

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Đorđević

**UZROČNE VARIJANTE TALASEMIJSKIH  
SINDROMA U POPULACIJI HRVATSKOG  
PRIMORJA I ISTRE**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Đorđević

**UZROČNE VARIJANTE TALASEMIJSKIH  
SINDROMA U POPULACIJI HRVATSKOG  
PRIMORJA I ISTRE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić

Komentor: Prof.dr.sc. Zlatko Dembić

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF MEDICINE

Ana Đorđević

**CAUSAL VARIANTS OF THALASSEMIA  
SYNDROMES IN THE POPULATION OF  
THE CROATIAN LITTORAL AND ISTRIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Ines Mrakovčić-Šutić, PhD, Prof.

Co-supervisor: Zlatko Dembić, PhD, Prof.

Rijeka, 2024

Mentor: Prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić

Komentor: Prof.dr.sc. Zlatko Dembić

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## ZAHVALA

Zahvaljujem prije svega svojim mentorima, prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić i prof.dr.sc. Zlatku Dembiću, na znanju, razumijevanju, podršci i savjetima kojima su me pratili tijekom izrade doktorskog rada.

Veliku zahvalnost osjećam prema dr.sc. Sonji Pavlović, čiji su entuzijizam i spremnost da dijeli znanje bili dragocjeni tijekom mog istraživanja. Njezina ljubav i predanost ostavile su trajni dojam i želju za nastavkom istraživanja na području talasemija.

Također se zahvaljujem dr.sc. Mileni Radmilović na velikoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada, koja je izradu ove disertacije učinila lakšom i ugodnijom. Hvala prof.dr.sc. Lidiji Bilić Zulle na statističkoj obradi podataka i nesebičnoj potpori.

Zahvaljujem se i članovima Stručnog povjerenstva na sugestijama i konstruktivnim kritikama koje su unaprijedile kvalitetu ovog rada.

Na kraju, zahvaljujem svojim roditeljima na beskrajnoj podršci i strpljenju, kako uvijek, tako i tijekom školovanja.

## SAŽETAK

Cilj istraživanja: Istražiti uzročne varijante talasemijskih sindroma u populaciji Hrvatskog primorja i Istre te ih usporediti s uzročnim varijantama u drugim populacijama. Specifični ciljevi su ispitati hematološke, biokemijske i kliničke značajke u pojedinaca s talasemijskim sindromima, utvrditi korelaciju genotipa i fenotipa te izraditi algoritam za molekularno-genetičku dijagnostiku talasemija.

Materijal i metode: U presječno istraživanje je uključeno 112 ispitanika iz 65 obitelji koje nisu u međusobnom krvnom srodstvu sa sumnjom na talasemiju. Analizirani su hematološki i biokemijski parametri. Molekularno-genetička analiza globinskih gena provedena je metodama lančane reakcije polimerazom i sekvenciranja po Sangeru. Procjena težine talasemijskog fenotipa je učinjena Mahidol sustavom bodovanja. U statističkoj obradi podataka korišten je Mann-Whitney U-test.

Rezultati: Heterozigotni  $\beta$ -talasemijski sindrom je otkriven u 30 ispitanika i njihovih 16 prvih srodnika u 24 obitelji iz Hrvatskog primorja i Istre koje nisu u međusobnom krvnom srodstvu. U svih ispitanika utvrđena je mikrocitoza i hipokromija, a u 60,0% i blaga anemija. Hemoglobin (Hb) F je bio povišen u 75,0%, a HbA<sub>2</sub> u 60,7% ispitanika. Specifični genotipski profil u populaciji Hrvatskog primorja i Istre čini devet uzročnih varijanti, od kojih na pet varijanti otpada 83,2%: Hb Lepore Boston-Washington (BW),  $\beta^+$  IVS-I-110,  $\beta^0$  IVS-II-1,  $\beta^0$  IVS-I-1 i  $\beta^+$  IVS-I-6. Najčešće uzročne varijante su pretežito mediteranskog podrijetla i većinom se podudaraju s varijantama opisanim u susjednim populacijama Mediterana i Balkana. Nisu otkrivene nove varijante. Svi ispitanici su imali blagi oblik talasemije. Postoji dobra korelacija genotipa i fenotipa. U ispitanika s istim genotipom i varijabilnim biokemijskim fenotipom (HbF >5%) otkrivena je prisutnost XmnI polimorfizma, kao potencijalnog sekundarnog modifikatora. Niti jedan ispitanik nije bio nositelj  $\alpha$ -talasemijske varijante.

Zaključak: Molekularno-genetičko testiranje ima sve veći značaj u postavljanju precizne dijagnoze talasemijskih sindroma, otkrivanju statusa nositelja, genetičkom savjetovanju, izradi preventivnih programa, definiranju terapijskih ciljeva i razvoju javnozdravstvenih mjera. Vrijedno je nastaviti istraživanja na molekularnoj karakterizaciji uzročnih varijanti  $\beta$ -talasemijskih sindroma na području cijele Hrvatske.

Ključne riječi: Beta-globini; Fenotip; Genotip; Hemoglobinopatije; Talasemija

## SUMMARY

**Objectives:** To investigate the causal variants of thalassemia syndromes in the population of the Croatian Littoral and Istria, and compare the findings with other populations. The specific aims are to analyze the hematological, biochemical, and clinical features in individuals with thalassemia syndromes, to determine the correlation between genotype and phenotype, and to design the algorithm for molecular-genetic diagnosis of thalassemia.

**Material and Methods:** The cross-sectional study included 112 participants from 65 unrelated families with suspected thalassemia. Hematological and biochemical parameters were analyzed. Molecular-genetic analysis of the globin genes was performed using polymerase chain reaction and Sanger sequencing. The assessment of thalassemic phenotype was performed according to Mahidol scoring system. The Mann-Whitney U-test was used for statistical data processing.

**Results:** Heterozygous  $\beta$ -thalassemia syndrome was identified in 30 participants and their 16 first-degree relatives from 24 unrelated families from the Croatian Littoral and Istria. Microcytosis and hypochromia were observed in all subjects, with mild anemia present in 60%. Hemoglobin (Hb) F was elevated in 75,0%, and HbA2 in 60,7% of subjects. The specific genotype profile in the population of the Croatian Littoral and Istria consists of nine causal variants, five of which account for 83.2%: Hb Lepore Boston-Washington (BW),  $\beta^+$  IVS-I-110,  $\beta^0$  IVS-II-1,  $\beta^0$  IVS-I-1, and  $\beta^+$  IVS-I-6. The most frequent causal variants are predominantly of Mediterranean origin and largely overlap with variants reported in neighboring Mediterranean and Balkan populations. No new variants were detected. All participants had a mild type of disease. There is a good correlation between genotype and phenotype. In subjects with the same genotype and a variable biochemical phenotype (HbF >5%), the presence of the XmnI polymorphism was detected as a potential secondary modifier. None  $\alpha$ -thalassemia carrier was identified.

**Conclusion:** Molecular-genetic testing is increasingly important for the precise diagnosis of thalassemia syndromes, detection of carriers, genetic counseling, the development of preventive strategies, setting therapeutic goals, and the implementation of public health programs. It is worth to continue research on the molecular characterization of causal variants of  $\beta$ -thalassemia syndromes in the Croatian population.

