

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Nina S. Ilić

**DISTRIBUCIJA MUTACIJA U *F8* GENU  
KOD PACIJENATA IZ SRBIJE  
OBOLELIH OD HEMOFILIJE A**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Nina S. Ilić

**DISTRIBUTION OF *F8* GENE MUTATIONS  
IN SERBIAN HEMOPHILIA A PATIENTS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2014

MENTOR:

dr Marija Guć-Šćekić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Nasta Tanić, viši naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu-Institut za nuklearne nauke  
„Vinča”

dr Dobriła Veljković, naučni saradnik u penziji,  
Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Vukan  
Čupić”

dr Miloš Kuzmanović, docent,  
Univerzitet u Beogradu-Medicinski Fakultet

Dr Katarina Zeljić, docent,  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

DATUM ODBRANE:

DATUM PROMOCIJE:

Za izradu ovog rada najveću zahvalnost dugujem dr Mariji Guć-Šćekić, zbog uloženog truda, neiscrpne pozitivne energije, entuzijazma i svega što me je tokom proteklih 10 godina naučila.

Takođe se zahvaljujem: dr Nasti Tanić, na brilijantnom naučničkom duhu, korisnim sugestijama i radu koji je omogućio sprovođenje ovog istraživanja; Dr Milošu Kuzmanoviću na dugogodišnjoj uspešnoj saradnji iz koje je ova studija proizašla, kao i na važnim smernicama tokom pisanja rada; dr Dobrili Veljković na korisnim savetima i podršci; dr Katarini Zeljić na nesebičnom uloženom trudu tokom oblikovanja teze; Dr Valeriji Dobričić i Mileni Janković što su svojim istraživanjem omogućile da se rad upotpuni i Dr Marini Stamenković-Radak bez čijih uputstava svega ovoga ne bi ni bilo.

Neizmerno se zahvaljujem svim kolegama iz Laboratorije za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”, ova studija je rezultat zajedničkog truda, moje je bilo samo da je sročim. Koleginicama Dr Marijani Mišković i dr Sanji Ćirković posebno se zahvaljujem na podršci i prijateljstvu.

Svojim roditeljima, suprugu i sinu hvala na strpljenju, ljubavi ...i svemu što sam.

***Rad posvećujem :***

***..... osobama sa hemofilijom A, u nadi da će im pomoći.....***

## **Naslov: DISTRIBUCIJA MUTACIJA U *F8* GENU KOD PACIJENTA IZ SRBIJE OBOLELIH OD HEMOFILJE A**

### **Rezime**

**Uvod:** Hemofilija A (HA) je X-vezano recesivno oboljenje, koje spada u grupu koagulopatija. Nastaje kao posledica mutacija u *F8* genu (Xq28) i javlja se sa učestalošću od 1:5 000 muškaraca. U cilju određivanja distribucije mutacija kod obolelih od HA sa teritorije Srbije, u ovoj studiji sprovedene su analize za detekciju specifičnih mutacija: inverzije introna 1 (inv1) i introna 22 (inv22), kao i velikih delecija i duplikacija i tačkastih mutacija gena *F8*.

**Materijal i metode:** Istraživanje je sprovedeno na uzorku od 71 pacijenta, muškog pola, koji su upućeni sa dijagnozom HA u Laboratoriju za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Analize za detekciju inv22, delecija i duplikacija introna 22 i inv1, sprovedene su kod čitave grupe od 71 pacijenta primenom IS-PCRa. U cilju detekcije velikih delecija i duplikacija kodirajućeg regiona *F8* gena, korišćena je MLPA metoda, a obrađena je grupa od 20/71 pacijenata negativnih za inv22 i inv1. Presekvencioni skrining, sproveden SSCP metodom, obuhvatio je pacijente sa negativnim statusom u prethodnim testiranjima (46/71), a izdvojena su tri pacijenta kod kojih je sumnja na postojanje tačkaste mutacije proverena metodom sekvenciranja. Detekcija statusa nosilaca mutacija urađena je kod 46 članova porodica obolelih (15 majki, 23 sestre i 4 ćerke obolelih). Ove analize omogućile su davanje adekvatnog genetičkog saveta i prenatalnu dijagnostiku HA kod 6 trudnica u 9 trudnoća. Statistička analiza dobijenih rezultata sprovedena je metodom Hi kvadrat testa.

**Rezultati i diskusija:** Rezultati studije su pokazali učestalošću inv22 od 28,1% (20/71) (tip1 22,5 % (16/71), tip2 5,6% (4/71)) i inv1 od 4,2 % (3/71) dok delecije i duplikacije introna 22 nisu detektovane. Detektovane su velike delecije sa učestalošću od 15% (3/20); kod jednog pacijenta je uočeno postojanje delecije egzona 7, a kod dva delecija egzona 2-3. Prisustvo tačkastih mutacija, missense tipa (c.6532C>T) i delecije (c.1332\_1332delA) definisano je kod dva (2/71; 2,8%) pacijenta.

Raspodela učestalost detektovanih mutacija je dalje definisana u odnosu na kliničke karakteristike: klinički oblik bolesti i prisustvo inhibitora za FVIII. Utvrđena je učestalost inv22 kod pacijenata sa teškom HA od 39,1% (18/46) i kod pacijenata sa umerenom HA od 14,3% (2/14), dok kod pacijenata sa blagim oblikom ova mutacija nije detektovana. Na osnovu toga statističkom analizama dokazana je pozitivna korelacija prisustva inv22 i teškog kliničkog oblika bolesti. Prisustvo inv1 detektovano je isključivo kod pacijenata sa teškom HA (3/46; 6,5%), ali pozitivna genotip–fenotip korelacija nije utvrđena. Velike delecije uočene su kod pacijenata sa teškom (2/15; 13%) i umerenom HA (1/5; 25%), a statistička analiza takođe nije potvrdila pozitivnu genotip-fenotip korelaciju. Kod pacijenata sa prisustvom inhibitorom FVIII, detektovana je učestalost inv22 od 37,5% (3/8), dok je kod 12,5% (1/8) pacijenata utvrđeno prisustvo velike delecije. Sprovedena statistička analiza korelacije inv22 genotipa i fenotipa sa inhibitorom FVIII kod obolelih od teške HA, dala je negativne rezultate. Detekcija statusa nosilaca mutacija urađena je kod 46 članova porodica obolelih (15 majki, 23 sestre i 4 ćerke obolelih). Ove analize omogućile su davanje adekvatnog genetičkog saveta i prenatalnu dijagnostiku HA kod 6 trudnica u 9 trudnoća. Kod 3/9 fetusa, kod kojih je analizama najpre definisan muški pol, utvrđeno je i prisustvo inv22. Kao poseban slučaj u ovoj studiji, predstavljeni su rezultati analiza sprovedenih kod jedne ženske osobe obolele od HA. Molekularnim testovima pacijentu je definisano heterozigotno prisustvo delecije introna 22 tip 2 i delecije egzona 1-22, dok je citogenetičkim i molekularno–citogenetičkim analizama (FISH) uočen mozaični kariotip:

a) citogenetička analiza: mos 47,XX,+mar(2)/47,XXX(2)/46,XX(47);

b) FISH analiza:

mos nuc ish(DXZ1x1)(15/162)/(DXZ1x3)(12/162)/(DXZ1x2)(135//162);

mos ish (DXZ1x4)(1/28)/(DXZ1x3)(2/28)/ (DXZ1x1)(5/28)/ (DXZ1x2)(20/28).

Dobijeni rezultati diskutovani su u odnosu na dostupnu literaturu..

**Zaključak:** Rezultati ove studije predstavljaju prve do sada objavljene podatke o molekularnoj osnovi kod obolelih od HA sa teritorije Srbije i utvrđeno je da odgovaraju rezultatima do sada objavljenih studija.

Pored toga, primenjene metode i strategija testiranja ovim istraživanjem su uvrštene u standardnu dijagnostičku proceduru čime je znatno poboljšana tretman obolelih sa ovih prostora.

**Ključne reči:** hemofilija A, inv22, inv1, velike delecije, tačkaste mutacije, IS-PCR, MLPA, učestalost, Srbija.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Medicinska genetika

**UDK:** 571.1:616-008.815] (497.11) (043.3)

## Title: **DISTRIBUTION OF *F8* GENE MUTATIONS IN SERBIAN HEMOPHILIA A PATIENTS**

### Abstract

**Introduction:** Hemophilia A (HA) is a common X-linked recessive bleeding disorder, with incidence of 1 in 5 000 male and caused by mutations of *F8* gene (Xq28). In order to detect the distribution of *F8* mutations in Serbian HA population, the analyses for detection of recurrent inversions of intron 1 (inv1) and intron 22 (inv22) of *F8*, large deletions and duplications and point mutations, were performed in this study.

**Material and methods:** The investigation considered the cohort of 71 male patients, whose blood samples were collected at the Laboratory for Medical Genetics, Mother and Child Health Care Institute of Serbia "Dr Vukan Cupic" (IMD) with HA diagnosis. Detection of the inv 22, inv1 and duplications and the deletions of intron 22, were performed using IS-PCR for entire group of HA patients. The group of 20 patients, with negative inv22 and inv1 status, were analysed for the presence of large deletions and duplications of coding region of *F8* gene, using MLPA. Next step was the pre-sequencing screening for point mutations, using SSCP, for 46 patients with previous negative mutation status. Carrier status testing were obtained for 46 relatives (15 mothers, 23 sisters and 4 daughters) and allowed adequate genetic counseling and prenatal diagnosis in 9 pregnancies. Statistical analyses were performed using chi-squared test.

**Results and discussion:** The results showed the inv22 frequency of 28,1% (20/71) (type1 22,5 % (16/71) and type 2 5,6% (4/71)) and inv1 frequency of 4,2 % (3/71). No deletions or duplications were detected. The large deletions were detected in 15% (3/20) of patients; one patient with deletion of exon 7 and two patients with deletion of exon 2-3. The sequencing analyses in 3/46 of them showed one missense mutation ((c.6532C>T) and one deletion (c.1332\_1332delA).

The distribution of the detected mutation was matched with clinical characteristics: severity of the disease and presence of FVIII inhibitor. Analysis for clinical severity of the disease, showed the occurrence of inv22 in 39,1% (18/46) patients with severe and



14,3 % (2/14) patientes with moderate HA. Inv22 genotype was not found in patientes with mild HA. Statistic analyses verified the positive correlation between inv22 genotype and severe HA phenotype. Whole group of patients with inv1 genotype had the severe HA (3/46; 6,5%), but genotype-phenotype correlation wasn't shown as positive. Large deletions were found in 2/15 (13%) severe and 1/5 (25%) moderate HA patientes, but positive genotype-phenotype correlation also did not achieved. In a group of patients with FVIII inhibitor the genotype with inv22 and large deletions were detected with the frequencies of 37,5% (3/8) and 12,5% (1/8). Statistic analysis of correlation between inv22 genotype and phenotype with FVIII in severe HA patientes was not verified as positive.

Carrier status testing were obtained for 46 relatives (15 mothers, 23 sisters and 4 daughters) and allowed adequate genetic counseling and prenatal diagnostic in 9 pregnancies. Prenatal analyses showed the presence of mild foetuses in 3/9 cases and all of them had the inv22 genotype.

In addition, in this study we presented the case report of one female HA patient. Molecular analyses revealed that the woman was a carrier of the deletion of intron 22 type 2 and deletion of exon 1-22. Cytogenetic and molecular-cytogenetic analyses also showed the presence of mosaic karyotype:

- a) mos 47, XX,+ mar [2] / 47, XXX [2]/ 46, XX [47];
- b) mos nuc ish (DXZ1x1)(15/162)/(DXZ1x3)(12/162)/ (DXZ1x2)(135//162); mos ish (DXZ1x4)(1/28)/(DXZ1x3)(2/28)/ (DXZ1x1)(5/28)/ (DXZ1x2)(20/28).

Presented results were discussed according to present literature data.

**Conclusion:** The results of this study are the first published data of molecular basis of HA in Serbian population and we concluded that they are in line with similar literature data from the other populations.

The great advantage of this study is also the fact that presented methods and strategy of testing after this investigation, become a routine diagnostic program for Serbian HA patients.

**Key words:** hemophilia A, inv22, inv1, large deletions, point mutations, IS-PCR, MLPA, frequency, Serbia.

**Scientific field: Biology**

**Narrower scientific field: Medical genetics**

**UDC: 571.1:616-008.815] (497.11) (043.3)**

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Genom i genetička varijabilnost</b>	<b>2</b>
1.1.1. Mutacije	3
1.1.1.1. Hromozomske aberacije	3
1.1.1.2. Genske mutacije	4
<b>1.2. Monogenska oboljenja</b>	<b>6</b>
1.2.1. Tipovi nasleđivanja monogeniskih oboljenja	6
<b>1.2. Hemofilija A</b>	<b>8</b>
1.2.1. Kliničke karakteristike HA	9
1.2.1.1. Klinička slika HA	9
1.2.1.2. Laboratorijski parametri (algoritam dijagnostičkih postupaka)	9
1.2.2. Genetička osnova HA	11
1.2.2.1. Učestalost i način nasleđivanja	11
1.2.2.2. Struktura i funkcija <i>F8</i> gena	13
1.2.2.2.1 Struktura gena	13
1.2.2.2.2. Funkcija gena	14
1.2.2.3. Struktura i funkcija faktora koagulacije VIII	15
1.2.2.3.1. Struktura FVIII	15
1.2.2.3.2. Funkcija FVIII	17
1.2.2.4. Genetičke promene kao uzrok nastanka HA	18
1.2.2.4.1. Mutacije <i>F8</i> gena	18
1.2.2.4.1.1. Inverzija introna 22	18
1.2.2.4.1.2. Inverzija introna 1	20
1.2.2.4.1.3. Delecije	21
1.2.2.4.1.4. Insercije	23
1.2.2.4.1.5. Duplikacije	23
1.2.2.4.1.6. Zamena pojedinačnih baza	24
1.2.2.4.2. Promene izvan okvira <i>F8</i> gena koje su uzrok HA	25
1.2.3. Detekcija mutacija u <i>F8</i> genu	25
1.2.3.1. Metode za detekciju inv 22 i inv1	26
1.2.3.1.1. Southern Blot analiza	26
1.2.3.1.2. Long distance-PCR	27
1.2.3.1.3. Inverse shifting-PCR	28
1.2.3.2. Detekcija velikih delecija i duplikacija	30
1.2.3.2.1. Multipleks ligaciono zavisna amplifikacija proba za detekciju velikih delecija i duplikacija	30
1.2.3.4. Detekcija malih i tačkastih mutacija	32
1.2.3.4.1. Metode za presekvencionu analizu <i>F8</i> gena	33
1.2.3.4.2. Sekvenciranje	34
1.2.3.5. Indirektne metode za praćenje X hromozoma	35
1.2.3.6. Prenatalna dijagnostika	35

1.2.4. Terapijski pristup u lečenju obolelih od HA .....	36
1.2.4.1. Razvoj inhibitora na FVIII .....	36
<b>2. CILJ RADA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Pacijenti .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>43</b>
3.2.1. Izolacija DNK.....	43
3.2.1.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi.....	43
3.2.1.2. Izolacija DNK iz horionskih resica/kulture amnijskih ćelija.....	44
3.2.2. Detekcija inv1 i inv 22 gena <i>F8</i> .....	45
3.2.2.1. IS-PCR protokol .....	45
3.2.2.2. Analiza produkata IS-PCR reakcije .....	48
3.2.3. Detekcija delecija i duplikacija u genu <i>F8</i> .....	51
3.2.3.1. Detekcija velikih delecija i duplikacija u kodirajućem regionu gena <i>F8</i> .....	52
3.2.3.1.1. Struktura SALSA MLPA kita P178-B2 <i>F8</i> .....	52
3.2.3.1.2. MLPA protokol .....	54
3.2.3.1.3. Razdvajanje produkata kapilarnom elektroforezom.....	55
3.2.3.1.4. Obrada podataka .....	56
3.2.4. Presekvencioni skrining.....	57
3.2.4.1. PCR reakcija za amplifikaciju egzona <i>F8</i> gena.....	57
3.2.4.2. SSCP metoda.....	59
3.2.5. Sekvenciranje.....	61
3.2.5.1. Priprema uzoraka za reakciju sekvenciranja .....	61
3.2.5.2. Reakcija sekvenciranja .....	61
3.2.5.3. Prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja etanol/Na-acetat precipitacijom.....	62
3.2.5.4. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja .....	63
3.2.5.5. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem.....	63
3.2.6. PCR reakcija za detekciju pola .....	64
3.2.7. Citogenetička i molekularno – citogenetička (FISH) analiza limfocita periferne krvi .....	66
3.2.7.1. Kultivisanje limfocita periferne krvi .....	66
3.2.7.2. Preparacija hromozoma iz kulture limfocita periferne krvi .....	66
3.2.7.3. Tehnika G traka .....	67
3.2.7.4. Citogenetička analiza kariotipa.....	67
3.2.7.5. Molekularno-citogenetička analiza FISH metodom.....	68
3.2.8. Statistička analiza.....	68
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Određivanje distribucije mutacija u <i>F8</i> genu kod obolelih od HA .....</b>	<b>71</b>
4.1.1. Detekcija i učestalost inv22 u <i>F8</i> genu.....	71

4.1.2. Detekcija i učestalost inv1 u <i>F8</i> genu.....	73
4.1.3. Uporedna analiza prisustva inv22 i inv1 u <i>F8</i> genu .....	75
4.1.4. Detekcija i učestalost velikih delecija i duplikacija u <i>F8</i> genu.....	76
4.1.6. Sekvenciranje.....	82
4.1.7. Učestalost mutacija u <i>F8</i> genu u ispitivanom uzorku HA pacijenata iz Srbije.....	85
<b>4.2. Distribucije mutacija u odnosu na klinički oblik HA.....</b>	<b>86</b>
4.2.1. Analiza učestalosti inv22 mutacija u odnosu na klinički oblik bolesti .....	86
4.2.2. Analiza učestalosti inv1 u odnosu na klinički oblik bolesti .....	88
4.2.3. Analiza učestalosti velikih delecija u odnosu na klinički oblik bolesti.....	89
<b>4.3. Analiza korelacije detektovanih genotipova i prisustva inhibitora FVIII .....</b>	<b>91</b>
4.3.1. Distribucija mutacija kod pacijenata sa inhibitorom FVIII.....	92
4.3.1. Analiza korelacije između genotipa sa inv22 i prisustva inhibitora FVIII kod pacijenta sa teškim oblikom HA.....	92
<b>4.4. Analiza članova porodica obolelih od HA.....</b>	<b>94</b>
<b>4.4.1. Analiza statusa nosilaca mutacije .....</b>	<b>94</b>
4.4.2. Prenatalna dijagnostika.....	100
4.4.3. Prikaz slučaja ženske osobe obolele od HA.....	102
4.4.3.1. Prikaz pacijenta.....	102
4.4.3.2. Rezultati molekularnih analiza .....	103
4.4.3.3. Rezultati citogenetičke analize i fluorescentne hibridizacije <i>in situ</i> (FISH) .....	105
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>110</b>
<b>5.1. Određivanje distribucije mutacija u <i>F8</i> genu kod obolelih od HA u Srbiji.....</b>	<b>111</b>
5.1.1 Detekcija i učestalost inv 22 u <i>F8</i> genu.....	111
5.1.2. Detekcija i učestalost inv1 u <i>F8</i> genu.....	114
5.1.3. Uporedna analiza prisustva inv22 i inv1 u <i>F8</i> genu .....	116
5.1.4. Detekcija i učestalost velikih delecija i duplikacija u <i>F8</i> genu.....	116
5.1.5 Presekvencioni skrining <i>F8</i> gena .....	120
5.1.6 Sekvenciranje.....	123
5.1.7. Sumirani rezultati otkrivenih mutacija u <i>F8</i> genu kod HA pacijenata sa teritorije Srbije .....	124
<b>5.2. Distribucija mutacija u odnosu na klinički oblik HA.....</b>	<b>125</b>
5.2.1. Analiza učestalosti inv22.....	126
5.2.2. Analiza učestalosti inv1.....	130
5.2.3. Analiza učestalosti velikih delecija .....	132
<b>5.3. Distribucija mutacija u odnosu na prisustvo inhibitora FVIII .....</b>	<b>134</b>

5.3.1. Distribucija mutacija kod pacijenta sa inhibitorom FVIII.....	134
5.3.2. Analiza korelacije između genotipa sa inv 22 i prisustva inhibitora FVIII kod pacijenta sa teškim oblikom HA.....	135
<b>5.4. Analiza statusa nosilaca mutacije .....</b>	<b>137</b>
<b>5.5. Prenatalna dijagnostika .....</b>	<b>140</b>
<b>5.6. Prikaz slučaja ženske osobe obolele od HA .....</b>	<b>142</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>146</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>150</b>
<i>Изјава о ауторству.....</i>	<i>164</i>
<i>Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....</i>	<i>165</i>
<i>Изјава о коришћењу.....</i>	<i>166</i>

## **1.UVOD**

## 1.1. Genom i genetička varijabilnost

Prva saznanja o strukturi i funkciji naslednog materijala objavljena su krajem XIX i početkom XX veka. Proučavajući ćelijsku deobu, nemački citolog Flemming je 1882. godine, po prvi put u jedru uočio stuktore koje je anatom Waldeyera, šest godina kasnije, nazvao hromozomima (Neitzel i sar., 2007). Daljim razvojem genetike zaključeno je da osnovu građe hromozoma čini molekul dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), čiju su helikoidnu strukturu otkrili i opisali 1953. godine Watson i Crick (Watson i sar., 1953). Molekul DNK sadrži informaciju koja preko procesa transkripcije (sinteze ribonukleinske kiseline-RNK) i translacije (sinteze protein) određuje sve ostale procese koji karakterišu jedan organizam i čine ga funkcionalnim.

Ukupan nasledni materijal ljudske ćelije definiše se kao genom čoveka, a Tio i Levan su 1956.godine zaključili da je u jedru svake ćelije upakovan u 46 hromozoma, tj. 23 para autozoma (1-22) i polne hromozome X i Y (Tio i sar, 1956). Regioni hromozoma slabije kondenzacije, koji uglavnom direktno učestvuju u procesu transkripcije, označeni su kao euhromatinski, dok se kondenzovaniji delovi nazivaju heterohromatinskim, nemaju mogućnost transkripcije i učestvuju u kontrolnim procesima. Utvrđeno je da se u okviru hromozoma nalazi oko 20 000- 25000 gena, struktura koje su definisane kao jedinice genetičke informacije (OMIM) Geni u svom sastavu sadrže kodirajuće delove koji nakon prepisivanja u informacionu RNK (iRNK) učestvuju u procesu translacije i označeni su kao egzoni. Pored egzona u okviru gena nalaze se i introni, nekodirajuće sekvence koje se nakon transkripcije isecaju, nisu prisutne u zrelih iRNK u citoplazmi i ne prepisuju se u proteine. Nakon dugogodišnjih istraživanja, februara 2001. godine u dva vodeća naučna časopisa „Science” i „Nature”, objavljeni su prvi rezultati projekta dešifrovanja humanog genoma (Engl. Human Genom Project). Kao rezultat najobimnije do sada urađene studije iz oblasti genetike, pod rukovodstvom Craig Ventera i Francis Collinsa, definisana je sekvenca gotovo 95% euhromatinskog materijala Homo sapiensa (2,91 Gbp) (Engl. International Human Genome Sequencing Consortium - IHGSC, 2001; Vanter i sar., 2001).



U okviru ljudske vrste, pojedinačni genomi pokazuju sličnost od 99,9%, a preostali deo obezbeđuje neophodnu različitost. Različitost genoma svake jedinke, tj. genetička varijabilnost, rezultat je dva osnovna procesa:

1. procesa rekombinacije;
2. procesa pojave mutacija.

Rekombinacija je proces koji se dešava prirodno, u toku ćelijske deobe, kada se putem razmene genetičkog materijala između nesestrinskih hromatida homologih hromozoma („krosing-overa“), stvaraju nove kombinacije već postojećih genskih oblika, tj. alela.

Nasledne promene genetičkog materijala, koje nisu posledica rekombinacije nazivaju se mutacijama. One mogu biti indukovane različitim spoljašnjim faktorima (zračenje, hemijski agensi, biološke strukture) ili mogu nastati spontano, a posledica su grešaka u procesu rekombinacije, replikacije i/ili reparacije molekula DNK. Ukoliko se dese u somatskim ćelijama nisu nasledne, dovode do pojave mozaicizma u datom organizmu i označene su kao somatske, dok se one nastale u gametima nazivaju germinativnim i prenose se na sledeću generaciju (Tom i sar., 2010).

### **1.1.1. Mutacije**

Mutacije se mogu dogoditi na hromozomima kao posledica hromozomskih aberacija ili u pojedinačnim genima kao rezultat promene u redosledu i sastavu nukleotida.

#### **1.1.1.1. Hromozomske aberacije**

Hromozomske aberacije mogu da dovedu do promene u broju hromozoma kada se nazivaju numeričkim, ili u strukturi hromozoma kada se zovu strukturnim aberacijama.

Numeričke aberacije se, prema tome da li zahvataju promene u broju celih haploidnih setova ili pojedinačnih hromozoma, dele na poliploidije ili aneuploidije.

Strukturne hromozomske aberacije nastaju kao posledica:

1. delecija-gubitka pojedinih delova hromozoma;
2. duplikacija-udvajanja pojedinih regiona hromozoma;
3. translokacija-razmene delova nehomologih hromozoma i
4. inverzija-invertovanja određenih delova hromozoma za 180 step (Bryant, 2007).

### 1.1.1.2. Genske mutacije

Genske mutacije obuhvataju manji broj nukleotida i predstavljaju promene u molekularnoj strukturi pojedinačnih gena, a prema mehanizmu nastanka se dele na :

1. supstitucije - zamena jedne baze drugom;
2. insercije - umetanje baza;
3. delecije - gubitak baza i
4. duplikacije - udvajanje baza.

Pošto su ograničene na promenu pojedinačne baze, supstitucije se još nazivaju i tačkastim (Eng. point ) mutacijama. Promene jedne purinske baze u drugu ( $A \leftrightarrow G$ ), ili zamene u okviru pirimidinskih baza ( $C \leftrightarrow T$ ) označene su kao tranzicije, dok transverzije predstavljaju zamene purinskih baza pirimidinskim i obrnuto ( $A \leftrightarrow T$ ,  $A \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ). U odnosu na efekat koji tačkaste mutacije imaju na funkciju gena razlikujemo:

- a) missense (Engl. missense - promena smisla) mutacije - izmenjeni kodon dovodi do ugradnje druge aminokiseline u protein što drastično menja njegovu funkciju;
- b) nonsense (Engl. nonsense - besmisleno) mutacije- promena transformiše kodon u stop kodon što na tom mestu stopira sintezu proteina;
- c) silent (Engl. silent - tiho) mutacije - promena u kodonu ne dovodi do promene aminokiseline koja se ugrađuje ili dovodi do ugradnje slične aminokiseline pa je efekat neuočljiv;
- d) splice-site (Engl. splice site - mesto razdvajanja) mutacije - promene koje se dešavaju na egzon-intron granicama i utiču na obradu iRNK.

Insercije i delecije mogu promeniti okvir čitanja gena i tada su označene kao frameshift (Engl. frame shift – pomeranje okvira) mutacije, a ukoliko je promena takva da ne remeti okvir čitanja, tj.dolazi do umetanja ili delecije jednog ili više kodona, promena je označena kao inframe (Engl. in frame – u okviru) mutacija (Griffiths i sar., 1999).

Predhodno pomenute promene mogu nastati pod uticajem različitih spoljašnjih (zračenje, hemijski ili biološki faktori) ili unutrašnjih faktora (greške u toku replikacije, rekombinacije, itd). Stopa spontanih mutacija varira od vrste do vrste, a kod čoveka se procenjuje da iznosi oko  $2 \times 10^{-7}$  po genu po ćelijskoj deobi (Oller i sar., 1989). U zavisnosti od toga koji je geni pogođen mutacijom i na koji način ona utiče na njegovu funkciju, promena će imati manju ili veću fenotipsku ekspresiju i manje ili više uticati na normalno funkcionisanje organizma. U toku mapiranja humanog genoma otkriven je veliki broj mutacija koje dovode do nastanka određenih naslednih oboljenja kod čoveka.

## 1.2. Monogenska oboljenja

Oboljenja koja nastaju kao posledica mutacija, a dovode do poremećaja normalne funkcije jednog gena, nazivaju se monogenkim oboljenjima. Do sada ih je otkriveno preko 10 000, a za oko 3 000 definisane su mutacije koje dovode do bolesti, utvrđen je mehanizam njihovog nastanka i nasleđivanja (OMIM, The Human Genom). Iako pojedinačno spadaju u grupu retkih oboljenja, ukupna učestalost monogenkih oboljenja u ljudskoj populaciji danas iznosi oko 1%. Najučestalije među njima jesu cistična fibroza, Duchenneova mišićna distrofija, hemofilija A (The Human Genome).

### 1.2.1. Tipovi nasleđivanja monogenkih oboljenja

Monogenska oboljenja nasleđuju se prema Mendelovim pravilima nasleđivanja koja se zasnivaju na dominantno-recesivnom odnosu mutiranih i nemutiranih formi odgovarajućeg gena. U zavisnosti od pomenutog odnosa i od toga da li se gen nalazi na nekom od autozomnih ili polnih hromozoma razlikuju se pet tipova nasleđivanja:

1. Autozomno dominantno nasleđivanje - odnosi se na nasleđivanje mutiranih gena na autozomima. Mutirana forma gena je dominantna u odnosu na nemutiranu i ukoliko je prisutna, bolest se obavezno ispoljava bilo da je mutacija prisutna u heterozigotnom obliku (prisutna jedna kopija mutiranog alela) ili homozigotnom obliku (prisutne dve kopije mutiranog alela). Oboljenje se javlja u svakoj generaciji i podjednako je zastupljeno kod oba pola. Verovatnoća da se bolest prenese na potomstvo iznosi 50%. Primer su Hantingtonova bolest, Marfanov sindrom.
2. Autozomno recesivno nasleđivanje- vezano je takođe za autozome, a mutirana forma gena je recesivna u odnosu na nemutiranu i bolest se ispoljava ako je mutacija prisutna na oba alela (homozigotna forma). Ukoliko je mutacija prisutna u heterozigotnom obliku, osobe ne oboljevaju, a označene su kao heterozigotni nosioci mutacije. Bolest se podjednako nasleđuje kod oba pola i ne mora da se javi u svakoj generaciji. Primer su cistična fibroza, enzimopatije.

3. X-vezano dominantno nasleđivanje- odnosi se na nasleđivanje mutiranih gena sa X hromozoma. Mutirani alelski oblik je dominantan u odnosu na nemutirane alele tako da ukoliko je prisutan u homozigotnom, heterozigotnom ili hemizigotnom stanju (prisutna jedna kopija gena, kod muškaraca), bolest se ispoljava. Oboljevaju i muškarci i žene, muškarci obavezno prenose bolest na žensko potomstvo, a žene na potomstvo oba pola sa verovatnoćom od 50%. Primer je Rettov sindrom.

4. X-vezano recesivno nasleđivanje- odnosi se na nasleđivanje mutiranih gena koji se nalaze na X hromozomu. Mutirana forma alela je recesivna u odnosu na nemutiranu, pa se bolest sa značajno većom učestalošću ispoljava kod muškaraca gde se, ukoliko je prisutan, mutirani alel nalazi u hemizigotnoj formi (prisutna samo jedna kopija gena). Takođe, bolest se ispoljava i kod žena ukoliko je mutacija prisutna na oba alela, tj. na oba X hromozoma. Osobe ženskog pola koje su heterozigotni nosioci mutacije ne oboljevaju, izuzev ako nekom drugom promenom nije narušena funkcija normalnog alela. Žene kod kojih je mutacija prisutna u homozigotnom obliku obavezno prenose mutaciju na potomstvo oba pola, oboleli muškarci isključivo na potomstvo ženskog pola, dok žene heterozigotni nosioci imaju 50% šanse da na svoje muške potomke prenesu mutaciju. Primer je hemoofilija A, Duchenneova mišićna distrofija.

5. Y-vezano nasleđivanje-odnosi se na nasleđivanje mutiranih gena na Y hromozomu i naziva se još i holandrični tip nasleđivanja, a prenosi se sa očeva na sinove.

U zavisnosti od navedenih mehanizma kojima se nasleđuju, monogenska oboljenja se definišu kao autozomno dominantna i recesivna, X-vezano dominantna i recesivna ili Y-vezana oboljenja (Chial, 2008).

## 1.2. Hemofilija A

U vavilonskom Talmudu iz II veka, jevrejski rabini ostavili su zapis: „Ako joj je nakon cirkumcizije preminuo prvi sin, i drugi takođe, trećeg ne treba da obrezuje.” Ova rečenica predstavlja najstariji do sada pronađeni spis u kome se neko oboljenje prepoznaje kao nasledno, a ovaj davno prepoznati problem dovodi se u vezu sa poremećajem procesa koagulacije krvi, danas označenim kao hemofilija (Ingram i sar., 1976). Prvi medicinski opis hemofilije datira sredinom XII veka u tekstu arapskog lekara, Albukazisa koji u jednom od svojih zapisa navodi da u pojedinim selima postoje porodice kod kojih muški članovi umiru i nakon manjih ozleda.

Vekovima nadalje slični problemi se pominju u različitim spisima, ali prva naučna objašnjenja data su tek 800 godina kasnije, kada se i zvanično navodi reč „hemofilija”, tj. „ljubav prema krvi. Istorija od sredine XIX i početka XX veka ispisuje hemofiliji epitet „kraljevske bolesti”. Kraljica Engleske Viktorija, rađa sina Leopolda, za koga se nakon članka u British Medical Journalu obelodanjuje da ima problema sa krvarenjem. Hemofilija se sklapanjem brakova dalje prenosi na druge kraljevske porodice među kojima je najpoznatija porodica Romanovih, čija je tragična životna priča imala veliki uticaj na istoriju Rusije, a opisana je u mnogim značajnim umetničkim delima (Lannoy i sar., 2010). Monumentalna monografija koju istraživači smatraju šekspirovskim delom iz ove oblasti, objavljena je 1911. godine od strane Bullocha i Fildesa, koji su precizno su definisali kliničke karakteristike, način nasleđivanja hemofilije i postavili temelj za dalja laboratoriska istraživanja ove bolesti (Ingram i sar., 1976).

Istraživanja sprovedena poslednjih 50 godina u centrima širom sveta razjasnila su gotovo u potpunosti fiziologiju, genetičku osnovu i molekularni mehanizam nastanka hemofilije A (HA). Formiranje različitih društava objedinjenih danas u okviru Svetske federacije osoba sa hemofilijom A kao i opšta globalizacija obezbedili su bržu razmenu novih saznanja i veliki napredak u daljem otkivanju prirode hemofilije A i tretmanu obolelih.

### **1.2.1. Kliničke karakteristike HA**

#### 1.2.1.1. Klinička slika HA

Klinička slika i uzrast u kome se ispoljava HA se razlikuje u zavisnosti od aktivnosti FVIII. Teški oblici bolesti se najčešće ispoljavaju u prvoj godini života kao mekotkivna krvarenja, krvarenja iz usne duplje i krvarenja u zglobove.

Osnovna klinička karakteristika teškog oblika HA su krvarenja u velike zglobove i meka tkiva. U periodu novorođenčeta krvarenja su jatrogenog porekla (hematomi na mestu venepunkcije, kefalhematomi, visceralna krvarenja kao posledica porođajnih trauma). Tokom prve godine života, kada dete postaje motorno nezavisno, javljaju se krvarenja u meka tkiva i zglobove. Indikacija za ispitivanje koagulacije je produženo krvarenje zbog povrede sluzokoža usne duplje i jezika, kao i kod produženih krvarenja posle ekstrakcije zuba ili tonziloadenoidtomije.

Kod bolesnika sa blagim oblikom hemofilije bolest se ispoljava posle povreda ili hirurških intervencija.

Ponavljana krvarenja u zglobove koja mogu da dovedu hemofilične artropatije, koja je razlog trajnog oštećenja zglobova i invaliditeta. Krvarenja u drugim regionima mogu biti uzrok privremenih i trajnih promena zbog pritiska hematoma na nerve i krvne sudove (compartment sindrom). Smrtni ishod zbog krvarenja najčešće je posledica interkranijalnog krvarenja (Corell i sar., 2008).

#### 1.2.1.2. Laboratorijski parametri (algoritam dijagnostičkih postupaka)

Kod bolesnika koji krvari ispitivanje hemostaze započinje skrining testovima (broj trombocita, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (APTT), protrombinskog vremena (PT)) a u zavisnosti od rezultata ovih testova planiraju se dalja ispitivanja. Karakteristično je da oboleli od hemofilije imaju produženo aPTT. Dalje ispitivanje se nastavlja određivanjem aktivnosti pojedinačnih činilaca koagulacije, s obzirom na to da klinička slika nije specifična za deficit određenog činilaca koagulacije.

Ukoliko kod osobe muškog pola dođe krvarenja karakterističnog za hemofiliju, određivanje aktivnosti činilaca koagulacije je indikovano i kada je aPTT u granicama referentnih vrednosti.

U odnosu na aktivnost FVIII, definišu se tri klinička oblika bolesti:

1. baka HA- kada je nivo faktora koagulacije FVIII 5-30% (IU/dl) (IU-Engl. international units – IU)
2. umerena HA - kada je nivo faktora koagulacije FVIII 1-5% (IU/dl)
3. teška HA - kada je nivo faktora koagulacije FVIII <1% (IU/dl) (White i sar., 2001).

Precizno određivanje stepena deficita FVIII je značajno radi racionalnog planiranja supstitucione terapije, praćenja titra antitela na FVIII (češće se javljaju kod bolesnika sa teškim stepenom deficita FVIII) i strategije ispitivanja genetičke osnove bolesti.

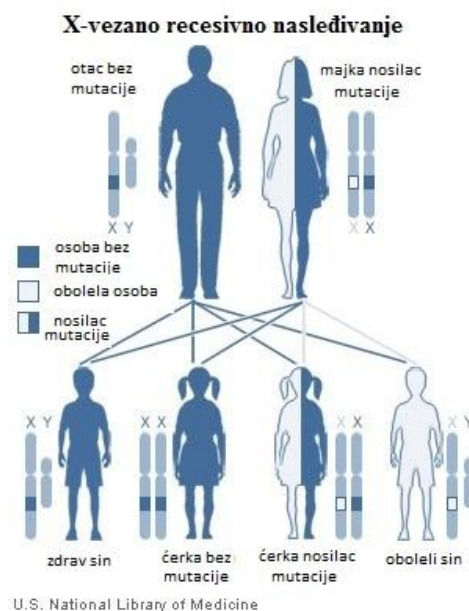


### 1.2.2. Genetička osnova HA

Kao rezultat decenijskih istraživanja i pomenutih saznanja iz oblasti genetike, molekularne biologije i medicine, HA (OMIM #306700) se danas definiše kao nasledno, X-vezano recesivno oboljenje. Klinički se odlikuje poremećajem procesa koagulacije krvi koji nastaje usled neadekvatne sinteze i aktivnosti faktora koagulacije FVIII, čiji su osnovni uzrok promene strukture i funkcije gena *F8*, lociranom na dugom kraku hromozoma X (Xq28) (Gitschier, 1984).

#### 1.2.2.1. Učestalost i način nasleđivanja

HA je nasledni tip koagulopatija kod ljudi i kako nastaje kao posledica recesivnih mutacija u *F8* genu na X hromozomu, ovo oboljenje prati X vezani recesivni način nasleđivanja.



*Slika1. Šematski prikaz mehanizma X-vezanog recesivnog nasleđivanja  
(preuzeto: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org), modifikovano)*

Usled ovakve molekularne osnove od HA gotovo isključivo oboljevaju muškarci, nosioci mutiranog gena u hemizigotnom obliku, sa učestalošću od 1: 5 000 kod živorođene muške dece. (Klinge, 2001) Žene koje nose mutaciju u heterozigotnom obliku najčešće nisu obolele, imaju smanjen nivo faktora koagulacije do 50%, a razlike u nivou nastaju usled različitog broja ćelija u kojima je inaktivan, odnosno aktivan X hromozom koji nosi mutaciju (Lyon hipoteza) (Pike i sar. 2011; Lyon i sar, 1962). Slučajevi žena obolelih od hemofilije su retki i predstavljaju 2-3% od ukupnog broja pacijenata (Sharma i sar, 2013). Simptomi bolesti se ispoljavaju kod žena koje su heterozigotni nosioci mutacija kao rezultat dodatnih promena:

- prisustvo dodatne hromozomske aberacije X hromozoma koji ne nosi mutaciju, što dovodi mutirani alel u hemizigotno stanje (Turnerov sindrom- 45,X, izo Xp, itd.);
- preferencijalne (Engl. non random) inaktivacije normalnog X hromozoma (Lyon hipoteza), čime se povećava procenat inaktivisanih normalnih *F8* alela (Renault i sar., 2008). Ovaj poremećaj se javlja kod 10-20% žena heterozigotnih nosilaca mutacije;
- postojanje mutacije *F8* gena kod žena u homozigotnom stanju, tj. na oba X hromozoma što je izuzetno redak slučaj, a mutacije mogu biti nasleđene od roditelja ili se desiti *de novo* (Lusher i sar., 1978; Sharma i sar., 2013).

Dugogodišnja istraživanja za sada nisu pokazala razlike u incidenci ove bolesti kod različitih etničkih, rasnih, socijalnih ili drugih populacionih grupa. Međutim, studije sprovedene u poslednjih nekoliko godina ukazuju na porast broja obolelih (prevalencu) čak i do 50% u visoko razvijenim državama kao što su Kanada, UK, SAD u odnosu na socijalno i ekonomski manje razvijene zajednice (Stonenbraker i sar., 2010). Objašnjenja se za sad nalaze u višoj stopi preživljavanja bolesnika usled boljeg tretmana, kao i migraciji hemofiličara u potrazi za boljom negom.

Kao jedan do uzroka se posebno ističe i efikasniji sistem registrovanaja hemofiličara u razvijenim zamljama i formiranje verodostojnih registara, što bi moglo uticati na promenu do sada registrovane učestalosti i omogućilo dobijanje realnih vrednosti.

