći broj uzoraka testiranih za alel C282Y biti homozigotni mutanti te to potvrđuju Evangelista i sur. (2005) u svom eksperimentu provedenom na 26 pacijenata od kojih njih 13 (50 %), pokazuje homozigotni oblik C282Y. Najveći broj uzoraka je bio sakupljen za alel C282Y, ali udio homozigota u ovom eksperimentu iznosio je samo 23 % (6 od 26) dok su heterozigoti činili 38,5 % uzoraka. Za heterozigotni oblik alela H63D koji je prisutan u 21,1% oboljelih od hemokromatoze prema Lakshmanan i Epstein (2020) testiran je dva puta veći broj uzoraka (njih 10) u odnosu na homozigote (5 uzoraka). Prema istim autorima je veći broj dostupnih uzoraka za heterozigote u odnosu na homozigote očekivan s obzirom na to da je homozigotni oblik dosta rijedak te se javlja u samo 0,68% oboljelih. Mali broj uzoraka testiranih za alel S65C (ukupno 17 od čega je 10 divljih tipova) u skladu je s očekivanjima na temelju rada Holmstrom i sur. (2002) s obzirom na to da pojavnost heterozigotnoga oblika iznosi 4,9% u populaciji oboljelih od hemokromatoze. Cimburova i sur. (2005) navode kako dosad nije zabilježen homozigot za alel S65C.

Potpunim podudaranjem rezultata osam uzastopno ispitivanih uzoraka zadovoljen je parametar preciznosti. Zadovoljavanjem ovog parametra podrazumijeva se uniformnost izvođenja određene metode u laboratoriju. Ovakvo podudaranje rezultata je u potpunosti u skladu s *CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance* smjernicom.

Ispitivanje točnosti je također dalo rezultate koji su se 100 % podudarali s rezultatima vanjske kontrole kvalitete Reference Institute for Bioanalytics. Rezultati dobiveni u ovom dijelu eksperimenta potvrdili su usklađenost rezultata uzoraka testiranih u laboratoriju u koji se želi uvesti neka metoda s rezultatima dobivenim u drugom laboratoriju najčešće u ustanovama specijaliziranim za vanjsku kontrolu kvalitete prema *CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*.

## 6. Zaključak

Verifikacija metode za genotipizaciju smatra se uspješno provedenom prema *CLSI EP12-A2:2008 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance*. Međutim, zbog nesukladnih rezultata koji su doveli do ponavljanja analize na većem broju uzoraka (njih 10), metoda nije uvrštena na popis pretraga koje se provode na Zavodu za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku u KB Sveti Duh. Metoda se može ponovno verificirati promjenom proizvođača ili industrijskog broja kita za genotipizaciju.

## 7. Literatura

- Alvarez S., Mesab M. S., Bandres F., Arroyoa E. (2001): C282Y and H63D mutation frequencies in a population from central Spain. *Disease Markers* 17: 111–114.
- Anderson G. J., Frazer D. M. (2017): Current understanding of iron homeostasis. *American Journal of Clinical Nutrition* 106(6): 1559S-1566S.
- Andriopoulos B. Jr., Corradini E., Xia Y., Faasse S. A., Chen S., Grgurevic L., Knutson M. D., Pietrangelo A., Vukicevic S., Lin H. Y., Babitt J. L. (2009): BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genetics* 41(4): 482-487.
- Asberg A., Thorstensen K., Hveem K., Bjerve K.S. (2002): Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. *Genetic Testing* 2002, 6: 59-62.
- Barton J. C., Parker C. J. (2000): HFE-Related Hemochromatosis. Updated 2024. GeneReviews. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/> (pristupljeno 12.05.2024).
- Basrowi R. W., Zulfiqqar A., Sitorus N. L. (2024): Anemia in Breastfeeding Women and Its Impact on Offspring's Health in Indonesia: A Narrative Review. *Nutrients* 16(9): 1285.
- Beaumont C., Delaby C. (2009): Recycling Iron in Normal and Pathological States. *Seminars in Hematology* 46(4): 328-338.
- Cimburová M., Půtová I., Provazníková H., Pintérová D., Horák J. (2005): S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51(6):172-6.
- Cocciolillo S., Sebastiani G., Blostein M., Pantopoulos K. (2020): Hormonal Signaling in Biology and Medicine. U: Litwack G. (ur.) Chapter 18 - Liver Hormones. Academic Press, str. 425-444.
- Coffey R., Ganz T. (2017): Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. *Journal of Biological Chemistry* 292(31): 12727-12734.
- CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Collins J. F., Flores S. R. L., Wang X., Anderson G. J. (2018): Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition). U: Said H. M. (ur.) Chapter 60 - Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Transport. Academic Press, str. 1451-1483.