**Key words:** Beta-Globins; Genotype; Hemoglobinopathies; Phenotype; Thalassemia

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Ljudski hemoglobin.....	1
1.1.1. Građa hemoglobina.....	1
1.1.2. Funkcije hemoglobina.....	3
1.1.3. Biosinteza hemoglobina.....	4
1.2. Poremećaji hemoglobina .....	6
1.2.1. Kvalitativni poremećaji hemoglobina.....	6
1.2.2. Kvantitativni poremećaji hemoglobina.....	9
1.2.2.1. Epidemiologija .....	9
1.2.2.2. Patofiziologija - opći principi.....	10
1.2.2.3. Klasifikacija .....	11
1.3. Beta-talasemijski sindromi .....	14
1.3.1. Patofiziologija $\beta$ -talasemijskih sindroma.....	14
1.3.2. Klinička slika.....	15
1.3.3. Dijagnoza .....	16
1.4. Molekularna osnova $\beta$ -talasemije.....	17
1.4.1. Polimorfizmi $\beta$ -globinskih gena.....	17
1.4.2. Geni modifikatori .....	19
1.5. Principi liječenja.....	20
1.5.1. Standardna terapija.....	20
1.5.2. Nove terapije .....	21
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	23
3. MATERIJAL I METODE .....	24
3.1. Materijal.....	24
3.1.1. Ispitanici.....	24
3.1.2. Biološki materijal.....	24
3.1.3. Početnice .....	25
3.2. Metode.....	27



3.2.1. Hematološki parametri.....	27
3.2.2. Elektroforeza hemoglobina .....	28
3.2.3. DNK.....	29
3.2.3.1. Izolacija DNK iz periferne krvi.....	29
3.2.3.2. Kvantifikacija izolirane DNK .....	29
3.2.3.3. Reakcija lančane polimeraze .....	30
3.2.3.3.1. Alel specifični PCR .....	30
3.2.3.3.2. Gap PCR.....	32
3.2.3.3.3. Reakcija umnažanja cjelokupnog <i>HBB</i> gena.....	33
3.2.3.3.4. Reakcija umnažanja promotorske regije <i>HBG2</i> gena.....	33
3.2.3.4. Analiza DNK na agaroznom gelu.....	34
3.2.3.5. Sekvenciranje PCR produkata.....	34
3.2.4. Metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda za detekciju varijanti u <i>HBA</i> genu	35
3.2.5. Procjena težine talasemijskog fenotipa .....	37
3.3. Statistička obrada podataka .....	38
3.4. Etički aspekti istraživanja.....	39
4. REZULTATI.....	40
4.1. Genotipske analize.....	40
4.1.1. Uzročna varijanta Hb Lepore-BW (NG_000007.3:g.63632_71046del).....	43
4.1.2. Uzročna varijanta IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A).....	44
4.1.3. Uzročna varijanta IVSII-1 (HBB:c.315+1G>A) .....	45
4.1.4. Uzročna varijanta IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A).....	45
4.1.5. Uzročna varijanta IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C).....	46
4.1.6. Uzročna varijanta IVSII-745 (HBB:c.316-106C>G).....	46
4.1.7. Uzročna varijanta Codon 39 (HBB:c.118C>T) .....	47
4.1.8. Uzročna varijanta Hb Monroe (HBB:c.92G>C).....	48
4.1.9. Uzročna varijanta Poly A (A>G) (HBB:c.*111A>G).....	48
4.2. Geni modifikatori .....	49
4.3. Laboratorijske i kliničke značajke u nositelja $\beta$ -talasemijskog sindroma .....	49
5. DISKUSIJA.....	55

5.1. Algoritam za postavljanje dijagnoze $\beta$ -talasemije minor .....	67
6. ZAKLJUČAK .....	69
7. LITERATURA .....	70
ILUSTRACIJE .....	84
Popis slika.....	84
Popis tablica.....	85
POPIS POKRATA.....	87
ŽIVOTOPIS .....	91

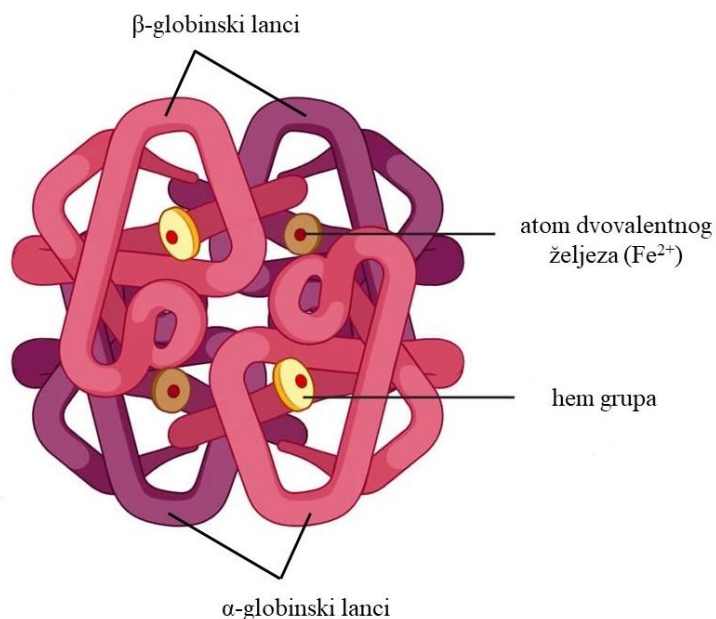
# 1. UVOD

## 1.1. Ljudski hemoglobin

Hemoglobin (Hb) je kompleksni metaloprotein građen od četiri podjedinice, od kojih svaka sadrži jedan polipeptidni lanac i jednu hem grupu. Ima vitalnu funkciju oksigenacije tkiva, zahvaljujući svojim strukturnim i funkcionalnim svojstvima koja su kroz evoluciju prilagođena za rad u eritrocitima - tetramernoj strukturi, definiranom afinitetu prema kisiku, kooperativnom vezanju i alosteričkoj regulaciji [1].

### 1.1.1. Građa hemoglobina

Hb je tetramer molekularne mase 64 500 g/mol, prisutan u eritrocitima u koncentraciji 35 g/dL, odnosno 12-15 g/dL u krvi. Svaki eritrocit ima oko 2 milijuna molekula Hb [2]. Hb se sastoji od četiri polipeptidna globinska lanca (dva para) i četiri prostetičke hem grupe smještene unutar globinskih podjedinica. Hem (feroprotoporfirin IX) je sastavljen od protoporfirinskog IX prstena načinjenog od četiri molekule pirola povezane alfa-metilenskim mostovima i od atoma dvovalentnog željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) smještenog u središtu svake molekule. Svaki globinski lanac je zasebno kovalentno vezan za protoporfirinsko željezo [3].