### 1.2.2.2. Struktura i funkcija *F8* gena

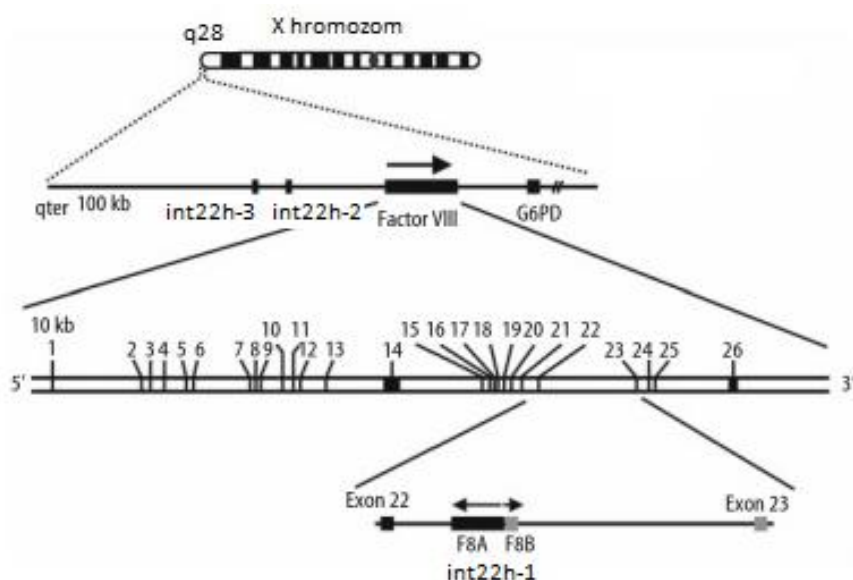
Koagulacioni faktor VIII gen (*F8*) (OMIM \*300841), nalazi se na terminalnom delu dugog kraka hromozoma X, na poziciji Xq28, sa genomskim koordinatama (GRCh37): X:154,064,062 - 154,255,350.

#### 1.2.2.2.1 Struktura gena

Gen *F8* je kloniran 1984. godine od strane nekoliko istraživačkih timova, gotovo istovremeno (Toole i sar., 1984; Gitschier i sar., 1984; Wood i sar., 1984). Utvrđeno je da je veličine 186 kb što predstavlja 0,1% čitavog X hromozoma i jedan je od najvećih gena u genomu čoveka. U svojoj strukturi sadrži 26 egzona obeleženih brojevima od 1 do 26. Njihove veličine variraju od 69 do 262 nukleotida, sa izuzetkom egzona 14 čija je dužina 3 106 bp, i egzona 26 koga čini 1958 bp. Ukupna veličina egzonskog regiona, zajedno sa egzon-intron granicama, kao i 5' i 3' netranslatirajućim regionima obuhvata oko 9 kb. U okviru gena postoji i 25 introna veličine od 207 do 32 400 bp koji ukupno obuhvataju 177 kb.

Utvrđeno je da se u okviru regiona najdužeg introna 22 *F8* gena, nalaze CpG ostrvca koja predstavljaju promotore za sintezu transkripata sekvenci unutar ovog introna. Ovim je potvrđeno postojanje gena unutar gena, a transkribujuće sekvence su označene kao dva posebna gena *F8A* (Engl. Factor VIII- associated gene) (OMIM\*305423) i *F8B* (Engl. Factor VIII- associated gene 2) ( OMIM\*305424 ). *F8A* gen se ceo nalazi u okviru introna 22, ne sadrži intronske regione i transkribuje se u suprotnom smeru od gena *F8* (Levinson i sar, 1990). *F8B* gen, pored regiona introna 22 uključuje i delove egzona 23 i 26, i iste je orijentacije kao *F8* gen.

U okviru ovih gena, tj. u intronu 22 nalazi se sekvenca označena kao *int22h-1*, a njoj homologe strukture, označene kao *int22h-2* i *int22h-3*, uočene su 400 kb telomerno od gena *F8* i imaju značajnu ulogu u procesu rekombinacije (slika 2) (Naylor i sar., 1995; Rossi sar., 2005).



**Slika 2.** Šematski prikaz hromozomske pozicije i strukture gena *F8*: gen na poziciji *Xq28* sa 26 egzona i intronom 22 (*int22h-1*) u okviru koga se nalaze geni *F8A* i *F8B*; van gena nalaze se homologe strukture introna 22, tj. *int22h-2* i *int22h-3* regioni

#### 1.2.2.2.2. Funkcija gena

Gen *F8* se transkribuje u iRNK veličine 9 029 bp i kodira prekursorski protein faktora koagulacije VIII od 2315 amino kiselina. Ekspirira se u mnogim tkivima, najveće količine iRNK uočene su u jetri, slezini, bubrezima, limfnim čvorovima, dok se u perifernoj krvi, koštanoj srži i endotelnim ćelijama aktivnost ovog gena ne detektuje (White i sar., 1989; Graw i sar., 2005).

Funkcija umetnutih gena u okviru gena *F8*, *F8A* i *F8B* još uvek nije precizno definisana. Utvrđeno je da *F8A* kodira HAP40 protein, za koji se smatra da ima ulogu u nastanku Huntingtonove bolesti, dok je uloga *F8B* gena za sada nepoznata (Peters i sar., 2001).

### 1.2.2.3. Struktura i funkcija faktora koagulacije VIII

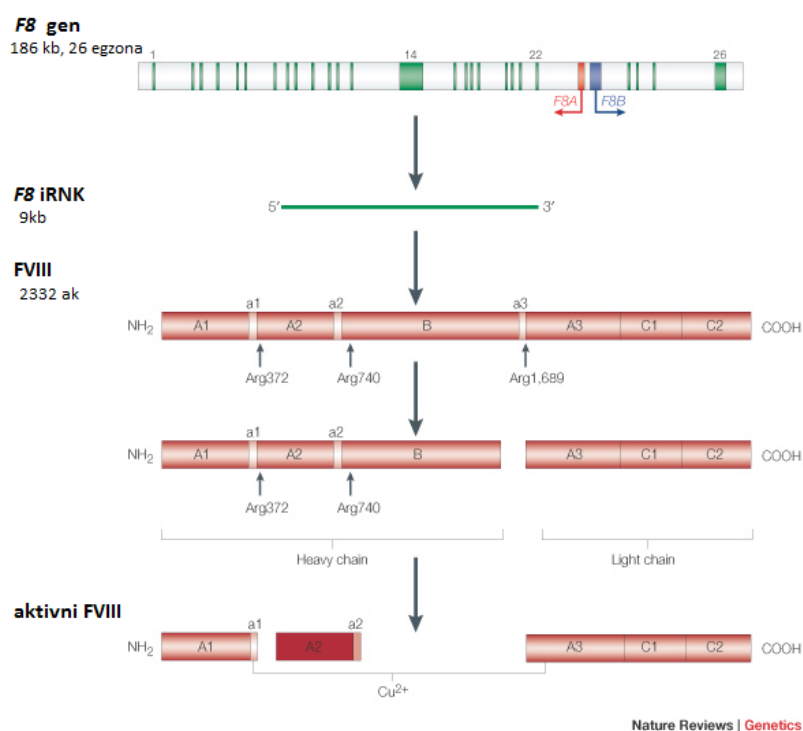
Prekursorski protein formiran na osnovu iRNK transkribovane sa *F8* gena, nakon isecanja signalnog peptida od 19 amino kiselina transformiše se u polipeptid veličine 2332 amino kiseline i predstavlja zreli protein, faktor koagulacije VIII (FVIII) (Graw i sar., 2005).

#### 1.2.2.3.1. Struktura FVIII

Precizna struktura FVIII definisana je početkom 1980- tih godina XX veka, uporedo sa kloniranjem *F8* gena. (Toole i sar., 1984; Gitschier i sar., 1984; Wood i sar., 1984). Utvrđeno je da primarna struktura proteina obuhvata domene: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Svi A domeni su homologni u 30% svoje strukture, a utvrđena je i homologija sa određenim regionima faktora V i proteina celuloplazmina. Domeni C takođe poseduju regione slične C domenima faktora V, dok se strukture domena B smatraju jedinstvenim. Regioni a1, a2 i a3 sadrže segmente bogate aminokiselinama asparaginom i glutaminom, pa se nazivaju još i kiselim regionima.

Iako je iRNK *F8* gena detektovana u različitim tkivima, utvrđeno je da najveću količinu proteina FVIII, sintetišu ćelije jetre (hepatociti). Nakon glikozilacije u endoplazmatičnom retikulumu (ER) hepatocita, FVIII interaguje sa šaperonskim proteinima (kalretikulinom, kaleksinom, Ig-vezujućim proteinom) i usled ove interakcije značajna količina FVIII se zadržava u okviru ERa. Ostatak proteina se transportuje u Goldžijev kompleks na dalju obradu, tj. dodavanje oligosaharida, glikozilaciju i sulfataciju.

Faktor koagulacije VIII takođe pripada i grupi proteina koji podležu proteolizi. Trombin vrši proteolizu u vezi A3 i B domena FVIII, preko arginina (Arg) na mestu 1,689 i u plazmi najpre cirkuliše protein u odliku heterodimera, sačinjenog od lakog lanca koji obuhvata domene A3-C1-C2 i teškog lanca domenske strukture A1-a1-A2-a2- ostatak B. Zatim se protein prevodi u aktivnu formu isecanjem na pozicijama Arg372 i Arg 740, a veza između delova aktivne strukture biva ostvarena pomoću jona bakra ( $\text{Cu}^{++}$ ) (slika 3) (Lenting i sar., 1998; Graw i sar., 2005).

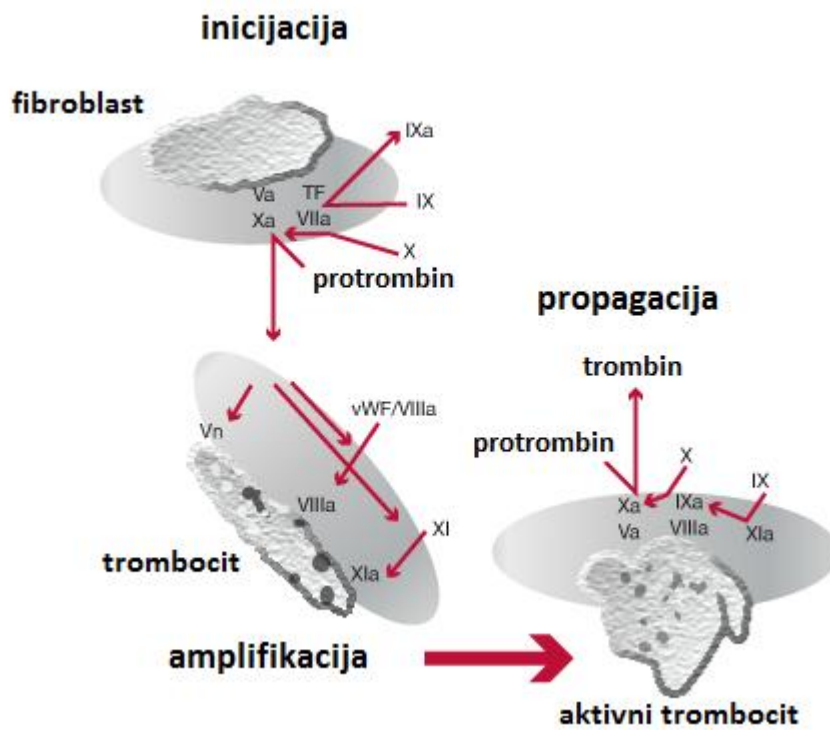


**Slika 3.** Šematski prikaz struktura koje se formiraju transkripcijom i translacijom F8 gena: F8 gen, F8 iRNK formirana transkripcijom F8 gena veličine 9 kb nakon obrade, protein FVIII formiran nakon translacije i isecanja 19 ak dugog oligonukleotidnog kraja i heterodimer nastao nakon proteolize trombinom, aktivna forma FVIII proteina nakon dodatne trombinske proteolize.

(preuzeto: [www.nature.com](http://www.nature.com), modifikovano)

1.2.2.3.2. Funkcija FVIII

FVIII je protein koji učestvuje u procesu hemostaze, tj. zgrušavanja krvi. Prema ćelijskom modelu hemostaze (Engl. Cell-based model of hemostasis), ovaj proces podrazumeva početnu fazu inicijacije koja se dešava na ćelijama koje sintetišu ćelijske faktore (Engl. Tissue factor bearing cells- TF bearing cells) (npr. fibroblasti), čemu sledi amplifikacija koagulacionog odgovora na površini trombocita. Poslednju fazu predstavlja proces propagacije tokom kojeg aktivni trombociti sintetišu odgovarajuću količinu trombina. U navedenim procesima, osnovna uloga FVIII je da u svojoj aktivnoj formi (FVIIIa), ostvarivanjem kompleksa sa FIX učestvuje u aktivaciji FX. (slika4) (Hoffman i sar., 2001).



*Slika 4. Uloga FVIII faktora u procesu hemostaze*

(preuzeto: [http://www.heparinscience.com/model\\_hemostasis.html](http://www.heparinscience.com/model_hemostasis.html), modifikovano)

Smanjena količina FVIII u cirkulaciji, ili njegovo potpuno odsustvo utiče na smanjenje brzine i efikasnosti procesa hemostaze, usporavanje koagulacije, a samim tim i produžavanje procesa krvarenja, što se definiše kao HA.

### 1.2.2.4. Genetičke promene kao uzrok nastanka HA

Smanjenje nivoa FVIII i razvoj HA kod većine obolelih (98%) rezultat je strukturnih promena, tj. mutacija u *F8* genu (Naylor i sar., 1997; Keeney i sar., 2005). Kod malog broja hemofiličara, kod kojih je struktura gena *F8* očuvana, uzrok bolesti predstavljaju promene u regulatornim procesima koji utiču na strukturu i funkciju njegovih produkata (iRNK, proteina FVIII), a rezultat su strukturnih promena van *F8* gena.

#### 1.2.2.4.1. Mutacije *F8* gena

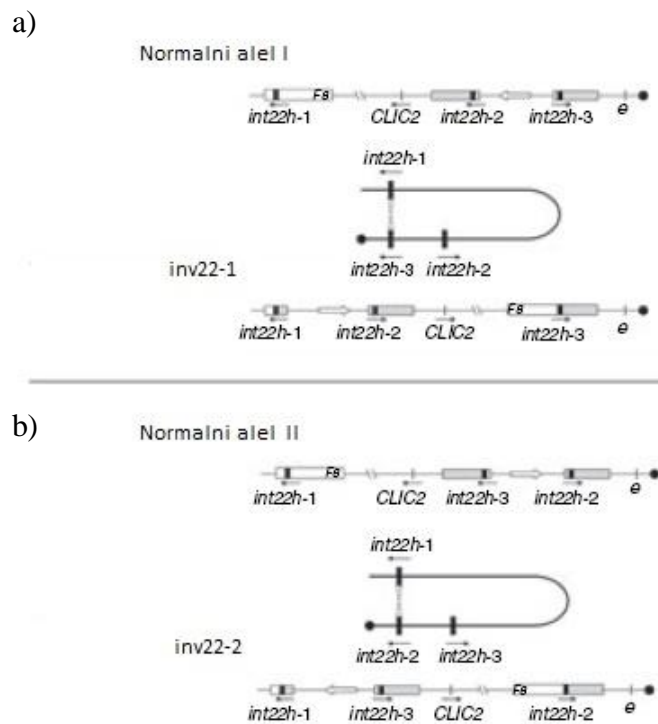
Do sada je otkriveno i registrovano preko 2 800 različitih mutacija u genu *F8* koje za posledicu imaju razvoj HA (internet baza HAMSTeRS). Najučestalije među njima jesu inverzije introna 22 i introna 1. One se javljaju kod 50% obolelih od teškog kliničkog oblika bolesti, inverzija introna 22 kod 45-50% pacijenata, a inverzija introna 1 kod 2-5%. Velike delecije i duplikacije *F8* gena, sledeće su po učestalosti i uzrok su bolesti kod 2-3% od ukupnog broja obolelih. Preostali broj detektovanih promena čini izuzetno heterogena grupa tačkastih mutacija, malih insercija i delecija (Anotnarakis i sar., 1995).

##### 1.2.2.4.1.1. Inverzija introna 22

Utvrđeno je da do nastanka inverzije introna 22 (inv22) *F8* gena najčešće dolazi tokom formiranja muških polnih ćelija, tj. spermatogeneze. Tom prilikom, u toku mejotičke deobe, zbog prisustva samo jednog X hromozoma dešava se intrahromozomska, tj. hromatidna, homologa rekombinacija između regiona introna 22 gena *F8* (*int22h-1*) i homologih, palindromskih struktura koje se nalaze 400 i 500 bp telomerno, izvan ovog gena (*int22h-2* i *int22h-3*) (Lakich i sar., 1993).



Region *int22h-2* je bliži genu *F8* i iste orijentacije kao *int22h-1*, a *int22h-3* je udaljeniji i inverzno orijentisan u odnosu na *int22h-1* (slika 5). *Int22h-1* se uvek rekombinuje sa najudaljenijim, inverzno orijentisanim, homologim regionom, što je najčešće *int22h-3*, a ovaj proces vodi formiranju inv 22 tipa 1 (inv22-1). Sa pet puta manjom učestalošću inverzija nastaje kao rezultat dva događaja, tj. dvostruke rekombinacije. Prvi događaj predstavlja rekombinacija između *int22h-2* i *int22h-3*, za koju je utvrđeno da nema štetnog efekta i predstavlja normalni polimorfizam u genomu čoveka. Međutim rezultat ove inverzije je zamena položaja *int22h-2* i *int22h-3*, i postavljanje *int22h-2* u najudaljeniji, inverzni položaj u odnosu na *int22h-1*. Drugi događaj, rekombinacija *int22h-1* sa najudaljenijim homologom, u ovom slučaju *int22h-2* vodi nastanku inv 22 tipa 2 (inv22-2) (slika 5) (Bagnall i sar., 2005).



**Slika 5.** Šematski prikaz mehanizma nastanka inv22 tipa 1 i tipa 2: a) normalni alel sa rasporedom *int22h* regiona *int22h-1*, *int22h-2*, *int22h-3*; rekombinacija *int22h-1/int22h-3* i nastanak inv22-1; b) normalni alel sa rasporedom *int22h* regiona *int22h-1*, *int22h-3*, *int22h-2*; rekombinacija *int22h-1/int22h-2* i nastanak inv22-2;

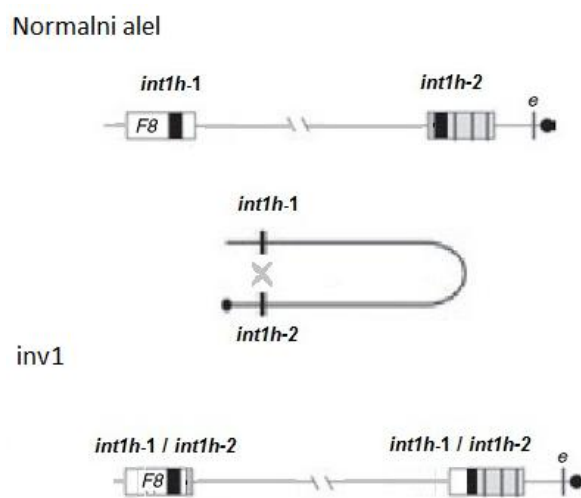
(preuzeto: Bagnall i sar., 2006, modifikovano)

Pretpostavlja se da se intrahromozomske rekombinacije retko dešavaju kada su prisutna dva X hromozoma, tj. prilikom formiranja ženskih polnih ćelija.

Inv22 drastično menja strukturu *F8* gena, u potpunosti onemogućava sintezu normalnog proteina, faktora koagulacije VIII, i kod 99% nosilaca uzrok je razvoja teškog oblika HA. (Lakich i sar., 1993; Naylor i sar., 1997).

#### 1.2.2.4.1.2. Inverzija introna 1

Iza inv22, sledeću po učestalosti masivnu strukturnu promenu *F8* gena, koja je uzrok HA predstavlja inverzija introna 1 (inv1). Mehanizam nastanka ove promene takođe podrazumeva intrahromozomsku rekombinaciju između regiona introna 1 (*int1h-1*) i njemu homologog, inverzno orijentisanog regiona koji je mapiran oko 140 kb telomerno od *F8* gena i označen kao *int1h-2* (slika 6). Pretpostavlja se da do intrahromozomske rekombinacije, kao i u slučaju inv22 dolazi u toku mejoze, prilikom nastanka muških polnih ćelija, kada je prisutan samo jedan X hromozom (Brinke i sar., 1996; Bagnall i sar., 2002).



**Slika 6.** Šematski prikaz *inv1* (normalni alel i alel sa inverzijom)  
(preuzeto: Bagnall i sar., 2002, modifikovano)

Interhromozomske rekombinacije regiona *int1h-1* i *int1h-2* između homologih hromozoma ili hromatida vode formiranju dicentričnih hromozoma i acentričnih struktura koje nisu vijabilne.

Inv1, kao i inv22 u potpunosti narušava sintezu faktora VIII, što za rezultat takođe ima razvoj teškog kliničkog oblika HA (Brinke i sar., 1996).

#### 1.2.2.4.1.3. Delecije

Uzrok HA mogu biti i delecije različitih regiona u okviru *F8* gena. U odnosu na veličinu regiona koji obuhvataju moguće ih je klasifikovati na velike delecije, one koje uključuju više od 50 bp i male, kod kojih deletirani region iznosi manje od 50 bp (internet baza HAMSTeRS).

##### **1.2.2.4.1.3.1. Velike delecije**

Velike delecije uglavnom predstavljaju nedostatak više od jednog egzona *F8* gena. Utvrđeno je da se tačke prekida kod ovih mutacija najčešće nalaze u regionima *F8* gena koji poseduju mikrohomologiju, tj. kratke sekvence identične regionima genoma koji su bogati ponovljenim elementima i koji često učestvuju u procesu rekombinacije. Na osnovu toga, predpostavlja se da delecije većeg obima najčešće nastaju kao rezultat nehomologe rekombinacije na mestima koja poseduju mikrohomologe regione (Engl. microhomology-mediated replication-dependent recombination - MMRDR). Takođe, one mogu biti i rezultat popravke dvolančanih prekida mehanizmom nehomologog vezivanja krajeva DNK (Engl. non-homologous end joining DNA repair pathway - NHEJ) (You i sar., 2013).

Do sada je najbolje proučen mehanizam nastanka velikih delecija sa tačkama prekida u regionu introna 22 *F8* gena. Specifična struktura ovog introna, pored nastanka inverzija uzrok je pojave i velikih delecija. Usled intrahromozomske rekombinacija identično orijentisanih *int22h* struktura u *F8* genu i van njega (*int22h-1/int22h-2* rekombinacije ili *int22h-1/int22h-3* razmene ukoliko je prethodno došlo do *int22h-2/int22h-3* rekombinacije), može doći do gubitka odgovarajućih regiona nastanka

velikih delecija tipa 1 (del22-1) ili tipa 2 (del22-2). One takođe mogu biti rezultat interhromozomskih rekombinacija ovih regiona u slučajevima prisustva dva X hromozoma (kod žena) ili kao rezultat hromatidnih rekombinacija tokom mejoze (Bagnall i sar., 2006) (slika 7).

a)

int22h-1 int22h-2 int22h-3

int22h-1 int22h-2 int22h-3

b)

int22h-1  
int22h-2 int22h-3

del22-1

int22h-1/2 int22h-3 e

**Slika 7.** Mehanizam nastanka delecija regiona introna 22: a) interhromozomska rekombinacija int22h-1 i int22h-2 i nastanak del22-1; b) intrahromozomska rekombinacija int22h-1 i int22h-2 i nastanak del22-1

(preuzeto: Bagnal i sar., 2006, modifikovano)

Velike delecije onemogućavaju sintezu normalnog FVIII i uglavnom su uzrok teškog kliničkog oblika bolesti (You i sar., 2013).

#### 1.2.2.4.1.3.2. Male delecije

Na osnovu do sada prijavljenih rezultata utvrđeno je da 50% delecije manjih od 50bp predstavljaju delecije pojedinačnih baza. Gubitak se najčešće dešava u okviru sekvenci koje sadrže ponovljene A nukleotide, a u regionu najdužeg A niza, sačinjenog od 9A nukleotida (kodonska pozicija 1,191) registrovano je čak 34 delecije (internet baza HAMSTeRS). Pretpostavlja se da do gubitka najčešće dolazi usled grešaka (tzv. proklizavanja) DNK polimeraze u toku procesa replikacije (Lee i sar., 2011).

Najveći broj malih delecija kao rezultat ima pomerenje okvira čitanaja gena *F8* (frameshift mutacije), što najčešće dovodi do ozbiljnih promena u aktivnosti ovog gena i pojave teškog oblika HA. Retki su sličajevi kod kojih okvir čitanja ostaje očuvan (inframe mutacije), a time u određenom stepenu očuvana i struktura i funkcija proteina, što za rezultat ima razvoj umerenog ili čak blagog kliničkog oblika bolesti (Lui i sar., 2002).

#### 1.2.2.4.1.4. Insercije

Do sada su u okviru molekularne osnove HA detektovane gotovo isključivo insercije manjeg obima, u najvećem broju slučajeva kao dodatak pojedinačnih nukleotida (internet baza HAMSTeRS). Kao i male delecije, pretežno nastaju u regionima sa ponovljenim A nukleotidima, i takođe se pretpostavlja da su rezultat greške u aktivnosti DNK polimeraze. Potvrda toga je čak 12 regisrovanih malih insercija u pomenutom nizu od 9A nukleotida (Lee i sar., 2011).

Insercije uglavnom menjaju okvir čitanja gena, što drastično remeti njegovu aktivnost i uzrok je teškog oblika bolesti, dok retke inframe promene mogu da dovedu i do razvoja umerenog ili blagog oblika oboljenja (Green i sar., 2008).

#### 1.2.2.4.1.5. Duplikacije

Duplikacije u *F8* genu predstavljaju molekularnu osnovu HA kod oko 0,5% pacijenata. Detektovane su uglavnom duplikacije većeg obima, one koje obuhvataju jedan (npr.egzon 13) ili više egzona, a utvrđeno je da nastaju kao posledica nejednakog procesa rekombinacije između alela dva normalna homologa hromozoma (tandem duplikacije). Takođe ove promene mogu da budu rezultat i nealelske homologe rekombinacije (NAHR) posebno u regionima bogatim Alu sekvencama (intron 25). Ukoliko remete strukturu kodirajućeg dela i menjaju okvir čitanja *F8* gena, duplikacije su uzrok nastanka teškog oblika HA. Umerena i blaga klinička slika prati prisustvo duplikacija koje delimično utiču na strukturu i obim sinteze FVIII (Rost i sar., 2008).

U okviru *F8* gena uočene su i duplikacije koje ne remete sintezu normalnog proteina i ne dovode do pojave bolesti (npr. duplikacija u introna 22) (El-Hattab i sar., 2011).

### 1.2.2.4.1.6. Zamena pojedinačnih baza

Zamena pojedinačnih baza u kodirajućem regionu *F8* gena, tj. u okviru egzona, uzrok je nastanka mutacije missense ili nonsense tipa. Takođe, do zamene može doći na intron-egzon granicama usled čega nastaju splice-site mutacije koje dovode do promena u obradi iRNK. Pretpostavlja se da mehanizam nastanka ovih zamena podrazumeva greške tokom procesa replikacije, pre svega u CpG bogatim regionima (Lee i sar., 2011).

Do sada je registrovano 1349 mutacija ovog tipa, od toga preko 800 jedinstvenih promena (internet baza HAMSTERS). Missense i splice-site mutacije se javljaju sa gotovo podjednakom učestalošću duž čitavog kodirajućeg regiona gena, dok nonsense mutacije imaju 10 puta veću učestalost u regionu exona 14 (Graw i sar., 2005).

Nonsense mutacije, usled prevremenog formiranja stop kodona u 97% slučajeva dovode do potpunog odsustva sinteze proteina i uzrok su teške HA. Missense i splice-site mutacije mogu biti uzrok sva tri klinička oblika oboljenja, a fenotipska ekspresija istih mutacija kod različitih individua može biti različita usled uticaja drugih genetičkih i sredinskih faktora (Lee i sar., 2011).

Delecije, duplikacije, insercije kao i zamene pojedinačnih baza u *F8* genu, koje su uzrok HA, usled toga što su posledica neadekvatnog procesa rekombinacije ili replikacije mogu nastati kako tokom mitotičke, tako i prilikom mejotičke deobe, tj. u toku formiranja polnih ćelija kod oba pola, ali i postkonceptijski.

#### 1.2.2.4.2. Promene izvan okvira *F8* gena koje su uzrok HA

Kod 1,8-2% pacijenata obolelih od HA, primenom dostupnih molekularnih metoda mutacije u *F8* genu nije moguće detektovati (Keeney i sar., 2005). Do sada su objavljeni rezultati malog broja istraživanja, koja uprkos očuvanoj strukturi potvrđuju odsustvo ekspresije *F8* gena, tj. odsustvo odgovarajuće iRNK ili njenu brzu degradaciju. Molekularna osnova ovih slučajeva do sada nije razjašnjena, a pretpostavka je da uzrok mogu biti promene regiona genoma izvan *F8* gena, a koji utiču na regulaciju njegove funkcije (El-Maarri i sar., 2006).

#### **1.2.3. Detekcija mutacija u *F8* genu**

Ukoliko je nakon evaluacije kliničke slike i rezultata laboratorijskih analiza utvrđeno da pacijent boluje od HA, prema predlogu Svetske federacije za hemofiliju (Eng. World Federation of Hemophilia - WFH), publikovanom u zvaničnom vodiču udruženja, neophodno je sprovesti genetička testiranja (Srivastava i sar., 2012).

Pre sprovođenja bilo kakvih genetičkih analiza preporučeno je utvrditi porodičnu istoriju bolesti, kako bi genetičko testiranje obuhvatilo sve članove porodica kod kojih je to potrebno.

Analize za detekciju mutacija u *F8* genu prvo se rade kod obolelih osoba. Strategija genetičkog testiranja podrazumeva određeni redosled analiza radi što preciznijeg i vremenski i materijalno najefikasnijeg načina određivanja molekularne osnove bolesti. Ukoliko je kod pacijenta utvrđeno prisustvo teškog oblika HA, neophodno je prvo sprovesti genetičko testiranje za prisustvo inv22 i inv1. Ako su rezultati ovih analiza negativni, preporuka je da dalja ispitivanja budu usmerena ka otkrivanju velikih delecija i duplikacija, a zatim, ukoliko pozitivni rezultati nisu dobijeni, neophodno je sprovođenje analize za detekciju malih delecija, insercija i tačkastih mutacija. Razlika u pristupku za pacijente sa blagim i umerenim oblikom oboljenja, podrazumeve preporuku da analize za detekciju inverzija nije potrebno raditi.

Za svaku od ovih analiza verifikovano je i zvanično prihvaćeno više direktnih metoda, koje omogućavaju detekciju prisustva mutacija kod osoba muškog pola u čak 98% slučajeva sa osetljivošću i do 99,9%, a neke i detekciju mutacija u heterozigotnom obliku (Keeney i sar., 2005).

Ukoliko je mutacija definisana, testiraju se ženski članovi porodice koji su mogući heterozgotni nosioci promene. Analize za status nosioca potrebne su kako zbog rizika da su žene nosioci takođe obolele od blagog oblika koji klinički još nije uočen, tako i zbog eventualne prenatalne dijagnostike.

U porodicama sa HA kod kojih mutacija nije definisana, od velike pomoći mogu biti brojne standardizovane indirektno metode za praćenje X hromozoma sa mogućim oštećenjem.

Rezultate genetičkih testova neophodno je da prati i genetički savet, dat od strane stručnih osoba, koji predstavlja osnovu adekvatnog tretmana porodica sa HA (Srivastava i sar., 2012).

### 1.2.3.1. Metode za detekciju inv 22 i inv1

#### 1.2.3.1.1. Southern Blot analiza

Southern Blot analiza prva je opisana metoda za detekciju inv 22, 1993. godine od strane Lakich i saradnika, i do današnjih dana predstavlja jednu od referentnih metoda za inv22 genotipizaciju. Zasniva se na isecanju genomske DNK pomoću restriktionog enzima Bcl I, nakon čega se fragmenti obeležavaju specifičnim probama (900 bp *Eco* RI-*Sac* I fragmenti plazmida p462.6, ATCC #57203) koje odgovaraju *F8A* genu lociranom unutar introna 22 gena *F8*, kao i dvema ekstaragenskim kopijama. Rezultati Southern blot analize uvek podrazumevaju tri signala po alelu i to: normalan alel bez inverzije označen je signalima veličine 21,5; 16 i 14kb; alel sa inv22-1 predstavljen je signalima veličine 20;17,5 i 14kb; dok se alel sa inv22-2 detektuje pomoću signala veličine 20, 16 i 15,5kb. Po istom principu metoda se koristi i za detekciju inverzije introna 1 (Lakich i sar., 1993).



Southern blot metoda omogućava detekciju svih tipova inverzija, kao i detekciju statusa nosioca. Takođe je primenljiva i za semikvantitativo određivanje mozaicizma kod heterozigotnih nosilaca *inv22* i *inv1* (Oldenburg i sar., 2000). Pored pomenutih prednosti, procedura ove metode prilično je robusna, zahteva 8-10 dana za izvođenje kao i posebno obučeno osoblje, a njen najveći nedostatak jeste korišćenje izuzetno štetnih radiohemijskih sredstava (Rossetti i sar., 2011).

### 1.2.3.1.2. Long distance-PCR

Sredinom 1990-tih, Sommer, Liu i saradnici dizajnirali su metod za detekciju *inv22*, zasnovan na sintezi izuzetno dugih PCR produkata po čemu je metoda i dobila naziv Long distance-PCR (Engl. long distance – dugo rastojanje- LD-PCR). U reakciji se koristi genomska DNK i četiri prajmera: P i Q prajmeri lokalizovani u *F8* genu gde ograničavaju *int22h-1* na poziciji -1,212 bp i +1,334 bp ; kao i A i B prajmeri koji ograničavaju ekstrageneske ponovke *int22h-2* i *int22h-3*, svaki od njih na poziciji -167 bp i +118 bp. Kada inverzije nema, tj. kada su prisutni normalni aleli, rezultati analize su predstavljeni u vidu PQ (12kb) i AB (10kb) produkata. *Inv22* u hemizigotnom stanju, kod obolelih muškaraca, detektuje se preko produkata PB (11kb), AQ (11kb), i AB (10kb), dok postojanje inverzije u heterozigotnom stanju, kod žena nosilaca preko produkata PQ, PB, AQ, AB. Produkt AB predstavlja i kontrolu same reakcije i uvek mora biti prisutan, jer i u slučaju inverzije jedna od ekstrageneskih kopija ostaje nepromenjena. Efikasnost reakcija povećana je korišćenjem visoke koncentracije dimetil-sulfoksida, dodavanjem 7-deaza-dGTPa i korišćenjem smeše Taq i Pwo DNK polimeraza. Razdvajanje produkata najbolje se sprovodi na agaroznom gelu (0,6%), 6-8 časova (Liu i sar., 1998).

Originalna metoda je dopunjena izvesnim minimalnim procedurama i predstavlja jednostavnu, brzu i materijalno ne mnogu zahtevnu tehniku koja se koristi u velikom broju referentnih laboratorija. Nedostatak ove metode je činjenica da se njom ne može detektovati razlika u tipu *inv22* (Rossetti i sar., 2011).

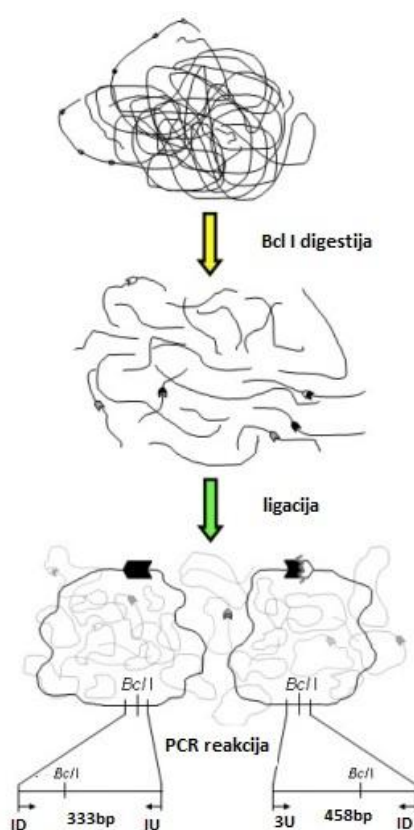
### 1.2.3.1.3. Inverse shifting-PCR

U cilju prevazilaženja problema prilikom umnožavanja izuzetno velikih produkata *int22h* duplikona, 2005. godine Rosseti i saradnici razvili su novu metodu za *inv22* i *inv1* genotipizaciju. Korišćenjem principa klasičnog, inverznog PCRa i modifikacijama inspirisanim pomeranjem signala sa 21,5 na 20kb u odnosu na prisustvo *inv22-1* ili *inv22-2*, na Southern blot autoradiogramu, kreiran je Inverse shifting- PCR (Engl. inverse shifting - inverzno pomeranje -IS-PCR) (Ochman i sar., 1988; Rossetti i sar., 2005). Metoda je 2008. godine usavršena nakon dešifrovanja humanog genoma, određivanja sekvence X hromozoma i strukture *int22h* i *int1h*, kao i preciznog definisanja mehanizma inverzija (Rossetti i sar., 2008).

Strategija IS-PCRa bazira se na specifičnom isecanju genomske DNK restrikcijom BclI enzimom, što dovodi do formiranja samo-ligirajućih fragmenata. Oni se pomoću enzima ligaze transformišu u prstenaste DNK strukture koje su označene kao B-ringovi. Lančanim umnožavanjem polimerazom delova B-ringova pomoću specifičnih prajmera za regione introna 22 i introna 1, dobija se informacija o prisustvu ili odsustvu inverzija u pomenutim intronima.

Korišćenjem humane genomske DNK sekvence utvrđena su restrikciona mesta BclI enzima u okviru *int22h-1*, u bazama 36204 i 14595, tj. njegovom proksimalnom i distalnim regionu. Identična restrikciona mesta se nalaze i u ekstrahromozomskim homologim regionima *int22h-2* i *int22h-3*, što omogućava da se nakon enzimске digestije i ligacije, formiraju B-ringovi sa regionom čija će struktura zavisiti od toga da li je došlo do inverzije ili ne. Ukoliko se radi o normalnoj formi gena, novoformirani region obuhvata proksimalne i distalne delove isključivo introna *22h-1*, a formirani B-ring su veličine 21,6 kb. Ukoliko inverzija postoji, cirkularizacijom se formiraju strukture sa himernim regionom. Kod inverzije tipa 1 himerni region je sastavljen od dela *int22h-1* i *int22h-3*, a veličina cirkularnih struktura iznosi 17,5 kb. Inverzija tipa 2 omogućava formiranje B-ringa od 15,5 kb sa himernim regionom načinjenim od delova *int22h-1* i *int22h-2*.

Specifično kreirani prajmeri ID, IU, 2U, 3U, ED omogućavaju umnožavanje produkata različitih veličina (333, 385, 458 bp). Kod osoba muškog pola prisustvo normalnog gena biće predstavljeno produktom veličine 458 bp, inv22 -1 produktom veličine 333 bp, a postojanje inv22 -2 produktom od 385 bp. Heterozigotni nosioci inv22-1, prepoznaju se na osnovu prisustva produkata od 485 i 333 bp, a nosioci inv22-2 po prisustvu 458 i 385 bp dugih produkata (slika 8). Dodatna, takozvana komplementarna reakcija za koju se koriste ED, IU, 2U, 3U prajmeri pored detekcije inverzija, obezbeđuje i podatak o postojanju del22 ili dupl22.



**Slika 8.** Šematski prikaz IS-PCR metode za detekciju inv22

(preuzeto: [www.openi.nlm.nih.gov](http://www.openi.nlm.nih.gov), modifikovano)

Restrikciona mesta Bcl I enzima definisana su i u okviru int1h-1 i int2. Cirkularna struktura veličine 13 kb, sadrži regione int1h-1 introna (WT) i prepoznaje se nakon PCR u kome se koriste 1-IU i 1-ID prajmeri (veličina produkta 555 bp).

Ukoliko inverzija introna postoji, cirkularizacijom se formira B-ring veličine 12,4 kb sa himernim regionom formiranim od delova int1h-1 i int1h-2. Prajmeri 1-IU i 1-ED omogućavaju umnožavanje dela ovog regiona veličine 358bp. Kod heterozigotnih nosilaca inv1, detektuju se produkti veličine 555 i 358 bp (Rossetti sar., 2008).

Metoda IS-PCRa omogućava detekciju svih tipova inverzija kao i određivanje statusa nosioca. Po svojim tehničkim karakteristikama spada u bezbednu i jednostavnu tehniku, bez potrebe za posebnom obukom osoblja. Materijalno i vremenski nije previše zahtevna, tako da po svim parametrima preuzima primat u odnosu na druge pomenute metode (Rossetti i sar., 2011).

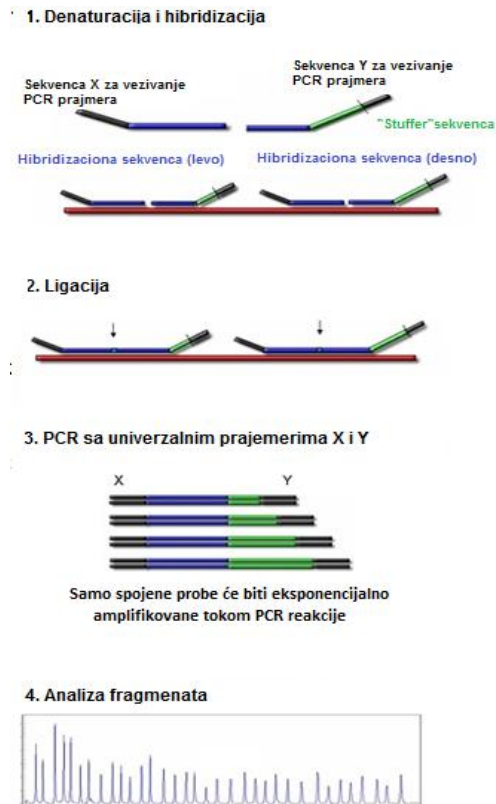
### 1.2.3.2. Detekcija velikih delecija i duplikacija

Ukoliko inverzije kod pacijenata sa teškim oblikom HA nisu detektovane, sledeći preporučeni korak u testiranju podrazumeva analize za detekciju velikih delecija i duplikacija. Takođe je preporučeno da ove analize budu prvi korak u testiranju za pacijente sa umerenom i blagom HA.