- Chambers K., Ashraf M. A., Sharma S. (2023): Physiology, Heparin. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538257/> (pristupljeno 06.05.2024.).
- Çuhadar S. (2013): Preanalytical variables and factors that interfere with the biochemical parameters: a review. *OA Biotechnology* 2(2):19.
- Daniłowicz-Szymanowicz L., Świątczak M., Sikorska K., Starzyński R.R., Raczak A., Lipiński P. (2021): Pathogenesis, Diagnosis, and Clinical Implications of Hereditary Hemochromatosis—The Cardiologist's Point of View. *Diagnostics* 11: 1279.
- EASL. Clinical practice guidelines on haemochromatosis. European Association for the Study of the Liver, 2022. *77(2)*: 479-502.
- Feder F. J., Tsuchihashi Z., Irrinki A., Parkkila S., Sly W. S., Schatzman R. C. (1997): The Hemochromatosis Founder Mutation in HLA-H Disrupts  $\beta$ 2-Microglobulin Interaction and Cell Surface Expression. *Journal of Biological Chemistry* 272(22): 14025-14028.
- Friedecky B., Sprongl L., Kratochvila J. (2004): Validation and verification of analytical methods in clinical laboratories. Recommendation of the Board of the Czech Society for Clinical Biochemistry.
- Ganz T. (2013): Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews*. 93(4): 1721-41.
- Gao J., Zhao N., Knutson M. D., Enns C. A. (2008): The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 283(31): 21462-8.
- Girelli D., Bozzini C., Roetto A., Alberti F., Daraio F., Colombari R., Olivieri O., Corrocher R., Camaschella C. (2002): Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. *Gastroenterology* 122(5): 1295-1302.
- Gomme P. T., McCann K. B., Bertolini J. (2005): Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today* 10(4):267-73.
- Goswami T., Andrews N. C. (2006): Hereditary Hemochromatosis Protein, HFE, Interaction with Transferrin Receptor 2 Suggests a Molecular Mechanism for Mammalian Iron Sensing. *Journal of Biological Chemistry* 281(39): 28494-28498.



- Hanson E. H., Imperatore G., Burke W. (2001): HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* 154(3): 193–206.
- Hawula Z. J., Wallace D. F., Subramaniam V. N., Rishi G. (2019) Therapeutic Advances in Regulating the Hepcidin/Ferroportin Axis. *Pharmaceuticals* 12(4): 170.
- Hernández G., Ferrer-Cortès X., Venturi V., Musri M., Pilquil M. F., Torres P. M. M., Rodríguez I. H., Mínguez M. À. R., Kelleher N. J., Pelucchi S., Piperno A., Alberca E. P., Ricós G. G., Giró E. C., Pérez-Montero S., Tornador C., Villà-Freixa J., Sánchez M. (2021): New Mutations in HFE2 and TFR2 Genes Causing Non HFE-Related Hereditary Hemochromatosis. *Genes* 12(12): 1980.
- Hilton C., Sabaratnam R., Drakesmith H., Karpe F. (2023): Iron, glucose and fat metabolism and obesity: an intertwined relationship. *International Journal of Obesity* 47(7): 554-563.
- Holmström P., Marmur J., Eggertsen G., Gåfvæls M., Stål P. (2002): Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut* 51(5): 723-30.
- Hrvatska komora medicinskih biokemičara (2013): Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Medicinska naklada, Zagreb.
- Hunter H. N., Fulton D. B., Ganz T., Vogel H. J. (2002): Structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *Protein structure and folding* 277(40): 37597-37603.
- Iqbai M. S., Tabassum A., Arbaeen A. F., Qasem A. H., Elshemi A. G., Almasmoum H. (2023): Preanalytical Errors in Hematology Laboratory: An Experience from a Tertiary Care Center. *Diagnostics* 13(4): 591.
- JCGM. International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM) – 3rd edition. JCGM document 200:2012. Joint Committee for Guides in Metrology (2008).
- Katsarou M. S., Papasavva M., Latsi R., Drakoulis N. (2019): Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. *Vitamines and Hormones* 110: 201-222.