Slika 1. Struktura adultnog hemoglobina [4]

Ljudi posjeduju 6 različitih globinskih lanaca označenih slovima grčkog alfabeta od alfa do zeta:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\zeta$ , koji mogu formirati različite hemoglobinske tetramere.  $\alpha$ - i  $\zeta$ - lanci se sastoje od 141 aminokiseline, a  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\epsilon$ -lanci imaju 146 aminokiselina.  $\gamma$ -,  $\delta$ - i  $\epsilon$ - lanci se razlikuju od  $\beta$ -lanaca samo na poziciji 39 ( $\gamma$ ), 36 ( $\epsilon$ ) i 10 ( $\delta$ ), te se često označavaju  $\beta$ -nalik (engl.  *$\beta$ -like*) lancima.  $\zeta$ -lanac je nalik  $\alpha$ -lancu, a prisutan je s  $\epsilon$ -lancem u eritrocitima embrija [5].

Vrste i struktura Hb u različitim životnim razdobljima, referentne vrijednosti i stanja s povišenim vrijednostima pojedinih vrsta Hb prikazani su na Tablici 1.

Tablica 1. Ljudski hemoglobini [5]

Vrsta Hb	Struktura	Dob	Normalne vrijednosti (%)	Stanja s povišenim vrijednostima
A	$\alpha_2\beta_2$	Odrasli	96	
A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$		2-3	$\beta$ -talasemija
H	$\beta_4$		0	Neke $\alpha$ -talasemije
F	$\alpha_2\gamma_2$	Fetus	<1	Novorođenčad, nasljedno perzistiranje fetalnog Hb i eritroidni stres
Barts	$\gamma_4$		0	Neke $\alpha$ -talasemije
Gower I	$\zeta_2\epsilon_2$	Embrio	0	Rana embrionalna faza (< 8 tjedana)
Gower II	$\alpha_2\epsilon_2$	Embrio	0	Rana embrionalna faza (> 8 tjedana)
Portland	$\zeta_2\gamma_2$	Embrio	0	Kasna embrionalna faza (< 8 tjedana) i $\alpha$ -talasemija (fetalni hidrops)

Pokrate: Hb = hemoglobin

Hb je globularna molekula (5.0 x 5.4 x 6.4 nm) s jednom simetričnom osi [6]. Oko 75% globinskih lanaca formira  $\alpha$ -spiralu, koja ima sedam ili osam spiralnih segmenata označenih

slovima A - H ( $\alpha$  podjedinica nema spiralni segment D) i povezanih nespiralnim (interhelikalnim) segmentima [7]. Interhelikalni segmenti omogućuju savijanje polipeptida u trodimenzionalni globinski nabor [6]. Pojedine aminokiseline u lancu označavaju se prema poziciji unutar spiralnog segmenta. Željezo je smješteno u sredini svakog od četiri pirolna prstena u Hb i za prsten vezano s četiri atoma dušika. Koordinirani atomi dušika, koji imaju elektron-donorski karakter, sprječavaju pretvaranje hemskog željeza u feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oblik koji ne veže kisik za razliku od fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oblika koji ga veže reverzibilno. Vezanje kisika na jednu podjedinicu Hb povećava afinitet ostalih podjedinica za kisik (kooperativno vezanje). U središtu hemoglobinskog tetramera nalazi se molekula 2,3-bisfosfoglicerata (2,3-BPG), vezana na mjestu udaljenom od vezanja kisika. 2,3-BPG je alosterički modulator koji smanjuje afinitet Hb za kisik, čime potiče učinkovito oslobađanje kisika i stabilizira strukturu Hb [1]. Hemsko željezo je također pričvršćeno za globinski lanac kovalentnom vezom s aminokiselinom histidinom na poziciji heliksa F8. Aminokiseline s polarnim (kiselim ili baznim) bočnim grupama smještene su na površini molekule, a neutralne aminokiseline su smještene pretežno na unutarnjoj hidrofobnoj strani molekule Hb [8].

### 1.1.2. Funkcije hemoglobina

Hb je višefunkcionalna molekula. Osnovna fiziološka funkcija Hb je vezanje kisika u plućima, prijenos i isporuka kisika u tkiva te prijenos ugljičnog dioksida iz tkiva u pluća. Dvosmjernu respiratornu funkciju Hb omogućuju izvanredna svojstva ove molekule. U arterijskoj cirkulaciji Hb ima velik afinitet za kisik i nizak afinitet za ugljični dioksid, ione vodika i klorida te organske fosfate, dok su u venskoj cirkulaciji ovi relativni afiniteti obrnuti [9]. Oksigenacija i deoksigenacija Hb odigrava se na hemskom željezu. Pri vezanju kisika pomiče se  $\text{Fe}^{2+}$  za 0,04 nm što uzrokuje pomicanje jednog para podjedinice  $\alpha/\beta$  za  $15^\circ$  prema drugom paru. Time molekula Hb prelazi iz napetog stanja T (engl. *tense*) s niskim afinitetom za kisik u relaksirano stanje R (engl. *relaxed*), u kojem je olakšano vezanje novih molekula kisika za slobodne molekule hema [10]. Nakon deoksigenacije,  $\beta$ -lanci se odvajaju za 0,7 nm [6]. Novija kristalografska ispitivanja upućuju da je alosterična tranzicija Hb puno složenija od ovog modela s dva stanja [11]. Afinitet prema kisiku se najčešće označava kao  $P_{50}$ , koji odražava parcijalni tlak kisika pri kojem je 50% Hb zasićeno [6]. Normalan  $P_{50}$  iznosi 27 mmHg pri temperaturi  $37^\circ\text{C}$  i pH 7,4. Krivulja vezanja/disocijacije kisika je sigmoidnog oblika. Sigmoidni oblik krivulje oksihemoglobina odražava hem-hem interakciju, koja omogućuje da etapna oksigenacija svake hem grupe u hemoglobinskom tetrameru povećava afinitet kisika za

preostale neoksisgenirane hem grupe [5]. Na afinitet vezanja kisika utječe i pH, tjelesna temperatura, ugljični dioksid i količina 2,3-BPG. Bohrov učinak označava promjenu afiniteta kisika za Hb vezanu uz promjenu pH i koncentraciju ugljičnog dioksida. Na tkivnom nivou, niži pH i viši pCO<sub>2</sub> smanjuju afinitet vezanja kisika i pospješuje njegovo oslobađanje. Nasuprot tome, viši pH i niži pCO<sub>2</sub> u plućima povećavaju afinitet vezanja kisika [12]. Ugljični dioksid se također reverzibilno veže za molekulu Hb preko aminogrupa na polipeptidnim lancima i formira karbaminohemoglobin. Na ovaj način se transportira oko 10% ugljičnog dioksida, a ostatak se transportira otopljen u plazmi kao ugljična kiselina koja disocira u bikarbonatni ion i proton [13].

Osim respiratorne funkcije, Hb ima katalitičke funkcije (monooksigenaza, dušična reduktaza, dušična dioksigenaza, esteraza, alkilhidroperoksidaza, lipoksigenaza), učestvuje u metabolizmu dušičnog oksida, metaboličkom reprogramiranju, regulaciji acidobazne ravnoteže, održavanju oksidacijsko-redukcijske (redoks) ravnoteže i regulaciji vazomotornog tonusa [6,7].