#### 1.2.3.2.1. Multipleks ligaciono zavisna amplifikacija proba za detekciju velikih delecija i duplikacija

Metoda multipleks ligaciono zavisne amplifikacije proba (Engl. multiplex ligation-dependent probe amplification-MLPA) je kreirana 2002. godine od strane Schoutena i saradnika, kao metoda za detekciju kvantitativnih promena u genomu (Schouten i sar., 2002). Zasniva se na korišćenju genomske DNK i specifičnih, sintetisanih proba koje hibridizuju sa odgovarajućim DNK regionima. Svaka proba sastoji se od dva oligonukletida, kratkog i dugog niza, koji imaju mogućnost međusobne ligacije. Sve proba na svojim 5' i 3' krajevima (5 kraj kratkog i 3 kraj dugog oligonukleotida) sadrže identične sekvence koje omogućavaju istovremenu amplifikaciju u PCR reakciji, dok ostatak kratkog i dugog oligonukleotida čine target-specifične sekvence.

Nakon hibridizacije target sekvenci sa odgovarajućim regionima DNK, i ligacije tako vezanih delova proba, sve probe se umnožavaju u jedinstvenoj PCR reakciji gde se dobijaju produkti veličine od 130 do 480bp. Produkti se dalje razdvajaju pomoću kapilarne elektroforeze (ABI 3100, ABI 3500), a njihova vizuelizacija i analiza vrši se pomoću posebnih softvera (Genemapper, Coffalyser) (slika 9).



**Slika 8.** Šematski prikaz MLPA reakcije  
 (preuzeto: <http://www.mlpa.com>, modifikovano)

Rezultati su predstavljeni pomoću pika na grafikonu za svaku umnoženu sekvencu (interferogram), a površina svakog signala se upoređuje sa vrednostima kontrolnog uzorka. Ukoliko je prisutna normalna doza genskog regiona, ovaj odnos će imati vrednost 1,0 (sa varijansom 0,8-1,2); vrednost jednaka nuli odnosi se na potpuno odsustvo analiziranaog regiona; vrednost oko 0,5 podrazumeva heterozigotnu deleciju, a vrednosti oko 1,5 heterozigotnu duplikaciju.

Za detekciju velikih delecija i duplikacija u *F8* genu metodom MLPA, danas postoje visoko efikasni komercijalni kitovi među kojima se najšire koristi SALSA P178 F8 MLPA kit (MRC Amsterdam, Holandija).

Ova metoda je brza, visoko osetljiva (99,9%) i omogućava određivanje statusa nosioca. Iako velike delecije i duplikacije imaju nisku učestalost, MLPA se svrstava u početni deo testiranja, jer ima mogućnost istovremenog skeniranja čitavog gena na nivou DNK.

Za detekciju velikih delecija i duplikacija moguće je koristiti i druge metode: RT-PCR, sekvenciranje, IS-PCR. Njima se detektuje samo deo promena koje su MLPA metodom jasno uočljive, a razlog je to što se analiza ograničava samo na kodirajući region *F8* gena (RT-PCR metoda) ili njegov deo (IS-PCR). Takođe zbog tehničkih karakteristika u nekim slučajevima amplifikaciju regiona nije ni moguće uočiti (klasično sekvenciranje) (Acquila i sar., 2008; Rost i sar., 2008).

#### 1.2.3.4. Detekcija malih i tačkastih mutacija

Analizama za detekciju malih i tačkastih mutacija kod obolelih od hemofilije A, pribegava se ukoliko prethodna testiranja nisu pokazala pozitivne rezultate. Kako ove promene predstavljaju izuzetno heterogenu grupu, sa konstantnom stopom otkrivanja novih mutacija, u osnovi analize leži direktno sekvenciranje. Da bi se izbeglo sekvenciranje čitavog gena vrši se presekvencionana analiza (presekvencioni skrining) i izdvajaju regioni gena sa sumnjom na mutaciju. Ukoliko detektovana promena do sada nije registrovana u zvaničnoj bazi mutacija, postoji preporuka i uputstvo za njenu registraciju (Keeney i sar., 2005).

#### 1.2.3.4.1. Metode za presekvencionu analizu *F8* gena

Presekvencionu analiza bez obzira na metodu kojom se obavlja, započinje umnožavanjem fragmenata koji zajedno obuhvataju čitav *F8* gen. U te svrhe koristi se set prajmera tako kreiranih da formiraju produkti veličine od 100 pa do 700 bp, u zavisnosti od metode koja se dalje primenjuje za selekciju fragmenta sa mogućom promenom. Postoji veleiki broj takvih metoda, i u savremenoj dijagnostici HA najčešće se koriste sledeće:

1. Konformaciono osetljiva gel elektroforeza (Engl. conformation sensitive gel electrophoresis - CSGE) - zasniva se na formiranju i analizi heterodupleksnih struktura. Optimalni rezultati se postižu sa produktima ne većim od 500bp, a očekivana detekciona osetljivost metode je veća od 90%. Ova procedura je jednostavna, brza i ne zahteva korišćenje radioaktivno obeleženih supstanci, ali je izuzetno zahtevna u pogledu interpretacije rezultata (Ganguly i sar., 1993).

2. Denaturišuća hromatografija visokih performansi (Engl. denaturing high performance liquid chromatography-dHPLC) - predstavlja metodu u kojoj se heterodupleksi i homodupleksi razdvajaju na osnovu razlike u ponašanju, na denaturišućem neporoznom polistirendivinilbenzenskom matriksu. Optimalno je da prajmeri budu dizajnirani tako da formiraju fragmente 150-500bp i tada je moguće postići osetljivost veću od 95%. Metoda je brza, vremenski i manuelno ne previše zahtevna, ali je neophodno posedovanje specifične aparature ( Transgenomic Wave System) (Oefner i sar., 1995).

3. Konformacioni polimorfizam jednolančane DNK (Engl. single strand conformation polymorphism- SSCP) - zasniva se na činjenici da jednolančani molekuli DNK, na osnovu svoje primarne strukture (sekvence) zauzimaju definisanu sekundarnu konformaciju, i usled toga u uslovima nedenaturišuće elektroforeze putuju specifičnom brzinom. Promene u sekvenci dovešće do promena u konformaciji, a time i do promene brzine putovanja kroz gel, tj. WT i mutirana DNK će na gelu dati različite signale.

Optimalni rezultati se postužu analizom fragmenata ne dužih od 300 bp, korišćenjem poliakrilamidnog gela koncentracije 4-6% sa odnosom akrilamida i bisakrilamida 39:1 (nizak kros-linking odnos), na sobnoj ili temperaturi od 4°C. Takođe, iste uzorke neophodno je testirati na više kombinacija eksperimentalnih uslova (Orita i sar., 1989; Hayashi i sar., 1991).

Ova metoda je visoko osetljiva, tehnički jednostavna, ali u odnosu na druge metode zahtevnija u pogledu vremena i tumačenja rezultata.

4. Denaturišuća gradijent gel elektroforeza (Engl. denaturing gradient gel electrophoresis-DGGE) - zasniva se na razdvajanju PCR-om umnoženih fragmenata DNK, na denatušućem gradient-gelu. Prisustvo mutacije uticaće na denaturaciju fragmenta koji će na gelu zauzeti drugačiju poziciju u odnosu na kontrolni uzorak. Denaturacija se vrši na poliakrilamidnom gelu, a vizuelizacija pomoću stidijum bromida na UV-transiluminatoru (Mayers i sar., 1987).

Metoda je osetljiva, tehnički jednostavna ali zahteva optimizaciju za svaki DNK fragment.

#### 1.2.3.4.2. Sekvenciranje

Nakon izdvajanja fragmenata, kandidata za prisustvo mutacije (malih delecija, insercija ili tačkastih mutacije) sledeći korak je DNK sekvenciranje, najpre kod obolelih muškaraca, a zatim kod ostalih članova porodice kod kojih je to potrebno. Zvanični vodiči ističu „streamlined” proceduru kao zlatni standard i daju detaljna, standardizovana uputstva za njenu primenu (website Sequencing Best Practice Guidelines, [http://www.cmgs.org/new\\_cmgs/](http://www.cmgs.org/new_cmgs/))



### 1.2.3.5. Indirektne metode za praćenje X hromozoma

Indirektne metode (Engl. linkage analyses), u prošlost intenzivno korišćenje u dijagnostici hemofilije, pre svega za definisanje eventualnog statusa nosioca, danas su potisnute od strane preciznih metoda direktne dijagnostike. Međutim i u savremenom pristupu „linkage” analize nalaze svoje mesto, pre svega u situaciji kada direktnim metodama mutacija nije nađena. Takođe, ove analize poželjno je primeniti i prilikom tretmana porodica kod kojih je detektovana mutacija, takva da je PCR produkt izuzetno teško dobiti (npr. velike delecije). U te svrhe koristi se više metoda koje uglavnom podrazumevaju upotrebu intragenjskih markera (Engl. dinucleotide repeats, dimorphisms-standard PCR analysis, dimorphisms-southern blot and long PCR analysis) (Keeney i sar., 2005).

### 1.2.3.6. Prenatalna dijagnostika

Bilo koju od pomenutih metoda za detekciju mutacija u *F8* genu moguće je uraditi kako postnatalno tako i prenatalno, tj. na uzorku DNK poreklom od fetusa. Preporuka je da DNK bude izolovana iz uzorka horionskih resica, zbog mogućnosti rane prenatalne dijagnostike, ali nije neuobičajeno da se analize rade i na uzorcima poreklom iz amnijske tečnosti ili fetalne krvi.

Strategija prenatalnih analiza podrazumeva pre svega određivanje pola fetusa, putem analize kariotipa ili nekim od PCR protokola. Ukoliko je utvrđeno da je fetus ženskog pola, neophodno je isključiti maternalnu kontaminaciju analiziranog uzorka, i u slučaju da je nema dalje analize nisu potrebne. Kada se utvrdi da je fetus muškog pola, sprovode se dalje testovi neophodni za detekciju mutacije koja u porodici postoji (Keeney i sar., 2005; Srivastava i sar., 2012).

Preimplantaciona genetička dijagnostika (PGD) HA, takođe je moguća korišćenjem „FVIII DNA microarray” analiza, ali s obziroma na finansiski aspekt, prenatalna dijagnostika za sada i dalje ostaje metoda izbora (Lavery., 2009).

Nakon završetka pomenutih analiza i određivanja genetičkog opterećenja koje je uzrok bolesti u jednoj porodici, obaveza genetičara je i davanje genetičkog saveta. Samo ovakav pristup obezbeđuje sveobuhvatni i najbolji tretman porodica sa HA.

### **1.2.4. Terapijski pristup u lečenju obolelih od HA**

Tretman pacijenata sa HA je složen i podrazumeva adekvatno angažovanje medicinskog osoblja iz različitih oblasti (hematologa, transfuziologa, fizioterapeuta, genetičara, stomatologa, hirurga, ginekologa, psihologa, imunologa, itd.).

Postoje dva pristupa u lečenju:

1. profilaktičko- koje ima za cilj sprečavanje pojave krvarenja;
2. po potrebi – što se sprovodi kod akutnih krvarenja.

Osnovu terapije kod hemofiličara predstavlja supstitucija faktora VIII, u vidu infuzije koncentrata što će za rezultat imati adekvatno zgrušavanje krvi i zaustavljanje krvarenja. Danas se koriste koncentрати sintetisani iz ljudske plazme ili iz genetički modifikovanih ćelijskih linija dobijenih metodom rekombinantne DNK. Terapija se primenjuje u akutnim slučajevima krvarenja, a u zajednicama u kojima to materijalni uslovi dozvoljavaju, i u obliku visoko efikasne profilakse. (Srivastava i sar., 2012) .

#### **1.2.4.1. Razvoj inhibitora na FVIII**

Jedna od najtežih komplikacija u tretmanu pacijenata sa HA je razvoj neutrališućih, IgG antitela za eksterno uneti FVIII. Kumulativni rizik (Engl. lifetime risk) za pojavu inhibitora, kod pacijenata koji predhodno nisu koristili supstitucionu terapiju, kreće se od 0-30%, i pre svega zavisi od kliničke težine oboljenja. Procenjeno je da se kod obolelih od teške HA, rizik kreće u rasponu od 20-30%, dok je kod obolelih od umerenog i blagog oblika bolesti, procenjena mogućnost nešto niža i iznosi 5-10% (Srivastava i sar., 2012).

Brojnim istraživanjima je zaključeno da na razvoj inhibitora takođe utiču i mnogi drugi genetički i negenetički faktori, tako da je preciznu procenu konkretnog rizika za pojedinačne pacijente jako teško utvrditi (Tantawy i sar., 2010) (tabela 1).

<i>Faktori razvoja inhibitora FVII</i>
<u><i>Genetički</i></u>
tip F8 mutacije
polimorfizam HLA klase II
etnička pripadnost
porodična istorija inhibitora
<u><i>Negenetički</i></u>
imunološki faktori
operacije i traume
priroda tretmana

**Tabela 1.** *Genetički i negenetički faktori razvoja inhibitora FVIII*

Uticaj mutacija u *F8* genu na pojavu razvoja inhibitora do današnjih dana nije razjašnjen, a istraživanja su davala oprečne rezultate. Prema studiji Coppola i saradnika, do sada najobimnijoj iz ove oblasti, procenjuje se da veći rizik za ovu pojavu imaju pacijenti sa velikim delecijama, inverzijama, nonsence i splice-site mutacijama, dok pacijenti sa malim delecijama i insercijama spadaju u grupu sa niskim rizikom (Coppola i sar., 2009).

Zbog ovakvog uticaja terapije koja se trenutno primenjuje i već navedenih činjenica o monogenskoj osnovi i hroničnim, teškim kliničkim karakteristikama, HA se smatra jednim od idealnih kandidata za sprovođenje genske terapije. Razvoj ove grane, korišćenjem *ex vivo* i *in vivo* pristupa trenutno je u toku.

## **2. CILJ RADA**

U ovoj doktorskoj tezi postavljeni su sledeći ciljevi:

1. da se utvrdi *distribucija mutacija u F8 genu* u populaciji osoba obolelih od HA sa teritorije Srbije. U te svrhe planirana je analiza učestalosti:

- a. inv22 i inv1 i;
- b. velikih delecija i duplikacija;
- c. tačkastih mutacija.

2. *određivanje učestalosti detektovanih mutacija u odnosu na kliničke karakteristike bolesti* ( klinički oblik oboljenja i prisustvo inhibitora za FVIII)

3. *određivanje statusa nosioca kod članova porodica obolelih kod kojih su mutacije predhodno definisane, a u cilju davanja adekvatnog genetičkog saveta,*

4.  *sprovođenje prenatalne dijagnostike za detekciju mutacija kod fetusa, kod onih parova, kod kojih je kod ženskog partnera dokazano heterozigotno prisustvo određene mutacije.*

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. Pacijenti

U cilju direktne detekcije mutacija u genu *F8*, kod obolelih od HA u Srbiji, tokom ovog istraživanja korišćeni su uzorci genomske DNK izolovane iz limfocita periferne krvi 71 pacijenta iz 66 porodica. Oni su sa kliničkom dijagnozom HA upućeni u Laboratoriju za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zastitu majke i deteta Srbije „ Dr Vukan Čupić ”, radi utvrđivanja precizne molekularno-genetičke osnove bolesti. Pacijentima je klinička dijagnoza bolesti postavljena na Odeljenju za hematologiju: Instituta za zdravstvenu zastitu majke i deteta Srbije „ Dr Vukan Čupić ” (IMD), Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine u Novom Sadu i Dečje klinike u Nišu.

Na osnovu nivoa faktora koagulacije VIII u plazmi 11/71 obolelih je upućeno sa dijagnozom blagog kliničkog oblika bolesti, kod 14/71 obolelih dijagnostikovana je umerena HA, dok je njih 46/71 upućeno sa dijagnozom teške HA (White i sar, 2001). Podaci o prisustvu inhibitora na eksterno uneti FVIII bili su poznati za 56/71 pacijenata. Njih 8/56 upućeno je sa pozitivnim statusom za inhibitor, dok kod 46/56 pacijenata inhibitor predhodno nije detektovan.

Pacijenti su uvršteni u zvanični registar obolelih od HA sa teritorije Srbije, a njihovi podaci se nalaze i okviru zvaničnog svetskog registra za obolele od hemofilije (WFH Annula Global Survey 2012).

Svi (71/71) oboleli pacijenti od HA analizirani u ovom radu bili su muškog pola, starosti od 2 do 65 godina.

Detekcija prisustva *inv22* i *inv1*, urađena je kod svih pacijenata u analiziranom uzorku (71/71), dok su analize za detekciju velikih duplikacija i delecija urađene kod 20/71 pacijenata. Presekvencioni skrining obuhvatio je grupu od 46/71 pacijenta, dok je sekvenciranje sprovedeno na uzorcima 3/71 pacijenta.

U drugom delu ove studije određivan je status nosilaca kod članova porodica obolelih kojima je tokom istraživanja detektovano i definisano prisustvo određene mutacije. U tom cilju analizirana je genomska DNK izolovana iz limfocita periferne krvi 42 osobe dostupne za analizu (15 majki, 23 sestre i 4 ćerke obolelih).

Istraživanje je obuhvatilo i sprovođenje prenatalne dijagnostike za detekciju mutacija u *F8* genu kod fetusa, u 9 slučajeva kod 6 trudnica. Sve one su se obratile Genetičkom savetovalištu IMD sa pozitivnom porodičnom anamnezom i predhodno definisanom molekularnom osnovom HA. Jedna analiza sprovedena je korišćenjem genomske DNK fetusa izolovane iz amnijske tečnosti, dok je u 8 slučajeva analizirana DNK poreklom iz uzorka dobijenog biopsijom horionskih resica (CVS).

U okviru istraživanja u ovoj tezi otkriven je i veoma redak slučaj osobe ženskog pola obolele od HA, kod koje je precizno analizirana molekularna osnova bolesti i urađena detaljna analiza kariotipa primenom citogenetičkih metoda i fluorescentne hibridizacije *in situ* (Engl. fluorescence *in situ* hybridization-FISH). Takođe je definisan i status nosioca za utvrđenu mutaciju kod sestre oboleleog pacijenta.

Genetički savet dat je svim analiziranim pacijentima i članovima njihovih porodica, u okviru Genetičkog Savetovališta IMD-a.

Izvođenje ove studije i objavljivanje dobijenih rezultata odobreno je od strane Etičkog komiteta IMD-a.



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija DNK

#### 3.2.1.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi urađena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMDa, korišćenjem metode koju su standardizovali Miller i saradnici, 1988. godine, uz neznatne modifikacije (Miller i sar., 1988.) Procedura je sprovedena na sledeći način:

I dan:

- ✓ uzorak periferne krvi (1ml antikoagulansa (4,5% EDTA/0,7% NaCl) sa 5-10ml krvi) rastvara se u 10ml litičkog pufera, pH=7,4 (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA);
- ✓ inkubacija 30min na +4°C, centrifugira (15min, 5000rpm, +4°C);
- ✓ supernatant se odbaci, talog resuspenduje u 10ml litičkog pufera i centrifugiran (15min, 5000rpm, na +4°C). Postupak je ponovljen dva puta;
- ✓ odbaci se supernatant, talog resuspenduje u 12ml drugog litičkog pufera, pH=8,0 (10mM TrisHCl, 400mM NaCl, 2 mM EDTA), 140µl 10% proteinaza K i 800µl 10% SDS;
- ✓ inkubacija u vodenom kupatilu sa šejkerom na 37°C preko noći.

II dan:

- ✓ inkubiranje se nastavlja u vodenom kupatilu sa šejkerom na 55°C, 60min;
- ✓ dodaje se 4ml 6M NaCl, i rastvor se centrifugira (15 min, 5000rpm, +4°C);
- ✓ supernatant se prebaci u novu epruvetu, centrifugira pod istim uslovima;
- ✓ supernatant se ponovo prebaci u novu epruvetu, doda 10ml apsolutnog etanola i precipitira DNK;
- ✓ uzorak DNK se ispere u 70% etanolu i prebaci u sterilnu ependorf - epruvetu sa odgovarajućom količinom redestilovane vode;
- ✓ uzorci se čuvaju na +4°C ili -20°C.

### 3.2.1.2. Izolacija DNK iz horionskih resica/kulture amnionskih ćelija

Izolacija genomske DNK fetusa iz uzorka horionskih resica i kulture amnionskih ćelija urađena je u Laboratoriju za medicinsku genetiku IMDa, korišćenjem metode koja se bazira na ekstrakciji uz pomoć fenola i hloroforma (Ausubel i sar., 1987).

Amnionske ćelije za izolaciju DNK se ovom metodom mogu dobiti direktno iz punktata amnionske tečnosti, ali zbog malog broja fetalnih ćelija izolovanih na ovaj način i često mnedovoljnog prinosa izolovane DNK, pristupilo se kultivisanju amnionskih ćelija u *in vitro* uslovima. Izolacija je nakon kultivisanja sprovedena prema standardnom protokolu uz neznatne izmene. Horionske resice se pre postupka izolacije prvo usitne i isperu u običnom medijumu cenrifugiranjem (2 000 rpm, 10 min). Sledeći koraci za oba tipa uzorka su bili isti i obuhvataju:

- ✓ nakon cenrifugiranja supernatant se odbaci i doda 5ml CB rastvora (50mM TRIS, 100mM NaCl, 1mM EDTA), a zatim se rastvor cenrifugira (2 000rpm, 10min);
- ✓ supernatant se odbaci i talogu doda 1ml STE rastvora (0,1M NaCl, 10mM TRIS-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8), 50µl 10% SDS (pH 7,2) i 70 µl proteinaze K;
- ✓ inkubacija 2h na 55°C u vodenom kupatilu sa šejkerom;
- ✓ nakon inkubacije materijal se rasporedi u ependorf-epruvete i doda fenol (pH 8) u zapreminskom odnosu 1:1, zatim se rastvor cenrifugira (12 000 rpm, 10min);
- ✓ supernatant se prebaci u nove ependorf-epruvete i doda hloroform u zapreminskom odnosu 2:1, zatim cenrifugiran (12 000 rpm, 10min);
- ✓ supernatant se prebaci u nove ependorf-epruvete i doda se 7,5M amonijumacetat (zapreminski odnos 2:1) i apsolutni etanol, zatim se cenrifugira (10 000 rpm; 10min)
- ✓ precipitirana DNK se rastvori u odgovarajućoj količini redestilovane vode i čuva se na +4°C ili -20°C

### 3.2.2. Detekcija *inv1* i *inv 22* gena *F8*

Detekcija *inv1* i *inv22* sprovedena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMDa, korišćenjem metode inverzne lančane reakcije polimeraze (IS PCR), prema IS PCR protokolu definisanom od strane Rossetia i saradnika, 2008. godine (Rosseti i sar., 2008). U odnosu na predloženi protokol sprovedene su izvesne modifikacije koje su se odnosile na optimizaciju koncentracije DNK, promene u koncentraciji sastojaka ligacione smeše i variranje dužine pojedinih procesa PCR reakcije. Ovim izmenama postignuta je bolja reproducibilnost i kvalitet dobijenih rezultata.

#### 3.2.2.1. IS-PCR protokol

Sprovođenje protokola za IS-PCR podrazumevalo je sledeće:

a) Digestija genomske DNK Bcl I enzimom

Genomska DNK podvrgnuta je digestiji Bcl I restrikcijom enzimom. Reakciona smeša od 50  $\mu$ l formirana je korišćenjem 5  $\mu$ l pufera G (komercijalni pufer, Promega), 2  $\mu$ l Bcl I (1 000 u) restrikcionog enzima, 20  $\mu$ l DNK uzorka koncentracije oko 500ng/ $\mu$ l (10ng) i H<sub>2</sub>O do konačne zapremine. Nakon mešanja i kratkog centrifugiranja na 13000 obrtaja, uzorci su inkubirani na 55°C, 4h u termobloku (Eppendorf, Nemačka).

b) Izolacija digestovane DNK

Nakon inkubacije, u cilju izolovanja DNK digestovane Bcl I enzimom, primenjena je standardna metoda ekstrakcije uz pomoć fenola i hloroforma (Ausubel i sar., 1987). Izvesne modifikacije sprovedene su radi prilagođavanja metode izolaciji izuzetno male količine DNK koju ju je u ovom slučaju bilo potrebno izdvojiti. Procedura je podrazumevala sledeće korake:

- ✓ posle kratkog centrifugiranja na 13000 obrtaja, u 50 $\mu$ l reakcione smeše sa digestovanom DNK doda se 100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O , 150 $\mu$ l fenola (pH 8) i 50 $\mu$ l hloroforma;
- ✓ konačna smeša se nakon mešanja na vorteksu centrifugirana na 13 000 obrtaja, 10 minuta;
- ✓ supernatant se prebaci u nove epruvete i doda 150-200 $\mu$ l hloroforma (1:1);
- ✓ nakon mešanja na vorteksu smeša se centrifugira na 13 000 obrtaja, 10 min;
- ✓ supernatant se prebaci u nove epruvete i doda 40 $\mu$ l amonijumacetata i 200 $\mu$ l apsolutnog etanola koji je čuvan na -20°C;
- ✓ nakon laganog mešanja, uzorak se centrifugira na 13 000 obrtaja, 15 minut;
- ✓ špricom se odbaci supernatant, a talog sa DNK ostavlja da se osuši na vazduhu nakon čega se rastvori u 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

### c) Ligacija

Ligacija DNK fragmenata i formiranje cirkularnih, B-ring struktura omogućeno je korišćenjem enzima ligaze.

Reakciona smeša zaprine 400  $\mu$ l kreirana je po uputstvu proizvođača (Promega) uz izvesne korekcije. U 50  $\mu$ l uzorka koji sadrži Bcl I enzimom digestovanu DNK dodato je 30  $\mu$ l 10 x pufera (komercijalni pufer) , 3  $\mu$ l ligaze (1000 U) i H<sub>2</sub>O do 400  $\mu$ l. Ova smeša je inkubirana 1h na 22°C , u termobloku (Eppendorf, Nemačka).

### d) Izolacija cirkularne DNK nakon ligacije

Nakon ligacije, cirkularne B-ring strukture DNK su izolovane primenom standardne metode ekstrakcije uz pomoć fenola i hloroforma (Ausubel i sar., 1987). Primenjene su modifikacije u cilju prilagođavanja metode izolaciji male količine DNK po sledećoj proceduri:

- ✓ u 400µl smeše sa uzorkom DNK, nakon ligacije doda se 300 µl fenola (pH 8) i 100 µl hloroforma;
- ✓ nakon mešanja na vorteksu uzorci su centrifugirani na 13000obrtaja, 10min;
- ✓ izdvoji se supernatant u koji se doda 150 µl 7,5M  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$  i 500 µl etanola čuvanog na  $-20^\circ\text{C}$ .
- ✓ nakon laganog mešanja uzorak se centrifugiran na 13000obrtaja, 15min;
- ✓ odbaci se supernatant, a talog se rastvori u 50 µl  $\text{H}_2\text{O}$ .

### e) PCR za detekciju inv1, inv22 i del22 i dupl22

U PCR reakciji korišćeni su uzorci cirkularne DNK, od 2 do 10 µl. Reakciona smeša je kreirana za zapreminu od 25 µl po uzorku, a sadržala je: 1U Taq polimeraze (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, SAD); 2,5mM  $\text{MgCl}_2$  (Applied Biosystems, SAD); 10xPCR pufer- $\text{MgCl}_2$  (Applied Biosystems, SAD) ,0,5 mM dNTPs (Fermentas, Nemačka), odgovarajuće 0,2 mM prajmere i  $\text{ddH}_2\text{O}$ .

Postavljene su tri posebne PCR reakcije sa tri različite kombinacije prajmera:

- ✓ IS-PCR reakcija za detekciju inverzije introna 1 u kojoj su korišćeni prajmeri 1-IU, 1-ID i 1-ED;
- ✓ IS-PCR reakcija za detekciju inverzije introna 22 u kojoj su korišćeni prajmeri IU, ID, 2U i 3U;
- ✓ cIS-PCR komplementarna reakcija za potvrdu inverzije introna 22 i detekciju delecija i duplikacija ovog regiona u kojoj su korišćeni prajmeri ED, IU, 2U i 3U.

Sekvence oligonukleotidnih prajmera navedene su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Oligonukleotidni prajmeri za IS-PCR reakciju i cIS-PCR reakciju

Oznaka prajmera	Sekvenca (5'-3')	Referenca
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT	(Rossetti i sar, 2005)
ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG	(Rossetti i sar, 2005)
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	(Rossetti i sar, 2005)
2U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC	(Rossetti i sar, 2008)
3U	CTCACATTGTGTCTTGTAGTC	(Rossetti et all, 2008)
1-IU	GCCGATTGCTTATTTATATC	(Rossetti et all, 2008)
1-ID	TCTGCAACTGGTACTCATC	(Rossetti et all, 2008)
1-ED	GCCTTTACAATCCAACACT	(Rossetti et all, 2008)

Sve PCR reakcije izvedene su pod sledećim uslovima: denaturacija uzorka na 94°C 30s, zatim amplifikacija u 30 ciklusa (56°C, 15 sekundi; 57°C, 20 sekundi; 72°C, 30 sekundi) i finalna elongacija na 72°C 10min. Za sprovođenje reakcija korišćen je aparat 2720 Thermal cycler ( Applied Biosystems, SAD).

### 3.2.2.2. Analiza produkata IS-PCR reakcije

Detekcija produkata IS-PCR reakcije je urađena na 2% agaroznom gelu koji je pripremljen na sledeći način: 2% rastvor agaroze (w/v) u 1xTBE puferu (45mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH 8,0) zagrejan je do ključanja; u gel je dodat EtBr u finalnoj koncentraciji 0,5 µg/ml; zagrejeni gel je potom ohlađen do temperature od oko 60°C; ohlađeni gel je naliven u kadicu za gel i ostavljen je da polimeriše. U ležišta je nanešeno 10µl produkta sa 5µl boje Orange G (Sigma-Aldrich, SAD) U posebno ležište na gelu nanešeno je i 10µl DNK standarda za veličinu (50kb, Fermentas, Nemačka) radi određivanja dužine produkata. Uzorci su putovali na horizontalnoj elektroforezi, 1h pri konstantnom naponu od 85V. Vizuelizacija produkata postignuta je na UV transiluminatoru (ETX-F20.M transiluminator, Vilder Lourmat, Francuska), a rezultati uvršteni u fotodokumentaciju.

Rezultati su interpretirani poređenjem sa DNK kontrolama poreklom od zdravih osoba, kao i od osoba pozitivnih za postojnje inv1 i inv22, na sledeći način :

- ✓ nakon IS-PCR reakcije za detekciju *inv1*, kod muških osoba signal veličine 304bp ukazuje na postojanje normalnog alela, bez *inv1*, dok signal od 224 bp ukazuje na postojanje alela sa *inv1*. Kod ženskih osoba, detekcija signala od 304 bp ukazuje na prisustvo dva normalna alela dok detekcija oba signala (304 i 224 bp) ukazuje na postojanje normalnog i alela sa *inv1* (tabela 3, slika 9a);
- ✓ nakon IS-PCR reakcije za detekciju *inv22*, kod muških osoba signal veličine 487 bp ukazuje na postojanje normalnog alela, bez *inv22*, ili alela sa duplikacijom introna 22 (*dupl22*), dok signal veličine 333 bp ukazuje na postojanje *inv22-1* ili delecija introna 22 tipa1 (*del22-1*), a signal veličine 385 bp na genotip sa *inv22-2* ili delecijom introna 22 tipa 2 (*del22-2*). Kod ženskih osoba, detekcija signala veličine 487bp ukazuje na prisustvo dva normalan alela ili normalnog i alela sa *dupl22*, a detekcija signala od 487 bp i 333 bp ili 385 bp, ukazuje na posojanje dva alela, jednog normalnog i jednog sa *inv22- 1* ili *del22- 1*, a u drugom slučaju sa *inv22- 2* ili *del22- 2* (tabela 4,slika 9b);
- ✓ nakon *cIS-PCR* reakcije dobija se konačna informacija za potvrdu postojanja *inv22* ,delecija i duplikacija introna 22. Kod muškaraca detekcija kombinacije signala veličine 475 i 405 bp ukazuju na prisustvo normalnog alela, detekcija signala veličine 559 i 457 bp na prisustvo alela sa *inv22-1*, a signala od 559 i 405bp na postojanje *inv22-2*. Detekcija sva tri signala (559, 475 i 405 bp) kod muškaraca ukazuje na prisustvo *dupl-22*, detekcija signala od 475bp na genotip sa *del22-1*, a singal od 405bp na postojanje *del22-2*. Kod ženskih osoba, detekcija signala veličine 457 bp i 405 bp, ukazuje na dva normalna alela ili prisusva *del22* na jednom alelu, dok detekcija tri signala (559, 475 i 405 bp) ukazuje na prisustvo jednog normalnog i alela sa inverzijom ili duplikacijom ( tabela 4, slika 9c);
- ✓ **Konačni rezultati analize za detekciju mutacija u regionu introna 22, dobijaju se kombinacijom IS-PCRa i cIS-PCRa (tabela 4).**

**Tabela 3.** Veličina produkata IS-PCRa za detekciju *inv1*

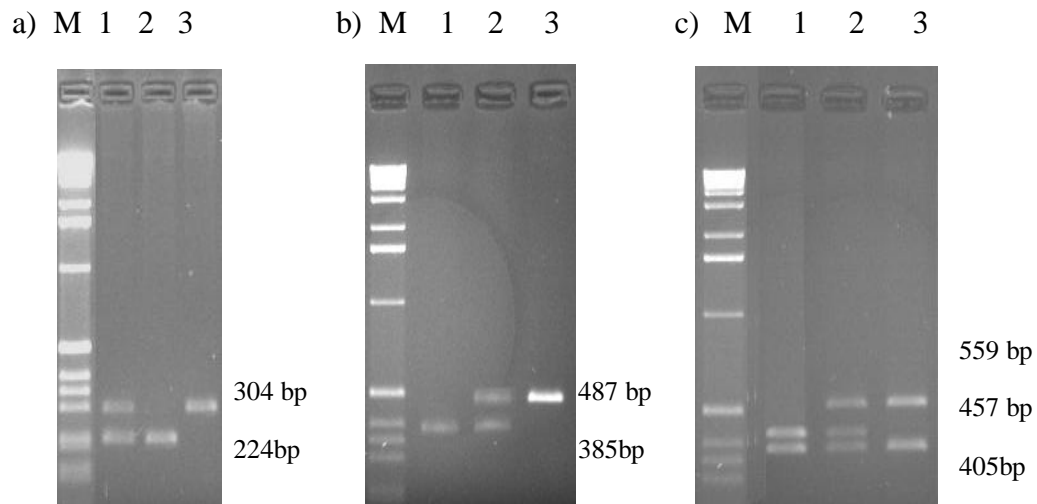
<i>Tip alela</i>	<i>Produkti IS-PCRa za Inv1 (bp)</i>
<i>Muškarci</i>	
N	304
<i>inv1</i>	224
<i>Žene</i>	
N/N	304
<i>inv1/N</i>	304,224

N-alel bez mutacije

**Tabela 4.** Veličina produkata IS-PCRa i *cIS-PCRa* za detekciju rearanžmana u *int22h*

<i>Tip alela</i>	<i>Produkti IS-PCRa za int22h rearanžmane (bp)</i>	<i>Produkti cIS-PCRa za int22h rearanžmane (bp)</i>
<i>Muškarci</i>		
N	487	457,405
<i>inv22-1</i>	333	559,457
<i>inv22-2</i>	385	559,405
<i>dupl22</i>	487	559,457,405
<i>del22-1</i>	333	457
<i>del22-2</i>	385	405
<i>Žene</i>		
N/N	487	457,405
<i>inv22-1/N</i>	487,333	559,457,405
<i>inv22-2/N</i>	487,385	559,457,405
<i>dupl22/N</i>	487	559,457,405
<i>del22-1/N</i>	487,333	457,405
<i>del22-2/N</i>	487, 385	457,405





**Slika 9.** Analiza produkata IS-PCRa i cIS-PCR na agaroznom gelu : a) IS-PCR za *inv1* (M-DNK marker , 1 – heterozigotni nosilac *inv1*, 2- pacijenta sa *inv1*, 3- kontrola bez *inv1* ); b) IS-PCR za *inv 22* (M-DNK marker , 1 – pacijenta sa *inv22*, 2- heterozigotni nosilac *inv22*, 3- kontrola bez *Inv22* ); c) cIS-PCR za *inv22* (M-DNK marker , 1 – kontrola bez *inv22*, 2- heterozigotni nosilac *inv22*, 3- pacijent sa *inv22*).

### 3.2.3. Detekcija delecija i duplikacija u genu *F8*

Detekcija velikih delecija i duplikacija (>0,5kb), sprovedena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMDa, a obuhvatila je primenu metoda za detekciju ovih promena nastalih u regionu introna 22, kao i velikih delecija i duplikacija kodirajućeg regiona *F8* gena.

Analiza za detekciju velikih delecija i duplikacija nastalih u regionu introna 22 sprovedene su primenom IS-PCR metode (IS-PCR i cIS-PCR) prema protokolu navedenom u predhodnom poglavlju (3.2.2.), dok je analiza kodirajućeg regiona sprovedena primenom MLPA metode.

### 3.2.3.1. Detekcija velikih delecija i duplikacija u kodirajućem regionu gena *F8*

U cilju detekcije velikih delecija i duplikacija (>0,5kb) uzorci su analizirani MLPA metodom. Procedura je izvedena korišćenjem komercijalnog SALSA MLPA kita, P178-B2 F8 (MRC-Holland, Amsterdam, Holandija) po standardnom MLPA protokolu uz minimalne korekcije radi optimizacije koncentracije korišćenih DNK uzoraka, a u cilju dobijanja preciznijih rezultata. Produkati MLPA reakcije su analizirani na kapilarnoj elektroforezi, ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems International Inc., Foster City, CA, USA) korišćenjem 500 LIZ® markera (Applied Biosystems, California, USA). Dobijeni podaci bili su obrađeni korišćenjem softvera Gene mapper verzija 4.0 (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD), a nakon toga analizirani i interpretirani pomoću softvera Coffalyser verzija 9 (MRC-Holland, Amsterdam, Holandija).

#### 3.2.3.1.1. Struktura SALSA MLPA kita P178-B2 F8

Kit P178-B2 F8 sadrži 45 MLPA proba za analizu regiona 27 egzona *F8* gena, veličine od 136 do 476 nukleotida (nt). Probama su obuhvaćeni svi egzoni ovog gena, osim egzona 23 koji je prisutan u drugačijoj transkripcionoj formi, pa njegovo umnožavanje na nivou genomske DNK nije informativno. Za egzone 1, 3, 12, 14 i 27 kit sadrži dve ili više proba dok su ostali analizirani korišćenjem pojedinačnih proba.

U okviru kita nalazi se 12 dodatnih proba sa drugih regiona X hromozoma, dve probe koje mapiraju u regionu Xq13, dve iz regiona Xp2 i po jedna iz regiona Xp22, Xq22, Xq27, Xq28, Xq26, Xq23, Xp1, Xq2. Takođe postoji i 9 kontrolnih fragmenata čiji su produkti manji od 120nt: četiri fragmenta za kvantifikaciju DNK (Q-fragmenti) veličine 64, 70, 76 i 82 nt; tri fragmenta za kontrolu denaturacije DNK (D-fragmenti) veličine 88, 92 i 96 nt; i po jedan fragment sa X i Y hromozoma veličine 100 i 105 nt (tabela5)

*Tabela 5. Mešavina proba SALSA MLPA P178-B2 F8 kita*

<i>Dužina (nt)</i>	<i>Naziv SALSA MLPA probe</i>	<i>Genomska pozicija</i>
64-70-76-82	Q-fragmenti *	/
88-92-96	D-fragmenti**	/
100	X-fragment***	X
105	Y-fragment****	Y
136	Referentna proba 07103-L14743	Xp22
142	<b>F8 proba 05610-L05060</b>	<b>F8 gen Egzon 1</b>
148	<b>F8 proba 05618-L05068</b>	<b>F8 gen Egzon 7</b>
154	<b>F8 proba 05627-L06055</b>	<b>F8 gen Egzon 14</b>
160	<b>F8 proba 05633-L05083</b>	<b>Exon 20</b>
166	Reference probe 02927-L03721	Xq27
172	<b>F8 proba 05612-L05062</b>	<b>F8 gen Egzon 2</b>
179	<b>F8 proba 05619-L14947</b>	<b>F8 gen Egzon 8</b>
186	<b>F8 proba 06290-L17545</b>	<b>F8 gen Egzon 6</b>
191	<b>F8 proba 05626-L17546</b>	<b>F8 gen Egzon 14</b>
197	<b>F8 proba 05634-L17547 1</b>	<b>F8 gen Egzon 2</b>
202	Referentna proba 13203-L14524	Xq13
209	<b>F8 proba 05611-L17548</b>	<b>F8 gen Egzon 1</b>
215	<b>F8 proba 05620-L17549</b>	<b>F8 gen Egzon 9</b>
221	<b>F8 proba 06288-L05892</b>	<b>F8 gen Egzon 5</b>
229	<b>F8 proba 05641-L05091</b>	<b>F8 gen Egzon 27</b>
238	Referentna proba 069-L06490	Xq22
247	<b>F8 proba 05617-L05067</b>	<b>F8 gen Egzon 7</b>
256	<b>F8 proba 05621-L05071</b>	<b>F8 gen Egzon 10</b>
265	<b>F8 proba 05628-L05078</b>	<b>F8 gen Egzon 15</b>
274	<b>F8 proba 07044-L05899</b>	<b>F8 gen Egzon 12</b>
283	Referentna proba 06035-L05490	Xq13
292	Referentna proba 02920-L02314	Xp21
298	<b>F8 proba 05614-L05891</b>	<b>F8 gen Egzon 4</b>
305	<b>F8 proba 06287-L06058</b>	<b>F8 gen Egzon 11</b>
313	<b>F8 proba 06506-L06340</b>	<b>F8 gen Egzon 3</b>
319	<b>F8 proba 05629-L05079</b>	<b>F8 gen Egzon 16</b>
328	<b>F8 proba 05637-L05087</b>	<b>F8 gen Egzon 24</b>
337	Referentna proba 02932-L02323	Xq28
346	Referentna proba 05125-L04515	Xq26
355	<b>F8 proba 05623-L05893</b>	<b>F8 gen Egzon 12</b>
364	<b>F8 proba 05630-L05080</b>	<b>F8 gen Egzon 17</b>
372	<b>F8 proba 14164-L15766</b>	<b>F8 gen Egzon 25</b>
382	Referentna proba 02908-L02302	Xq23
391	<b>F8 proba 07045-L05898</b>	<b>F8 gen Egzon 22</b>
400	<b>F8 proba 05624-L05074</b>	<b>F8 gen Egzon 13</b>
409	<b>F8 proba 05631-L05081</b>	<b>F8 gen Egzon 18</b>
418	<b>F8 proba 13707-L15181</b>	<b>F8 gen Egzon 26</b>
426	Referentna proba 13207-L14528	Xp11
434	Referentna proba 13118-L15558	Xq21
444	<b>F8 proba 05613-L14948</b>	<b>F8 gen Egzon 3</b>
452	<b>F8 proba 05625-L14949</b>	<b>F8 gen Egzon 14</b>
460	<b>F8 proba 05632-L14950</b>	<b>F8 gen Egzon 19</b>
468	<b>F8 proba 13708-L15182</b>	<b>F8 gen Egzon 27</b>
476	Referentna proba 01391-L01039	Xp21

\*DNK fragmenti značajni za kontrolu kvaliteta DNK uzorka, vidljivi kada je prisutno manje od 100ng DNK

\*\* Niski signali fragmenata 88 i 96nt ukazuju na nepotpunu denaturaciju

\*\*\* Fragmenti specifični za prisustvo X hromozoma

\*\*\*\* Fragmenti specifični za prisustvo Y hromozoma

### 3.2.3.1.2. MLPA protokol

Za kreiranje i sprovođenje MLPA reakcije, primenjen je preporučeni protokol za SALSA kit od strane MRC-Hollanda, uz minimalne korekcije.