- Kelley M., Joshi N., Xie Y., Borgaonkar M. (2014): Iron overload is rare in patients homozygous for the H63D mutation. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28(4): 198-202.
- Kelly A. L., Rhodes D. A., Roland J. M., Schofield P., Cox T. M. (1998): Hereditary juvenile haemochromatosis: a genetically heterogeneous life-threatening iron-storage disease. *QJM: An International Journal of Medicine* 91(9): 607–618.
- Kontoghiorghes C. N., Kontoghiorghes G. J. (2016): Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Design, Development and Therapy*. 10: 465–481.
- Kroot J. J. C., Tjalsma H., Fleming R. E., Swinkels D. W. (2011): Heparin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. *Clinical Chemistry* 57(12): 1650–1669.
- Lakshmanan S. i Epstein A. (2020): S3530 Homozygous H63D Mutation in Hereditary Hemochromatosis. *The American Journal of Gastroenterology*. 115:p S13.
- Lebrón J. A., Bennett M. J., Vaughn D. E., Chirino A. J., Snow P. M., Mintier G. A., Feder J. N., Bjorkman P. J. (1998): Crystal Structure of the Hemochromatosis Protein HFE and Characterization of Its Interaction with Transferrin Receptor. *Cell* 93(1): 111-123.
- Lescano M. A., Tavares L. C., Santos P. C. J. L. (2017): Juvenile hemochromatosis: HAMP mutation and severe iron overload treated with phlebotomies and deferasirox. *World Journal of Clinical Cases* 5(10): 381-383.
- Li H., Xia X., Tan X., Zang J., Wang Z., Ei-Seedi H. R., Du M. (2022): Advancements of nature nanocage protein: preparation, identification and multiple applications of ferritins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(25): 7117-7128.
- Li D., Li J., Zhang H., Zhao W., Zhao S., Li W. (2024): Hereditary hemochromatosis caused by a C282Y/H63D mutation in the HFE gene: A case report. *Heliyon*. 10(7).
- Lucena-Aguilar G., Sánchez-López A.M., Barberán-Aceituno C., Carrillo-Ávila J.A., López-Guerrero J.A., Aguilar-Quesada R. (2016): DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 14(4):264-70.

- MacKenzie E.L., Iwasaki K., Tsuji Y. (2008): Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 10(6): 997-1030.
- Majore S., Bonaccorsi di Patti M. C., Valiante M., Polticelli F., Cortese A., Di Bartolomeo S., De Bernardo C., De Muro M., Faienza F., Radio F. C., Grammatico P., Musci G. (2018): Characterization of three novel pathogenic SLC40A1 mutations and genotype/phenotype correlations in 7 Italian families with type 4 hereditary hemochromatosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1864 (2): 464-470.
- McDonnell S. M., Preston B. L., Jewell S. A., Barton J. C., Edwards C. Q., Adams P. C., Yip R. (1999): A survey of 2,851 patients with hemochromatosis:: Symptoms and response to treatment. *The American Journal of Medicine* 106(6): 619-624.
- Mladenka P., Hrdina R., Hübl M., Simůnek T. (2005): The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2005;48(3-4):127-35.
- Mobarra N., Shanaki M., Ehteram H., Nasiri H., Sahmani M., Saeidi M., Goudarzi M., Pourkarim H., Azad M. (2016): A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *International Journal of Hematology and Oncology* 10(4): 239-247.
- Mrzljak A., Pulanić D.: Hemokromatoze, 1. izdanje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022.
- Nasrullah H., Nasrullah A., Ijaz N., Hayat U. (2022): H63D Homozygous Mutation: An Unusual Cause of Deranged Liver Function Test in an Elderly Patient. *Cureus* 14(11).
- Pointon J. F., Wallace D., Merryweather-Clarke A. T., Robson K. J. H. (2004): Uncommon Mutations and Polymorphisms in the Hemochromatosis Gene. *Genetic Testing* 4(2).
- Poli M., Luscieti S., Gandini V., Maccarinelli F., Finazzi D., Silvestri L., Roetto A., Arosio P. (2010): Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* 95(11): 1832-40.
- Ponka P., Beaumont C., Richardson D. R. (1998): Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in Hematology* 35(1): 35-54.