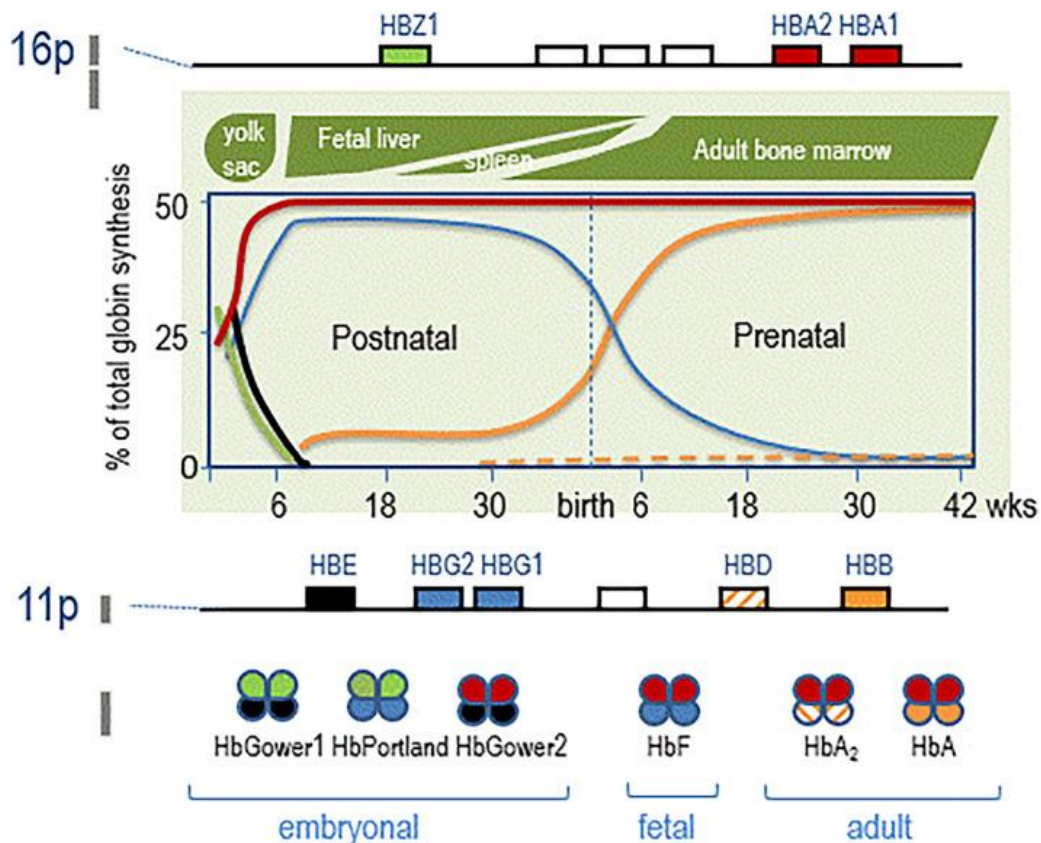
### 1.1.3. Biosinteza hemoglobina

Globinski geni koji kodiraju određene polipeptidne lance različito su izraženi tijekom intrauterinog razvoja i nakon rođenja, čime omogućuju prijenos kisika u smjeru potrebnom za embrionalni i fetalni razvoj. Glavni globinski geni su raspoređeni u okviru dva klastera. Klaster  $\alpha$ -globinskih gena lociran je na kratkom kraku kromosoma 16 (između 16p13.2 i telomere) i dugačak je 30 kb. Klaster  $\beta$ -globinskih gena lociran je terminalnom kraju kratkog kromosoma 11 na poziciji 15.5. i dugačak je preko 70 kb [8,14]. Klaster  $\alpha$ -globinskih gena ima tri funkcionalna gena:  $\zeta$ - gen (*HBZ*) koji je izražen u embrionalnom stadiju i kodira  $\zeta$ -globinske lance, te gene  $\alpha_2$  (*HBA2*) i  $\alpha_1$  (*HBA1*) koji kodiraju  $\alpha$ -globinske lance od gestacijske dobi do kraja života. U klasteru  $\alpha$ -globinskih gena, postoje i tri pseudogena (pseudo $\zeta$ , pseudo $\alpha_2$  i pseudo $\alpha_1$ ), kao evolucijski ostaci koji ne kodiraju proteine. Klaster  $\beta$ -globinskih gena sadrži pet funkcionalnih gena:  $\epsilon$  gen (*HBE*) koji kodira embrionalne globinske lance, A- $\gamma$  (*HBG1*) i G- $\gamma$  (*HBG2*) gene koji kodiraju fetalne  $\gamma$ -globinske lance, te  $\beta$  (*HBB*) i  $\delta$  gene (*HBD*) koji kodiraju adultne  $\beta$ - odnosno  $\delta$ -globinske lance.  $\beta$ - i  $\delta$ -globinski lanci se razlikuju u 10 od 146 aminokiselina. I u klasteru  $\beta$ -globinskih gena postoji pseudogen  $\psi\beta$ , koji ne kodira globinske lance [15]. Redoslijed gena uzduž kromosoma odgovara redoslijedu njihove ekspresije za proizvodnju različitih hemoglobinskih tetramera tijekom ontogenetskog razvoja čovjeka [16].

Ekspresija globinskih gena je, osim u različito vrijeme i u različitim količinama, regulirana i prostorno: u embrionalnom stadiju je ograničena na žumanjčanu vreću, u fetalnom stadiju se zbiva u jetri i slezeni, a nakon rođenja u koštanoj srži.

Embrionalni Hb su (redom pojavnosti): Hb Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) i Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ). Sintetiziraju se u žumanjčanoj vreći od 4. tjedna gestacije. Fetalni HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) je glavni Hb od 8. tjedna gestacije, nakon uspostave eritropoeze u fetalnoj jetri i slezeni. Od 14. tjedna gestacije, embrionalni hemoglobini potpuno su zamijenjeni HbF. Nakon rođenja, HbF bude zamijenjen adultnim Hb: HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) i HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) [5].

Redosljed sinteze humanih Hb u embrionalnom, fetalnom i adultnom stadiju prikazan je na Slici 2. Slijed pojavljivanja različitih globinskih lanaca pomaže nam u razumijevanju početka kliničkih manifestacija hemoglobinskih poremećaja.



Slika 2. Redosljed sinteze humanih hemoglobina u embrionalnom, fetalnom i adultnom stadiju [17]

## 1.2. Poremećaji hemoglobina

Glavni Hb u eritrocitima odraslog čovjeka je HbA i čini 95 - 98% svih Hb u hemolizatu. Pri analizi Hb mogu se uočiti različite komponente s nižom izoelektričnom točkom od HbA, tzv. minorne frakcije, koje su produkti posttranslacijske modifikacije HbA. Klinički značaj ima samo HbA<sub>1c</sub> (glikozilirani Hb), koji na N-terminalnoj grupi β-lanca ima vezanu glukozu i koristi se u procjeni regulacije šećerne bolesti [18]. HbA<sub>2</sub> (α<sub>2</sub>δ<sub>2</sub>) je mala adultna frakcija Hb, s udjelom od 2,5 - 3,5% ukupnog Hb. HbA<sub>2</sub> ima funkcionalna obilježja vrlo slična HbA, ali u fiziološkim uvjetima nema značaja. Najbolji je biljeg za diferencijalnu dijagnozu talasemijskih sindroma. HbA<sub>2</sub> se sintetizira u svim eritroidnim prekursorima i univerzalno je prisutan u eritrocitima. Nasuprot tome, distribucija HbF u eritrocitima je neravnomjerna i samo 0,1 – 7% eritrocita sadrži detektibilne količine HbF. Eritrociti novorođenčeta sadrže otprilike 60% HbF i 40% HbA. Nekoliko mjeseci nakon rođenja, HbF čini minornu frakciju Hb, sa 6 mjeseci života čini <5%, a kasnije <1% ukupnog Hb [6,19].