I dan-DNK denaturacija i hibridizacija:

- ✓ 50-250 ng DNK rastvorene u TE ili dd H<sub>2</sub>O je denaturiše se na 98°C, 5 min;
- ✓ nakon DNK denaturacije, na temperature od 25°C, u svaku epruvetu sa uzorkom raspoređuje se hibridizaciona smeša koja sadrži: MLPA pufer (KCl, Tris-HCl, EDTA i PEG-6000. pH 8.5) i mešavina proba (Engl. synthetic oligonucleotides, oligonucleotides purified from bacteria, Tris-HCl, EDTA. pH 8.0) u zapreminskom odnosu 1:1;
- ✓ Smeša se inkubira 1 min na 95°C a zatim 16 – 20 h na temperaturi od 60°C.

II dan- ligaciona reakcija:

- ✓ temperature uzoraka se sa 60°C spuštaju na 54°C i u svaki uzorak raspoređuje ligaciona smeša koja sadrži: ddH<sub>2</sub>O, ligacioni pufer A (NAD (bakterijskog porekla, pH 3.5) i ligacioni pufer B (Tris-HCl, nejonski deterdžent, MgCl<sub>2</sub>. pH 8.5) u zapreminskom odnosu 1:1. Zatim se u uzorke doda enzim Ligase-65 (Glycerol, BRIJ (0.05 %), EDTA, Beta-Mercaptoethanol (0.1%), KCl, Tris-HCl. pH 7.5, Ligase-65 enzim bakterijskog porekla);
- ✓ uzorci se dalje inkubiraju na 54°C, 15 min a zatim se reakcija inaktivira inkubacijom na 20°C;
- ✓ do sledećeg koraka uzorci su čuvani na 4°C.

II dan-PCR reakcija:

Uzorci DNK su nakon ligacije podvrgnuti lančanoj reakciji polimeraze radi umnožavanja odgovarajućih fragmenata F8 gena. Reakciona smeša je postavljena tako što su kompletni produkti ligacije dodati u 10 µl PCR smeše koja sadrži:

ddH<sub>2</sub>O, SALSA(P178-B2 F8) PCR smešu prajmera (sintetički oligonukleotidi od kojih je jedan fluorescentno obeležen FAM) , dNTPs, Tris (HCl,KCl, EDTA, BRIJ (0.04 %). pH 8.0), SALSA polimerazu (Glicerol, BRIJ (0.5 %), EDTA, DTT (0.1 %), KCl, Tris-HCl, polimeraza enzim bakterijskog porekla, pH 7.5).

PCR reakcija je rađena pomoću aparat 2720 Thermal cycler ( Applied Biosystems, SAD), a postavljena je sa sledećim uslovima: 35 ciklusa (30s, 95°C; 30s 60°C; 60s, 72°C). Nakon elongacije od 20 min na 72°C reakcija je završena na 15°C.

Produkti PCR reakcije su čuvani na +4°C ili između -25°C i -15°C, zaštićeni od svetla.

### 3.2.3.1.3 Razdvajanje produkata kapilarnom elektroforezom

Produkti nakon MLPA i PCR reakcije su razdvojeni na kapilarnoj elektroforezi ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems International Inc., Foster City, Kalifornija, SAD).

Reakciona smeša koja je podvrgnuta elektroforezi sadržala je sledeće: 0,7µl PCR produkta uzorka, 0,2 µl 500 LIZ® (rastvor standarda veličine) (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) i 9 µl formamida. Ovako pripremljeni uzorci sipani su u ležišta na ploči, a zatim inkubirani radi denaturacije 2 min na 80°C. Denaturacija je prekinuta hlađenjem uzoraka koji su stavljeni u posudu sa ledom.

Uzorci su dalje podvrgnuti kapilarnoj elektroforezi za koju je na aparatu korišćena kapilara od 50cm i polimer POP7. Uslovi elektroforze su bili sledeći: voltaža prilikom injekcije 1.6 kV; injekciono vreme 15s.; voltaža kretanja produkata kroz kapilaru :10 kV; vreme kretanja produkata kroz kapilaru: 2 600s. Nakon toga usledila je analiza dobijeni MLPA profila za svakog pacijenta.

3.2.3.1.4. Obrada podataka

Dobijeni MLPA profili nakon kapilarne elektroforeze, obrađeni su pomoću softvera Genemapper verzija 4.0 (*Applied Biosystems, Kalifornija, SAD*), a potom analizirani i interpretirani korišćenjem softvera Coffalyser verzija 9 (*MRC-Holland, Amsterdam, Holandija*). Uzorci su prema vrednosti označenoj kao relativna visina pika (Engl. relative peak heights-RPH) upoređeni sa najmanje tri normalne kontrola. RPH za svaku probu unutar istog testa je dobijana tako što je visina pika svake specifične probe bila normalizovana deljenjem sa kombinovanim visinama kontrolnih proba. RPH svake probe je potom bila poređena sa RPH iste probe u kontrolnim uzorcima da bi se dobio odnos visine pika za svaku probu. Kontrolni uzorci su izabrani iz krvi muških osoba koje nisu obolele od HA. U Coffalyser analizi veličina pika pokazuje prisustvo normalnog egzona *F8* gena kada je odnos 0.7–1.3 u poređenju sa normalnom kontrolom; duplikaciju egzona kada je odnos >1.3; i nedostatak kada pokazuje odnos jednak (slika 10) .

	Probe target info	AllSamples					ReferenceSamples	
		H216r	H217 30 r	H217 30	H218 30	H218 30r	MR101	ctrl I
FRSS (n=7)	n/a	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CAS (n=5)	n/a	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%
FMPS	n/a	OK	Warni...	Warni...	Warni...	Warni...	OK	OK
PSLP - Relati...	n/a	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
PSLP - Relati...	n/a	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
RSD - Refere...	n/a	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
RPO - Refere...	n/a	Warni...	OK	Warni...	OK	OK	Warni...	Warni...
Xq (n=33)	F8-27	0.99	1.23	1.11	1.11	1.11	0.97	1.03
	F8-27	0.86	0.75	0.71	0.89	0.91	0.96	1.04
	F8-26	0.98	0.93	0.97	1.04	1.05	0.93	1.03
	F8-25	0.9	0.99	0.95	1.02	1.05	0.94	1.07
	F8-24	0.92	1	0.98	1.05	1.07	0.88	1.15
	F8-22	0.88	0.53	0.52	1.05	1.06	0.99	1.01
	F8-21	1.11	0.55	0.59	1.04	1.05	1.04	0.97
	F8-20	0.85	0.64	0.7	1.05	1.08	0.82	1.25
	F8-19	0.81	0.42	0.4	0.84	0.86	0.97	1.04
	F8-18	1	0.59	0.59	0.99	1.02	0.93	1.09
	F8-17	0.94	0.57	0.56	0.92	0.93	0.92	1.1
	F8-16	0.92	0.59	0.59	1.01	1.01	0.92	1.1
	F8-15	0.92	0.6	0.64	0.95	0.97	0.89	1.15
	F8-14	0.91	0.66	0.72	1.08	1.09	0.84	1.23
	F8-14	0.85	0.56	0.61	1.06	1.07	0.85	1.21
	F8-14	0.87	0.47	0.46	0.88	0.89	0.98	1.02
	F8-13	0.95	0.6	0.6	1	1.01	1.01	0.99
	F8-12	0.85	0.54	0.61	1	1.13	0.84	1.23
	F8-12	0.91	0.61	0.59	1.01	1.02	1	1
	F8-11	0.78	0.5	0.5	0.91	0.91	0.84	1.25
	F8-10	0.84	0.55	0.58	0.97	0.98	0.91	1.11
	F8-9	0.94	0.63	0.66	1.08	1.09	0.9	1.13
	F8-8	0.79	0.59	0.62	0.94	0.93	0.86	1.19
	F8-7	0.85	0.65	0.72	1.07	1.05	0.9	1.13
	F8-7	0.83	0.55	0.58	0.94	0.94	0.9	1.13
	F8-6	0.8	0.63	0.66	1.03	1.04	0.88	1.16
	F8-5	0.89	0.71	0.74	1.09	1.1	0.94	1.06
	F8-4	0.8	0.51	0.52	0.89	0.9	0.89	1.15
	F8-3	0.91	0.56	0.57	0.97	0.99	0.91	1.11
	F8-3	0.93	0.52	0.5	1	0.99	0.97	1.03
	F8-2	0.82	0.65	0.7	1	1	0.83	1.27
	F8-1	0.93	0.6	0.64	1.07	1.09	0.85	1.21
	F8-1	0.87	0.61	0.69	1.07	1.07	0.83	1.25
Reference*	X:022 061573	1.06	1.07	1.19	1.07	1.05	1.07	0.94
Reference*	X:028 515816	0.78	0.98	1	0.89	0.9	0.86	1.2
Reference*	X:032 339883	0.94	0.92	0.89	1.03	1.04	0.89	1.15
Reference*	X:043 694101	0.97	1.03	0.99	1.05	1.05	1.01	0.99
Reference*	X:053 159658	1.17	0.85	0.87	0.85	0.88	1.17	0.88
Reference*	X:070 361320	1.01	0.99	1.03	1.01	1.03	1.09	0.93
Reference*	X:085 042653	1.08	0.97	0.94	1.04	1.07	0.93	1.08
Reference*	X:100 516201	1.27	0.87	0.92	1.02	1.02	1.17	0.88
Reference*	X:110 253034	1.01	1.13	1.1	1.01	1.01	0.99	1.01
Reference*	X:132 267467	0.9	0.97	0.96	1	1	0.92	1.1
Reference*	X:146 821895	1.14	1.07	1.12	1.02	1.03	1.04	0.96
Reference*	X:147 845306	0.9	0.94	0.94	0.9	0.91	0.96	1.05

Slika 10. Rezultati Coffalyser analize produkata MLPA reakcije

### 3.2.4. Presekvencioni skrining

Presekvencioni skrining za izdvajanje egzonskih regiona *F8* gena sa promenama, radi sekvenciranja i preciznog definisanja eventualnih mutacija podrazumevao je primenu PCR-SSCP metode (Orita i sar., 1989). Najpre je sprovedena PCR amplifikaciju egzona gena *F8*, koji su dalje analizirani primenom SSCPa.

#### 3.2.4.1. PCR reakcija za amplifikaciju egzona *F8* gena

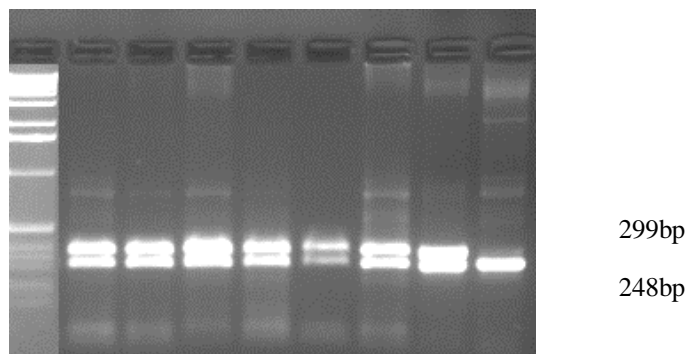
U Laboratoriji za medicinsku genetiku IMDa, pomoću PCR reakcije sprovedeno je umnožavanje 6 egzona gena *F8*: egzon 3, 4, 9, 13, 19 i 23. Korišćeni su uzorci genomske DNK, od 2 do 10 ng. Reakciona smeša je kreirana za zapreminu od 25  $\mu$ l po uzorku, a sadržala je: 1U Taq polimeraze (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, SAD); 2,5mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, SAD); 10xPCR pufer–MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, SAD), 0,5 mM dNTPs (Fermentas, Nemačka), odgovarajuće 0,2mM prajmere i ddH<sub>2</sub>O (tabela 6). Svaka PCR reakcije kreirana je sa četiri prajmera za po dva egzona (multipleks PCR) a izvedene je pod sledećim uslovima: denaturacija uzorka na 94o C 2 min, zatim amplifikacija u 35 ciklusa (94°C, 30s; 65°C, 30s; 72°C, 30s) i zatim čuvanje na 4°C. Za sprovođenje reakcija korišćen je aparat 2 720 Thermal cycler (Applied Biosystems,SAD).

**Tabela 6.** *Prajmeri za PCR reakciju umnožavanja egzona 3, 4, 9, 13, 19 i 23 gena F8 (HAMSTeRS)*

<i>Oznaka prajmera</i>	<i>Sekvenca (5'-3')</i>	<i>Veličina produkta (bp)</i>
F8EX3F F8EX3R	GCATGCTTCTCCACTGTGAC GCCACCATTACAAAGCACAC	299
F8EX4F F8EX4R	CATGTTTCTTTGAGTGTACAGTGG TTCAGGTGAAGGAACACAAATG	372
F8EX9F F8EX9R	TTTGAGCCTACCTAGAATTTTCTTC GGTATTTTAGAAACTCAAACCTCTCC	300
F8EX13F F8EX13R	CATGACAATCACAATCCAAAATA CATGTGAGCTAGTGGGCAA	364
F8EX19F F8EX19R	AACCAATGTATCTCATGCTCATTTT GGAAGAAAGCTGTAAAGAAGTAGGC	248
F8EX23F F8EX23R	TTGACAGAAATTGCTTTTTACTCTG TCCCCAGTCTCAGGATAACT	294

Kvalitet PCR produkata proveren je elektroforezom na 0,8 % agaroznom gelu sa EtBr finalne koncentracije 0,5 µg/ml koji se koristi za vizuelizaciju produkata. Produkti su analizirani posmatranjem gela na transiluminatoru (ETX-F20.M transilluminator, Vilder Lourmat, Francuska). Dužina dobijenih PCR produkata je određivana poređenjem sa DNK standardom za veličinu (1kb, Fermentas, Nemačka) (slika 11).





*Slika 11. Analiza produkata multipleks PCR za umnožavalje egzona 3 i 19 na agaroznom gelu*

#### 3.2.4.2. SSCP metoda

Nakon umnožavanja navedenih egzona, sprovedena je SSCP metoda u cilju izdvajanja umnoženih PCR produkata egzona sa razlikama u strukturi u odnosu na normalnu kontrolu. SSCP metoda je sprovedena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, prema standardnoj proceduri uz modifikacije koje su se odnosile na optimizaciju uslova ( % poliakrilamidnog-PPA gela, % umreženosti-C, % glicerina, RT, V/h) kako bi se dobili što bolji SSCP profili. Procedura rada je podrazumevala sledeće postupke:

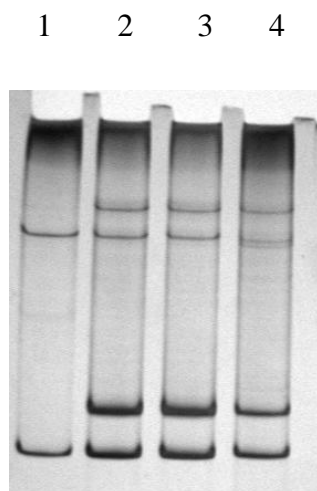
- ✓ uzorci egzona, umnoženi PCRom, razblaženi su sa ddH<sub>2</sub>O u odnosu 1:1;
- ✓ 3,5 µl razblaženog uzorka rastvoreno je u 3,5 µl ddH<sub>2</sub>O;
- ✓ od toga je 4 µl rastvoreno sa 5 µl ddH<sub>2</sub>O i 10 µl boje u formamidu (95% formamid, 20 mM EDTA, 0.05% ksilen-cijanol, 0.05% brom-fenol plavo). Odnos boje i formamida u odnosu na preporuku standardne metode;
- ✓ uzorci su dalje inkubirani u ključaloj vodi, a zatim prebačeni na led (1minut).

Najpre su obrađeni uzorci pojedinačnih umnoženih egzona, zatim smeše njihovih parova koje su dalje korišćenje za tumačenje uzoraka dobijenih multipleks PCR reakcijama sa umnoženim sledećim parovima egzona: 3 i 19, 4 i 9, 13 i 23.

Detekcija SSCP profila uzoraka iz multipleks PCR reakcija sprovedena je korišćenjem PPA gela, obojenog srebro-nitratom i to pod sledećem uslovima, opimiziranim za svaki tip analizirane grupe egzona:

- ✓ za egzon 3 i egzon 19 : 8% PAA gel, %C = 2.6, 10% glicerina , 0.5x TBE, RT<sup>0</sup> , 190 – 210V/4h;
- ✓ za E4 i E9: 8% PAA gelu, %C = 3.4, 10% glicerina, 0.5x TBE, RT<sup>0</sup> , 200V/4h ili na 8% PAA gelu, %C = 2.6, 1 TBE, 4<sup>0</sup>C, 220V/4.5h;
- ✓ za E13 i E23: 7% PAA gelu, %C = 2,56, 10% glicerina, 0.5x TBE, RT<sup>0</sup> , 200V/4h.

Analiza je sprovedena poređenjem uzoraka pacijenta sa uzorcima normalnih kontrola, a rezultati uvršteni u fotodokumentaciju (slika 12).



**Slika 12.** Rezultati SSCP metode na PAA gelu obojenom srebro-nitratom (1-profil pojedinačnog egzona 23 normalne kontrole; 2-profil egzona 13 i 23 normalna kontrola; 3-profil egzona 13 i 23 pacijenta I; 4- profil egzona 13 i 23 pacijenta II)

### 3.2.5. Sekvenciranje

Nakon presekvencionog skrininga, izdvojena je grupa pacijenata sa sumnjom na prisustvo eventualne mutacije u egzonima 9, 13 i 23. Sintetisani su PCR produkti ovih egzona (protokol iz poglavlja 3.2.4.1), a zatim je priprema i određivanje njihove sekvence urađeno primenom metode direktnog sekvenciranja u Laboratoriji za genetiku, Instituta za neurologiju Kliničkog centra Srbije.

#### 3.2.5.1. Priprema uzoraka za reakciju sekvenciranja

PCR uzorci koji će se sekvencirati prvo su prečišćeni od ostataka neugrađenih prajmera i nukleotida, koji bi mogli uticati na reakciju sekvenciranja. Prečišćavanje je vršeno enzimima Exonuclease I (Exo I) (Fermentas, Nemačka) i Shrimp alkaline phosphatase (SAP) (Fermentas, Nemačka). Reakcija je pripremana sa 5 µl PCR produkta u koji se dodaje 10 U Exo I i 2 U SAP enzima. Smeša je zatim inkubirana 15 min na 37°C, a zatim 15 minuta na 80 °C radi inaktivacije enzima.

#### 3.2.5.2. Reakcija sekvenciranja

Reakcija sekvenciranja pripremana je upotrebom BigDye Terminator Ready Reaction kita (Applied Biosystems, SAD). Protokol za pripremu reakcije sekvenciranja BigDye Terminator Ready Reaction kitom dat je u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Protokol za pripremu reakcije sekvenciranja

<i>Komponente</i>	<i>Količina (µl)</i>
Ready Reaction Premix v3.1 (2,5x)	0,8
Big Dye Sequencing Buffer (5x)	2
Prajmer (10 pmol/µl)	2
PCR produkt	*
Dejonizovana voda	do 10

\* Količina PCR produkta koja se dodaje je 3-10 ng za PCR produkte od 200-500 bp i 10-40 ng za PCR produkte od 500-1000 bp.

PCR reakcije su izvodene u GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 ili Veriti (AppliedBiosystems, SAD) PCR mašini po programu koji se sastoji od inicijalne denaturacije 1 min na 96°C i 25 ciklusa amplifikacije. Svaki ciklus amplifikacije se sastoji od denaturacije 10s na 96°C, hibridizacije 5s na 50°C i elongacije 4 min na 60°C. Nakon završetka amplifikacije uzorci se čuvaju na 4°C.

### 3.2.5.3. Prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja etanol/Na-acetat precipitacijom

Pre analize produkata reakcije sekvenciranja na automatskom sekvenatoru oni se prečišćavaju od ostataka fluorescentno obeleženih ddNTP-ova.

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavani etanol/Na-acetat precipitacijom. Preostali talog prečišćenih obeleženih DNK fragmenata rastvoren je u dejonizovanom formamidu, i denaturisan. Procedura je dalje podrazumevala sledeće:

- ✓ u 10 µl produkta reakcije sekvenciranja dodato je 10 µl dejonizovane vode, 2 µl 3M Na-acetata i 50 µl 99% etanola. Sve je promešano izvrtanjem tubice i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi;
- ✓ uzorak je dalje centrifugiran 15 minuta na 13 000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor FA-45-30-11, Eppendorf, Nemačka) i nakon toga odbačen supernatant;
- ✓ u supernatant je dodato 70 µl 70% etanola, zatim je uzorak centrifugiran 10 minuta na 13000 rpm i nakon toga odbačen supernatant;
- ✓ precipitata je osušen 2 minuta na 90 °C;
- ✓ dodato je 20 µl dejonizovanog formamida (HiDi Formamide, AppliedBiosystems, USA), vorteksovano i zatim spovedena denaturacija 2 minuta na 95 °;
- ✓ uzorci su čuvani na ledu do puštanja na automatski sekvenator.

## 3.2.5.4. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja

Elektroforeza prečišćenih produkata reakcije sekvenciranja vršena je na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD). Prikupljanje „sirovih“ podataka (Engl. Raw data) sekvenci, kao i kontrola celog procesa automatskog sekvenciranja, sprovedena je se uz pomoć 310 Data Collection softvera (Applied Biosystems, SAD).

Elektroforeza je vršena na 15kV i 50°C (Run module Seq POP6 Rapid 1ml E.md4), a uslovi vezani za injektiranje uzorka i dužina elektroforeze za pojedine fragmente dati su u Tabeli 8. Za elektroforezu je korišćen polimer POP6 (Applied Biosystems, SAD) i kapilara od 47 cm.

**Tabela 8.** Uslovi injektiranja uzorka i dužina elektroforeze na automatskom sekvenatoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

<i>Egzoni</i>	<i>Injekciono vreme (s)</i>	<i>Injekciona voltaža (kV)</i>	<i>Trajanje elektroforeze (min)</i>
9	20	1,5	38
13	25	2	42
23	12	2	39

## 3.2.5.5. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem

Sirovi podaci prikupljeni 310 Data collection softverom tokom kapilarne elektroforeze obrađivani su u Sequencing Analysis v5.3.1 softveru (Applied Biosystems, SAD).

Ovako dobijene sekvence su analizirane, odnosno poređene se sa wt sekvencama koje su preuzete iz Ensembl baze podataka (<http://www.ensembl.org/index.html>). Poređenje je vršeno pomoću Sequencher 4.10.1 Demo softvera (Gene Codes Corporation, SAD).

Za sve detektovane promene u sekvenci se proverava da li su opisane u nekoj od baza podataka i da li postoji opisan njihov patološki značaj. Dve najveće baze podataka koje su korišćene su dbSNP v135 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) i HGMD (Engl. The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.org>). Osim ovih, korišćene su i baze podataka specifične za određene gene (HAMSTeRS i FVIII Mutation database)

Potencijalni patološki značaj detektovanih promena je predviđan i *in silico*, korišćenjem MutationTaster softvera (<http://www.mutationtaster.org>). Ovim programom se predviđa da li je testirana promena sekvence mutacija koja dovodi do oboljevanja ili je reč o polimorfizmu. Za svako predviđanje dobija se i p vrednost (nije isto što i p vrednost iz statističkih testova) koja govori o verovatnoći predikcije, tj. što je p vrednost bliža jedinici to je predikcija „sigurnija“. Osim toga, program vrši i analizu konzerviranosti aminokiselina pogođenih promenom i to tako što poredi humanu sekvencu sa homologim sekvencama kod deset vrsta životinja (od vinske mušice do šimpanze).

### **3.2.6. PCR reakcija za detekciju pola**

Molekularne analize za detekciju pola fetusa sprovedene su u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMDa. Tom prilikom korišćena je PCR metoda za umnožavanje Y-specifične sekvence (ponovljene sekvence iz DYZ1 porodice dužine 3,4 kb) (McPherson i sar., 1991).

Reakciona smeša je kreirana za zapreminu od 25  $\mu$ l po uzorku, a sadržala je: 1U Taq polimeraze (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, SAD); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, SAD); 10xPCR pufer–MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, SAD), 2 mM dNTPs (Fermentas, Nemačka), odgovarajuće 50 pM prajmere i ddH<sub>2</sub>O (tabela 9).

**Tabela 9.** Prajmeri za PCR reakciju detekcije pola

Oznaka prajmera	Sekvenca (5'-3')	Veličina produkta (bp)
Y1	TTCACTTTATTCCAGGCCTGTCC	154
Y2	TTGAATGGAATGGGAACGAATGG	

PCR reakcija je rađena pomoću aparat 2 720 Thermal cycler ( Applied Biosystems, SAD), a postavljena je sa sledećim uslovima: 20 ciklusa (30s ,95°C; 30s 58°C; 30s, 72°C). Nakon elongacije od 2 min na 72°C reakcija je završena na 4°C.

Detekcija produkata IS-PCR reakcije je urađena na 2% agaroznom gel, na horizontalnoj elektroforezi, 1h pri konstantnom naponu od 85V. Vizuelizacija produkata postignuta je na UV transiluminatoru (ETX-F20.M transilluminator, Vilder Lourmat, Francuska), a rezultati uvršteni u fotodokumentaciju. Prisustvo PCR produkta veličine 154 bp određuje muški pol, dok odsustvo signala potvrđuje prisustvo ženskog pola.

### **3.2.7. Citogenetička i molekularno – citogenetička (FISH) analiza limfocita periferne krvi**

Citogenetičke metode za analizu kariotipa limfocita periferne krvi i analiza FISH metodom, koje su urađene u Laboratoriji za medicinsku genetiku IMD-a, podrazumevale su kultivisanje i preparaciju limfocita, a zatim citogenetičku i molekularno-citogenetičku analizu (Gersen i sar., 2005).

#### **3.2.7.1. Kultivisanje limfocita periferne krvi**

Uzorak od 3 ml periferne krvi (0,5 ml rastvora heparina sa 2,5 ml krvi) je zasaden u 2 sterilne epruvete sa po 4,5 ml prethodno pripremljene podloge (RPMI 1640 sa 20% seruma (Engl. foetal bovine serum-FBS), 1% antibiotika (streptomycin i penicilin) i 1% fitohemoaglutinina (Engl. Phytohaemoagglutinin-PHA) i položen u termostat na 37 °C.

#### **3.2.7.2 Preparacija hromozoma iz kulture limfocita periferne krvi**

Nakon 70 h kultivacije u kulture je ubačen kolcemid (radni rastvor 12,5 µg/ml) u finalnoj koncentraciji od 2,5 µg/ml. Dva sata nakon ubacivanja kolcemida, ćelijske kulture se:

- ✓ resuspenduju i centrifugiraju 10 min na 25000 obrtaja;
- ✓ odliva se supernatant, talogu se dodaje 1ml hipotoničnog rastvora (5,6% KCl i 3,8% Na-citrat u odnosu 1:1) i talog se resuspenduje;
- ✓ dodaje se još 9 ml istog hipotoničnog rastvora i ostavlja u termostatu 20 min na 37°C;
- ✓ u svaku epruvetu dodaje se po 5 kapi tritona i centrifugira na 2500 obrtaja 10 min;



- ✓ supernatant se odliva, a u talogu se dodaje 1 ml fiksativa ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  i  $\text{CH}_3\text{OH}$  u odnosu 1:3), talog se resuspenduje, dopuni fiksativom do 10 ml i ostavlja na sobnoj temperaturi 20 min. Zatim sledi centrifugiranje na 2500 obrtaja 10 min;
- ✓ supernatant se odliva, talogu se dodaje 1 ml fiksativa, resuspenduje se i centrifugira na 2500 obrtaja 10 min;
- ✓ supernatant se odliva, a talogu, zavisno koliko ga ima, dodaje 3 – 4 kapi fiksativa i 3 – 4 kapi 60% sirćetne kiseline;
- ✓ na čistu prethodno ohlađenu i opranu staklenu pločicu nakapava se 2 – 3 kapi materijala koji se suši preko plamena.

Bojenje hromozoma po Gimzi se vrši tako što se „Gimza“ boja rastvori u fosfatnom puferu pH 7,6 (4,14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 0,35 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 500 ml destilovane vode) u odnosu 1:10 i tako napravljenim rastvorom preparat boji 7 – 10 min.

### 3.2.7.3. Tehnika G traka

Bojenje hromozoma tehnikom G traka urađeno je tako što je preparat izložen dejstvu rastvora 0,25% tripsina i GKN-a (80 mg  $\text{NaCl}$ , 4 mg  $\text{KCl}$  i 10 mg glukoze u 10 ml destilovane vode) u odnosu 1:1 u trajanju od 1 – 2 sekunde, zatim ispiran fosfatnim puferom pH 6,8 (2,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 0,48 g limunske kiseline u 500 ml destilovane vode) i obojen rastvorom Gimze 7 – 10 min.

### 3.2.7.4. Citogenetička analiza kariotipa

Analizirano je 50 metafaznih figura. Za standardnu analizu kariotipa korišćeni su konvencionalno obojeni hromozomski preparati a za preciznu identifikaciju i analizu hromozoma primenjena je tehnika G traka. Preparati su analizirani na svetlosnom mikroskopu (Zeiss, Nemačka).

### 3.2.7.5. Molekularno-citogenetička analiza FISH metodom

Analiza je urađena primenom FISH probe za detekciju centromernog regiona X hromozoma, Xp11.1-q11.1 (DXZ1) (Cytocell, Velika Britanija) prema sledećem protokolu predloženom od strane proizvođača uz minimalne korekcije:

a) kodenaturacija probe i preparata (staklena pločica sa fiksiranim materijalom): 10 $\mu$ l probe se nakapava na preparat, pokriva pokrovnim staklom i inkubira 7 minuta na 75°C u termobloku (Eppendorf, Nemačka);

b) hibridizacija: preparati se u vlažnoj komori inkubiraju na 37°C, 12 do 16h;

c) ispiranje preparata: uklanjaju se pokrovna stakla i preparati se inkubiraju u 0,25M SSC rastvoru, 2 min. na 72°C;

d) vizuelizacija se ostvaruje tretiranjem preparata sa 10 $\mu$ l DAPI suspenzijom, preko čega se polažu pokrovna stakla.

Detekcija signala sprovedena je mikroskopiranjem pomoću svetlosnog mikroskopa (Zeiss, Nemačka) uz korišćenje filtra za detekciju fluorescencije (DAPI, Avidinifc, Texasred). Analiza podrazumeva detekciju minimum 100 jedara i 50 metafaznih figura.

### 3.2.8. Statistička analiza

U obradi i analizi dobijenih podataka u cilju određivanja korelacije prisustva genotipa sa mutacijom (inv1, inv22 ili velikom delecijom) i fenotipa sa blagim, umerenim ili teškim kliničkim oblikom hemofilije A, kao i za određivanje korelacije genotipa sa inverzijom introna 22 i prisustva inhibitora FVIII kod pacijenta sa teškim oblikom hemofilije A korišćene su sledeće statističke **metode univarijantne statističke analize**:

- ✓ Deskriptivna statistika za opis podataka
- ✓ Pirsonov Hi kvadrat test za utvrđivanje postojanja veze između parametara

- ✓ Hi kvadrat Likelihood Ratio test za utvrđivanje postojanja veze između parametara
- ✓ Hi kvadrat test za jednakost raspodele parametara

U cilju obrade podataka korišćen je statistički paket SPSS (IBM SPSS Inc., SAD). Analize su rađene sa verovatnoćom od 95%, tj. smatra se da između određenih grupa bolesnika postoji statistički značajna razlika ukoliko je vrednost verovatnoće manja od 0,05 ( $p \leq 0.050$ ).

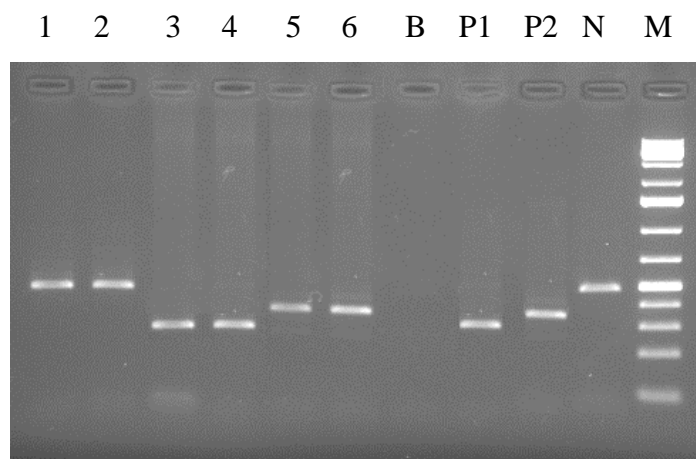
- Obradeni podaci i dobijeni rezultati su prikazani tabelarno.

## **4. REZULTATI**

## **4.1. Određivanje distribucije mutacija u F8 genu kod obolelih od HA**

### **4.1.1 Detekcija i učestalost inv22 u F8 genu**

Analiza za detekciju inv22 u F8 genu, urađena je kod 71 pacijenta sa dijagnozom HA, primenom metode IS-PCRa (slika 13).



**Slika 13.** Analiza produkata IS-PCRa za inv22 na agaroznom gelu kod pacijenata obolelih od HA ( 1, 2 - uzorci pacijenata bez inv22 ; 3,4-uzorci pacijenata sa inv22 -1; 5,6-uzorci pacijenata sa inv22-2; B-blank; P1 -pozitivna kontrola za inv22 tip1; P2 - pozitivna kontrola za inv22 tip2; N- negativna kontrola; M-50kb marker)

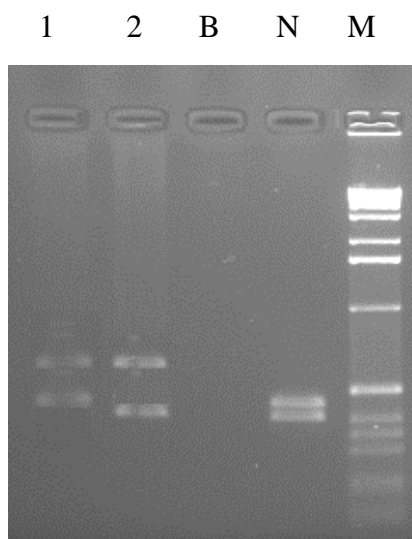
Uočeno je da je inv22 uzrok bolesti kod 20/71 (28,1%) pacijenata, a među nosiocima mutacije detektovani su pacijenti sa inverzijom tipa 1 ili tipa 2. Kod njih 16 /71 (22,5%) detektovana je inv22-1, dok je kod preostala 4/71 (5,6%) pacijenta sa inverzijom, ova aberacija bila uočena u obliku inv22-2.

Rezultati analiza kod 51/71(67,6%) pacijenta bili su negativni (tabela 10).

**Tabela 10.** Ukupna učestalost *inv22* i pojedinačne učestalosti za oba tipa inverzije (tip 1 i tip 2) u analiziranom uzorku pacijenata

<i>inv 22</i>		Broj pacijenata	Učestalost (%)
Pozitivni	<i>inv22-1</i>	16	22,5
	<i>inv22-2</i>	4	5,6
	Ukupno	20	28,1
Negativni		51	71,9
Ukupno		71	100

Dobijeni rezultati primenom metode IS-PCRa su, prema protokolu, provereni metodom komplementarnog, c IS-PCR (slika 14).



**Slika 14.** Analiza produkata *cIS-PCRa* za *inv22* na agaroznom gelu kod pacijenata obolelih od HA ( 1- uzorak pacijenata sa *inv22-1*; 2-uzorak pacijenata sa *inv22-2*; B blank; N- negativna kontrola; M-50kb marker)

Korišćenjem ove metode analizirano je svih 71 pacijenata koji su prethodno bili obrađeni metodom IS-PCRa. Kod pacijenata označenih rednim brojevima H1-16, kod kojih je analiza primenom IS-PCR metode pokazala prisustvo genotipa sa inv22-1, ovaj nalaz je potvrđen i primenom metode cIS-PCRa. Isto tako i kod pacijenata kod kojih je primenom metode IS-PCR-a dijagnostikovano prisustvo inv22 -2 (H17-20), ovaj rezultat je potvrđen i analizom cIS-PCR metodom. Rezultati obe analize su takođe pokazali apsolutno poklapanje i kod pacijenata za koje je utvrđeno da nisu nosioci inv22 (H21-71) (tabela 11) .

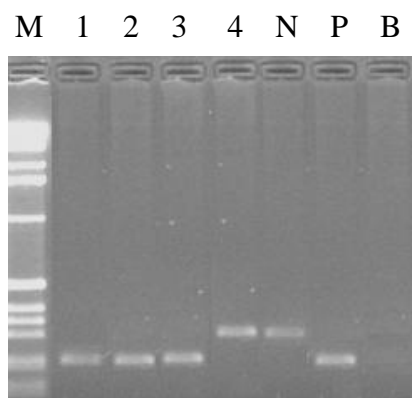
**Tabela 11.** *Uporedni prikaz rezultata IS-PCRa i cIS-PCRa za detekciju inv22 u grupi analiziranih pacijenata*

<i>N° Pacijenta</i>	<i>IS-PCR genotip</i>	<i>cIS-PCR genotip</i>
H1-16	inv22 -1	inv22 -1
H17-20	inv22 -2	Inv22- 2
H21-71	inv22 neg	inv22 neg

N°-redni broj; inv22 neg- genotip bez mutacije

#### **4.1.2. Detekcija i učestalost inv1 u F8 genu**

U cilju detekciju inv1, analizirana je ista grupa od 71 pacijenata sa dijagnozom HA primenom metode IS-PCRa (slika 15).



**Slika 15.** Analize produkata IS-PCRa za *inv1* na agaroznom gelu, kod pacijenata obolelih od HA (M-50kb marker; 1, 2, 3 - uzorci pacijenata sa *inv1*; 4-uzorak pacijenta bez *inv1*; N- negativna kontrola ; P -pozitivna kontrola; B-blank)

Analiza uzoraka pokazala je postojanje *inv1* kod 3/71 obolelog, što predstavlja učestalost pomenute mutacije od 4,2 % u datom uzorku. Za 68/71 (95,8%) pacijenata rezultati analize bili su negativni (tabela 12).

**Tabela 12.** Učestalost *inv1* u analiziranom uzorku HA pacijenta metodom IS-PCRa

<i>inv1</i>	Broj pacijenata	Učestalost (%)
Pozitivni	3	4,2
Negativni	68	95,8
Ukupno	71	100



#### **4.1.3. Uporedna analiza prisustva inv22 i inv1 u *F8* genu**

Detekcija inv22 i inv1, korišćenjem IS-PCRa rađene su uporedo kod svih pacijenata sa kliničkom slikom HA. Nakon završene analize za svakog analiziranog pacijenta pojedinačno, bio je poznat status nosioca gore pomenutih mutacija u *F8* genu.

Uporedne analize su pokazale da su oboleli kod kojih je mutacija detektovana bili nosioci ili inv22, ili inv1. Prisustvo obadve aberacije nije detektovano ni kod jednog pacijenta u okviru obrađene grupe (0/71 ili učestalost od 0%).

#### 4.1.4. Detekcija i učestalost velikih delecija i duplikacija u *F8* genu

Detekcija velikih delecija i duplikacija u ispitivanom uzorku rađene su primenom:

- IS-PCR i cIS-PCR metoda u cilju detekcije delecija i duplikacija u okviru introna 22 gena *F8*.

- MLPA metode za određivanje prisustva velikih delecija i duplikacija u kodirajućem delu *F8* gena.

Detekcija delecija i duplikacija introna 22, kombinacijom IS-PCRa i cIS-PCRa, urađene su uporedo sa analizama za detekciju inverzija, u uzorku od 71 pacijenta sa kliničkom dijagnozom HA. Rezultati su bili negativni za sve obrađene pacijente, tj. nije uočeno prisustvo delecija i duplikacija introna 22 ni kod jednog analiziranog pacijenta (0/71; učestalost od 0%).