- Porter J.L., Rawla P. (2023): Hemochromatosis. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430862> (pristupljeno 06.05.2024.)
- Sangkhae V., Nemeth E. (2017): Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Heparin. *Advances in Nutrition* 8(1): 126-136.
- Schmidt P.J., Toran P.T., Giannetti A.M., Bjorkman P.J., Andrews N.C. (2008): The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism* 7(3): 205-14.
- Shahbaaz M., Rahman S., Khan P., Kim J, Hassan I. (2017): Classification and structural analyses of mutational landscapes in hemochromatosis factor E protein: A protein defective in the hereditary hemochromatosis. *Gene Reports*. 6: 93-102.
- Sohal A., Kowdley K. V. (2024): A Review of New Concepts in Iron Overload. *Gastroenterology & Hepatology* 20(2):98-107.
- Sonagra A.M., Zubair M. (2023): Laboratory Evaluation of Hereditary Hemochromatosis. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK594250> (pristupljeno 08.05.2024.)
- Sukhbaatar N., Weichhart T. (2018): Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals* 14;11(4):137.
- Turshudzhyan A., Wu D. C., Wu G. Y. (2023): Primary Non-HFE Hemochromatosis: A Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 11(4): 925-931.
- Qamar W., Khan M.R., Arafah A. (2017): Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci*. 24(7):1465-1469.
- Zhao N., Zhang A-S., Enns C. A. (2013): Iron regulation by hepcidin. *Journal of Clinical Investigation* 123(6): 2337-2343.

## Životopis

Rođena sam 1998. godine u Zagrebu, a živjela sam i odrasla u Rudama gdje sam pohađala Osnovnu školu Rude. U Samoboru sam pohađala Gimnaziju Antuna Gustava Matoša, a fakultetsko sam obrazovanje započela 2017. godine upisavši Preddiplomski studij znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija sam sudjelovala u manifestaciji „Noć biologije“ kao dio Sekcije za mikrobiologiju. U istom sam periodu odrađivala laboratorijsku stručnu praksu pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen na Zavodu za molekularnu biologiju. U okviru laboratorijske stručne prakse s kolegama Vinković, Jaklinović i Kobelščak sam napisala rad “Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih omotačima na biljku duhana (*Nicotiana tabacum* L.)” koji je u akademskoj godini 2019./20. nagrađen Rektorovom nagradom. Rezultate spomenutog istraživanja sam dvaput predstavljala na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja, 2019. godine u okviru poster sekcije, a 2020. godine državši usmeno izlaganje. U akademskoj godini 2019./20. sam obnašala dužnost demonstratorice na kolegiju Stanična i molekularna biologija, a iduće akademske godine studentske pravobraniteljice. S obzirom na to da sam tijekom preddiplomskog studija otkrila interes za molekularnu biologiju, 2020. godine upisujem Diplomski studij molekularne biologije na istom fakultetu. Zbog želje da primjenim naučeno znanje u praksi s odmah vidljivim rezultatima, za izradu diplomskog rada odabirem Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KB Sveti Duh, a tijekom diplomskog studija djelujem kao suradnica u obrazovnom centru Učionica te obavljam funkciju laboranta u Laboratoriju za medicinski pomognutu oplodnju u Poliklinici Škvorc.