Hemoglobinopatije označavaju heterogenu skupinu nasljednih poremećaja Hb uzrokovanih varijantama globinskih gena koji kodiraju polipeptidne lance molekule Hb. Ovi poremećaji mogu biti kvalitativni i kvantitativni. Kvalitativni poremećaji se nazivaju hemoglobinske varijante ili strukturne hemoglobinopatije i uključuju Hb koji se sintetiziraju u normalnim količinama, ali imaju izmijenjen sastav aminokiselina. Kvantitativni poremećaji su talasemijski sindromi, koji uključuju poremećenu sintezu α- ili β-globinskih lanaca, čija je struktura normalna. Moguća je interakcija između kvantitativnih i strukturnih varijanti Hb, s vrlo širokim rasponom kliničkih poremećaja [17,20].

### 1.2.1. Kvalitativni poremećaji hemoglobina

Kvalitativni poremećaji Hb (hemoglobinske varijante ili strukturne hemoglobinopatije) rezultat su varijanti sekvence u globinskim genima s posljedičnim izmijenjenim sastavom aminokiselina u globinskim lancima Hb. Najčešće molekularno-genetičke alteracije su promjene jednog nukleotida koje uzrokuju pojedinačne supstitucije aminokiselina (primjerice HbS). Rjeđe alteracije su supstitucije dvije aminokiseline (HbC-Harlem), alteracije terminalnih kodona koje uzrokuju sintezu produljenog globinskog lanca (Hb Constant Spring), delecije jednog nukleotida s pomakom okvira čitanja (Hb Wayne), tripleta nukleotida (Hb Leiden) ili multiplih kodona (Hb Gun Hill), rekombinacije (Hb Lepore) i insercije s pomakom okvira čitanja (Hb Cranston) ili multiplih kodona (Hb Grady) [5,21]. Hemoglobinske varijante imaju



promijenjena fizikalna i kemijska obilježja. U HbVar bazi podataka (<http://globin.cse.psu.edu>) navedeno je 1429 varijanti Hb i 541 talasemijska varijanta, među kojima su najzastupljenije varijante  $\beta$ -lanaca [22]. Zastupljenost pojedinih vrsta abnormalnih Hb, uključujući hemoglobinske varijante, prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Vrste i zastupljenost abnormalnih hemoglobina [22]

<b>Vrsta abnormalnog hemoglobina</b>	<b>Broj</b>
Hemoglobinske varijante	1429
Talasemijske varijante	541
Kombinirane varijante	318
Varijante $\alpha_1$ gena	366
Varijante $\alpha_2$ gena	466
Varijante $\beta$ gena	954
Varijante $\delta$ gena	144
Varijante A- $\gamma$ gena	65
Varijante G- $\gamma$ gena	83
Fuzije	11
Delecije	244
Supstitucije	1514
Insercije	87
Hemoglobini s visokom afinitetom za kisik	103
Hemoglobini s niskim afinitetom za kisik	48
Nestabilni hemoglobini	156
Methemoglobini	13

Kliničke manifestacije hemoglobinskih varijanti su vrlo različite, od asimptomatskih oblika do teških kliničkih slika, a općenito su blaže nego kod kvantitativnih poremećaja Hb. Na varijante Hb može se posumnjati u pacijenata s teškom anemijom ili značajnom cijanozom. Češće se identificiraju laboratorijskim pretragama, budući da mnoge zamjene aminokiselina mijenjaju površinski naboj Hb. Time se omogućuje otkrivanje pomoću elektroforeze i kromatografije u okviru rutinskog novorođenačkog probira na češće hemoglobinopatije (HbS, HbC, talasemije) koji se provodi u Sjedinjenim Američkim Državama i nekim europskim zemljama [21]. Klinički značaj imaju HbS, nestabilni Hb, Hb varijante s promijenjenim afinitetom za kisik, methemoglobin (HbM) i talasemijske strukturne varijante.

HbS je najčešći abnormalni Hb u kojem je na poziciji 6  $\beta$ -globinskog lanca glutaminska kiselina zamijenjena valinom. Nasljeđuje se autosomno recesivno, stoga je za ekspresiju bolesti potrebno imati dvije kopije *HbS* gena ili jednu kopiju *HbS* i drugu Hb varijantu. Komplikacije u homozigota su posljedica opstrukcije protoka krvi srpastim stanicama, a uključuju kroničnu hemolitičku anemiju, vazookluzivne bolne krize, akutni torakalni sindrom, moždani udar, splenomegaliju, povećanu sklonost teškim bakterijskim infekcijama i poremećaje rasta [23,24].

Nestabilni Hb nasljeđuju se autosomno dominantno. Češće su  $\beta$ -globinske varijante, sa supstitucijom neutralnih aminokiselina u blizini džepa hema. Promjena sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture Hb rezultira nestabilnim Hb koji precipitira unutar eritrocita i formira Heinzova tjelešca. Najčešće kliničke i laboratorijske značajke su hemolitička anemija, žutica i splenomegalija [25].

Promjene u afinitetu Hb za kisik pomiču krivulju disocijacije kisika i identificiraju se abnormalnim  $P_{50}$ . Hemoglobinske varijante s povećanim afinitetom za kisik (nizak  $P_{50}$ ) najčešće su rezultat supstitucije aminokiselina koje stabiliziraju molekulu Hb u R stanju i/ili inhibiraju odgovore na okolišne alosteričke regulatore koji potiču oslobađanje kisika. Zbog oslabljenog otpuštanja kisika u tkiva povećano je lučenje eritropoetina s posljedičnom eritrocitozom. Varijante Hb sa smanjenim afinitetom za kisik (visok  $P_{50}$ ) obično se prezentiraju cijanozom. Najčešće su uzrokovane zamjenama aminokiselina u globinu koje pomiču kvarternu ravnotežu tetramera Hb u T (deoksigenirano) stanje [21,26].

HbM sadrži željezo u  $Fe^{3+}$  obliku, koje ne veže kisik niti ga može isporučiti tkivima. Nasljeđuje se autosomno dominantno, a najčešće je posljedica supstitucije proksimalnog ili distalnog histidina na  $\alpha$ - ili  $\beta$ -globinskom lancu tirozinom. Prezentira se različitim stupnjem otežanog disanja, cijanoze i hipoksemije, bez odgovora na primjenu kisika [27].