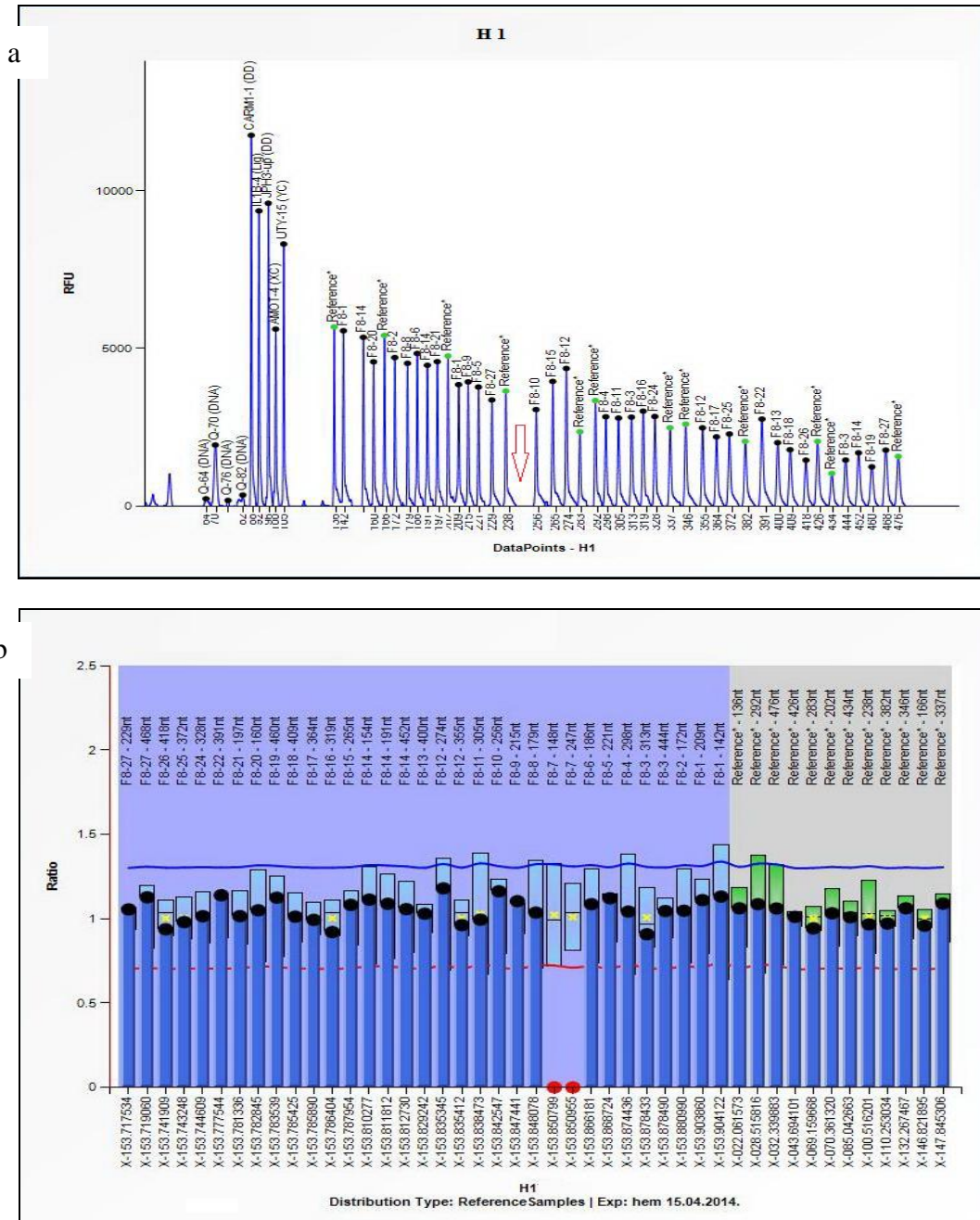
Detekcija velikih delecija i duplikacija primenom MLPA metode urađena je kod 20/71 pacijenata, kod kojih su rezultati testiranja na prisustvo inv22 i inv1 bili negativni.

Rezultati su pokazali postojanje mutacije kod 3/20 (15%) pacijenata, dok kod 17/20 (85%) obolelih, prisustvo delecija i duplikacija u kodirajućem regionu gena *F8* nije detektovano (tabela 13).

**Tabela 13.** Rezultati analize velikih duplikacija i delecija gena *F8* primenom MLPA metode u uzorku pacijenata sa HA

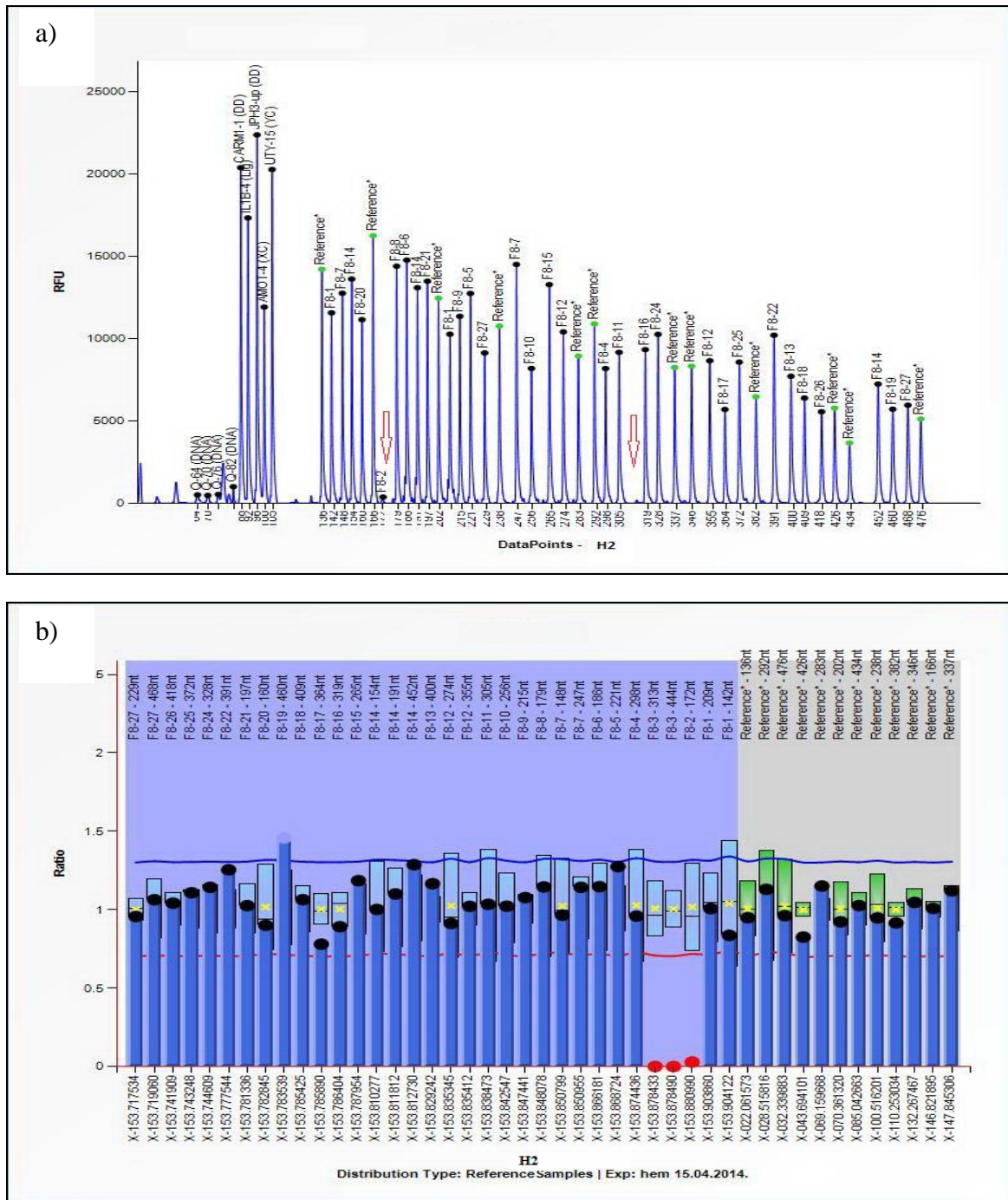
<i>Genotip sa mutacijom</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
Pozitivni	3	15
Negativni	17	85
Ukupno	20	100

Kod pacijenta označenog rednim brojem H1 uočena je delecija egzona 7 na osnovu potpunog odsustva signala u poređenju sa kontrolnim vrednostima u tom regionu (slika 16).



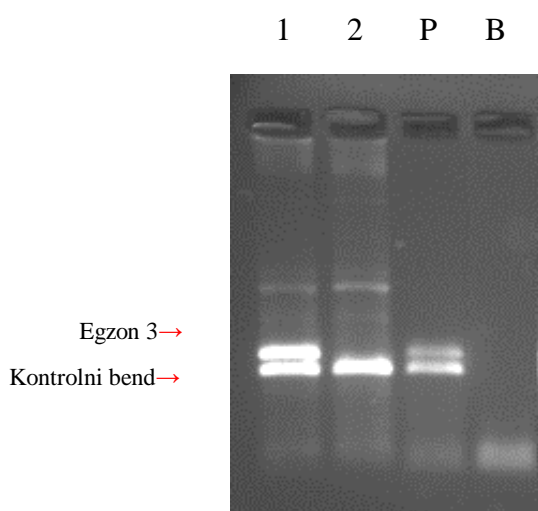
Slika 16. a) Elektroferogram pacijenta H1 (crvena strelica - odstupanje od kontrolnog uzorka; b) dijagram odnosa dobijenih vrednosti kod pacijenat H1 i kontrolnog uzorka

Potpuno odsustvo signala, kod pacijenata H2 i H3 uočeno je u regionu egzona 2 i egzona 3 (slika 17).



*Slika 17. a) Elektroferogram pacijenta H2 (crvena strelica - odstupanje od kontrolnog uzorka); b) dijagram odnosa dobijenih vrednosti kod pacijenat H2 i kontrolnog uzorka*

Kod pacijenata H2 i H3 je nakon MLPA analize, učinjena i kontrolna analiza PCR metodom za umnožavanje egzona 3 čiji su rezultati bili negativni, čime je potvrđeno odsustvo ovog regiona *F8* gena (slika 18).



**Slika 18.** Analiza produkata PCRa za detekciju prisustva egzona 3 u *F8* genu na agaroznom-gelu (1- uzorak pacijenata sa prisutnim egzonom 3; 2-uzorak pacijenata H2 sa delecijom egzona 3; N- negativna kontrola; B-blank)

Analiza kod pacijenata označenih rednim brojevima H4-20 nije pokazala prisustvo mutiranih genskih struktura (tabela 14).

**Tabela 14.** Rezultati MLPA analize u analiziranom uzorku pacijenata obolelih od HA

<i>N° pacijenta</i>	<i>Genotip</i>
H1	del egzon 7
H2	del egzon 2-3
H3	del egzon 2-3
H4- H20	del neg; dupl neg

del-delecija; dupl-duplikacija; neg.-negativno

#### 4.1.5 Presekvencioni skrining *F8* gena

Presekvencioni skrining *F8* gena urađen je kod 46/71 (65%) pacijenata kod kojih prethodnim analizama mutacije nisu detektovane. Primenom metode PCRa, umnoženo je 6 egzona gena *F8*: egzon 3, 4, 9, 13, 19 i 23 u okviru kojih su primenom SSCP metode izdvojeni regioni sa sumnjom na prisustvo mutacije, pojedinačno za svakog od 46 pacijenata.

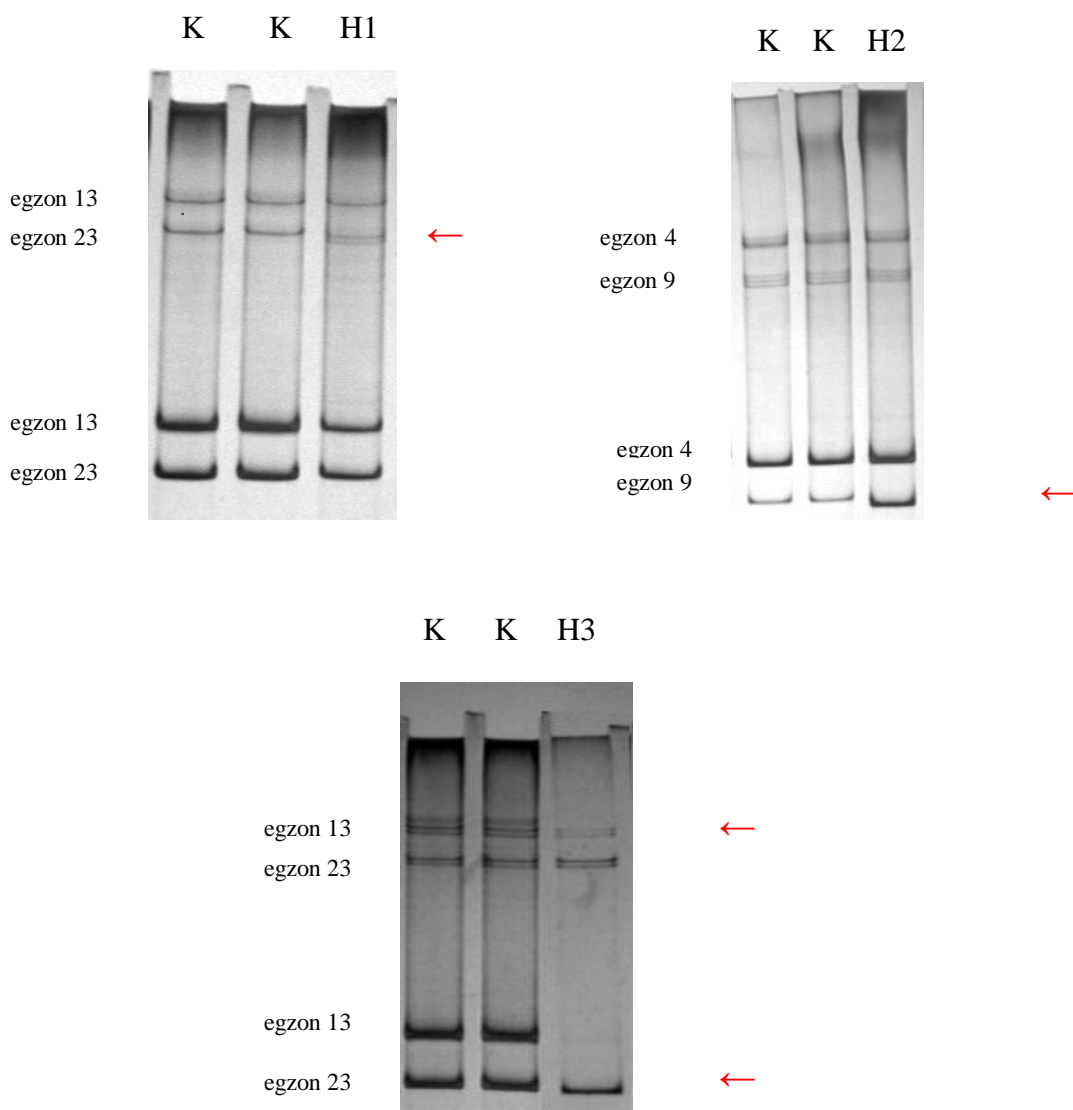
Kod 43/46 (93%) pacijenta rezultati SSCP metode su pokazali prisustvo struktura identičnih normalnoj kontroli, dok je kod 3/44 (7%) pacijenta uočeno odstupanje od kontrolnih uzoraka (tabela 15).

**Tabela 15.** Učestalost uzoraka sa odstupanjem od normalne kontrole u grupi HA pacijenata analiziranih SSCP metodom

<i>Tip uzorka</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
N	43	93
O	3	7
Ukupno	46	100

N-uzorak identičan normalnoj kontroli; O-uzorak sa odstupanjem od normalne kontrole

U uzorku pacijenta označenog rednim brojem H1, uočeno je odstupanje od normalne kontrole u regionu egzona 13, kod pacijenta H2 u regionu egzona 9, dok je kod pacijenta H3 odstupanje u odnosu na kontrolni uzorak detektovano u regionima egzona 13 i 23 ( slika 19). Analizirani uzorci pacijenata sa rednim brojevima H4-46 bili su identični uzorcima osoba koje ne boluju od HA (tabela 16).



**Slika 19.** a) Rezultatai analize egzona 13 i 23 primenom SSCP metode kod H1 pacijenta (K- normalna kontrola, H1 pacijent, crvenom strelicom obeleženo odstupanje od kontrole u regionu egzona 13); b) Rezultatai analize egzona 4 i 9 primenom SSCP metode kod H2 pacijenta (K- normalna kontrola, H2 pacijent, crvenom strelicom obeleženo odstupanje od kontrole u regionu egzona 9); c) Rezultatai analize egzona 13 i 23 primenom SSCP metode kod H3 pacijenta (K- normalna kontrola, H3 pacijent, crvenom strelicom obeleženo odstupanje od kontrole u regionu egzona).

**Tabela 16.** Rezultati SSCP analize u uzorku pacijenata obolelih od HA

<i>N° pacijenta</i>	<i>Egzon 3</i>	<i>Egzon 4</i>	<i>Egzon 9</i>	<i>Egzon 13</i>	<i>Egzon 19</i>	<i>Egzon 23</i>
H1	N	N	N	N	N	O
H2	N	N	O	N	N	N
H3	N	N	N	O	N	O
H4-H46	N	N	N	N	N	N

N-strukture identične normalnoj kontroli; O-strukture sa odstupanjem od normalne kontrole

#### 4.1.6. Sekvenciranje

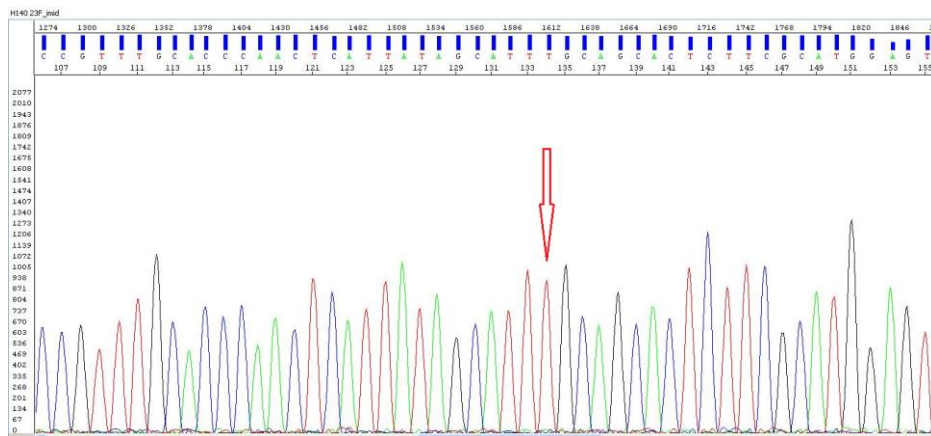
Kod 3/46 pacijenata označenih rednim brojevima H1, H2 i H3, kod kojih je analiza SSCP metodom pokazala odstupanje od normalne kontrole, u cilju detekcije tačkastih mutacija primenjena je metoda direktnog sekvenciranja ( tabela 17).

**Tabela 17.** Rezultati direktnog sekvenciranja egzona F8 gena kod ispitivane grupe pacijenata

<i>N° pacijenta</i>	<i>Egzon</i>	<i>Nukleotidna promena</i>	<i>Proteinska promena</i>
H1	23	c.6532C>T	p.Arg2159Cys
H2	9	c.1332_1332delA	p.Val445Serfs*8
H3	13 i 23	/	/



Kod pacijenta H1 direktno je sekvenciran egzon 23 gena *F8*, i rezultati su pokazali prisustvo tačkaste mutacije, c.6532C>T (p.Arg2159Cys) (slika 20). Ova mutacija na poziciji 6532, pripada grupi supstitucionih promena (tranzicija), missense tipa. Zamenom baze citozina timinom dolazi do promene kodona Cgc u Tgc, i do zamene aminokiseline arginina cisteinom na poziciji 2159. Okvir čitanja gena ostaje nepromenjen (Engl. in frame). Mutacija je registrovana u zvaničnoj bazi (Factor VIII Mutation Database) u 69 slučajeva.

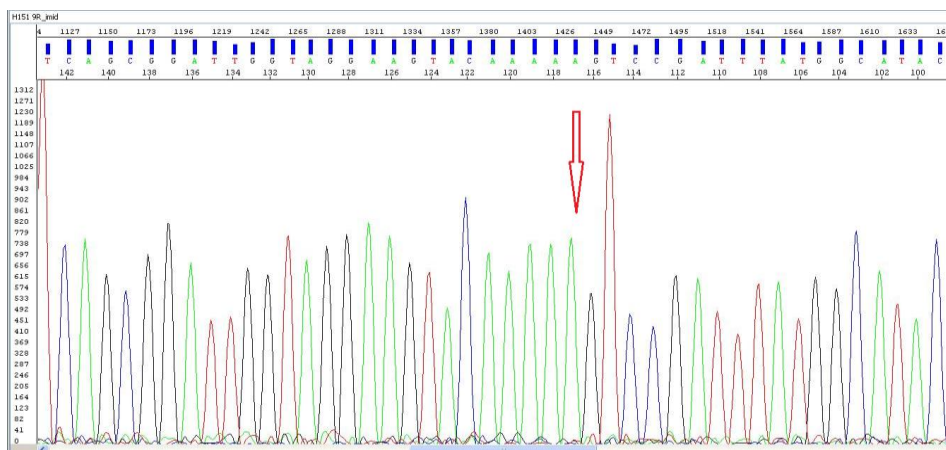


**Slika 20.** Sekvenca egzona 23 gena *F8* sa mutacijom c.6532C>T kod pacijenta H1 (crvenom strelicom obeleženo odstupanje od normalne (WT) sekvence)

Sekvenciranjem egzona 9 gena *F8* kod pacijenta H2 identifikovano je postojanje delecije A nukleotida, c.1332\_1332delA (p.Val445Serfs\*8) (slika 21). Ova delecija u okviru 6A sekvence, na poziciji 1332 menja okvir čitanja gena (freimshift), dovodi do zamene aminokiseline valina serinom na poziciji 445, usled čega se formira stop kodona 8 nukleotida ka 3 kraju.

U zvaničnoj bazi (Factor VIII Mutation Database) ova delecija registrovana je u četiri slučaja.

## REZULTATI



*Slika 21. Sekvenca egzona 9 gena F8 sa mutacijom c.1332\_1332delA kod pacijenta H2 (crvenom strelicom obeleženo odstupanje od normalne (WT) sekvence)*

Direktna analiza sekvence egzona 13 i 23, kod pacijenta H3 nije pokazala prisustvo mutacija.

**4.1.7. Učestalost mutacija u F8 genu u ispitivanom uzorku HA pacijenata iz Srbije**

Nakon primene predhodno navedenih metoda za detekciju mutacija u F8 genu, kod 71 pacijeneta obolelog od HA sa teritorije Srbije, postojanje mutacija je uočano kod njih 28/71 (40%), dok kod 43/71 (60%) pacijenata mutacije nisu detektovane. Sumirani rezultati već opisanih mutacija i njihovih učestalosti navedeni su u Tabeli 18.

*Tabela 18. Detektovane mutacije u F8 genu i njihova učestalost u uzorku HA pacijenta sa teritorije Srbije*

<i>Tip mutacije</i>		<i>Broj pacijenta</i>	<i>Učestalost tipa mutacije (%)</i>
inv22		20	28,1
inv1		3	4,2
Velika del	egzon 7	1	4,2
	egzon 2-3	2	
Tačkaste mutacije	missense (c.6532C>T )	1	2,8
	del (c.1332_1332delA )	1	
<i>Ukupno</i>		28	40
Bez mutacije		43	60
<i>Ukupno</i>		71	100

## 4.2. Distribucije mutacija u odnosu na klinički oblik HA

Pacijenti koji su analizirani u ovom radu, a kojih je bilo 71, su prema kliničkom obliku HA, podeljeni je u tri grupe (White i sar., 2001). Prvu grupu predstavljali su pacijenti sa blagim kliničkim oblikom bolesti, njih 11/71 (15,5%) dok su u drugoj grupi bili klasifikovani pacijenti sa umerenim kliničkim oblikom, kojih je bilo 14/71 (19,7%). 46/71 (64,8%) pacijenata sa uputnom dijagnozom teške HA svrstano je u treću grupu (tabela 19).

**Tabela 19.** Raspodela pacijenata po grupama u odnosu na klinički oblik HA

<i>Kliničku oblik HA</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
Blaga	11	15,5
Umerena	14	19,7
Teška	46	64,8
<i>Ukupno</i>	71	100

U okviru svake od navedenih grupa analizirana je učestalost detektovanih mutacija.

### 4.2.1. Analiza učestalosti inv22 mutacija u odnosu na klinički oblik bolesti

Učestalost inv22 (tip 1 ili 2), u analiziranom uzorku od 71 pacijenta, definisana je u okviru sve tri grupe obolelih, tj. kod pacijenata sa blagom, umerenom i teškom HA (tabela20).

**Tabela 20.** Učestalost inv22 u grupama pacijenata sa blagim, umerenim i teškim oblikom HA

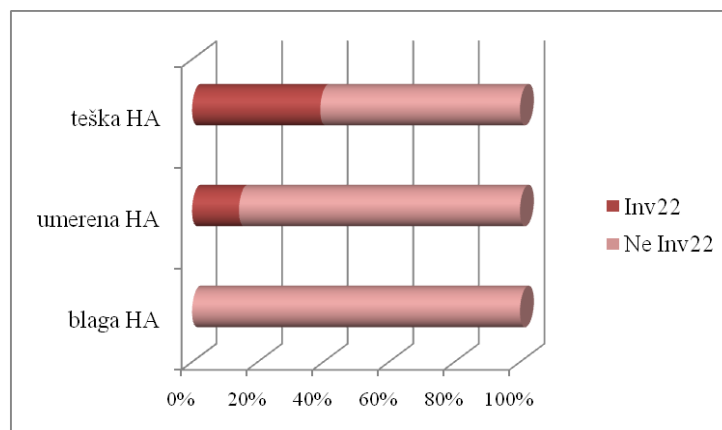
<i>Genotip</i>	<i>Klinički oblik HA</i>					
	<i>Blaga</i>		<i>Umerena</i>		<i>Teška</i>	
	Broj pacijenata	Učestalost (%)	Broj pacijenata	Učestalost (%)	Broj pacijenata	Učestalost (%)
inv 22	0	0	2	14,3	18	39,1
inv22 neg	11	100	12	85,7	28	60,9
<i>Ukupno</i>	11	100	14	100	46	100
<i>Hi kvadrat test</i>	$\chi^2=14.528;$		df=2;		p=0.001	

inv22 neg--genotip bez detektovane inv22;

Rezultati IS-PCRa pokazali su da inv22 nije uzrok bolesti ni kod jednog pacijenta iz grupe obolelih sa blagom kliničkom slikom (0/11; 0%). U grupi bolesnika sa kliničkom slikom karakterističnom za umereni oblik bolesti, prisustvo inverzije je uočeno kod 2/14 pacijenta, što predstavlja učestalost od 14,3% u okviru obrađene grupe. Kod 12/14 (85,7% u okviru grupe ) pacijenata ova mutacija nije detektovana. Rezultati analize u najbrojnijoj grupi pacijenata, tj. onoj sa teškim kliničkim oblikom HA, pokazali su učestalost inv22 od 39,1% (18/46 pacijenata). Kod 28/46 (60,9% ) pacijenata iz ove grupe nije uočeno prisustvo inv22.

U cilju utvrđivanja postojanja ili odsustva korelacije inv22 genotipa sa odgovarajućim fenotipom karakterističnim za pacijente sa blagim, umerenim i teškim oblikom HA, urađena je statistička analiza raspodele korišćenjem Hi kvadrat testa.

Dobijeni rezultati su pokazali statistički značajnu povezanost prisustva inv22 i teškog kliničkog oblika bolesti (p=0.001) (tabela20, slika 22).



**Slika 22.** Šematski prikaz distribucije učestalosti inv22 u zavisnosti od kliničkog oblika HA

#### 4.2.2. Analiza učestalosti inv1 u odnosu na klinički oblik bolesti

Nakon određivanja učestalosti inv1 u ukupnom uzorku od 71 pacijenata, analiza njene distribucije u odnosu na klinički oblik oboljenja urađena je u okviru sve tri grupe u koje su pacijenti svrstani na osnovu kliničkih karakteristika (tabela 21).

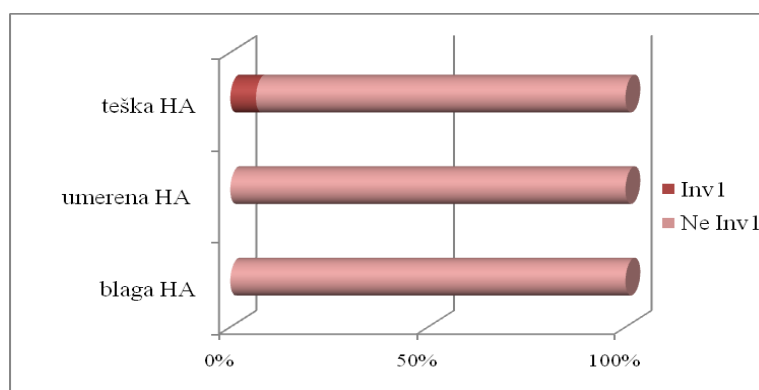
**Tabela 21.** Učestalost inv1 u grupama pacijenata sa blagim, umerenim i teškim oblikom HA

<i>Genotip</i>	<i>Klinički oblik HA</i>					
	<i>Blaga</i>		<i>Umerena</i>		<i>Teška</i>	
	Broj pacijenata	Učestalost (%)	Broj pacijenata	Učestalost (%)	Broj pacijenata	Učestalost (%)
inv1	0	0	0	0	3	6,5
inv1 neg	11	100	14	100	43	93,5
<i>Ukupno</i>	11	100	14	100	46	100
<i>Hi kvadrat test</i>		$\chi^2=0.590;$		df=1;		p=0.442

inv1-neg: genotip bez detektovane inv1;

Dobijeni rezultati su pokazali da ni kod jednog pacijenta iz grupa sa blagim i umerenim oblikom bolesti nije utvrđeno postojanje inv1. Ova inverzija je jedino detektovana kod pacijenata koji su pripadali grupi sa teškim kliničkim oblikom HA, i to sa učestalošću od 6,5% (3/46 pacijenta).

Statistička analiza primenom Hi kvadrat testa nije pokazala statistički značajnu povezanost između prisustva inv1 i nekog od kliničkog oblika HA (  $p=0.442$ ). (tabela 21, slika 23)



*Slika 23. Šematski prikaz distribucije učestalosti inv1 u zavisnosti od kliničkog oblika HA*

#### 4.2.3. Analiza učestalosti velikih delecija u odnosu na klinički oblik bolesti

Učestalost velikih delecija i duplikacija u kodirajućem regionu *F8* gena predhodno je obrađena na uzorku od 20/71 pacijenta sa uputnom dijagnozom HA. U okviru obrađene grupe, 15/20 (75%) pacijenata je bilo sa teškim kliničkim oblikom bolesti, dok je kod 5/20 (25%) pacijenata dijagnostikovana umerena HA (tabela 22).

**Tabela 22.** Raspodela učestalosti pacijenata analiziranih na prisustvo velikih delecija po grupama u odnosu na klinički oblik HA

<i>Kliničku oblik HA</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
Umerena	5	25
Teška	15	75
<i>Ukupno</i>	20	100

U okviru ove dve grupe analizirana je raspodela ukupne učestalost velikih delecija (tabela 23).

**Tabela 23.** Učestalost velikih delecija u grupama pacijenata sa umerenom i teškom HA

<i>Genotip</i>	<i>Klinički oblik HA</i>			
	<i>Umerena</i>		<i>Teška</i>	
	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
del	1	20	2	13
Ne del	4	80	13	87
<i>Ukupno</i>	5	100	15	100
<i>Hi kvadrat test</i>	$\chi^2=0.124;$		df=1;	p=0.725

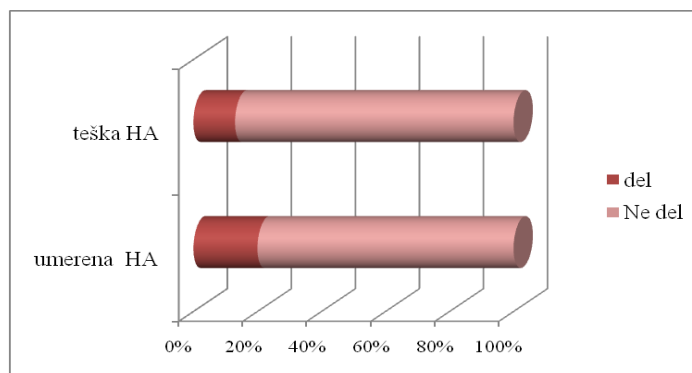
Ne del-genotip bez detektovane delecije;

Prisustvo velike delecije uočeno je kod dva pacijenta (2/15) iz grupe obolelih od teškog kliničkog oblika bolesti, što predstavlja učestalost od 13% u okviru grupe.



Isti tip mutacije detektovan je takođe kod jednog pacijenta (1/5) iz grupe obolelih od umerenog kliničkog oblika bolesti, što u okviru grupe predstavlja učestalost od 20%.

Statistička analiza primenom Hi kvadrat testa nije pokazala statistički značajnu povezanost između genotipa sa velikim delecijama i bilo kog od kliničkih oblika bolesti. ( $p=0.725$ ) (tabela 23, slika 24)



*Slika 24. Šematski prikaz distribucije učestalosti velikih delecija u zavisnosti od kliničkog oblika HA*

### 4.3. Analiza korelacije detektovanih genotipova i prisustva inhibitora FVIII

U uzorku od 71 pacijenta sa HA, status za prisustvo inhibitora bio je poznat kod njih 56/71. Od tog broja inhibitor je bio prisutan kod 8/56 pacijenata, što predstavlja učestalost od 14,3% (tabela 24).

*Tabela 24. Učestalost prisustva inhibitora u grupi analiziranih pacijenata sa HA*

<i>Inhibitor FVIII</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
Pozitivni	8	14,3
Negativni	46	85,7
<i>Ukupno</i>	56	100

#### 4.3.1. Distribucija mutacija kod pacijenata sa inhibitorom FVIII

Analiza učestalosti detektovanih mutacija u grupi od 8 pacijenata sa inhibitorom FVIII, pokazala je postojanje Inv22 kod 3/8 (37,5%); kod jednog pacijenta (1/8) je detektovano prisustvo velike delecije egzona 7 (učestalost 12,5%), dok je kod preostalih 4/8 (50%) pacijenata iz grupe, mutacije nisu uočene (tabela 25).

*Tabela 25. Detektovani genotipovi i njihova učestalost u grupi pacijenata sa inhibitorom FVIII*

<i>Genotip</i>	<i>Pacijenti sa inhibitorom FVIII</i>	
	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
inv22	3	37,5
del	1	12,5
Bez mutacije	4	50
<i>Ukupno</i>	8	100

#### 4.3.1. Analiza korelacije između genotipa sa inv22 i prisustva inhibitora FVIII kod pacijenta sa teškim oblikom HA

S obzirom da je kod svih 8/56 pacijenta sa inhibitorom dijagnostikovani teški oblik HA, statistička analiza genotip-fenotip korelacije urađena je samo u ovoj grupi bolesnika i to za genotip sa inv22 koji je kod pacijenata sa inhibitorom bio najzastupljeniji.

Prvo je utvrđena učestalost postojanja inhibitora u grupi pacijenata obolelih od teške HA sa inv22. Od 13 pacijenata sa teškom HA, kod kojih je detektovano postojanje inv22, a bio je poznat status inhibitora, on je bio prisutan kod 3/13 (23%). Kod 10/13 (77%) pacijenata sa inv22, inhibitor nije detektovan (tabela 26).

**Tabela 26.** Učestalost prisustva inhibitora kod pacijenta sa inv22

<i>Inhibitor</i>	<i>inv22</i>	
	<i>Broj pacijenta</i>	<i>Učestalost (%)</i>
Pozitivni	3	23
Negativni	10	77
<i>Ukupno</i>	13	100

Stataistička analiza za utvrđivanje genotip –fenotip korelacije dalje je obuhvatila 39 obolelih kod kojih je bio poznat status prisustva inv22 i inhibitora. Ovi pacijenti su podeljeni u grupe :

- ✓ sa inv22 i inhibitorom (3/39; 8%);
- ✓ sa inv22 i bez inhibitora (10/39; 26%);
- ✓ bez inv22 i sa inhibitorom (5/39; 13%);
- ✓ bez inv22 i bez inhibitora (21/39; 53%) (tabela 27).

**Tabela 27.** Korelacija prisustva inv22 i razvoja inhibitora FVIII kod pacijenata sa teškim kliničkim oblikom HA

<i>Inhibitor</i>	<i>inv22</i>					
	<i>Pozitivni</i>		<i>Negativni</i>		<i>Ukupno</i>	
	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>	<i>Broj pacijenata</i>	<i>Učestalost (%)</i>
<i>Pozitivni</i>	3	8	5	13	8	21
<i>Negativni</i>	10	26	21	53	31	79
<i>Ukupno</i>	13	34	26	66	39	100
<i>Fišerov test tačne vrednosti</i> $\chi^2=0.590$ ; <i>df</i> =1; <i>p</i> =0.442						

Statistička analiza unakrsnog poređenja navedenih grupa, korišćenjem Fisherovog testa tačne vrednosti, nije pokazala statistički značajnu korelaciju između prisustva inv22 i pojave inhibitora kod obrađene grupe pacijenata obolelih od teške HA ( $p=0.442$ ). (tabela 27).

#### 4.4. Analiza članova porodica obolelih od HA

##### 4.4.1. Analiza statusa nosilaca mutacije

Nakon detekcije mutacija kod obolelih od HA, pristupilo se analizama za određivanje statusa nosioca kod dostupnih članova porodica onih obolelih kojima su prethodnim analizama već otkrivene mutacije u *F8* genu .

Analizirani su uzorci 42 osobe i to: 15/42 (35%) majki, 23/42 (55%) sestara i 4/42 (10%) ćerki obolelih pacijenata (tabela 28).

**Tabela 28.** Članovi porodica obolelih kojima je određen status nosioca mutacije u *F8* genu

<i>Srodstvo sa obolelim</i>	<i>Broj osoba</i>	<i>Učestalost (%)</i>
Majka	15	35
Sestra	23	55
Ćerka	4	10
<i>Ukupno</i>	42	100

Analize su se odnosile na detekciju prisustva inv22 i inv1 metodom IS-PCRa i detekciju velike delecije egzona 2-3 MLPA metodom, jer su za obolele od HA sa ovim mutacijama, članovi porodica bili dostupni za analizu. Oboleli i analizirani članovi porodica podeljeni su u zavisnosti od genotipa obolelih i tipa sprovedenih analiza na :

- grupa sa inv22- genotipom;
- grupa sa inv1 genotipom;
- grupa sa genotipom koja uključuje veliku deleciju.

Rezultati su pretstavljeni u okviru grupa, za svaku analiziranu osobu (tabela 29).

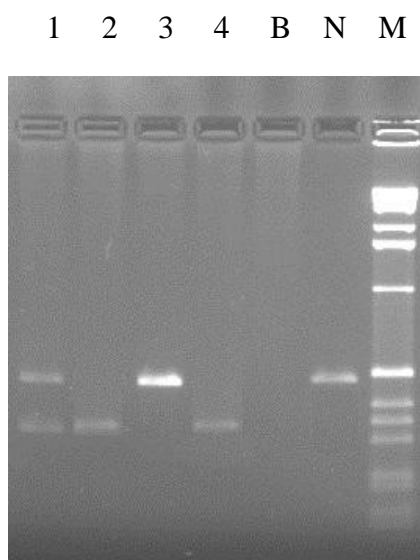
REZULTATI

**Tabela 29.** Rezultati analize za određivanje statusa nosioca mutacija u F8 genu

N° pacijenta	Genotip člana porodice		
	Majka	Sestra	Ćerka
<i>inv22 genotip</i>			
H1	inv22/N	inv22/N	/
H3	inv22/N	inv22/N	/
H4	inv22/N	inv22/N	/
H5	inv22/N	inv22/N	/
H6	inv22/N	inv22/N	/
H7	inv22/N	1.inv22/N; 2.N/N	/
H8	inv22/N	N/N	/
H9	inv22/N	N/N	/
H10	inv22/N	N/N	/
H11	inv22/N	/	/
H12	inv22/N	/	/
H13	inv22/N	/	/
H14	inv22/N	/	/
H15	N/N	/	/
H16	/	1.inv22/N; 2.inv22/N 3.N/N	/
H17	/	inv22/N	/
H18	/	inv22/N	/
H19		inv22/N	
H20		inv22/N	
H21	/	N/N	/
H22	/	N/N	/
H23	/	N/N	/
H24	/	1.N/N; 2.N/N	/
H25	/	/	inv22/N
H26	/	/	inv22/N
H27	/	/	inv22/N
H28	/	/	inv22/N
<i>inv1 genotip</i>			
H29*	inv1/N	/	/
H30*	inv1/N	/	/
<i>Genotip sa velikom delecijom</i>			
H31	/	del egzon2-3/N	/

\*Pacijenti H29 i H30 su rođena braća

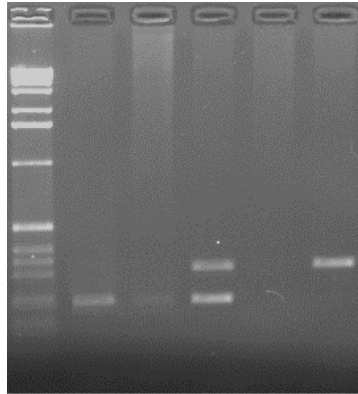
U grupi obolelih sa *inv22* genotipom svrstano je 26 HA pacijenta, označenih rednim brojevima H1-26, a majke su bile dostupne za dalju analizu kod pacijenta označenih brojevima H1-15. Kod analiziranih majki pacijenata pod rednim brojevima H1-14 testiranje je pokazalo da su heterozigotni nosioci *inv22* (*inv22/N* genotip), dok je za majku pacijenta H15 utvrđeno da poseduje normalan genotip (N/N), tj. da nije nosilac inverzije (slika 25). Sestre su analizirane kod pacijenta pod rednim brojevima H1-10 i H16-24. Kod sestara pacijenata H1-6 i H17-20 testiranje je pokazalo da su heterozigotni nosioci *inv22* (*inv22/N* genotip), dok je kod sestara pacijenta pod rednim brojevima H8-10 i H21-24 analiza pokazala normalan genotip (N/N). Za pacijenta H7 testiranje je obuhvatilo dve sestre i rezultati su pokazali da jedna jeste heterozigotni nosilac *inv22* (*inv22/N*), dok druga nije (N/N), a analize su obuhvatile i tri sestre pacijenta H16 od kojih jedna nije nosilac *inv22* (N/N), dok druge dve jesu (*inv22/N*). Prisustvo *inv22* takođe je analizirano i kod ćerki pacijenata pod rednim brojevima H25-28 i za sve njih analize su potvrdile da su nosioci *inv22* (*inv22/N*). Rezultati IS-PCRa u obrađenoj grupi osoba potvrđeni su i primenom *cIS-PCRa*.



**Slika 25.** Analiza produkata IS-PCRa za *inv22* na agaroznom gelu, kod pacijenata sa *inv22* i njihovih majki ( 1- uзорak majke pacijenata H14; 2-uzorak pacijenata H14; 3-uzorak majke pacijenta H15; 4-uzorak pacijenta H14; B-blank; N- negativna kontrola; M-50kb marker)

Grupu obolelih sa *inv1* činila su dva brata (H29, H30), a analiza sprovedena kod njihove majke pokazala je da ona jeste heterozigotni nosilac *inv1* (*inv1/N*) (slika 26).

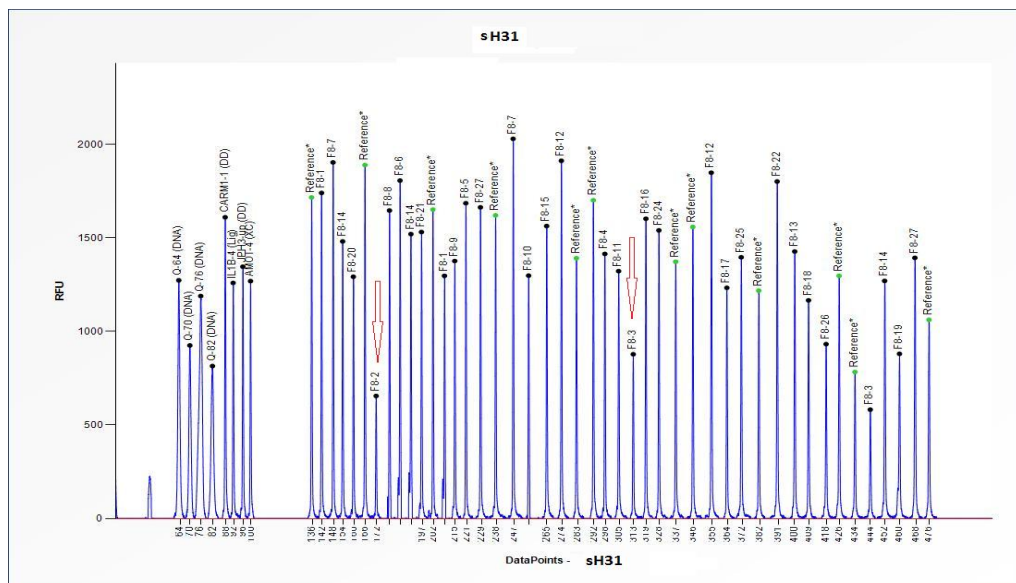
M 1 2 3 B N



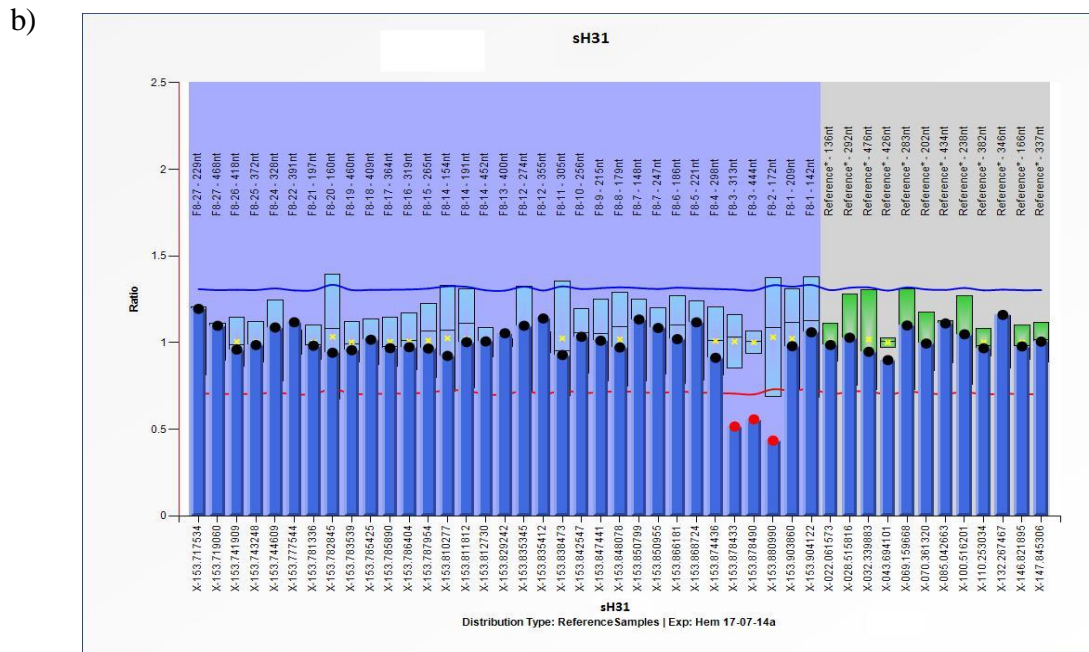
**Slika 26.** Analiza produkata IS-PCRa za *inv1* na agaroznom gelu, kod pacijenata sa *inv1* i njihove majke ( 1- uzorak pacijenata H29; 2-uzorak pacijenata H30; 3-uzorak majke pacijenta H29 i H30 ; B-blank; N- negativna kontrola; M-50kb marker)

Testiranje je obuhvatilo i člana porodice, tj. sestru jednog pacijenta (H31) kome je detektovana velika delecija ( delecija egzona 2-3). Analizama je utvrđeno da sestra takođe nosi navedenu deleciju (slika 27).

a)







*Slika 27. a) Elektroferogram sestre pacijenta H31 (crvena strelica - odstupanje od kontrolnih uzoraka); b) dijagram odnosa dobijenih vrednosti kod sestre pacijent H31 i kontrolnih uzoraka*

Na osnovu dobijenih rezultata definisana je učestalost detektovanih genotipova kod majki, sestara i ćerki u okviru svake od analiziranih grupa (tabela 30).

*Tabela 30. Raspodela učestalosti detektovanih genotipova kod članova porodica obolelih*

<u>Genotip</u>		<u>Majka</u> (Broj osoba (%))	<u>Sestra</u> (Broj osoba(%))	<u>Ćerka</u> (Broj osoba(%))
inv22	inv22/N	14(93)	10(45)	4(100)
	N/N	1(7)	12(55)	0(0)
	<i>Ukupno</i>	15 (100)	22(100)	4(100)
inv1	inv1/N	1(100)	/	/
	N/N	0(0)	/	/
	<i>Ukupno</i>	1(100)	/	/
del	del/N	/	1(100)	/
	N/N	/	0(0)	/
	<i>Ukupno</i>	/	1(100)	/

U grupi gde je analizirano prisustvo inv22 genotipa uočeno je da su 14/15 (93%) majki nosioci inv22 mutacije (inv22/N), dok je kod jedne 1/15 (7%) detektovan N/N genotip. Postojanje inv22 u heterozigotnom stanju dijagnostikivano je kod 11/23 (48%) analiziranih sestara obolelih pacijenata, dok je kod 12/23 (52%) njih uočen normalan genotip (N/N). Analize su takođe pokazale da su sve četiri analizirane ćerke (4/4 ;100%) obolelih pacijenata bile nosioci inv22 (inv22/N).

U grupi kod koje je sprovedena analiza prisustva inv1, jedna analizirana majka (1/1, 100% ) je bila nosilac inverzije (inv1/N).

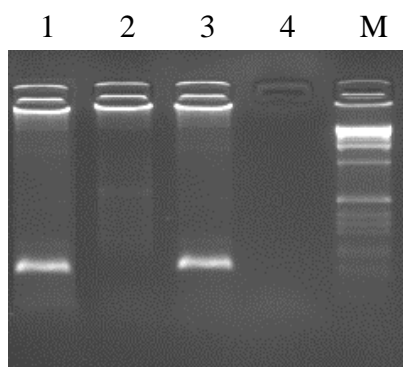
Analize za prisustvo velike delecije u trećoj grupi pokazale su da je jedna analizirana sestra (1/1, 100% ), takođe heterozigotni nosilac mutacije (del egzon 2-3 /N).

#### **4.4.2. Prenatalna dijagnostika**

U periodu od 2008-2014. godine, 6 porodica sa pozitivnom anamnezom za HA javilo se Genetičkom savetovalištu IMD-a, u cilju postavljanja prenatalne dijagnoze.. Urađeno je 9 prenatalnih analiza, kod 6 trudnica. Kod svih 6/6 žena, prethodnim analizama definisan je status heterozigotnih nosilaca inv 22.

Kod 8/9 (89%) trudnica, tj. kod fetusa označenih rednim brojevima FH1-8 analizirana je fetalna DNK dobijena iz uzoraka horionskih resica nakon biopsije u 13 nedelji graviditeta (CVS). Analiza je samo kod jednog fetusa označenog kao FH9 sprovedena na uzorku iz ćelija amnijske tečnosti, dobijenom amniocentezom u 17 nedelji trudnoće (tabela 22).

Prvi korak u prenatalnoj dijagnostici bio je određivanje pola fetusa, PCR metodom, kod svih 9 fetusa. U 6/9 (67%) slučajeva, tj. kod fetusa pod rednim brojevima FH 1-6, detektovan je ženski pol, dok je analiza za 3/6 (33%) fetusa, označenih brojevima F7-9, pokazala da su muškog pola (slika 28, tabela 22).



**Slika 28.** Analiza produkata PCRa za detekciju pola na agaroznom gelu (1-uzorak fetusa F7 muškog pola; 2-kontrolni uzorak ženskog pola; 3-kontrolni uzorak muškog pola; B-blank)

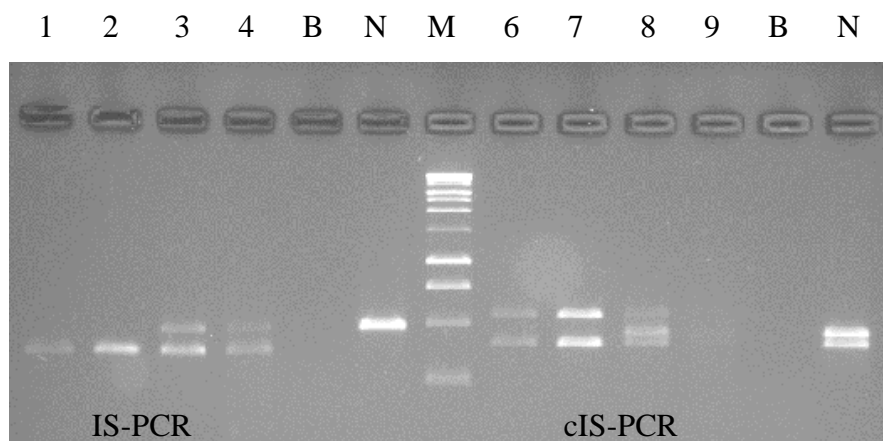
Za fetuse ženskog pola dalje analize nisu rađene. Kod sva tri fetusa muškog pola (FH7, FH8 i FH9) IS-PCR analizom za detekciju inv 22 utvrđeno je postojanje ove mutacije (tabela 31).

**Tabela 31.** Tipovi i rezultati prenatalnih analiza sprovedenih na ispitivanom uzorku

N° FU	Tip PA	Rezultati PA		
		pol	genotip	
FH-1	CVS	Ž	/	
FH-2	CVS	Ž	/	
FH-3	CVS	Ž	/	
FH-4	CVS	Ž	/	
FH-5	CVS	Ž	/	
FH-6	CVS	Ž	/	
FH-7	CVS	M	inv22-2	
FH-8	CVS	M	Inv22-1	
FH-9	AC	M	Inv22-1	
<b>Ukupno</b>	<b>9 FU</b>	<b>8 (89%)CVS; 1(11%) AC</b>	<b>6(67%)Ž; 3(33%) M</b>	<b>3 inv22</b>

FU-fetalni uzorak; PA –prenatalna analiza; Ž-ženski pol; M-muški pol

U 2/9 slučajeva detektovana je inv22-1 (FH 8-9), dok je kod 1/9 fetusa uočeno prisustvo inv22-2 (F7). Dobijeni rezultati potvrđeni su primenom cIS-PCRa (slika 29).



**Slika 29.** Analiza produkata IS-PCRa i cIS-PCRa za detekciju inv22 na agaroznom gelu kod fetusa F7 (1,2,6,7-uzorak fetusa F7; 3,4,8,9-uzorak majke fetusa F7; B-blank; N-negativna kontrola, M-DNK marker)

#### 4.4.3. Prikaz slučaja ženske osobe obolele od HA

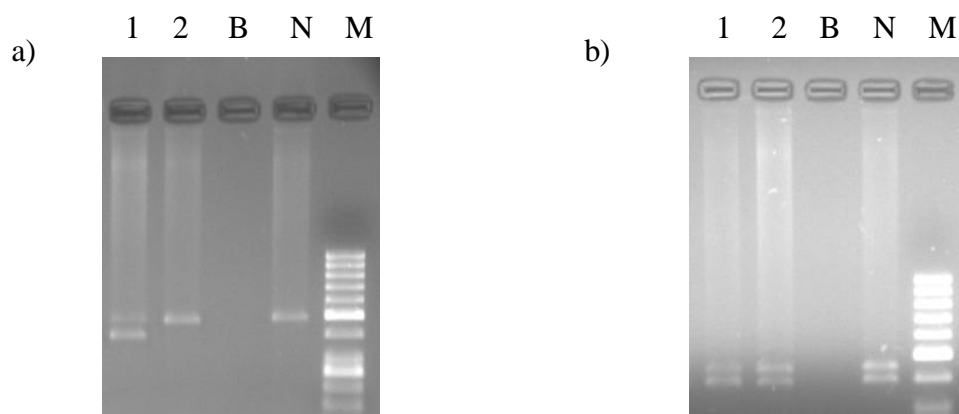
Iz celokupnog uzorka HA pacijenata analiziranog u ovoj tezi, izdvojen je kao veoma redak slučaj pacijentkinje, tj. osobe ženskog pola obolele od hemofilije, jer je kod nje zahvaljujući sprovedenim citogenetičkim i molekularnim analizama otkriven uzrok nastanka bolesti.

##### 4.4.3.1. Prikaz pacijenta

Obolela ženska osoba, označena kao HF, i njena rođena sestra (sHF), obratile su se Genetičkom savetovlištu IMDa radi dobijanja genetičkog saveta, pošto je sestra u tom trenutku bila u 27 nedelji trudnoće (tabela 23). Izmereni nivo faktora FVIII, kod obolele žene iznosio je <3IU/dl, što je klinički označavalo postojanje umerene HA. Molekularna osnova bolesti nije bila poznata, a porodična anamneza za HA je bila negativna.

4.4.3.2. Rezultati molekularnih analiza

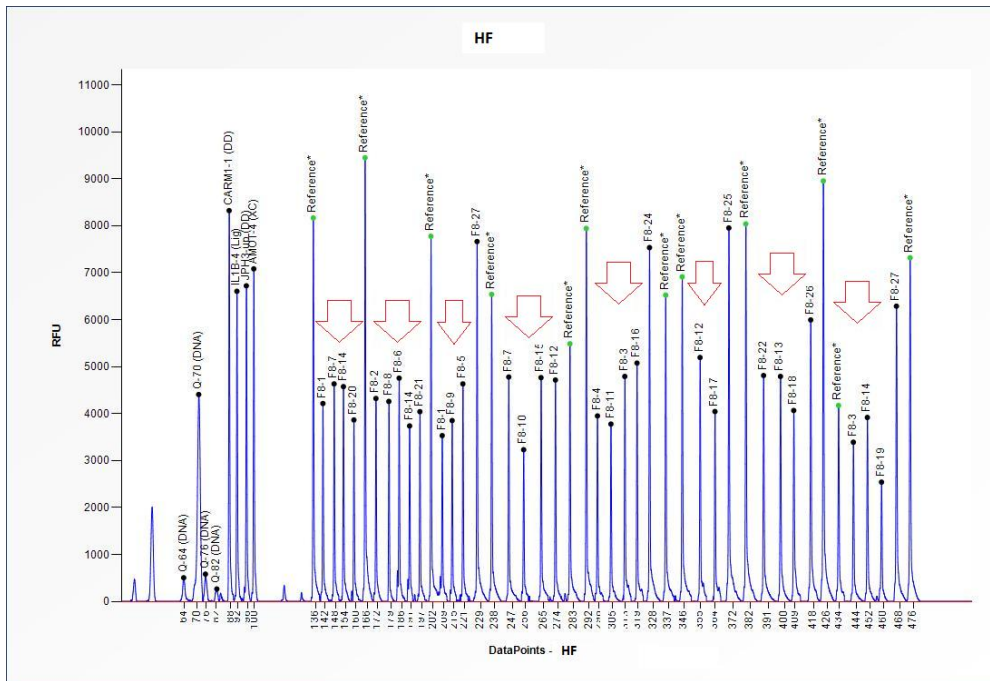
Prvo se pristupilo definisanju molekularne osnove bolesti kod obolele žene (HF). Analize za detekciju postojanja inv22 i inv1. Testiranje nije pokazalo prisustvo inverzija, ali je IS-PCRom detektovano heterozigotno prisustvo delecije introna 22 tip 2 (del 22-2/N) (slika 30, tabela 23).



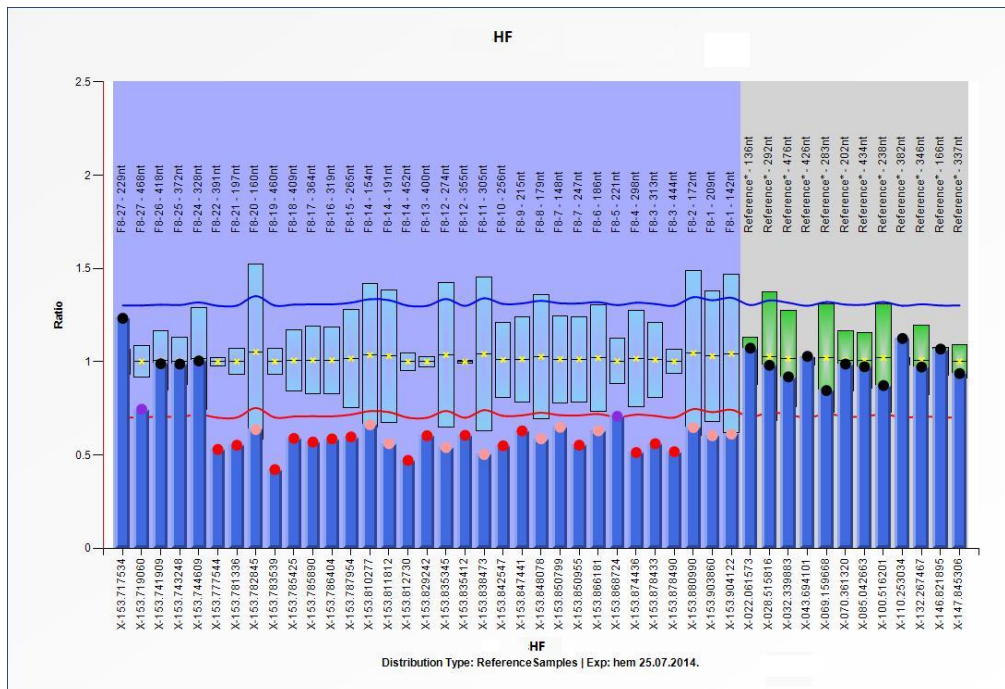
**Slika 30.** Analiza produkata IS-PCRa i cIS-PCRa za detekciju int22h rearanžmana na agaroznom gelu ( a) IS-PCR : 1-uzorak pacijenta HF, 2-uzorak pacijenta sHF, B-blank, N-normalna kontrola; b) cIS-PCR: 1-uzorak pacijenta HF, 2-uzorak pacijenta sHF, B-blank, N-normalna kontrola)

U daljem toku testiranja, pomoću MPLA metode, izvršena je detekcija velikih delecija i duplikacija kodirajućeg dela gena. Rezultati ovih testova su bili pozitivni i pokazali su postojanje velike delecije egzona 1-22 (del egzon 1-22) gena *F8* u heterozigotnom stanju (del egzon 1-22/N) (slika 31, tabela 23).

a)



b)

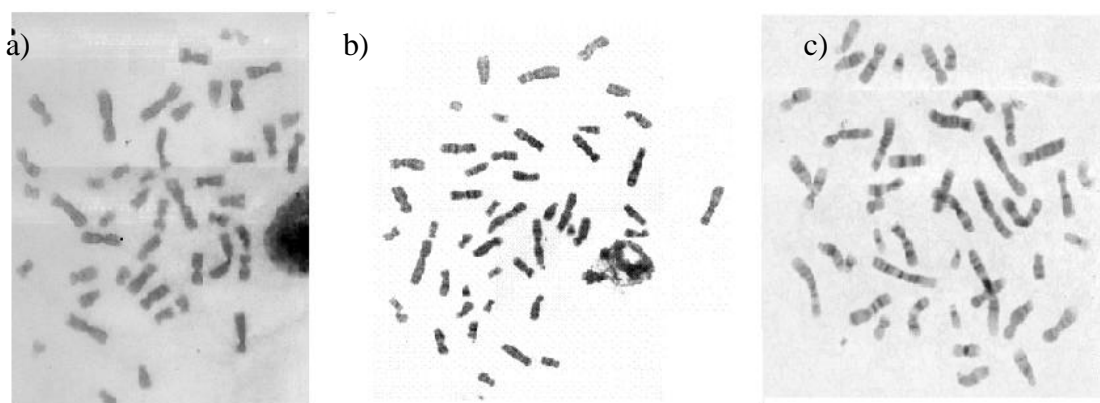


Slika 31. a) Elektroferogram pacijenta HF (crvene strelice- odstupanje od kontrolnih uzoraka); b) dijagram odnosa dobijenih vrednosti kod pacijenat HFi kontrolnih uzoraka

4.4.3.3. Rezultati citogenetičke analize i fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH)

Rezultati analize kariotipa iz kulture limfocita periferne krvi kod obolele pacijentkinje su pokazali prisustvo mozaičnog kariotipa:

mos 47, XX,+ mar (2) / 47, XXX (2)/ 46, XX (47) (slika 32, tabela 23).



**Slika 32.** Rezultati citogenetičke analize pacijenta HF : a) klon sa kariotipom 47,XXX; b) klon sa kariotipom 47,XX,+mar; c) klon sa normalnim kariotipom 46,XX

Detektovana su tri klona u kariotipu:

1. klon sa 47 hromozoma i marker hromozomom u višku, uočen u 2/51 (4%) analizirane metafazne figure;

2. klon sa 47 hromozoma i trizomijom X hromozoma, uočen u 2/51 (4%) metafazne figure i

3. klon sa normalnim ženskim kariotipom, uočen u 47/51 (92%) analiziranih ćelija.

U cilju potvrde izolovanih klonova primenom citogenetičkih metoda, kao i otkrivanja porekla prisutnog marker hromozoma, u daljoj analizi je primenjena molekularno–citogenetička – FISH metoda sa flurescentno obeleženom centromernom probom za X hromozom(DXZ1Xp11.1-q11.1).

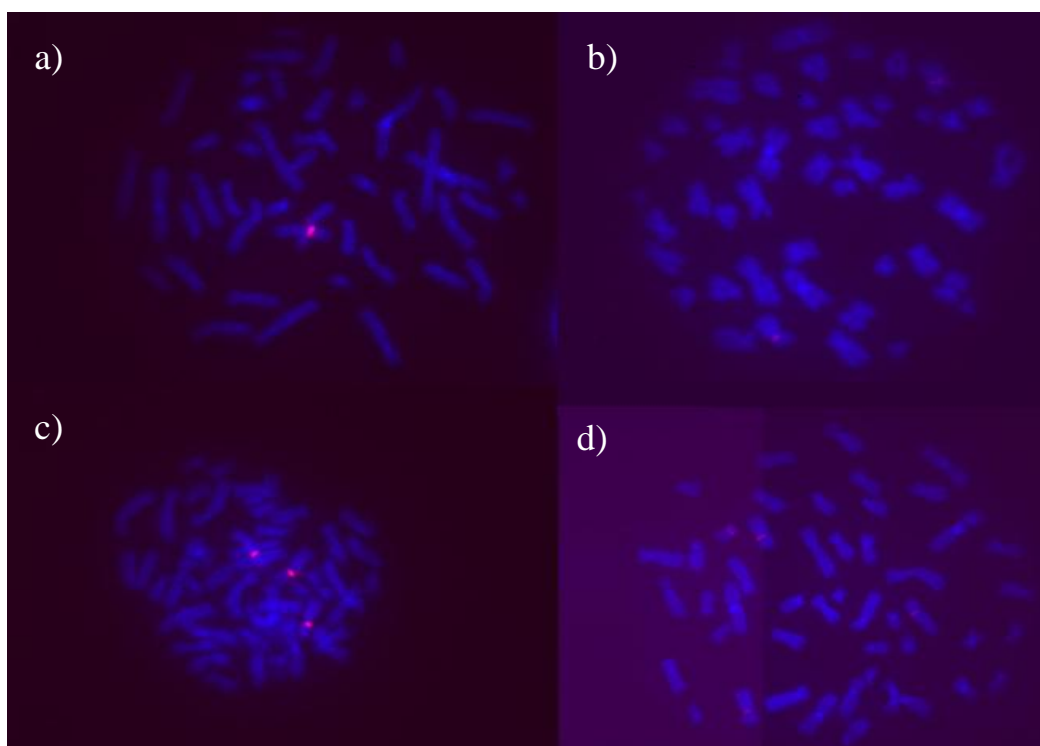
Dobijen su sledeći rezultati:

1. za analizu jedara

mos nuc ish (DXZ1x1)(15/162)/(DXZ1x3)(12/162)/ (DXZ1x2)(135/162);

2. za analizu mitoza

mos ish (DXZ1x4)(1/28)/(DXZ1x3)(2/28)/((DXZ1x1)(5/28)/ (DXZ1x2)(20/28)  
(slika 33, tabela 32).



**Slika 33.** Rezultati FISH analize metafaznih figura (proba za centromeru X hromozoma –DXZ1) kod pacijenta HF: a) mitoza sa 45 hromozoma i jednim X hromozomom (jedan crveni signal); b) mitoza sa 46 hromozoma i dva X hromozoma (dva crvena signala); c) mitoza sa 47 hromozoma i tri X hromozoma (tri crvena signala signala); d) mitoza sa 48 hromozoma, tri X hromozoma i marker hromozomom poreklom od X hromozoma (del X) (četiri crvena signala).



## REZULTATI

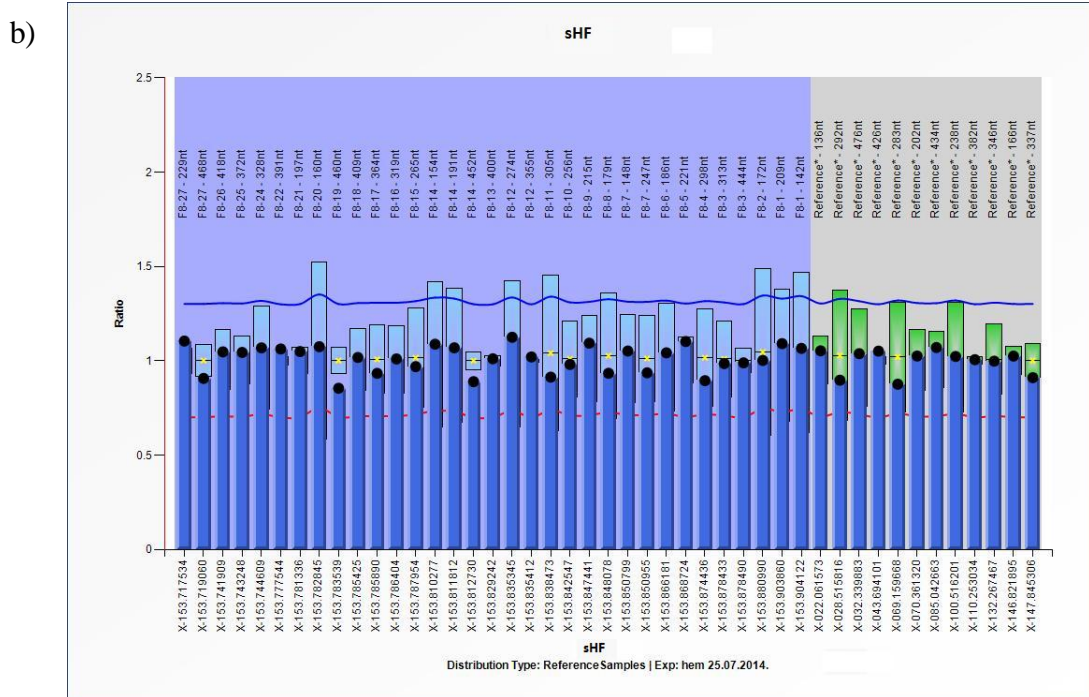
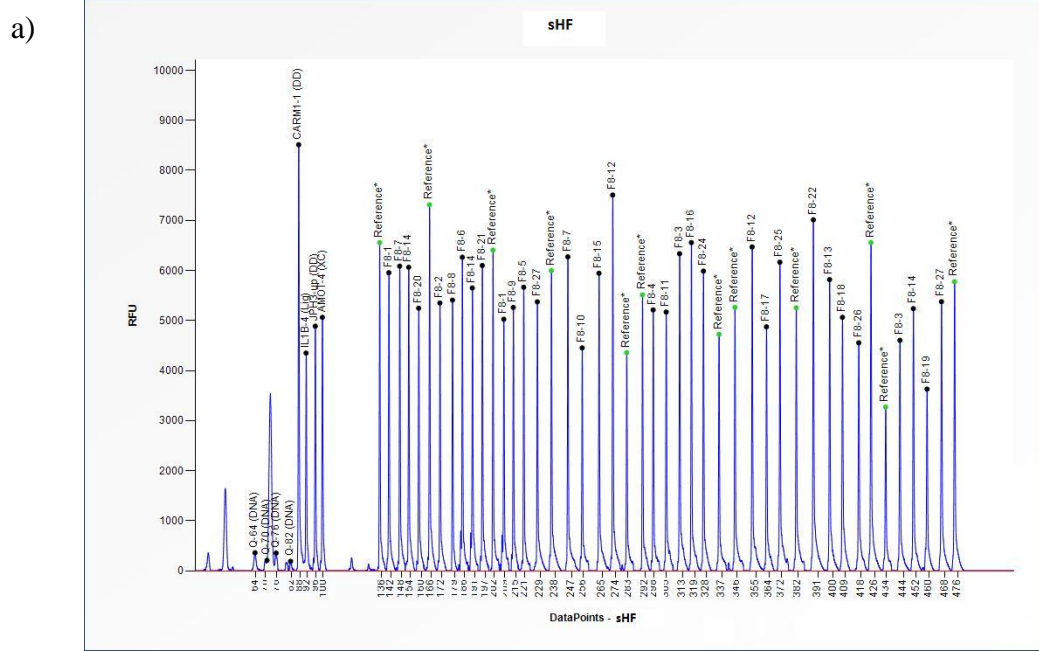
Primenom FISHa detektovana su četiri ćelijska klona:

1. klon sa jednim X hromozomom ( jedan signal) u ukupno 20/190 (10%) analiziranih ćelija;
2. klon sa tri X hromozoma (tri signala) u ukupno 14/190 (7%) analiziranih ćelija;
3. klon sa četiri X hromozoma od kojih je jedan hromozom sa krupnom strukturnom aberacijom tipa delecije - del (X) (četiri signala) u jednoj ćeliji (1/ 190; 0,5 %)
4. klon sa dva X hromozoma (dva signala) u ukupno 155/190 (82%) analiziranih ćelija.

**Tabela 32.** Rezultati citogenetičkih i molekularnih analiza kod pacijenata HF i sHF

<i>Rezultati</i>	<i>Pacijenti</i>	
	<b>HF</b>	<b>sHF</b>
<i>Citogenetička analiza (kariotip)</i>	mos 47, XX,+ mar (2) / 47, XXX (2)/ 46, XX (47)	/
<i>FISH analiza</i>	mos nuc ish (DXZ1x1)(15/162)/(DXZ1x3)(12/162)/ (DXZ1x2)(135//162)  mos ish (DXZ1x4)(1/28)/(DXZ1x3)(2/28)/ (DXZ1x1)(5/28)/ (DXZ1x2)(20/28)	/
<i>IS-PCR</i>	del22/N	N/N
<i>MLPA</i>	del egzon 1-22/N	

Nakon definisanja genotipa sa mutacijom kod obolele žene (HF), IS-PCR i MLPA analiza su urađena i kod njene sestre (sHF) za koju su rezultati pokazali da nije hetozigotni nosilac mutacija del 22 i del egzon 1-22, tj. kod nje je detektovan genotip N/N(tabela32,slika30,slika34).



Slika 34. a) Elektroferogram osobe sHF (crvena strelica - odstupanje od kontrolnih uzoraka); b) dijagram odnosa dobijenih vrednosti kod osobe sHF i kontrolnih uzoraka

S obzirom na ovakav rezultat, utvrđeno je da ne postoji povećan rizik da fetus u pomenutoj trudnoći bude oboleleo od HA, tako da dodatne analize u cilju prenatalne dijagnostike kod fetusa nije bilo potrebno raditi.

U skladu sa ovim podacima dat je i adekvatan genetički savet pacijentima

## **5. DISKUSIJA**

## **5.1. Određivanje distribucije mutacija u *F8* genu kod obolelih od HA u Srbiji**

U ovoj doktorskoj disertaciji objavljeni su, prvi put u Srbiji, rezultati molekularnih istraživanja genetičkih uzroka nastanka HA u reprezentativnom uzorku obolelih od ove bolesti sa teritorije Srbije. Istraživanja su imala za cilj određivanje distribucije mutacija u *F8* genu kod obolelih od HA u Srbiji, kroz analize za detekciju prisustva:

- inv 22 i inv1;
- velikih delecija i duplikacija;
- tačkastih mutacija putem presekvencionog skrininga i potom sekvenciranja.

Ovakav pristup predstavlja i zvaničnu preporuku vodiča svetske federacije hemofiličara, kao i preporuku nacionalnih vodiča zemalja vodećih u istraživanjima iz ove oblasti (Srivastava i sar., 2012; Keeney i sar., 2005).

### **5.1.1 Detekcija i učestalost inv 22 u *F8* genu**

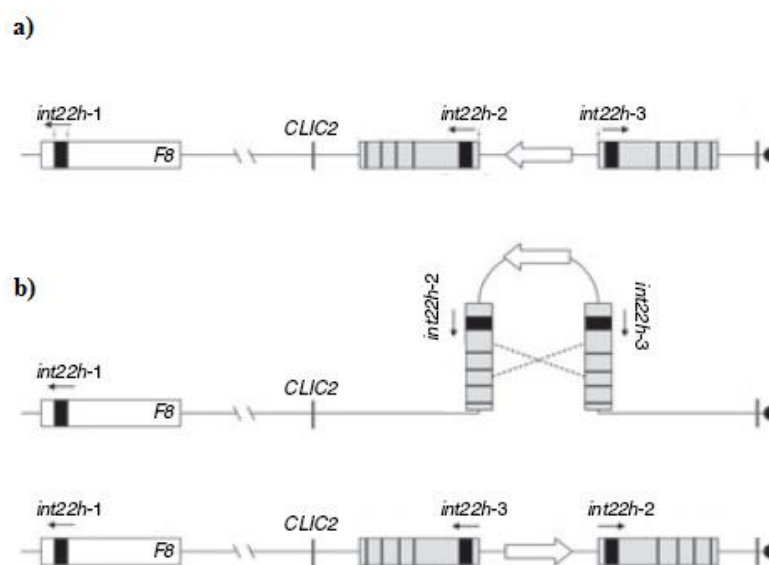
Inv22 predstavlja najučestaliju mutaciju u genu *F8*, koja je uzrok bolesti kod oko 30% pacijenata u ukupnoj populaciji hemofiličara (Abou-Elw i sar., 2011; Keeney i sar., 2005; Oldenburg i sar., 2004). Ova mutacija obuhvata nekodirajući deo gena i upravo zbog toga, nju nije moguće uočiti metodom sekvenciranja, kojom se registruje najveći broj ostalih mutacija (97%), već je za njenu detekciju neophodna primena specifičnih, direktnih molekularnih metoda (Keeney i sar., 2005).

Detekcija inv 22 kod analiziranih pacijenata u ovom radu urađena je korišćenjem metode IS-PCRa. Metoda se karakteriše brzinom, lakoćom izvođenja i interpretacije rezultata, kao i visokom pouzdanošću i reproducibilnošću (Rossetti i sar, 2008). Tokom ove studije, ova metoda je modifikovana i optimizirana u odnosu na uzorke i laboratorijske uslove). Primenom IS-PCRa u ovom istraživanju analizirana je grupa od 71 pacijenta, obolelih od HA.

Rezultati analize u obrađenom uzorku, pokazali su učestalost inv22 od 28,1% (20/71). Inv22-1 bila je zastupljena kod 22,5% (16/71) pacijenata, dok je kod 5,6% (4/71) detektovana inv22-2. Ukupna uočena učestalost inv22 u skladu je sa do sada publikovanim učestalostima ove mutacije od 20-35% u opštoj populaciji hemofiličara (Keeney i sar., 2005; Abou-Elew i sar., 2011). Detektovana učestalost inv22-1 četiri puta je veća u odnosu na učestalost inv22-2 (16:4), što su potvrdili i drugi autori u svojim studijama, navodeći razliku i do pet puta (Abou-Elew i sar., 2011; Antonarakis i sar., 1995).

Na osnovu gore navedenih i analiziranih rezultata može se izvesti zaključak da inv22 gena *F8* predstavlja tipičnu mutaciju kod obolelih od HA sa teritorije Srbije. Takođe, učestalost ove promene, kao i njena raspodela po tipovima u populaciji Srba ne odstupa od vrednosti registrovanih u do sad obrađenim populacijama.

Dobijeni rezultati, takođe su još jedna od potvrda predloženog evolucionog mehanizma nastanka inverzija, koji u svojim istraživanjima predlažu Bagnall i saradnici. U publikaciji iz 2005, oni ističu da je do dupliciranja regiona *int22h*, čijom intrahomozomskom rekombinacijom nastaje inv22, došlo još pre oko 25 miliona godina. Jedna njegova kopija (*int22h-1*) ubačena je u gen *F8*, dok su dve kopije ostale locirane van gena (*int22h2* i *int22h-3*). Sekvenciranjem X hromozoma i humanog genoma, ustanovilo se da su *int22-1* i *int22-2* strukture isto orjentisane, dok *int22h-1* i *int22h-3* sekvence imaju suprotnu orjentaciju (slika 35a). Takođe je utvrđeno da sličnost sekvence unutar *F8* gena (*int22-1*) i sekvenci van njega (*int22h2* i *int22h-3*), iznosi 99,32% dok sličnost vangsenskih (*int22h2* i *int22h-3*) sekvenci iznosi čak 99,92% (Bagnall i sar.,2005).



**Slika 35.** Šematski prikaz položaja *int22h* struktura: a) normalni alel (WT); b) alel nastao inverzijom *int22h-2* i *int22h-3* regiona

(preuzeto: Bagnall i sar., 2006, modificirano)

Ovakva genomska struktura predstavlja opterećenje genoma, jer dovodi do intra i interhromozomskih rekombinacija koje su uzrok inverzija, delecija i duplikacija, a pomenuti istraživači pretpostavljaju da se ona i pored toga evoluciono održala zahvaljujući mehanizmu genske konverzije.

Bagnall i saradnici takođe smatraju da postoje i evolucionari koraci u cilju redukcije ovih pojava. Jedan od njih bio bi veći stepen različitosti između intragenske, *int22h-1* sekvence i ekstragenskih kopija (*int22h-2* i *int22h-3*), u odnosu na međusobnu razliku ekstragenskih kopija. To bi trebalo da je uzrok učestalije rekombinacije između ekstragenskih *int22h-2* i *int22h-3* regiona, za koju je potvrđeno da nema patološku fenotipsku ekspresiju i smatra se normalnim polimorfizmom u populaciji ljudi (slika 35b). Takođe je potvrđeno da su *int22h-2* i *int22h-3* regioni sa istog X hromozoma (*cis* oblik) sličniji, u odnosu na regione sa dva homologa X hromozoma (*trans* oblik), što bi takođe trebalo da favorizuje njihovu, tj. intrahromozomsku rekombinaciju ekstragenskih regiona.

Ovakva rekombinacija, koja nema štetan efekat, smanjila bi verovatnoću nastanka patogene inverzije, za čiji je nastanak u tom slučaju potreban još jedan rekombinacioni događaj. Takva, dvostruka intrahromozomska rekombinacija zaista se dešava u slučaju inv22-2, a njena učestalost i jeste mnogo manja u odnosu na inv22-1 (Bagnall i sar., 2006).

Bagnall i saradnici, na osnovu svega navedenog zaključuju da nagomilavanje različitosti između intragenske i ekstragenskih kopija, a očuvanje sličnosti ekstragenskih kopija istog X hromozoma, predstavlja evolutivni način borbe protiv patogenih promena. Potvrdu ovakvog zaključka nalaze u pet puta manjoj učestalosti inv22-2 u odnosu na inv22-1, a dobijeni rezultati ove studije svakako idu u prilog predloženom evolutivnom mehanizmu (Antonarakis i sar., 1995; Bagnall i sar., 2006).

### **5.1.2. Detekcija i učestalost inv1 u *F8* genu**

Inv1 gena *F8*, posle inv22, predstavlja sledeću po učestalosti veliku inverziju koja je uzrok nastanka HA. Ova mutacija takođe nastaje kao rezultat intrahromozomske rekombinacije nekodirajućeg dela *F8* gena (*int1h-1*) i njegove ekstragenske kopije (*int1h-2*), tako da je i za njenu detekciju, kao i u slučaju inv22, neophodna primena specifičnih direktnih metoda (Keeney i sar., 2005).

U ovoj studiji, detekcija inv1 u ispitivanom uzorku HA pacijenata urađena je primenom metode IS-PCRa, koja je minimalno modifikovana u odnosu na preporučenu originalnu metodu (Rossetti i sar., 2008). Izmene su se uglavnom odnosile na optimizaciju koncentracije DNK korišćenih uzoraka. Dobijeni rezultati su pokazali prisustvo inv1 kod 4,2% pacijenata (3/71). Ova vrednost statistički se ne razlikuje od definisane učestalosti od oko 2% u opštoj populaciji hemofiličara (Keeney i sar., 2005). Na osnovu navedenog može se zaključiti da inv1 u genu *F8* predstavlja specifičnu mutaciju u populaciji obolelih od HA na teritoriji Srbije, a njena etnička učestalost se ne razlikuje od učestalosti u opštoj populaciji obolelih od HA.



Nakon što je sekvenciranjem potvrđeno prisustvo *int1h-1* strukture unutar *F8* gena, kao i identične, ali suprotno orjentisane sekvence, *int1h-2*, koja je locirana van gena, u okviru pojedinačnih genoma definisana je njihova homologija od 99,9% (Bagnall i sar., 2002) (slika 36).



**Slika 36.** Šematski prikaz položaja *int1h* struktura

Navedeni stepen homologije *int1h* regiona, viši je od međusobnog stepena homologije *int22h* regiona, na osnovu čega bi se očekivalo da se *int1h* regioni češće rekombinuju i da se *inv1* javlja sa višom učestalošću od *inv22*. Međutim, objavljeni rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da se *inv1* javlja sa i do 10 puta manjom učestalošću u odnosu na *inv22* (Oldenburg i sar., 2006; Xue i sar., 2010). Bagnall i saradnici smatraju da je osnovni uzrok toga 9 puta manji obim sekvenci koje se rekombinuju u okviru introna 1, u odnosu na one u regionu introna 22. Takođe, kao razlog ističu i postojanje tri kopije *int22h* koje stupaju u rekombinaciju, naspram dve *int1h* kopije.