### 1.2.2. Kvantitativni poremećaji hemoglobina

Kvantitativni poremećaji Hb (talasemijski sindromi) su heterogena skupina nasljednih bolesti koje karakterizira poremećaj u sintezi jednog ili više globinskih lanaca Hb, kao rezultat alteracija u genima za globinske lance. Općenito se nasljeđuju autosomno recesivno, iako nasljeđivanje može biti vrlo kompleksno budući da multipli geni utječu na sintezu Hb. U HbVar bazi podataka navedeno je više od 500 talasemijskih alela [22]. Talasemijski sindromi dijele se u dvije vrste: talasemije i talasemijske varijante. Nazivaju se prema tipu globinskog lanca čija je sinteza poremećena. Osnovne skupine čine  $\alpha$ - i  $\beta$ - talasemije, a rijetke i klinički manje značajne su  $\delta$ -talasemije. Postoje i kompleksne forme  $\beta$ -talasemija, koje su posljedica postojanja niza varijanti u lokusu  $\beta$ -globinskog gena:  $\delta\beta$ - i  $\gamma\delta\beta$ -talasemije [5,28].

Hereditarno perzistiranje fetalnog Hb (HPFH, engl. *hereditary persistence of fetal hemoglobin*) je benigni poremećaj uzrokovan alteracijama u  $\beta$ - ili  $\alpha$ -globinskim klasterima ili  $\gamma$ -promotorskoj regiji, koje uzrokuju povećanu i produljenu sintezu HbF i u odraslih osoba [29]. Udruženo nasljeđivanje HPFH i  $\beta$ -talasemije utječe na težinu kliničke slike [30].

Talasemijske hemoglobinopatije predstavljaju kombinaciju kvantitativnih i kvalitativnih poremećaja sinteze globinskih lanaca (Hb Lepore, HbS, HbE, Hb Constant Spring). Kompleksna interakcija talasemije i hemoglobinske varijante može uzrokovati različite kliničke slike [31].

#### 1.2.2.1. Epidemiologija

Talasemijski sindromi spadaju u najčešće monogenske nasljedne bolesti u svijetu. Procjenjuje se da je 5 do 7% svjetske populacije nositelji talasemijskog gena [32]. Prema izvještajima iz 2021. godine, na svijetu ima 13 104 071 osoba s talasemijom, s dobno-standardiziranom stopom prevalencije od 18,28/100 000 osoba (95% UI 15,29 – 22,02) i dobno-standardiziranom stopom incidencije od 1,93/100 000 osoba (95% UI 1,51 – 2,49) [33]. Prema procjenama, svake godine se rodi 60 000 do 70 000 djece s različitim vrstama talasemije [34].

Učestalost talasemijskih sindroma je različita u različitim populacijama, različitim regijama svijeta i manjim geografskim područjima [35]. Povijesno, talasemije su najčešće u endemskom malaričnom području, koje se proteže od sub-Saharske Afrike, preko Mediterana i Srednjeg istoka do Indijskog podkontinenta te istočne i jugoistočne Azije (tzv. talasemijski pojas) [34,36]. Visoka učestalost u ovim regijama odražava relativnu otpornost talasemijskih eritrocita na *Plasmodium falciparum* i veću učestalost brakova u krvnom srodstvu [37]. Velike migracije

stanovništva promijenile su epidemiološki profil talasemijskih sindroma, s povećanjem učestalosti u Sjevernoj Americi i Europi, pa talasemijski sindromi sada predstavljaju globalni zdravstveni problem. Istovremeno, zahvaljujući uvođenju preventivnih programa, učestalost talasemija opada u zemljama s tradicionalno visokom učestalošću [38].

### 1.2.2.2. Patofiziologija - opći principi

Osnovno obilježje svih talasemijskih sindroma je odsutna ili smanjena sinteza jednog ili više globinskih lanaca, uzrokovana alteracijama u globinskim genima koji ih kodiraju. Sinteza nezahvaćenog lanca se nastavlja neometano [5]. Klinički značaj imaju samo  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinski lanci koji su neophodni za sintezu HbA. Težina kliničke slike prvenstveno ovisi o podležućoj molekularnoj promjeni i stupnju defekta sinteze globinskog lanca.

Uravnotežena sinteza globinskih lanaca je izuzetno važna, jer su intaktni tetrameri HbA i HbF visoko topivi u citoplazmi eritrocita. Nevezani  $\alpha$ - i  $\beta$ -lanci su netopivi, te dolazi do agregacije i precipitiranja slobodnih lanaca u suvišku. U  $\beta$ -talasemiji stvaraju se agregati  $\alpha$ -lanaca koji formiraju inkluziona tjelešca u eritrocitima i eritroidnim prekursorima u koštanoj srži. Inkluziona tjelešca uzrokuju fizičko i oksidativno oštećenje eritrocitne membrane s posljedičnom kroničnom intramedularnom destrukcijom eritroidnih stanica (hemoliza) i neučinkovitom eritropoezom. U  $\alpha$ -talasemiji se stvaraju agregati  $\beta$ - (HbH,  $\beta_4$ ) i  $\gamma$ - lanaca (Hb Barts,  $\gamma_4$ ) koji su solubilniji i precipitiraju puno sporije. Hemoliza je prisutna i u  $\alpha$ - i  $\beta$ -talasemiji, iako u  $\beta$ -talasemiji može biti zasjenjena neučinkovitom eritropoezom [36]. Monocitno-makrofagni sustav, prvenstveno u slezeni, odstranjuje oštećene eritrocite [5,28].

Osnovna posljedica navedenih patofizioloških procesa je anemija. Kliničke manifestacije variraju od asimptomatske mikrocitoze do najtežih oblika koji su letalni in utero. Kod teških oblika talasemije, kronična anemija i hipoksija uzrokuju povećano lučenje hormona eritropoetina, koji stimulira stvaranje eritrocita u koštanoj srži i pogoršava akumulaciju abnormalnih eritroidnih prekursora. Povećana slezena (splenomegalija) i povećana aktivnost slezene (hipersplenizam) pogoršavaju anemiju [5]. Akumulacija željeza rezultat je hemolize, povećane apsorpcije željeza iz probavnog trakta zbog anemije, smanjene utilizacije željeza za sintezu Hb i ponavljanih transfuzija. Višak željeza aktivira makrofage u koštanoj srži i doprinosi neučinkovitoj eritropoezi. U neliječenih pacijenata, taloženje željeza u vitalne organe (srce, jetra, žlijezde s unutarnjim lučenjem) uzrokuje ozbiljne kronične komplikacije [39].

Danas je poznata molekularna osnova brojnih patofizioloških mehanizama u talasemijskim sindromima. Također je poznato da na kliničku sliku ne utječe samo uzročna genetska promjena, nego i drugi neovisni unutarnji i vanjski čimbenici (poglavlje 1.4.2.).

### 1.2.2.3. Klasifikacija

Talasemijski sindromi su posljedica velikog broja različitih genetskih promjena, koje se mogu naslijediti u homozigotnom obliku, heterozigotnom obliku i u međusobnim kombinacijama (dvostruki heterozigoti). Stoga imaju vrlo široki spektar kliničkih i hematoloških manifestacija [28]. Postoje dvije glavne skupine:  $\alpha$ - i  $\beta$ -talasemije, koje se dijele u  $\alpha^0$ - i  $\beta^0$ -talasemije (ako je potpuno odsutna sinteza  $\alpha$ - odnosno  $\beta$ -globinskog lanca) te  $\alpha^+$ - i  $\beta^+$ -talasemije (ako je sinteza  $\alpha$ - odnosno  $\beta$ -globinskog lanca smanjena). Daljnja klasifikacija  $\alpha$ - i  $\beta$ - talasemijskih sindroma se razlikuje.