Pored ovih kvantitativnih karakteristika, pomenuti istraživači ukazali su i na neke morfološke specifičnosti *int1h* struktura koje bi mogle biti razlog niže učestalosti *inv1*. Utvrđeno je da sličnost *int1h-1* sekvenci kod različitih osoba iznosi 100%, dok je polimorfizam *int1h-2* regiona uočen u samo jednoj bazi (C-G). Na osnovu ovih činjenica, istraživači su zaključili da i pored patogenog opterećenja, u *int1h* regionima nije došlo do nagomilavanja razlika, tj. da oni predstavljaju visoko konzervirane i evolutivno značajne strukture u okviru genoma (Bagnall i sar., 2002). Kao bi se ovakve genske strukture očuvale, pretpostavlja se da ih karakteriše i manja stopa rekombinacije u odnosu na regione *int22h*, što pored veličine struktura, takođe utiče na nižu učestalost *inv1* u odnosu na *inv22*.

Rezultati ovog istraživanja koji su pokazali 7 puta manju učestalost *inv 1* u odnosu na *inv22* (20/3), u skladu su sa navedenim literaturnim podacima i idu u prilog zaključku o posebanom značaju *int1h* regiona u genomu, što ih nasuprot evolucionom opterećenju favorizuje i čini stabilnim.

### **5.1.3. Uporedna analiza prisustva *inv22* i *inv1* u *F8* genu**

Uporedne analize prisustva *inv22* i *inv1*, u uzorku od 71 HA pacijenata, urađene su u cilju eventualnog potvrđivanja prisustva obe mutacije istovremeno, kod nekog od ispitanika. Rezultati su pokazali da je kod svih analiziranih pacijenata uočeno prisustvo samo jedne mutacije, tj. *inv22* ili *inv1*. U dostupnoj literaturi, podaci o prisustvu obe inverzije kod pacijenata sa HA, za sada nisu objavljeni.

Na osnovu gore analiziranih rezultata može se zaključiti da morfološki, nastanak jedne inverzije kod određenog pacijenta, onemogućava nastanak druge, tj. postojanje *inv22* onemogućava postavljanje regiona X hromozoma u položaj koji bi doveo do intrahromozomske rekombinaciju *int1h* struktura i obrnuto. Ova pretpostavka je još jedna od potvrda predloženog mehanizma nastanka inverzija.

### **5.1.4. Detekcija i učestalost velikih delecija i duplikacija u *F8* genu**

Detekcija velikih delecija i duplikacija u ispitivanom uzorku rađene su primenom:

- IS-PCR i cIS-PCR metoda u cilju detekcije delecija (*del22*) i duplikacija (*dup122*) u okviru introna 22 gena *F8*;
- MLPA metode za određivanje prisustva velikih delecija i duplikacija u kodirajućem delu gena *F8*.

Detekcija del22 i dupl22, primenom kombinacije IS-PCRa i cIS-PCRa, urađena je uporedo sa analizama za detekciju inverzija, u uzorku od 71 pacijenta sa kliničkom dijagnozom HA. Rezultati su bili negativni za sve obrađene pacijente, tj. nije uočeno prisustvo del22 i dupl22 ni kod jednog analiziranog pacijenta (0/71; učestalost od 0%).

Delecije koje je moguće detektovati metodom IS-PCRa, nastaju kao posledica rekombinacije *int22h* regiona, i velikog su obima jer obuhvataju veći deo gena *F8*, kao i region X hromozoma od *F8* gena do ekstragenetskih kopija *int22h*. Prema zaključcima El-Hattab i saradnika, kao i Abellayero i saradnika, delecije ovog tipa u hemizigotnom stanju, kod muškaraca, zbog svog obima, nisu kompatibilne sa životom (Abellayero i sar., 2012; El-Hattab i sar., 2011). Potvrda toga su i rezultati obimnih studija u kojima nisu detektovani slučajevi obolelih muškaraca sa ovim tipom mutacija (Rossetti i sar., 2007; Teophilus i sar., 2001). Abou-Elew i saradnici jedini do sada objavljuju pozitivne rezultate IS-PCR analize sa učestalošću delecije od 23% (3/13), za koje se smatra da su nastale izmenjenim mehanizmom, a čije definisanje zahteva dalja istraživanja.

Dupl22, kod obolelih od hemofilije, prema dosadašnjoj literaturi nisu detektovane. Najnovija istraživanja El-Habbata i saradnika ukazuju da ove promene ne dovode do razvoja HA, već do poremećaja u ponašanju označenog kao XILD sindrom (Engl. linked intellectual disability) (El-Hattab i sar., 2011).

Odsustvo del22 i dupl22 u obrađenom uzorku HA pacijenata tokom ove studije, u saglasnosti je sa navedenim podacima u dostupnoj literaturi.

Nakon gore navedenih istraživanja, sledeći korak je bio određivanje prisustva velikih delecija i duplikacija u kodirajućem delu *F8* gena, primenom MLPA metode. Objavljeni rezultati Acquila i saradnika, kao i drugih istraživača dali su potvrdu da MLPA predstavlja optimalnu metodu za direktnu detekciju čak 98% delecija i duplikacija većih od 50bp u kodirajućem regionu *F8* gena (Acquila i sar., 2008; Lannoy i sar., 2012).

U ovoj studiji prisustvo velikih delecija i duplikacija kodirajućeg regiona *F8* gena analizirano je u uzorku od 20/48 obolelih, koji su bili negativni na prisustvo *inv22* i *inv1* u prethodno sprovedenim analizama, a dostupni za dalje testiranje. Rezultati su pokazali prisustvo delecija kod 3/20 (15%) pacijenata, dok prisustvo duplikacija nije detektovano.

Uočena učestalost delecija u analiziranom uzorku pacijenata iz Srbije od 15%, razlikuje se od učestalosti koja se u literaturi navodi. Green i saradnici u svojoj obimnoj studiji na uzorku od 772 pacijenta navode učestalost od 5%, a Xue i saradnici učestalost od 2% u uzorku od 148 analiziranih pacijenta (Green i sar., 2008; Xue i sar., 2010). Uzrok velikog odstupanja dobijenih rezultata, u odnosu na one publikovane u literaturi, jedino može da se objasni malim brojem obrađenih pacijenata u ovoj studiji, što ćemo pokušati da proverimo tokom budućih istraživanja.

Kod dva pacijenta (2/20), označenih kao H1 i H2, detektovano je prisustvo delecije egzona 2 i 3. Ovaj tip delecije registrovan je u svetskoj bazi mutacija (HAMSTeRS). Prijavljena su dva ovakva slučaja, jedan od strane Youssoufian i saradnika koji opisuju deleciju od 9-12 kb, a drugi od strane Rossetia i saradnika, koji su detektovali deleciju manju od 22kb (Youssoufian i sar., 1988; Rossetti i sar., 2007). S obzirom na to da su delecije egzona 2 i 3 veoma retke, visoka učestalost od 10% ovih delecija u našem uzorku mogla bi da se objasni zajedničkim poreklom pacijenata, koje bi se dokazalo analizom njihovih haplotipova. Osim delecije egzona 2 i 3, kod 1/20 pacijenata označenog kao H1, uočena je delecija egzona 7. Delecija čitavog egzona 7, takođe je već prijavljena u HAMSTeRS bazi, od strane Astermark i saradnika, kod dva pacijenta iz iste porodice, a precizna veličina deleciranog regiona nije naznačena (Astermark i sar., 2005).

Uočeni tipovi velikih delecija u ovoj studiji, s obzirom na mali broj do sada registrovanih slučajeva u literaturi, mogu se posmatrati kao sporadične mutacije u *F8* genu kod obolelih iz Srbije.

Mehanizam nastanka registrovanih delecija egzona 2 i 3, kao i egzona 7, u literaturi nije definisan, a precizno objašnjenje trenutno postoji za mali broj promena ovog tipa (oko 10%). Roth i saradnici definisali su deleciju veličine 37 410 bp, koja obuhvata egzon 1 i promotorni region *F8* gena, a na svojim krajevima sadrži homologne GGGCC sekvence. Druga definisana delecija obuhvata regione egzona 25 i 26, veličine 22 230 bp, njene granične sekvence locirane u okviru TTTAAA ponovljenih motiva. Na osnovu navedenog zaključeno je da su ove velike delecije verovatno nastale nehomologim vezivanjem DNK krajeva, tj. NHEJ mehanizmom (Roth i sar., 2011). You i saradnici takođe su uspeli da definišu preciznu strukturu kod deset detektovanih delecija, čija veličina iznosi od 1,3 do 68,5 kb. Kod osam od njih uočena je mikrohomologija u tačkama prekida što ukazuje da uzrok nastanak ovih promena jeste replikacija u okviru malih, homologih regiona, tj. MMRDR (You i sar., 2013).

Tokom ove studije primenom MLPA metode, u vremenski prihvatljivom intervalu dobijeni su validni i precizni rezultati za sve HA pacijente u analiziranom uzorku. Pored efikasnosti, potvrđeno je da se njenom primenom obezbeđuje adekvatan dijagnostički tretman obolelih i njihovih porodica (detekcija statusa nosioca i prenatalna dijagnostika), pa se stoga ova metoda može preporučiti kao metoda izbora za detekciju velikih delecija i duplikacija. Međutim, za preciznu veličinu, strukturu i granice regiona obuhvaćenih mutacijom neophodno je sprovesti dalje analize, metodama direktnog sekvenciranja, a istraživanja u tom cilju su još uvek su u toku.

### 5.1.5 Presekvencioni skrining *F8* gena

Kod onih pacijenata kod kojih prethodnim analizama nisu detektovane inv22 i inv1, kao ni velike delecije i duplikacije kodirajućeg regiona, bilo je neophodno sprovesti dalje analize u cilju otkrivanja malih delecija, duplikacija, inverzija ili tačkastih mutacija u *F8* genu. Ovi tipovi mutacija se javljaju sa ukupnom učestalošću od preko 60% u populaciji obolelih od HA, a njihova detekcija je moguća jedino primenom metode direktnog sekvenciranja (Keeny i sar., 2005). Kako *F8* gen, veličine 186kb, spada u grupu najvećih gena u genomu čoveka, sekvenciranje čitavog njegovog regiona predstavlja izuzetno obimnu proceduru, vremenski i materijalno neadekvatnu u dijagnostičke svrhe. Iz tih razloga istraživači su se saglasili da je prvo najracionalnije uraditi presekvencioni skrining pojedinačnih delova gena, tj. izdvojiti regione gena sa razlikama u strukturi u odnosu na normalnu kontrolu, a nakon toga direktno sekvencirati samo ove regione kako bi se promene precizno definisale. U objavljenim vodičima za dijagnostiku HA, uvrštene su i preporučene metode presekvencionog skrininga koje podrazumevaju analizu egzonskih (kodirajućih) regiona gena, a u procesu standardizacije su i procedure za analizu i ostalih, promotornih i intronskih regiona (HAMSTeRS; Keeny i sar., 2005).

Ovakvim pristupom, do sad je registrovano preko 1500 različitih tačkastih mutacija, malih delecija i insercija (HAMSTeRS) (tabela 33).

**Tabela 33.** Broj registrovanih tačkastih mutacija, malih delecija i insercija u HAMSTeRS bazi

Egzon	Tačkaste mutacije (broj mutacija)			Male delecije i insercije (broj mutacija)	
	Missense	Nonsense (Stop)	Splice site		
1	25	2	9	3	
2	19	2	5	8	
3	49	0	7	6	
4	66	8	9	4	
5	16	1	8	5	
6	26	3	9	5	
7	61	5	4	13	
8	40	8	1	9	
9	40	4	13	12	
10	20	4	8	7	
11	56	6	7	5	
12	31	8	6	4	
13	60	5	7	18	
14	79	89	7	153	
15	39	4	9	8	
16	53	14	6	12	
17	47	4	3	10	
18	49	5	3	11	
19	24	2	9	8	
20	10	1	0	5	
21	13	7	3	0	
22	30	6	6	5	
23	47	3	6	13	
24	18	6	7	8	
25	26	5	6	13	
26	39	6	na	12	
<b>Ukupno</b>	<b>983</b>	<b>208</b>	<b>158</b>	<b>357</b>	<b>1706</b>

U ovoj studiji, u cilju presekvencionog skrininga kod 46/71 pacijenta, korišćenjem metode SSCPa, analizirane su strukture egzona 3, 4, 9, 11, 13 i 23 gena *F8*.

Prvi kriterijum za odabir navedenih 6, od ukupno 26 egzona u *F8* genu, bio je veličina egzona. Odabrani su oni egzoni čiji su produkti nakon umnožavanja PCRom bili oko 350 kb, što je predstavljalo optimalnu veličinu za direktnu primenu SSCP metode. Drugi kriterijum je bio učestalost do sada registrovanih mutacija u egzonima, a izdvojeni su oni kod kojih je ta učestalost bila najveća (HAMSTERS) (tabela 34).

**Tabela 34.** Karakteristike analiziranih egzona tokom presekvencionog skrininga

<i>Egzon</i>	<i>Veličina PCR produkta (bp)</i>	<i>Broj registrovanih mutacija*</i>
3	299	62
4	372	87
9	300	69
11	362	74
13	364	90
23	294	69

\*Odnosi se na broj tačkastih mutacija, malih delecija i insercija

Od 46 bolesnika kod kojih je urađena analiza SSCP metodom, presekvicioni skrining je pokazao odstupanje od kontrolnog uzorka kod 3 obolela pacijenta. Kod pacijenta pod rednim brojem H1, uočeno je odstupanje u regionu egzona 23 u vidu dodatne trake na gelu, što je ukazalo na prisustvo kvalitativne promene ovog regiona. Odstupanje kod pacijenta H2 detektovano je u regionu egzona 9, a odnosilo se na postojanje signalne trake na neodgovarajućoj poziciji u odnosu na kontrolu, čime je postavljena sumnja na prisustvo kvantitativne promene, tj. mutacije koja utiče na veličinu analiziranog egzona. U uzorku pacijenta označenog kao H3, detektovane razlike odnosile su se na postojanje signala nedovoljnog intenziteta u odnosu na normalu, a vezano za regione egzona 13 i 23.

Tokom daljeg istraživanja kod navedenih pacijenata sprovedena je analiza direktnog sekvenciranja, kako bi se utvrdilo da li su uočene promene posledica prisustva mutacija. Ove analize su, takođe bile značajne za utvrđivanje efikasnosti SSCP metode u presekvencionom skriningu regiona gena *F8*.



### 5.1.6 Sekvenciranje

Direktno sekvenciranje predstavlja poslednju u nizu metoda preporučenih u dijagnostičkoj proceduri za određivanje molekularne osnove HA. Metoda sekvenciranja je primenjena i u ovoj studiji, čime je zaokružen proces detekcije mutacija u uzorku obolelih od HA sa teritorije Srbije. Sekvencirani su regioni gena *F8* sa sumnjom na promenu nakon primene SSCP metode, kod tri pacijenta, a rezultati su pokazali prisustvo mutacija kod dve obolele osobe.

Kod pacijenta H1 detektovano je prisustvo missense mutacije, c.6532C>T (R2159). Ova mutacija je registrovan u zvaničnoj bazi (HAMSTeRS), a do sada je prijavljeno 69 slučajeva. U istraživanjima Greena i saradnika na uzorku od 772 pacijenta ova mutacija je detektovana kod 8 pacijenta, kod četiri pacijenta u studiji Lauriea i saradnika sprovedenoj kod 45 obolelih, u tri slučaja tokom istraživanja Repessea i saradnika, itd (Green i sar., 2008; Laurie i sar., 2007; Repesse i sar., 2007). S obzirom da je pomenuta promena detektovana kod više pacijenata u publikovanim obimnim studijama, a da je njeno prisustvo registrovano u obliku pojedinačnih slučajeva i u studijama manjeg obima, postavlja se pitanje da li se ona može uvrstiti u specifične mutacije kod obolelih od HA. Istraživanja u cilju odgovora na ovo pitanje sproveli su Laurie i saradnici, analizom haplotipova obolelih i njihovih porodica. Rezultati su pokazali da je navedena mutacija bila vezana za određeni haplotip, iako porodice nisu bile u rodbinskim vezama. S obzirom na to da je istraživanje bilo sprovedeno na ostrvskoj populaciji Novog Zelanda autori su uzeli u obzir „efekat osnivača”, a za konačne zaključke svakako su neophodna obimnija istraživanja (Laurie i sar., 2007)

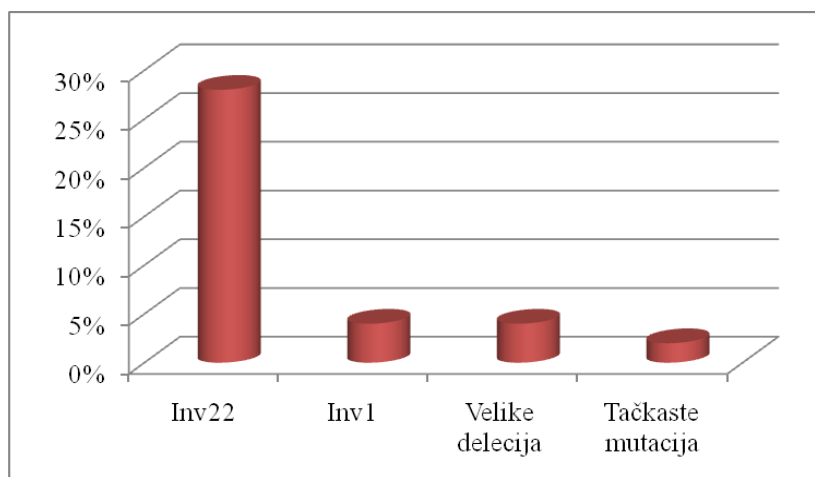
Detekcija c.6532C>T mutacije u populaciji obolelih od HA na teritoriji Srbije, koja predstavlja populaciju mnogo manjeg obima u odnosu na etničke populacije koje su do sada obrađivane, mogla bi ići u prilog pretpostavci o specifičnosti ove mutacije. Da bi se ova pretpostavka potvrdila ili dokazalo postojanje eventualnog „efekta osnivača” neophodno je dodatno istraživanje i definisanje haplotipova, kako u populaciji Srba tako i u okolnim etničkim grupama, zbog izražene migracije na ovim prostorima.

Druga mutacija, detektovana metodom direktnog sekvenciranja kod pacijenta H2 definisana je kao c.1332\_1332delA (p.Val445Serfs\*8) i pripada grupi mutacija koje menjaju okvir čitanja u *F8* genu (frameshift). Do sada je delecija ovog tipa prijavljena u zvaničnoj svetskoj bazi kod 4 pacijenta, od čega publikacije postoje za dva slučaja. Freson i saradnici prvi su objavili podatke o ovoj mutaciji, koju su detektovali kod jednog, iz grupe od 20 obolelih (Freson i sar, 1998). Drugi publikovan slučaj objavljen je u radu Greena i saradnika koji su takođe detektovali jedan slučaj navedene delecije u uzorku od 772 pacijenta (Green i sar., 2008). Mala učestalost c.1332\_1332delA mutacije ukazuje da se radi o mutaciji sporadičnog tipa.

Upravo iz ovih razloga opis, registracija, i publikovanje otkrivene delecije tokom ove studije od velikog su značaja za dopunu podataka o ovoj mutaciji u zvaničnoj svetskoj bazi mutacija .

#### **5.1.7. Sumirani rezultati otkrivenih mutacija u F8 genu kod HA pacijenata sa teritorije Srbije**

Molekularna istraživanja u uzorku od 71 pacijenta obolelog od HA u Srbiji potvrdila su prisustvo mutacija kod 40% (28/71) pacijenata, dok je kod 60% (43/71) njih, molekularna osnova bolesti ostala nedefinisana. U analiziranom uzorku detektovano je četiri tipa mutacija: inv22 sa učestalošću od 28,1%, inv1 sa učestalošću od 4,2%, velike delecije sa učestalošću od takođe 4,2% i tačkaste mutacije (missence tipa i mala delecija) sa učestalošću od 2,1 (slika 37).



*Slika 37. Šematski prikaz detektovane distribucije mutacija F8 genu u analiziranom uzorku*

U svim sličnim studijama u svetu, navedeni tipovi mutacija takođe su detektovani, tako da se iz dobijenih rezultata može izvesti zaključak da je distribucija mutacija u F8 genu, kod pacijenata obolelih od HA sa teritorije Srbije, u skladu sa distribucijom mutacija u drugim populacijama.

## **5.2. Distribucija mutacija u odnosu na klinički oblik HA**

Utvrđeno je da u opštoj populaciji obolelih od HA, 35-40% njih boluje od blagog kliničkog oblika bolesti, 20-25% pacijenata od umerene HA, dok se kod 40% pacijenata javlja težak klinički oblik oboljenja (Antonarakis i sar., 1995; White i sar., 2001). U uzorku pacijenata obrađenom u ovoj studiji 15,5% (11/71) bilo je upućeno sa dijagnozom blage HA, 19,7% (14/71) pacijaneta sa umerenim oblikom bolesti, dok je kod 64,8% (46/71) pacijenata dijagnostikovana teška HA. Učestalosti pacijenata sa blagim i umerenim tipom hemofilije značajno odstupaju od istih vrednosti publikovanih u literaturi. Uzrok ovakve raspodele proizilazi iz činjenice da se usled neophodne medicinske pomoći, veći broj pacijenata sa teškim oblikom javlja lekaru i biva dijagnostički obrađen. Pacijenti pre svega sa blagom hemofilijom, ređe zahtevaju medicinsku pomoć, a bolest često i dugo godina ostaje neotkrivena.

Nakon detekcije i određivanja distribucije mutacija u uzorku HA pacijenata na teritoriji Srbije, obrađeni pacijenti su svrstani u tri grupe u odnosu na klinički oblik bolesti. Učestalost svih detektovanih mutacija je dalje analizirana u okviru navedenih grupa.

### **5.2.1. Analiza učestalosti inv22**

Analiza učestalost inv22 u grupama sa različitim kliničkim oblikom bolesti pokazala je da je ovaj tip mutacije najzastupljeniji kod pacijenata sa teškom HA, kod kojih je registrovana učestalost inv22 od 39,1%.

Naylor i saradnici, kao i Lakich i saradnici, među prvima su detektovali prisustvo inv22 i to kod obolelih od teškog kliničkog oblika bolesti, sa učestalošću od 43% i 45% (Lakich i sar., 1993; Naylor i sar., 1995). Potvrda njihovih rezultata dobijena je nakon jedne od do sada najobimnijih studija međunarodnog konzorcijuma, pod rukovodstvom Antonarakisa i Rossitera, na uzorku od 2093 pacijenata tokom koje je registrovana učestalost inv22 od 42%, takođe samo kod pacijenata sa teškim oblikom HA (Antonarakis i sar., 1995). Precizno definisanje mehanizma nastanka inverzija, od strane Bagnalla i saradnika, daje objašnjenje razvoja teškog kliničkog oblika bolesti, tj. odsustva FVIII u plazmi ( $FVIII < 1$ ) kod pacijenata sa inv22. Oni ističu da do ovakve kliničke slike dolazi usled velikog obima mutacije, koja potpuno narušava strukturu *F8* gena i za posledicu ima sintezu hibridne iRNK koja obuhvata egzone 1-22, bez egzona 23-26. Na osnovu ovakve hibridne iRNK dalja sinteza funkcionalnog proteina, FVIII, nije moguća (Bagnall i sar., 2005).

Uočena zastupljenost inv22 od 39,1% kod pacijenata sa teškom HA na teritoriji Srbije, u ovoj studiji, potpuno je u skladu sa navedenim podacima iz literature.

Učestalost inv 22 u grupi pacijenata sa teškim oblikom HA u našoj zemlji upoređena je sa istim učestalostima dobijenim u populacijama hemofiličara iz drugih zemalja i to: evropskih država (Slovenije, Nemačke, Italije, Španije i Velike Britanije), azijskih država (Indije, Kine i Koreje), i država sa teritorije američkog kontinenta (Meksiko, Argentine, Brazil i Čilea) (tabela 35).

**Tabela 35.** Učestalost inv22 u različitim etničkim populacijama HA pacijenata i statističko poređenje sa rezultatima za populaciju iz Srbije

<i>Etnička populacija</i>	<i>Učestalost inv22</i>	<i>Značajnost</i>	<i>Referenca</i>
Srbija	18/46 (39,1%)	/	ova studija
<b>Evropske države</b>			
Slovenija	40/82 (48,8%)	0,233	Debeljak i sar, 2012
Nemačka	339/753(45%)	0,435	Olenburg i sar, 2006
Italija	451/874 (52%)	0,752	Margalione i sar, 2003
Španija	42/102 (42%)	0,814	Cassana i sar, 2008
Velika Britanija	94/209 (45%)	0,47	Bagnall i sar, 2002
<b>Azijske države</b>			
Indija	35/80 (44%)	0,613	Faridi i sar, 2012
Kina	57/148 (38,5%)	0,94	Xue i sar,2010
Koreja	30/100 (33%)	0,126	Kim i sar, 2012
<b>Američke države</b>			
Meksiko	14/31 (45%)	0,598	Mantilla –Capacho i sar, 2007
Argentina	25/64 (39%)	0,994	Rosseti i sar,2004
Brazil	46/107 (43%)	0,657	Leiria i sar ,2009

Analiza primenom statističke metode Hi kvadrat testa je pokazala da nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u analiziranoj učestalosti kod pacijenata sa teškom HA sa teritorije Srbije, u odnosu na iste populacije poreklom iz drugih etničkih zajednica. Ovakav rezultat ide u prilog pretpostvci da distribucija HA mutacija nije etnički uslovljena i uniformna je u opštoj populaciji širom sveta (Svarastava i sar., 2012).

Isti zaključak izvode u svojim istraživanjima brojni autori. Mantilla-Capacho i saradnici porede rezultate dobijene za teritoriju Meksika, sa 7 drugih etničkih populacija i takođe ne nalaze statistički značajnu razliku ( $p > 0,5$ ) (Mantilla –Capacho i sar., 2007). Margaglione i saradnici, koji su obradili odgovarajuću populaciju obolelih sa teritorije Italije i rezultate uporedili sa 5 drugih studija različitog etničkog karaktera, takođe izvode identičan zaključak (Margaglione i sar., 2008).

Prisustvo inv22 u ovoj studiji je takođe uočeno i kod 2/14 (14,3%) pacijenta sa umerenom HA. Ovakvi slučajevi su u literaturi izuzetno retki. U radu Abou-Elewa i saradnika navodi se primer 1/10 (10%) pacijenta sa umerenom HA kod koga je dijagnostikovana inv22, dok se u rezultatima istraživanja Polakove i saradnika, opisuje ista učestalost od 8% (Abou- Elew i sar., 2010; Polakov i sar., 1998). Uzevši u obzir da su ovakvi slučajevi nakon analize porodičnog stabla definisni kao sporadični, tj. bez prethodne pojave u porodicama obolelih, i da je nivo FVIII kod ovih pacijenata bio blizu 1UI/dl (1,1-3IU/dl), Abou-Elew i saradnici zaključuju da bi uzrok umerenog fenotipa, tj. prisustva male količine aktivnog FVIII, mogao biti somatski mozaicizam. Takva pretpostavka podrazumeva nastanak inv22 u toku embrionalnog razvoja, što bi imalo za posledicu i prisustvo određenog procenta normalnih ćelija kod obolelog, tj. ćelija bez mutacije (*wild type*) i sintezu izvesne količine funkcionalnog FVIII proteina. Nastanak inv22 postkonceptijski podrazumeva intrahromozomsku rekombinaciju tokom mitoze, što se smatra malo verovatnim događajem, a niska učestalost do sada registrovanih pacijenata sa inv22 i umerenim fenotipom svakako ide u prilog takvom stavu (Abou-Elew i sa.r, 2010).

Margaglione i kolege, pak, zajedno sa Goodeveom ističu često međusobno neslaganje rezultata dobijenih primenom različitih testova za detekciju nivoa faktora koagulacije, tj. da izbor metode za određivanje FVIII može biti uzrok neslaganja uočenog fenotipa sa genotipom. Usled toga navode da je neophodno višestruko ponavljanje ovih testova, kao i uniformisanje i usaglašavanje različitih metoda (Margaglione i sar., 2008; Goodeve i sar., 2003).

Kod dva pacijenta sa umerenom HA, kod kojih je tokom ove studije uočena inv22, izmereni nivo FVIII iznosio je 2 i 3 UI/dl, a porodična anamneza je bila negativna, što može ukazati na prisustvo somatskog mozaicizma kod ovih pacijenata. Eventualna analiza korišćenjem uzorka drugih tkiva, osim periferne krvi, mogla bi dati konačnu potvrdu ove hipoteze.

Prisustvo inv22, u grupi pacijenata sa blagom hemofilijom, u ovoj studiji nije detektovano. Ovakvi rezultati u potpunosti odgovaraju do sada objavljenim literaturnim podacima, među kojima nije moguće naći potvrdu o postojanju inv22 genotipa kod obolelih od blage HA.

Na osnovu dobijenih rezultata o distribuciji inv22 u odnosu na klinički oblik hemofilije, u ovoj studiji sprovedena je i statistička analiza genotip-fenotip korelacije koja je potvrdila pozitivnu korelaciju između postojanja genotipa sa inv22 i isključivo teškog kliničkog oblika HA. Ovakvi rezultati naše, kao i ostalih već pomenutih studija idu u prilog preporuci zvaničnog vodiča WFHa za molekularnu dijagnostiku HA, o obaveznom sprovođenju analize za detekciju inv22 kod obolelih od teškog kliničkog oblika bolesti (Svarastava i sar., 2012). Međutim, kako je inv22 detektovana i kod pacijenata sa umerenom hemofilijom, do dobijanja preciznog objašnjenja te pojave, preporuka ove studije, suprotno preporuci zvaničnog vodiča, jeste da je analize za detekciju inv22 neophodno uraditi i kod pacijenata sa umerenim fenotipom. U slučaju blagog oblika oboljenja, predlog ove studije jeste u saglasnosti sa zvaničnim vodičem, i podrazumeva da detekcija inv22 kod ovih pacijenata nije potrebna (Abou- Elew i sar., 2010; Svarastava i sar., 2012).

### 5.2.2. Analiza učestalosti inv1

Analiza učestalosti inv1, kao i u slučaju inv22, sprovedena je u grupama pacijenata sa teškim, umerenimi i blagim oblikom bolesti. Sva tri pacijenta (3/46; 6,5%), kod kojih je tokom ove studije dijagnostikovao genotip sa inv1 pripadali su grupi pacijenata sa teškom HA.

Brinke i saradnici, 1996 godine prvi su uočili, i u svojoj publikaciji objavili da HA može nastati kao rezultat velike inverzija introna 1 *F8* gena (Brinke i sar., 1996). Oni dalje objašnjavaju da se na osnovu ovako mutirane DNK strukture formiraju dve hibridne iRNK, jedna koja obuhvata promotorni region i intron 1 gena *F8*, i druga koja je formirana od ostatka *F8* gena i početnih delova C6.1A gena. Na osnovu ovakvih RNK struktura, nije moguća sinteza funkcionalnog proteina FVIII, što ima za posledicu prisustvo faktora koagulacije u koncentraciji manjoj od 1UI/dl i razvoj teškog oblika HA. Rezultati Bagnalla i saradnika, navode učestalost inv1 od 4,8% u populaciji hemofiličara sa teškim oblikom bolesti, što se slaže i sa publikovanim rezultatima drugih autora gde ta učestalost iznosi od 2-5% (Antonarakis i sar., 1995; Oldenburg i sar., 2006; Xue i sar., 2010). Dobijena učestalost prisustva inv1 od 6.5% u uzorku pacijenata sa teškim oblikom HA iz Srbije u skladu je sa vrednostima navedenim u literaturi.

Ova vrednost je takođe upoređena je sa istim tim vrednostima publikovanim za etničke zajednice iz drugih zemalja iz Evrope i sveta. (tabela 36).



**Tabela 36.** Učestalost inv1 u različitim etničkim populacijama HA pacijenata i statističko poređenje sa rezultatima za populaciju iz Srbije

<i>Etnička populacija</i>	<i>Učestalost inv1</i>	<i>Značajnost</i>	<i>Referenca</i>
Srbija	3/46 (6,52%)	/	ova studija
<b>Evropske države</b>			
Slovenija	0/82 (0%)	0,02	Debeljak i sar, 2012
Nemačka	19/753(2,5%)	0,108	Olenburg i sar, 2006
Italija	19/874 (6%)	0,839	Margalione i sar, 2008
Španija	4/102 (3%)	0,284	Cassana i sar, 2008
Velika Britanija	10/209 (4,7%)	0,628	Bagnall i sar 2002
<b>Azijske države</b>			
Indija	3/80 (4%)	0,482	Faridi i sar, 2012
Kina	3/148 (2%)	0,124	Xue i sar,2010
Koreja	1/100 (1%)	0,089	Kim i sar, 2012
<b>Američke države</b>			
Meksiko	0/65 (0%)	0,03	Mantilla –Capacho i sar, 2007
Argentina	1/64 (1,6%)	0,171	Rosseti i sar,2004
Brazil	3/107 (2,8%)	0,277	Leiria i sar ,2009

Rezultati dobijeni primenom statističke metode Hi kvadrat testa nisu pokazali statistički značajnu međuetničku razliku osim za populacije sa teritorije Slovenije i Meksika, u kojima inv1 nije detektovana (Debeljak i sar., 2012; Mantilla –Capacho i sar., 2007). Italijanski istraživači u svojoj obimnoj studiji ipak ističu uniformnost učestalosti inv1 među analiziranim populacijama, tj. odsustvo međuetničkih razlika (Margaglione i sar., 2008).

Prisustvo inv1 kod pacijenata sa umerenom i blagom HA u našoj studiji, kao i u studijama drugih autora, nije zabeleženo pa se stoga analize na prisustvo ove mutacije kod ovakvih bolesnika i ne preporučuju od strane svetske federacije hemofiličara (Svarastava i sar., 2012).

### 5.2.3. Analiza učestalosti velikih delecija

Učestalost velikih delecija ispitivana je u uzorku pacijenata sa umerenim (5/20) i teškim oblikom (15/20) HA. Ova analiza nije rađena za pacijente sa blagim oblikom hemofilije, zbog ograničene količine dostupnih reagenasa, a i u savremenoj literaturi nema podataka o učestalosti delecija u ovoj grupi. Razlog nepostojanja ovakvih istraživanja je, najverovatnije činjenica da pacijenti sa blagim oblikom hemofilije u velikom broju ostaju neregistrovani i neobrađeni, kao i morfologija ovog tipa mutacija čije prisustvo najverovatnije ne bi moglo da dovede do sinteze FVIII dovoljne za razvoj blage HA.

U grupi osoba sa teškom HA detektovana je učestalost od 13% (2/15). Rezultati sličnih studija objavljenih u literaturi pokazuju da se vrednosti ove učestalosti kreću od 5- 8% (Green i sar, 2008; Oldenburg i sar, 2006). Učestalost velikih delecija registrovana u ovoj studiji značajno je veća u odnosu na literarne podatke, a razlog takvih rezultata je najverovatnije manji broj ovakvih pacijenata u analiziranom uzorku.

Prema podacima zvanične svetske baze podataka za obolele od HA, do sada je registrovano 135 tipova delecija u *F8* genu većih od 50bp i kod 97% obolelih delecije su bile uzrok teškog kliničkog oblika bolesti (HAMSTeRS). Kako je samo mali broj ovakvih delecija (10%) precizno definisan, smatra se da je posledica njihovog prisustva formiranje hibridne iRNK koja ne dovodi do sinteze funkcionalnog FVIII proteina, što za rezultat ima potpuno odsustvo ovog proteina u plazmi i tešku kliničku sliku oboljenja (Roth i sar., 2011). Rezultati ove studije kod dva pacijenta sa teškim oblikom HA pokazali su prisustvo delecije egzona 7 i delecije egzona 2-3. Kako precizna struktura deletiranih regiona tokom ove studije nije definisana, za sada se samo pretpostavlja da ove promene u potpunosti narušavaju funkcionalnu strukturu *F8* gena i onemogućavaju sintezu FVIII proteina. Za potvrdu ove pretpostavke neophodna su dalja istraživanja u cilju određivanja sekvence deletiranih regiona.

U uzorku pacijenta sa umerenom HA, kod jednog pacijenta je uočeno prisustvo velike delecije (1/5) što se može posmatrati kao sporadičan slučaj. Razlog ovakvom zaključku su podaci iz literature koji pokazuju pojedinačne publikovane slučajeve, kojih je do sada registrovano samo 5 (HAMSTERS). U studiji Greena i saradnika uočeno je prisustvo dva pacijenta sa umerenom HA (FVIII:2 IU/dl) kod kojih su detektovane delecije egzona 4-5 i 4-6, a njihov uticaj na sintezu FVIII nije precizno definisan (Green i sar., 2008). Kod jednog pacijenta sa umerenim fenotipom Zoussoufian i saradnici uočili su prisustvo delecije egzona 22, a Lavargne i saradnici, takođe kod jednog pacijenta deleciju egzona 23-24 (Zoussoufian i sar., 1987; Lavargne i sar., 1992). Utvrđeno je da ove delecije dovode do formiranja hibridnih iRNK koje omogućavaju sintezu proteina FVIII, ali sa nedostatkom amino kiselina u C-domenu. Ovakav protein ima izmenjen metabolički put i smanjenu aktivnost u odnosu na normalni FVIII, pa je njegovo prisustvo uzrok umerenog oblika HA. Theophilus i saradnici u radu iz 2001. godine objavili su postojanje delecije egzona 5-6, kod takođe jednog pacijenta sa umerenom HA, a za mutaciju je ustanovljeno da ne remeti okvir čitanja gena (inframe). Ona je definisana na nivou iRNK, a istraživači su pretpostavili da ukoliko postoji i u DNK molekulu, dovodi do sinteze delimično funkcionalnog FVIII. Takođe, ovakva iRNK može da nastane i usled postojanja DNK mutacije drugog tipa, tj. split-site mutacije koja bi dovela do sinteze različitih tipova iRNK istovremeno, funkcionalnih i nefunkcionalnih, a usled toga i do razvoja umerenog fenotipa (Theophilus i sar., 2001). Ovim primerom ističe se da je u cilju izbegavanja sličnih dilema najbolje primeniti direktnu metodu za detekciju mutacija na nivou DNK, tj. MLPA metodu.

Kod jednog pacijenta sa umerenim fenotipom, u ovoj studiji, uočena je velika delecija egzona 2-3, a izmereni nivo faktora koagulacije iznosio je 2UI /dl. Ovakvi laboratorijski parametri i pomenuti literaturni podaci ukazuju da prisustvo ove mutacije nije dovelo do potpunog izostanka sinteze FVIII proteina, već do formiranja hibridne strukture sa izmenjenom funkcijom.

Kako je u našoj studiji ista mutacija detektovana i kod pacijenta sa teškom HA, pretpostavka je da se kod tog pacijenta najverovatnije radilo o frameshift mutaciji, dok je kod pacijenta sa umerenim fenotipom promena bila inframe. Za konačnu potvrdu ove hipoteze neophodna je precizna molekularna definicija prisutnih mutacija.

### **5.3. Distribucija mutacija u odnosu na prisustvo inhibitora FVIII**

Kod izvesnog broja obolelih od HA nakon primene osnovne terapije, tj. unošenja terapijskog FVIII, dolazi do imunog odgovora u vidu razvoja inhibitora za FVIII.

U uzorku pacijenata analiziranih u ovoj studiji, status prisustva inhibitora je bio poznat kod njih 56/71, a pozitivno je bilo 14,3% (8/56) obolelih. Ovakav rezultat poklapa se sa podacima WFH, koji su formirani na osnovu istraživanja velikog broja autora, i u kojima se ističe učestalost razvoja inhibitora FVIII u opštoj populaciji hemofiličara od 0-30% (Svarastava i sar., 2012; Oldenburg i sar., 2006; Margaglione i sar., 2008). Veliko variranje ove učestalosti može se objasniti kompleksnim delovanjem genetičkih i drugih negenetičkih faktora, koji determinišu njegov razvoj.

#### **5.3.1. Distribucija mutacija kod pacijenta sa inhibitorom FVIII**

Analiza distribucije detektovanih mutacija kod 8/56 pacijenata sa inhibitorom FVIII, pokazala je prisustvo dva tipa mutacija: inv22 sa učestalošću od 37,5% (3/8) i velike delecije sa učestalošću od 12,5% (1/8).

U radu Oldenburga i saradnika navedena je učestalost genotipa sa inv22 kod pacijenta pozitivnih za inhibitor od 45% (91/201), dok je učestalost velikih delecija u obrađenoj grupi iznosila 8% (Oldenburg i sar., 2006). Kim i saradnici u svojoj studiji detektuju nešto nižu učestalost inv22, od 23% (6/26), dok je uočena učestalost velikih delecija iznosila 15% (4/26) (Kim i sar., 2012).

Rezultati Margaglionea i saradnika, pak, ukazuju na visoku učestalost inv22 među pacijentima sa inhibitorom od čak 58% (113/193), dok je učestalost velikih delecija u analiziranoj grupi detektovana kao jako niska, sa vrednošću od samo 3,6% (7/193) (Margaglione i sar., 2008). Poređenjem rezultata ove studije sa navedenim istraživanjima, kao i njihovim međusobnim poređenjem uočavaju se značajna variranja. Kako je distribucija mutacija u opštoj populaciji uniformna, ovo je još jedna od potvrda da je proces razvoja inhibitora veoma kompleksan i multifaktorijalan (Tantawy i sar., 2010).

### **5.3.2. Analiza korelacije između genotipa sa inv 22 i prisustva inhibitora FVIII kod pacijenta sa teškim oblikom HA**

Bez obzira na heterogenu distribuciju mutacija kod pacijenta sa inhibitorom, naučnici su utvrdili da se inhibitor sa većom učestalošću javlja kod obolelih sa velikim delecijama, inverzijama i nonsense mutacijama u odnosu na druge genotipove (Oldenburg i sar., 2006). Iz tih razloga istraživanja su usmerena na proučavanje korelacije specifičnih genotipova i pojave inhibitora, a u cilju definisanja nekog od genotipa kao prediktivnog faktora za razvoj inhibitora. Studije su se odnosile pre svega na pacijente sa teškim kliničkim oblikom bolesti, jer su pomenute mutacije uzrok teškog fenotipa, a i primena terapijskog FVIII kod ovih pacijenata je znatno učestalija, pa samim tim i razvoj inhibitora.