Klaster za  $\alpha$ -globin sadrži dvije kopije  $\alpha$ -globinskih gena,  $\alpha_2$  ( $HBA_2$ ) i  $\alpha_1$  ( $HBA_1$ ). Zdrava osoba ima četiri normalno funkcionalna  $\alpha$ -globinska gena koja se označavaju „ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ “. Prva pozicija na kromosomu uvijek predstavlja  $\alpha_2$  gen, koji je odgovoran za sintezu 75% svih  $\alpha$  lanaca. U  $\alpha_0$ -talasemijama su česte velike delecije cijelih skupina gena za  $\alpha$ -globin (delecijske varijante), a  $\alpha^+$ -talasemije mogu uključivati točkaste mutacije (nedelecijske varijante). Klinički fenotip ovisi o kombinaciji varijanti  $\alpha$ -globina koje pojedinac ima. Uz to, moguće je više kombinacija varijanti, što povećava složenost klasifikacije  $\alpha$ -talasemije [28,40].

Prema kliničkom fenotipu,  $\alpha$ -talasemije se dijele u četiri tipa:  $\alpha$ -talasemija minima ili tihi nositelj (engl. *silent carrier*),  $\alpha$ -talasemija minor ( $\alpha$ -talasemija obrazac ili trait), bolest HbH, te fetalni hidrops s Hb Barts. Heterozigoti s tri normalna i jednim delecijskim  $\alpha$  genom ( $\alpha^-/\alpha\alpha$ ) nazivaju se tihi nositelji ( $\alpha$ -talasemija minima ili  $\alpha$ -talasemija-2). Ove osobe gotovo redovito nemaju kliničke niti hematološke abnormalnosti, a dijagnoza se postavlja genetičkom analizom. Alfa-talasemija minor ili  $\alpha$ -talasemija trait označava nasljeđivanje dva normalna i dva delecijska  $\alpha$  gena, odnosno heterozigotnost za  $--/\alpha\alpha$  ili  $-\alpha/-\alpha$  genotip. Može biti prisutna blaga mikrocitna hipokromna anemija. HbH bolest se odnosi na deleciju ili inaktivaciju tri od četiri  $\alpha$ -globinska gena ( $--/\alpha-$ ). Značajna neravnoteža sinteze globinskih lanaca uzrokuje nakupljanje slobodnih  $\gamma$ -lanaca tijekom fetalnog razvoja i ranog djetinjstva koji formiraju Hb Barts ( $\gamma_4$ ), te nakupljanje slobodnih  $\beta$ -lanaca u odrasloj dobi koji formiraju HbH ( $\beta_4$ ). Prisutnost jednog funkcionalnog alela za  $\alpha$ -globin omogućuje fetusu dovoljnu sintezu HbF da preživi i dovoljnu sintezu HbA za održavanje postnatalnog života, ali uz značajan morbiditet. Osobe s HbH bolesti

imaju kroničnu hemolitičku anemiju. Fenotipska prezentacija je vrlo varijabilna u različitim etničkim populacijama i ovisi o prisutnosti drugih genetskih promjena (genetski modifikatori) [41]. Fetalni hidrops s Hb Barts je najteži tip  $\alpha$ -talasemije, uzrokovan delecijom ili inaktivacijom sva četiri  $\alpha$ -globinska gena (homozigotnost --/--). Budući da Hb bez  $\alpha$  lanaca ne može prenositi kisik, najčešće je letalan in utero ili par sati nakon rođenja [40,42].

Za razliku od četiri  $\alpha$ -gena, svaki pojedinac ima dva  $\beta$ -globinska gena. Brojne varijante i različite kombinacije nasljeđivanja rezultiraju vrlo heterogenom skupinom  $\beta$ -talasemijskih sindroma. Tradicionalna klasifikacija uključuje tri skupine (slijedom od najblažih prema težim oblicima):  $\beta$ -talasemiju minor ili  $\beta$ -talasemija trait (blago smanjena sinteza  $\beta$ -globinskog lanca),  $\beta$ -talasemiju intermedia ( $\beta^+$ , djelomično smanjena sinteza  $\beta$ -globinskog lanca) i  $\beta$ -talasemiju major ( $\beta^0$ , potpuno odsutna sinteza  $\beta$ -globinskog lanca) [36,40]. Osobe s minor oblikom su heterozigotni nositelji s asimptomatskom blagom mikrocitnom hipokromnom anemijom. Talasemija intermedia odlikuje se različitim stupnjem anemije i varijabilnom kliničkom slikom od asimptomatskih oblika do kronične potrebe za učestalim transfuzijama. Beta-talasemija major (Cooleyeva anemija ili Mediteranska anemija) je najteži oblik u homozigota ili složenih heterozigota za  $\beta^0$  patogene varijante, s teškom anemijom koja zahtijeva redovitu transfuzijsku terapiju [43,44]. Udruženo nasljeđivanje patogene varijante za HbS na jednom  $\beta$ -globinskom alelu i talasemijske varijante na drugom  $\beta$ -globinskom alelu rezultira HbS-talasemijom. Klinička slika nalikuje bolesti srpastih stanica, ali je blažeg oblika ovisno o prirodi  $\beta$ -alteracije ( $\beta^0$  ili  $\beta^+$ ) [45]. Molekularna osnova i klinička slika  $\beta$ -talasemijskih sindroma detaljno su opisane u poglavlju 3 i 4.

Tablica 3 prikazuje klasifikaciju  $\alpha$ - i  $\beta$ - talasemijskih sindroma.

Tablica 3. Klasifikacija talasemijskih sindroma [40,45]

Tip		Alterirani gen	Kliničke značajke
<b><math>\alpha</math>-talasemijski sindrom</b>	<b><math>\alpha</math>-talasemija minima (tihi nositelj)</b>	Jedan defektni alel ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )	Bez simptoma
	<b><math>\alpha</math>-talasemija minor</b>	Dva defektna alela ( $-\alpha/-\alpha$ or $--/\alpha\alpha$ )	Bez simptoma ili blaga anemija
	<b>Bolest HbH</b>	Tri defektna alela ( $--/-\alpha$ )	Žutica i anemija na porodu Kronična hemolitička anemija (mogu biti potrebne transfuzije) Hepatosplenomegalija Sekundarna hemokromatoza
	<b>Bolest Hb Barts</b>	Četiri defektna alela ( $--/--$ )	Fetalni hidrops
<b><math>\beta</math>-talasemijski sindrom</b>	<b><math>\beta</math>-talasemija minor</b>	Jedan defektni alel ( $\beta/\beta^+$ ili $\beta/\beta^0$ )	Bez simptoma ili blaga anemija
	<b><math>\beta</math>-talasemija intermedia</b>	Dva defektna alela ( $\beta^+/\beta^+$ ili $\beta^+/\beta^0$ ) ili udruženo nasljeđivanje drugih varijanti	Varijabilni stupanj anemije (transfuzije mogu biti potrebne u razdobljima stresa: infekcije, trudnoća, kirurški zahvat)
	<b><math>\beta</math>-talasemija major</b>	Dva defektna alela ( $\beta^0/\beta^0$ )	Teška hemolitička anemija (česte transfuzije) Hepatosplenomegalija Sekundarna hemokromatoza Deformiteti kostiju Zastoj u rastu Aplastične krize
	<b>HbS-<math>\beta</math>-talasemija</b>	Kombinacija jednog defektnog $\beta$ -globinskog alela i jednog defektnog HbS alela ( $\beta^+/\text{HbS}$ ili $\beta^0/\text{HbS}$ )	Obilježja bolesti srpastih stanica