Tokom ove studije učinjena je analiza korelacije genotipa sa inv22 i razvoja inhibitora kod pacijenta obolelih od teškog oblika HA. U tom cilju prvo je utvrđena učestalost prisustva inhibitora kod pacijenta sa inv22 genotipom, koja je iznosila 23% (3/13). Oldenburg i saradnici na uzorku od 735 pacijenata sa teškom HA otkrivaju učestalost pojave inhibitora kod 21% pacijenta sa inv22 (Oldenburg i sar., 2006). Margaglione i saradnici nakon obimne studije koja je obuhvatila 847 obolelih, navode da je inhibitor bio prisutan kod 25% pacijenata sa inv22 genotipom, dok u radu Kima i saradnika ta učestalost iznosi 20% (Kim i sar., 2012 ; Margaglione i sar., 2008).

Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima pomenutih studija , ali se razlikuju od rezultata španskih istraživača, gde ova učestalost iznosi 5%, kao i rezultata brazilske studije u kojoj učestalost razvoja inhibitora kod pacijenata sa inv22 iznosi 51% (Fernandez-Lopez i sar., 2005; Leiria i sar., 2009).

Tokom ovog istraživanja, statističke analize za određivanje korelacije genotipa sa inv22 i razvoja inhibitora kod pacijenata sa teškom HA, nisu dale pozitivne rezultate. Ovakav nalaz odgovara rezultatima svih gore pomenutih studija, koje uprkos izuzetno heterogenim podacima o učestalosti razvoja inhibitora kod pacijenta sa inv22, takođe nisu dokazale postojanje pozitivne korelacije za ispitivane parametre.

Kako je u praksi primećeno da se kod pacijenata sa inv22 i velikim delecijama inhibitor razvija već pri malim dozama FVIII, opravdano se i dalje sumnja na postojanje povezanosti između prisustva ovih mutacija i pojave inhibitora, ali konačan odgovor u budućnosti jedino će moći da daju rezultati multicentričnih objedinjenih studija.

#### 5.4. Analiza statusa nosilaca mutacije

Registrovanim HA pacijentima i njihovim porodicama neophodno je blagovremeno dati precizan i adekvatan genetički savet, koji pre svega podrazumeva određivanje statusa nosilaca mutiranog gena kod ženskih članova u ovakvim porodicama. Rezultati ovih analiza omogućavaju i preciznije definisanje mehanizma nastanka HA mutacija.

Nakon detekcije mutacija kod obolelih od HA poseban deo ove studije obuhvatio je analize u cilju određivanja statusa nosilaca za dostupne članove porodica obolelih. Testiranje koje je obuhvatilo 14 majki, 23 sestre i četiri ćerke obolelih, dalo je validne rezultate za sve obrađene osobe. Analize za detekciju statusa nosioca *inv22* i *inv1* sprovedene su korišćenjem metode IS-PCR, a detekcija heterozigotnog statusa velikih delecija primenom MLPA metode. Kreatori IS-PCR metode, De Brassi i saradnici, u svojoj studiji posebno ističu njenu prednost za direktnu detekciju heterozigotnih nosilaca. Takođe, u nizu navedenih istraživanja među kojima su studije Aquiole, Lannoy i saradnika, MLPA metode se favorizuje zbog mogućnosti direktnog određivanja heterozigotnog statusa velikih delecija i duplikacija (Acquila i sar, 2008; Lannoz i sar, 2012). Dobijeni rezultati u ovoj studiji takođe idu u prilog potvrdi da pomenute metode jesu visoko efikasne za direktnu detekciju statusa nosilaca u porodicama obolelih od HA.

U grupi osoba, kod kojih je analiziran status za *inv22*, testiranje je sprovedeno kod 15 majki čiji su sinovi. Kod njih 14/15 (93%) uočeno je prisustvo *inv22* u heterozigotnom obliku (*inv22/N*), dok je kod jedne osobe 1/15 (7%) uočen normalan genotip (*N/N*). Odsustvo *inv22* kod majke, ukazuje na prisustvo *de novo* mutacije kod pacijenta označenog kao H15. Antonarakis i saradnici u svom obimnom istraživanju koje je obuhvatilo studije 14 centara, od analiziranih 225 majki iz porodica sa sporadičnim slučajevima HA, pozitivan status nosilaca *inv22* definisali su kod 216 (96%) njih (Antonarakis i sar, 1995).

U 4% slučajeva, inv22 je kod probanda definisna kao *de novo*, tako da oni smatraju da je ova mutacija najverovatnije nastala tokom formiranja polnih ćelija majke, usled čega je došlo i do razvoja gonadnog mozaicizama. U ovakvim sličajevima inv22 bi bila posledica intrahromozomske rekombinacije u prisustvu dva X hromozoma, tokom mejoze, što predstavlja malo verovatan slučaj, čime se i opravdava niska učestalost ovako nastalih mutacija. Na osnovu navedenih rezultata, pomenuti istraživači izveli su zaključak da se kod sporadičnih sličajeva HA sa inv22, kod jedne od 25 majki desi mutacija u polnim ćelijama (majka nije nosilac mutacije), a koja je uzrok bolesti. Skorija istraživanja De Brasi i sradnika nisu potvrdila pretpostavljenu stopu mutacije, pošto prisustvo *de novo* inv22 u obrađenom uzorku nije detektovano (De Brasi i sar., 2000). Mutacije *de novo* mogle bi biti i rezultat postkonceptijskih promena, a HA tada nastaje usled mozaičnog genotipa pacijenta. Ovo bi podrazumevalo intrahromozomsku rekombinaciju tokom mejoze, za koju je već pomenuto da takođe predstavlja redak slučaj, čime se i objašnjava niska učestalost *de novo* inv22 (Rosseti i sar., 2008).

Visoka učestalost majki nosilaca inv22 u ovoj, kao i u drugim navedenim studijama idu u prilog predloženom mehanizmu nastanka inv22 koji je gotovo isključivo vezan za mušku gametogenezu (Rossiter i sar., 1994).

Inv22 u heterozigotnom obliku detektovana je i kod 10 (43%) sestara obolelih pacijenata. Ovaj procenat odgovara mehanizmu nasleđivanja X-vezanih recesivnih oboljenja i mogućnost prenošenja mutacije sa majke na žensko potomstvo od 50%. Analize su pokazale da su sestre pacijenta označenih rednim brojevima H1-7, heterozigotni nosioci inv22, a kako je i kod njihovih majki dokazano prisustvo mutacije, potvrđen je već poznati mehanizam nastanka i nasleđivanja HA. S obzirom da kod pacijenat H16-20 majke nisu bile dostupne za analizu, a kod sestara je potvrđeno prisustvo inv22, o mehanizmu nastanka mutacije se jedino može zaključiti da nije nastala kao posledica postkonceptijskih promena kod obolelih.

Detekcija prisustva inv22 sa učestalošću od 100% (4/4) kod ćerki obolelih, potvrda je mehanizma nasleđivanja HA. Takođe ovakav rezultat posebna je potvrda i kvaliteta primenjene IS-PCR metode za detekciju inv22.



Status nosioca za *inv1* određen je kod jedne osobe, majke dva obolela pacijenta (H29 i H30) i predstavlja učestalost od 100% u okviru grupe. Slične podatke u dostupnoj literaturi nije moguće naći, kao ni podatke o eventualnim slučajevima *de novo inv1*, verovatno zbog niske učestalosti ove mutacije kod obolelih od HA. Kako je na više načina potvrđeno da je mehanizam *inv1* sličan mehanizmu *inv22*, pretpostavlja se da se i ona najverovatnije dešava u muškoj gametogenezi (Bagnall i sar., 2001). Rezultati ove studije svakako idu u prilog tim prepostavkama, a obimnija, pre svega multicentrična istraživanja omogućila bi konačne zaključke.

Iz grupe pacijenata sa velikim delecijama, analizirana je sestra jednog od njih (H31) kod koje je takođe uočeno prisustvo odgovarajuće mutacije (del egzona 2-3), u heterozigotnom obliku (del egzona 2-3/N). O mehanizmu nastanka delecije, na osnovu ovih rezultata, nije bilo moguće doneti detaljnije zaključke.

Rezultati analiza za detekciju statusa nosilaca omogućili su preciznije definisnje mehanizma nastanka mutacija, ali su pre svega bili značajni za davanje adekvatnog genetičkog saveta. U porodicama gde su članovi definisani kao heterozigotni nosioci mutacija, s obzirom na verovatnoću od 50% da mutaciju prenesu na potomstvo, savetovano je sprovođenje prenatalne dijagnostike kod ovih žena u svakoj narednoj trudnoći. Ukoliko mutacija kod obolelog nije detektovana, pacijentima i njihovim porodicama savetovano je sprovođenje obimnije dijagnostike u nekom od centara koji to omogućavaju.

## 5.5. Prenatalna dijagnostika

Osnovni cilj prenatalne dijagnostike jeste prevencija rađanja dece sa naslednim oboljenjima i planiranje i dobijanje zdravog potomstva. Upravo iz tih razloga detekcija mutacija kod obolelih, kao i određivanje statusa nosilaca u porodicama sa anamnezom o postojanju HA, najvećim delom se i sprovode radi efikasne prenatalne dijagnostike ovog oboljenja.

Precizno definisanje mutacija kod obolelih i statusa nosilaca kod članova njihovih porodica, tokom ove studije, omogućilo je prenatalnu dijagnostiku kod 6 parova, kod kojih je kod ženskog partnera dokazano da je heterozigotni nosilac inv22. U tim porodicama prenatalne analize sprovedene su kod 6 trudnica u 9 trudnoća.

U 8/9 (89%) slučajeva trudnice su se odlučile za ranu invazivnu dijagnostiku koja je podrazumevala dobijanje DNK uzoraka fetusa iz biopsije horionskih resica, dok je kod jedne trudnice (1/9; 11%) uzorak fetalne DNK dobijen iz kulture amniocita (amniocenteza). Uzorci DNK fetusa, prema preporukama zvaničnog vodiča, prvo su analizirani kako bi se odredio pol, a testiranje je pokazalo prisustvo fetusa ženskog pola u 6 slučajeva, dok je muški pol detektovan u tri trudnoće. Dalje analize kod fetusa ženskog pola nisu rađene, a budućim roditeljima je dat genetički savet da se analize za detekciju statusa nosioca kod njihovog ženskog deteta odrade postnatalno i da verovatnoća da njihova ćerka bude heterozigotni nosilac iznosi 50%. Roditeljima je takođe predočeno da su slučajevi žena nosilaca mutacija koji oboljevaju od teške ili umerene HA retki, i rezultat su nastalih događaja kao što su : non-random inaktivacije X hromozoma, hromozomskih rearanžmana X hromozoma ili mutacija u drugom *F8* alelu. S obzirom da su ovi slučajevi veoma retki, kod fetusa ženskog pola dalja prenatalna dijagnostika se ne savetuje.

Kod sva tri fetusa muškog pola, zbog visokog rizika od 50% da obole od HA rađene su dalje molekularne analize IS-PCR metodom u cilju detekcije prisustva inv22. Analize su u sva tri slučaja pokazale prisustvo inv22 (inv22-1 kod dva i inv22-2 kod jednog fetusa).

U svom radu Radić i saradnici standardizuju i daju potvrdu efikasnosti primene IS-PCRa za prenatalnu detekciju inv22, korišćenjem uzoraka dobijenih CVS metodom (Radić i sar., 2009). Precizna i jednostavna detekcija inv22 kod fetusa tokom molekularnih analiza u ovoj studiji, sprovedena kako na uzorcima dobijenim iz horionskih resica, tako i nakon amniocenteze, još jedan su preporuka za primenu pomenute metode u prenatalnoj dijagnostici HA

## 5.6. Prikaz slučaja ženske osobe obolele od HA

U toku istraživanja u ovoj studiji otkrivena je i jedna osoba ženskog pola (HF) koja je bolovala od HA i kod koje je definisana molekularna osnova bolesti.

Molekularne analize primenom IS-PCRa kod ove pacijentkinje pokazale su da je ona heterozigotni nosilac delecije introna 22 tip2 (del22-2/N), a MLPA testiranjem je detektovana heterozigotna, velika delecija *F8* gena koja obuhvata egzone 1-22 (del exona 22/N). Ovakav nalaz ukazao je na prisustvo velike delecije regiona X hromozoma koja je nastala rekombinacijom *int22h-1* strukture i *int22h-3* regiona (nakon intrahromozomske rekombinacije *int22h-2/int22h-3*). S obzirom na negativnu porodičnu anamnezu za HA u porodici, detektovana mutirana struktura najverovatnije je nastala ili u mejozi, tokom oogeneze kod majke pacijentkinje ili u ranom embrionalnom razvoju obolele, tokom mitotičke deobe. Ova mutacija za posledicu ima nemogućnost sinteze FVIII faktora zbog prisustva mutiranog alela *F8* (Abellyero i sar., 2012).

Prisustvo mutacije u *F8* genu u heterozigotnom stanju, ne dovodi do razvoja HA jer nivo sinteze FVIII faktora kod ovih osoba iznosi najmanje 50% (usled inaktivacije X hromozoma-Lyon hipoteza). Upravo iz ovih razloga prisustvo umerenog HA fenotipa kod ove pacijentkinje, sa nivoom FVIII < 3 IU/dl, ukazivao je da pored velike delecije, kod nje postoje i neke dodatne promene koje su uslovile ovakav fenotip (Pike i sar., 2011). Prva pretpostavka na početku ispitivanja je bila, da je bolest mogla da nastane kao posledica neslučajne (Engl. non-random, skewed) inaktivacije X hromozoma kod ove pacijentkinje, pri čemu bi se u većini ćelija inaktivisao X hromozoma sa normalnim *F8* alelom, i time smanjila količina sintetisanog FVIII ispod 50%. Drugi uzrok bolesti mogle su da budu i dodatne hromozomske aberacije koje uključuje Xq28 region i dovode mutirani *F8* alel u hemizigotno stanje (delecija) ili menjaju regulaciju normalnog alela i onemogućavaju njegovu ekspresiju (translokacije, inverzije, duplikacije). Konačno, hemofilija je mogla da se ispolji i kao posledica mutacije na drugom *F8* alelu (Sharma i sar., 2013)

U cilju detekcije hromozomskih aberacija, kod pacijentkinje HF je urađena citogenetička analiza iz kulture limfocita periferne krvi, koja je pokazala prisustvo mozaičnog kariotipa sa tri klona: klon sa 47 hromozoma i marker hromozomom u višku u 4% ćelija, klon sa 47 hromozoma i trizomijom X hromozoma (4% ćelija), kao i klon sa normalnim ženskim kariotipom u najvećem broju analiziranih ćelija (92%) (mos 47,XX,+mar [2]/47,XXX [2]/46,XX [47]). FISH metodom potvrđeno je prisustvo navedenih klonova (osim klona 47,XX,+mar) u odgovarajućem odnosu, a detektovano i prisustvo dodatnih klonova: klona sa 45 hromozoma i jednim X hromozomom, kao i klona sa 48 hromozoma, tri X hromozoma i jednim marker hromozomom poreklom od X hromozoma. Dodatnom analizom je utvrđeno da je marker hromozom poreklom od X hromozoma, i da je najverovatnije nastao kao posledica delecije na ovom hromozomu (del(X)).

Na osnovu rezultata citogenetičkih i FISH analiza moglo se pretpostaviti sledeće: početni kariotip fetusa nakon koncepcije je najverovatnije bio 47,XXX, a onda je u toku embriogeneze usled nepravilne segregacije hromozoma tokom mitoze, došlo do nastanka klonova 46,XX i 45,X. Sledeći događaj se dogodio u klonu ćelija sa kariotipom 47,XXX, kada je došlo do delecije na X hromozomu što je rezultiralo u nastanku klona 47,XX,+mar(X), a potom je od ovog klona u sledećim mitotskim deobama, usled nepravilnog razdvajanja hromozoma došlo do nastanka dva dodatna klona 48,XXX,+mar(X) i 46,X,+mar(X), koji nije registrovan ovim analizama, najverovatnije zbog njegove male procentualne zastupljenosti. Na osnovu svih ovih rezultata pretpostavljeni kariotip obolele pacijentkinje bi mogao da se definiše kao: mos 45,X[20]/47,XXX[16]/47,XX,+marX[2]/48,XXX,+marX[1]/46,XX[202].

Ovakav mozaičan kariotip bi mogao da dovede do nastanka HA kod analizirane pacijentkinje iz nekoliko razloga:

-prvi uzrok bi mogla da bude nejednaka (Engl. non random) inaktivacija X hromozoma sa normalnim alelom *F8* gena (bez delecije) u ćelijskom klonu sa 46,XX kariotipom koji je i najmnogobrojniji, što bi imalo za posledicu aktivnost X hromozom sa mutiranim *F8* genom i ispoljavanje bolesti.

- drugi razlog za nastanak hemofilije mogla bi da bude veća procentualna zastupljenost klona sa 45,X kariotipom u tkivu jetre kod ove pacijentkinje, gde se pretežno sintetiše FVIII, ali pod uslovom da je u tom klonu ostao prisutan X hromozom sa mutiranim alelom (mutirani alel u hemizigotnom stanju).

- treći razlog za nastanak hemofilije mogao bi se objasniti većom procentualnom zastupljenošću ćelijskog klona sa 47,XXX kariotipom u target tkivu, u kome je u višku X hromozom sa mutiranim *F8* alelom, a pri tom je u procesu inaktivacije upravo jedan od ta dva X hromozoma ostao aktivan (mutiran alel u hemizigotnom stanju)

- u ćelijskim klonovima 47,XX, +mar (X), kao i 48,XXX,+ mar (X), marker hromozom je nastao kao posledica delecije dugog kraka X hromozoma, što podrazumeva i gubitak inaktivacionog centra (*XIST* gen na poziciji Xq13.2) kao i *F8* gena, tako da ovaj deleciran hromozom uvek ostaje aktivan. Ukoliko bi u ovim ćelijskim klonovima osim marker hromozoma ostao aktivan i X hromozom sa mutiranim *F8* genom, to bi moglo da dovede do fenotipske ekspresije HA (hemozigotnost za mutirani alel).

Iz svega gore navedenog može se zaključiti, da se uzrok fenotipske ekspresije HA kod analizirane pacijentkinje može objasniti prisustvom kompleksnog mozaičnog kariotipa sa različitom procentualnom zastupljenošću klonova u različitim tkivima, pa na taj način i u target tkivu gde se sintetiše FVIII, kao i non-random inaktivacijom X hromozoma.

Opisani slučajevi žena obolelih od HA u literaturi su retki, pre svega zato što podrazumevaju postojanje dva patološka događaja, ali i zbog toga što od ukupnog broja samo mali broj njih oboli od teškog i umerenog oblika bolesti, a blagi oblici uglavnom ostaju neotkriveni

U dostupnoj literaturi registrovan je jedan slučaj obolele žene sa del egzona 1-22, kod koje je na drugom alelu detektovana del egzona 13, što je dovelo do razvoja teške HA (Vencesla i sar., 2008). U jedinoj obimnijoj studiji o molekularnoj obnovi HA kod žena, Di Michele i sardanci analizirali su čak 16 osoba ženskog pola, obolelih od teškog i umerenog oblika HA sa teritorije SADA.

Detekcija mutacija u *F8* genu pokazala je postojanje inv22 kod 40% obolelih, dok su kod ostatka detektovne tačkaste mutacije koje takođe onemogućavaju sintezu FVIII. Kod jedne osobe uočeno je prisustvo genotipa inv22-1/inv22-2 (homozigota za inv22), što je dovelo do ispoljavanja HA fenotipa. Citogenetičke analize kod 10 analiziranih pacijenata pokazale su prisustvo normalnog kariotipa, dok je u 2 slučaja kariotip bio aberantan i podrazumevao je balansirane translokacije X hromozoma i autozoma, za koje se nije moglo direktno zaključiti da su uzrok razvoja HA. Međutim, rezultati procesa inaktivacije X hromozoma kod svih analiziranih pacijenat pokazale su postojanje non-random (skewed) X- inaktivacionog procesa (XPI) (Di Michele i sar., 2014). Na osnovu dobijenih rezultata, autori ove studije, kao i drugih sa sličnom problematikom, zaključuju da je osnovni uzrok razvoja teškog i umerenog fenotipa HA kod žena heterozigotnih nosilaca mutacija, non-random inaktivacija X hromozoma. Homozigotne mutacije *F8* gena i krupni hromozomski rearanžmani koji bi podrazumevali gubitak aktivnosti normalnog *F8* alela, udruženi sa mutacijama, mogu se smatrati pojedinačnim slučajevima, izuzetno niske učestalosti (Di Michele i sar., 2014; Sharma i sar., 2013).

S obzirom na navedene podatke iz literature i dobijene rezultate u ovoj studiji može se izvesti zaključak da je do razvoja umerenog oblika HA kod HF pacijentkinje došlo zbog prisustva velike delecije *F8* gena, ali i zbog prisutnosti veoma kompleksnog mozaičnog kariotipa. Postojanje više različitih ćelijskih klonova sa numeričkim i strukturnom aberacijom X hromozoma u kojima je najverovatnije došlo do različitih oblika „skewed” inaktivacije X hromozoma, dodatno je moglo da dovede do ispoljavanja HA kod ove pacijentkinje. Za konačnu potvrdu postavljenih hipoteza potrebno je analizirati način inaktivacije X hromozoma kod ove pacijentkinje u različitim dostupnim tkivima (pre svega tkivu jetre), i takva analiza je u planu.

Kod sestre (sHF) obolele pacijentkinje HF, koja je bila u 27. nedelji trudnoće, u skladu sa dobijenim rezultatima, urađene su analize za detekciju heterozigotnog statusa del 22 i del egzona 1-22. Rezultati su bili negativni, na osnovu čega je ovoj pacijentkinji, u okviru genetičkog savetovališta IMDa, savetovano da nije potrebno da uradi prenatalnu dijagnostiku, jer ne postoji povećan rizik da je fetus oboleo od HA.

## **6. ZAKLJUČCI**



Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi omogućili su donošenje sledećih zaključaka u okviru postavljenih ciljeva:

1. U analiziranom uzorku obolelih od HA na teritoriji Srbije, primenom molekularnih metoda otkriveno je prisustvo sledećih mutacija :
  - a) inv22 sa učestalošću od 28,1 % , od toga inv22-1 kod 22,5% obolelih, a inv22-2 kod 5,6 % njih. Ovakva učestalost, kao i raspodela učestalosti po tipovima nije pokazala specifičnosti u odnosu na etničko poreklo analiziranog uzorka;
  - b) inv1 sa učestalošću od 4,2 % , što je takođe u saglasnosti sa do sada objavljenim vrednostima;
  - c) velike delecije (del egzon 2-3, del egzon 7) bile su prisutne sa učestalošću od 15%. Učestalost velikih delecija registrovana u ovoj studiji značajno je veća u odnosu na publikovane rezultate drugih autora , a razlog je najverovatnije manji broj pacijenata dostupnih za analizu u obrađenom uzorku;
  - d) male delecije (c.1332\_1332delA ) i promene missence tipa (c.6532C>T) detektovane su kod dva pacijenta primenom presekvencionog skrininga i sekvenciranja.
2. Distribucija otkrivenih mutacija u uzorku pacijenata obolelih od HA na teritoriji Srbije, ne razlikuje se (osim u slučaju velikih delecija) od distribuciji mutacija u drugim, do sada analiziranim etničkim grupama.
3. Analiza učestalosti detektovanih genotipova u odnosu na klinički oblik oboljenja pokazala je :
  - a) učestalost inv22 od 39,1% kod pacijenta sa teškom HA, 14,3% kod pacijenta sa umerenom HA, dok kod pacijenta sa blagom HA ova mutacije nije detektovana. Na osnovu ovih rezultata potvrđena je pozitivna korelacija inv22 genotipa i teškog kliničkog oblika HA;

- b) učestalost inv1 kod 6,5 % pacijenata sa teškom HA, dok kod pacijenata sa umerenom i blagom HA, ova mutacije nije detektovana, a pozitivana korelacija inv1 i bilo kog od kliničkih oblika HA nije dokazana;
- c) učestalost velikih delecija od 13% kod pacijenta sa teškom HA i 20% kod pacijenta sa umerenom HA, na osnovu čega nije utvrđena pozitivna korelacija prisustva ovih mutacija i nekog od navedenih kliničkih oblik bolesti.
4. Analiza distribucije mutacija kod pacijenata sa inhibitorom pokazala je da je inv 22 prisutna sa najvećom učetsalošću u ovoj grupi koja je iznosila 37,5% , dok su velike delecije bile zastupljene sa 12,5% , što je u skladu sa vrednostima za druge etničke zajednice.
5. Statističkom analiza korelacije prisustva inhibitora i inv22 kod pacijenta sa teškim oblikom HA nije dokazana.
6. Određivanje statusa nosilaca kod članova porodica 31 obolelog pacijenta pokazalo je:
- a) majke su bile heterozigotni nosioci inv22 u 93%, dok je kod jedne majke (7%) detektovan normalan genotip (*de novo* inv22 kod deteta). Kod sestara obolelih pacijenata učestalost detektovane mutacije iznosila je 45% , dok je učestalost mutacije u heterozigotnom obliku otkrivena kod 100% analiziranih ćerki obolelih pacijenata;
- b) učestalost majki nosilaca inv1 od 100%;
- c) heterozigotni status velike delecije kod jedne sestre obolelog (100%).
- Detektovane učestalosti heterozigotnih nosilaca ne razlikuju se od vrednosti uočenih u drugim etničkim zajednicama.
7. Detekcija statusa nosilaca HA mutacija omogućila je davanje adekvatnog genetičkog saveta i sprovođenje prenatalne dijagnostike.
8. Prenatalna dijagnostika kod trudnica sa rizikom za rađanje deteta sa HA (postojanje obolelih u porodici), pokazala je prisustvo već detektovane mutacije u porodici kod svih fetusa muškog pola.

9. Detekcija mutacija kod 45 % obolelih, određivanje statusa nosilaca kod svih dostupnih članova njihovih porodica, kao i sprovedena prenatalna dijagnostika, potvrda su efikasnosti primenjenih metoda (IS-PCRa, MLPA, SSCP, direktno sekvenciranje), kao i strategije kojom su one sprovedene.
10. Svi navedeni rezultati predstavljaju prve i jedine do sada objavljene podatke u Srbiji o molekularnoj osnovi HA kao i distribuciji mutacija u uzorku obolelih pacijenata sa ovog prostora, kao i članova njihovih porodica.
11. Najveći značaj ove studije jeste u tome, što je njenim sprovođenjem omogućeno uvođenje navedenih metoda u rutinsku postnatalnu i prenatalnu dijagnostiku HA kod pacijenata sa teritorije Srbije, čime je značajno poboljšan tretman obolelih i njihovih porodica.

## **7. LITERATURA**

- Abelleyro MM, Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Larripa IB, De Brasi CD. Are int22h-mediated deletions a common cause of hemophilia? *Ann Hematol* 2012 ;91(4):633-6.
- Abou-Elew H, Ahmed H, Raslan H, Abdelwahab M, Hammoud R, Mokhtar D, Arnaut H. Genotyping of intron 22-related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. *Ann Hematol* 2011;90(5):579-84.
- Acquila M, Pasino M, Di Duca M, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi. MP MLPA assay in F8 gene mutation screening. *Haemophilia* 2008;14: 625–627.
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH Jr, Négrier C, Vinciguerra C, Gitschier J, Goossens M, Girodon E, Ghanem N, Plassa F, Lavergne JM, Vidaud M, Costa JM, Laurian Y, Lin SW, Lin SR, Shen MC, Lillicrap D, Taylor SA, Windsor S, Valleix SV, Nafa K, Sultan Y, Delpech M, Vnencak-Jones CL, Phillips JA 3rd, Ljung RC, Koumbarelis E, Gialeraki A, Mandalaki T, Jenkins PV, Collins PW, Pasi KJ, Goodeve A, Peake I, Preston FE, Schwartz M, Scheibel E, Ingerslev J, Cooper DN, Millar DS, Kakkar VV, Giannelli F, Naylor JA, Tizzano EF, Baiget M, Domenech M, Altisent C, Tusell J, Beneyto M, Lorenzo JJ, Gaucher C, Mazurier C, Peerlinck K, Matthijs G, Cassiman JJ, Vermeylen J, Mori PG, Acquila M, Caprino D, Inaba H. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*. 1995 15;86(6):2206-12.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC 2nd, Berntorp E, Malmö International Brother Study study group. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 2005;90(7):924-31.
- Bagnall RD, Ayres KL, Green PM, Giannelli F. Gene conversion and evolution of Xq28 duplicons involved in recurring inversions causing severe hemophilia A. *Genome Res* 2005;15(2):214-23.

- Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 591–8.
- Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2598–9.
- Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002; 99(1):168-74.
- Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet*. 1996;5:1945-1951.
- Bryant PE. *Origin of Chromosome Aberrations: Mechanisms*. Springer Berlin Heidelberg 2007; 177-199.
- Casana P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinos C, Cortina V, Dasi MA, Aznar JA. Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica* 2008; 93(7):1091-4.
- Chial, H. Mendelian genetics: Patterns of inheritance and single-gene disorders. *Nature Education* 2008;1:63.
- Coller BS, Schneiderman PI. Clinical evaluation of hemorrhagic disorders: The bleeding history and differential diagnosis of purpura. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al., editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5. New York: Churchill Livingstone 2008;1851–76.

- Coppola A, Margaglione M, Santagostino E, Rocino A, Grandone E, Mannucci PM, et al. AICE PROFIT Study Group Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immune tolerance induction of hemophilia A patients with highresponding inhibitors. *J Thromb Haemost* 2009;7(11):1809–15..
- De Brasi C, Candela M, Cemelj M, Slavutsky I, Larripa I, Bianco RP, DeE Tezanos. Pinto M. Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2000; 6: 21-2.
- Debeljak M, Kitanovski L, Trampus - Bakija A, Benedik-Dolnic M. Spectrum of F8 gene mutations in haemophilia A patients from Slovenia. *Haemophilia* 2012; 18: e399-e425.
- Di Michele DM, Gibb C, Lefkowitz J M, Ni Q, Gerber LM, Ganguly A. Severe and moderate haemophilia A and B in US females. *Haemophilia* 2014; 20: e136–e143.
- El-Hattab AW, Fang P, Jin W, Hughes JR, Gibson JB, Patel GS, Grange DK, Manwaring LP, Patel A, Stankiewicz P, Cheung SW. Int22h-1/int22h-2-mediated Xq28 rearrangements: intellectual disability associated with duplications and in utero male lethality with deletions. *J Med Genet* 2011;48(12):840-50.
- El-Maarri O, Singer H, Klein C, Watzka M, Herbiniaux U, Brackmann HH, Schroder J, Graw J, Muller CR, Schramm W, Schwaab R, Haaf T, Hanfland P, Oldenburg J. Lack of *F8* mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. *Blood* 2006; 107 (7): 2759-2765.
- Faridi NJ, Kumar P, Husain N. Prevalence of intron 1 inversion of cases with hemophilia a in north Indian population. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012; 18(6):599-603.
- Fay PJ. Factor VIII Structure and Function *International Journal of Hematology* 2006; 83 (2): 103-108.

- Fernández-López O, García-LozanoJR, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldán A. The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations *Haematologica* 2005; 90:707-710.
- Freson K, Peerlinck K, Aguirre T, Arnout J, Vermeylen J, Cassiman JJ, Matthijs G. Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene. *Hum Mutat* 1998;11(6):470-9.
- Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10325–29.
- Gersen SL, Keagle MB. *The Principles of Clinical Cytogenetics* 2nd Edition. Humana Press Inc, New Jersey 2005
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326–30.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312:326.
- Goodeve AC, Peake IR .The molecular basis of hemophilia A: genotype–phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29:23–30.
- Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* 2008 ;143(1):115-28.
- Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman; 1999. *The Molecular Basis of Mutation*. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21322/>



- Guć-Šćekić M, Radivojević D. Priručnik iz medicinske genetike. Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu 2009; 70-74.
- Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Res* 1991;1:34-38.
- Hoffman M, Monroe III DM. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; : 958–65
- Ingram GC. The history of haemophilia *J. clin. Path* 1976; 29: 469-479.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409 : 860–921.
- Jochen Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: From mutation analysis to new therapies. *Nature* 2005 ; 6: 488-501.
- Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 2005 Jul;11(4):387-97.
- Kim HJ, Chung HS, Kim SK, Yoo KY, Jung SY, Park IA, Lee KO, Kim SK, Kim HJ. Mutation spectrum and inhibitor risk in 100 Korean patients with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2012; 18: 1008–1013.
- Klinge J, Ananyeva NM, Hauser CA, Saenko EL. Hemophilia A – from basic science to clinical practice. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:309–22.
- Konkle BA, Josephson CN, Fletcher NS, BS. GeneReviews<sup>®</sup>: Hemophilia A. University of Washington 2014. URL [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=hemo-a](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=hemo-a)
- Lakich D, Kazazian H H Jr, Antonarakis S E, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993; 5: 236-241.

- Lannoy N, Abinet I, Bosmans A, Lambert C, Vermynen C, Hermans C. Computational and molecular approaches for predicting unreported causal missense mutations in Belgian patients with haemophilia A. *Haemophilia*. 2012 ;18(3):e331-9.
- Lannoy N, Hermans C The 'royal disease'-haemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved. *Haemophilia*. 2010 Nov;16(6):843-7.
- Laurie AD, Sheen CR, Hanrahan V, Smith MP, George PM The molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia*. 2007;13(4):420-7.
- Lavergne JM, Bahnak BR, Vidaud M, Laurian Y, Meyer D. A directed search for mutations in hemophilia A using restriction enzyme analysis and denaturing gradient gel electrophoresis. A study of seven exons in the factor VIII gene of 170 cases. *Nouv Rev Fr Hematol* 1992;34(1):85-91.
- Lavery S. Preimplantation genetic diagnosis of haemophilia. *Br J Haematol* 2009;144:303-307.
- Lee CA , Berntorp EE, Hoots WK. *Textbook of Hemophilia*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell 2011; 97-9.
- Leiria LB, Roisenberg I, Salzano FM, Bandinelli E. Introns 1 and 22 inversions and factor VIII inhibitors in patients with severe haemophilia A in southern Brazil. *Haemophilia* 2009; 15: 309–13.
- Lenting PJ, Van Mourik JA, Mertens K. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function *Blood* 1998; 92: 3983-3996.
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 1990; 7: 1-11.
- Liu ML, Nakaya S, Thompson AR Non-inversion factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thromb Haemost* 2002 ;87(2):273-6.

- Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood* 1998; 92: 1458–1459.
- Lusher J M, McMillan C W. Severe factor VIII and factor IX deficiency in females. *Am J Med.* 1978; 3:637–648.
- Lyon M F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet.* 1962; 3:135–148.
- Mantilla-Capacho JM, Beltran-Miranda CP, Luna -Zaizar H, Aguilar-Lopez L., Esparza-Flores MA, Lopez-Guido B, Troyo-Sanroman AR. Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007.; 82(4): 283-7.
- Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G, Tagliaferri AR, Zanon E, Bionchi MP, Castaldo G, Peyvandi F, Santacroce R, Torricelli F, Grandone E, Mannucci PM, and the AICE-Genetics Study Group. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008 May; 93(5):722-728.
- McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. *PCR A practical Approach.* Oxford University Press. USA 1991;18-21
- Miller SA, Dykes DD, Folesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988;16(3):1215.
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base pair changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth. Enzymol* 1987; 155: 501.
- Naylor JA, Buck D, Green PM, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1217–24.

- Naylor JA. Factor VIII Gene Mutations Causing Haemophilia A. PhD Thesis, King's College, London, 1997.
- Neitzel H, Trimborn M. Human Chromosomes: Structural and Functional Aspects. In: Günter Obe, Vijayalaxmi (Eds). Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007;1-20.
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 1988 ;120:621–623.
- Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequence by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 1995; 57: A266.
- Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006 ; 12 (6): 15–22.
- Oldenburg J, Rost S, El-Maarri O, Leuer M, Olek K, Müller CR, Schwaab R. De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 2000;96:2905–2906.
- Oller AR, Rastogi P, Morgenthaler S, Thilly WG. A Statistical Model to Estimate Variance in Long Term–Low Dose Mutation Assays: Testing of the model in a human lymphoblastoid mutation assay. *Mutat Res* 1989;216:149–61.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5:874-879.
- Peters MF, Ross CA. Isolation of a 40-kDa huntingtin-associated protein. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 3188-3194.
- Pike GN, Bolton-Maggs PH. Factor deficiencies in pregnancy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 3359–378.

- Poláková H, Kádasi L, Filová A . Analysis of inversion in intron 22 of the factor F VIII:C gene in patients with hemophilia A in the Slovak population. Bratisl Lek Listy 1998;99:538–542.
- Radic CP, Rossetti LC, Zuccoli JR, Abelleiro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Inverse shifting PCR based prenatal diagnosis of hemophilia-causative inversions involving int22h and int1h hotspots from chorionic villus samples. Prenat Diagn. 2009 Dec;29(12):1183-5.
- Renault NK, Dyack S, Dobson MJ, Costa T, Lam WL, Greer WL. Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. Eur J Hum Genet 2007; 15: 628–37.
- Repešé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, Lavergne JM, Borel-Derlon A. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. J Thromb Haemost 2007 ;5(7):1469-76.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature 2005; 434: 325–37.
- Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, De Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. Blood Coagul Fibrinolysis 2004;15 (7): 569-72.
- Rossetti LC, Radic CP, Abelleiro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Eighteen Years of Molecular Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot: From Southern Blot to Inverse Shifting-PCR. Int J Mol Sci 2011; 12(10): 7271–7285.

- Rossetti LC, Radic CP, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica*. 2007;92(6):842-5.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD Epub 2005 Apr 28. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem*. 2005;51(7):1154-8.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008;6:830–6.
- Rossiter JP, Young M, Kimberland M, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris M A, Schaid D J, de Moerloose P, Sommer S S, Kazazian H H Jr, Antonarakis SE. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum. Molec. Genet* 1994; 3: 1035-1039.
- Rost S, Loffler S, Pavlova A, Muller CR and Oldenburg J. Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA. *J Thromb Haemost* 2008;6:1996–9.
- Roth L, Marschalek R, Oldenburg J, Oyen F, Schneppenheim R. Characterisation of two novel large F8 deletions in patients with severe haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2011;105(2):279-84.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
- Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, Ludlam CA, Mahlangu JN, Mulder K, Poon MC. Guideline for the management of hemophilia. Montreal Quebec Blackwell Publishing Ltd 2012; 29-32.

- Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Soucie JM, Walker I, Brooker MA. Study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia*. 2010; 16(1):20-32.
- Tantawy AAG. Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2010;1: 105–114.
- Theophilus BDM, Enayat MS, Williams MD, Hill FGH. Site and type of mutations in the factor VIII gene in patients and carriers of haemophilia A. *Haemophilia* 2001; 7: 381-91.
- Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956;42:1–6.
- Tom S and Andrew R. *Human molecular genetics*. 4<sup>th</sup>
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman Ri, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster B, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984; 312:342.
- Vencesla A, Fuentes-Prior P, Baena M, Quintana M, Baiget M, Tizzano EF. Severe haemophilia A in a female resulting from an inherited gross deletion and a de novo codon deletion in the F8 gene. *Haemophilia* 2008; 14:1094–1098.
- Venter JC, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304–1351
- Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737–738.
- White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85(3):560.

White GC 2<sup>nd</sup>, Shoemaker CB. Factor VIII Gene and Hemophilia A Blood 1989; 73:1-12.

Wood WI, Capon Di, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. Nature 1984; 312:330.

Xue F, Hang Z, Sui T, Ge J, Gu D, Du W, Zhao H, Yang R. Factor VIII gene mutations profile in 148 Chinese hemophilia A subjects. Eur J Haematol 2010;85(3): 264-72.

You GL, Ding QL, Lu YL, Dai J, Xi XD, Wang XF, Wang HL. Characterization of large deletions in the F8 gene using multiple competitive amplification and the genome walking technique. J Thromb Haemost. 2013;11(6):1103-10.

Youssofian H, Antonarakis SE, Aronis S, Tsiftis G, Phillips DG, Kazazian HH Jr. Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84(11):3772-6.

Youssofian H, Kasper CK, Phillips DG, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. Restriction endonuclease mapping of six novel deletions of the factor VIII gene in hemophilia A. Hum Genet 1988;80(2):143-8.

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man, [www.omim.org](http://www.omim.org)

HAMSTeRS-The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site, [www.hadb.org.uk](http://www.hadb.org.uk)

The human genome-NCBI Human Genome Resources,

[www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human)

Ensembl Genome Browser, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

Coffalyser.net, <http://coffalyser.wordpress.com/>



## BIOGRAFIJA

Nina S. Ilić je rođena 02.04.1978. godine u Požarevcu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu u Beogradu 2003. godine, na studijskoj grupi: molekularna biologija i fiziologija, smer primenjena genetika, sa srednjom ocenom 8,5, i ocenom 10 na odbrani diplomskog rada.

Od 2004. godine, zaposlena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", gde radi na poslovima citogenetičke i molekularne dijagnostike malignih i naslednih oboljenja.

Februara 2007. godine provela je dve nedelje u laboratoriji Odeljenje za genetiku i mikrobiologiju Univerziteta u Bariju, radi savladavanja FISH metode, a učestvovala je i na dve radionice iz ove oblasti ( Q-biogene workshops).

Doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu upisala je 2006. godine u oblasti Biologije, modul: Genetika. Tokom marta 2012. godine u Institutu za nuklearne nauke „Vinča” saradivala je u sprovođenju SSCP metode, a avgusta 2012. godine učestvovala u obuci za sprovođenje MLPA analiza i procedure sekvenciranja (Applied Biosystems workshop). Iz oblasti dijagnostike malignih oboljenja, hromozomopatija i molekularne dijagnostike monogenских oboljenja objavila je 6 naučnih radova i učestvovala u saopštenjima na 6 međunarodnih i 11 domaćih simpozijuma. Kao predavač, učestvovala je na pet seminara u zemlji.

Прилог 1.

**Изјава о ауторству**

Потписана Нина Илић

број уписа GB 060091

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Дистрибуција мутација у F8 гену код пацијената из Србије оболелих од хемофилије А

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанта**

У Београду, 12.11.2014.



---

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора           Нина Илић          

Број уписа           GB060091          

Студијски програм           Биологија: Генетика          

Наслов рада           Дистрибуција мутација у F8 гену код пацијената из Србије  
оболелих од хеофилије А          

Ментор           проф. др Марија Гућ Шћекић          

Потписани           Нина Илић          

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанта**

У Београду, 12.11.2014.

  
\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Дистрибуција мутација у F8 гену код пацијената из Србије оболелих од хеофилије А

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанта**

У Београду, 12.11.2014.