Pokrate: Hb = hemoglobin

Novija klasifikacija talasemija zasniva se na kliničkim kriterijima, prvenstveno ovisnosti o transfuzijama kao glavnom prognostičkom čimbeniku. Transfuzijska potpora je osnova liječenja, a učestalost i količina transfuzija indirektno odražava težinu bolesti i utječe na kronične komplikacije. Prema kliničkoj klasifikaciji razlikuju se dvije skupine talasemija: talasemije ovisne o transfuzijama (TDT, engl. *transfusion-dependent thalassemia*) i talasemije neovisne o transfuzijama (NTDT, engl. *non-transfusion-dependent thalassemia*) [38,40]. Pacijenti koje povremeno zahtijevaju transfuzije ne smatraju se ovisnima, ali mogu s vremenom postati o njima ovisni i treba ih povremeno reevaluirati.

### 1.3. Beta-talasemijski sindromi

Beta-talasemija je najčešća kongenitalna hemolitička anemija [46]. Procjenjuje se da je oko 1,5% svjetske populacije (80 do 90 milijuna ljudi) nositelji  $\beta$ -talasemijskog gena, dok je godišnja incidencija simptomatskih osoba 1:100 000 u svijetu i 1:10 000 u Europskoj Uniji [47]. Heterogenost kliničkih i hematoloških značajki posljedica je prvenstveno ogromnog broja različitih alteracija  $\beta$ -globinskog gena, koji se mogu naslijediti u homozigotnom i heterozigotnom obliku te u međusobnim kombinacijama.

#### 1.3.1. Patofiziologija $\beta$ -talasemijskih sindroma

Osnova patofiziologije je neravnoteža  $\alpha$ - i ne- $\alpha$ -globinskih lanaca. Suvišak slobodnih  $\alpha$ -lanaca odgovoran je za tri važna patogenetska zbivanja: kroničnu anemiju i hipoksiju, neučinkovitu eritropoezu i opterećenje željezom [48]. Slobodni  $\alpha$ -lanci precipitiraju u eritroidnim stanicama i formiraju inkluziona tjelešca koja, vezana za membranu, uzrokuju njezino oksidativno oštećenje te apoptozu eritroidnih prekursora (neučinkovita eritropoeza) i hemolizu zrelih eritrocita. Nevezani  $\alpha$ -lanci također oksidiraju u HbM i netopive hemikrome (oksidirane i djelomično katabolizirane peptidne fragmente). Ovi hemikromi koji sadrže željezo mogu generirati reaktivne vrste kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) koji dodatno oštećuju eritrocite [49,50]. Oksidativni stres u mikrookolišu srži doprinosi smanjenom sazrijevanju i apoptozi eritroidnih prekursora [51]. Kronična anemija i hipoksija stimuliraju lučenje eritropoetina s posljedičnom značajnom ali neučinkovitom ekspanzijom koštane srži, koja uzrokuje tipične deformitete kostiju [47]. Signalni put koštanog morfogogenetskog proteina (BMP, engl. *bone morphogenetic protein*) inhibira stvaranje hepcidina, s posljedičnom povećanom apsorpcijom željeza iz probavnog trakta [52,53]. Aktivirani hipoksijom inducirani



faktor 2 alfa (HIF-2 $\alpha$ , engl. *hypoxia-inducible factor-2 alpha*) uzrokuje pojačanu ekspresiju gena odgovornih za apsorpciju željeza u tankom crijevu i pogoršava opterećenje željezom [54]. Makrofagi u koštanoj srži su aktivirani željezom i selektivno fagocitiraju apoptotičke eritroidne prekursore čime pogoršavaju neučinkovitu eritropoezu. Teška i dugotrajna anemija te povećana eritropoetinska aktivnost rezultiraju ekstramedularnom hematopoezom te povećanjem jetre i slezene. Kronična hemoliza s vezanjem imunoglobulina i komplementa aktivira sekvestraciju eritrocita u slezeni, a hipersplenizam pogoršava anemiju [55].

### 1.3.2. Klinička slika

Kompleksna patofiziologija  $\beta$ -talasemije rezultira različitim kliničkim manifestacijama, koje variraju od asimptomatskih oblika do letalnih ishoda in utero ili u ranom djetinjstvu.

Nositelji  $\beta$ -talasemijskog gena ( $\beta$ -talasemija minor ili  $\beta$ -talasemija trait) nemaju simptoma niti hematoloških abnormalosti (tzv. tihi nositelji), ili imaju blagu mikrocitnu hipokromnu anemiju. U trudnica nositeljica može se razviti značajna anemija (Hb <7 g/dL), obično u trećem trimestru [55]. Nositelji se najčešće otkrivaju u okviru obiteljskog probira ili populacijskog istraživanja, ili slučajno prilikom uzorkovanja krvi zbog druge bolesti [56].

Pacijenti s  $\beta$ -talasemijom major se prezentiraju u prvoj godini života teškom anemijom (obično oko 6 mjeseci starosti) i nakon toga zahtijevaju redovite transfuzije [55]. Hb može biti snižen na 3 do 4 g/dL. Neliječena dojenčad je izrazito blijeda, razdražljiva, zaostaje u rastu, ima žuticu i tamni urin zbog hemolize, izbočen trbuh zbog hepatosplenomegalije i ponavljane infekcije [57]. Česte su koštane deformacije zbog bujanja koštane srži. Karakteristične su crte lice s istaknutim čelom, jagodičnim kostima i gornjom čeljusti („talasemijsko lice“). Splenomegalija uzrokovana hemolizom može se pogoršati ekstramedularnom hematopoezom. Neliječena djeca obično umiru zbog zatajenja srca. Dugoročne komplikacije povezane s opterećenjem željezom uključuju zaostajanje u rastu i spolnom razvoju, cirozu jetre, oštećenje žlijezda s unutarnjim lučenjem (dijabetes melitus, hipotireoza, hipogonadizam) i miokardiopatiju [47,49,57,58]. Mnoga djeca koja se primjereno transfundiraju (održavanje Hb >9 g/dL) i redovito primaju kelate željeza, imaju normalan rast, razvoj i spolno sazrijevanje [56].

Beta-talasemija intermedia spada u NTDT, s blagom do umjerenom hemolitičkom anemijom (Hb je 7 do 10 g/dL bez transfuzijske potpore). Obuhvaća širok raspon kliničkih fenotipova između talasemije minor i major [59]. Blagi oblici mogu biti asimptomatski do odrasle dobi, a teži se obično prezentiraju u dobi od 2 do 4 godine bljedilom, žuticom, povećanjem jetre i

slezene te promjenama na kostima. Rast i razvoj su općenito bolji nego u pacijenata s major formom. Međutim, u usporedbi s TDT, pacijenti s  $\beta$ -talasemijom intermedia imaju veći rizik za žučne kamence, trombozu i plućnu hipertenziju. Ekstramedularna hematopoeza se primarno dešava u slezeni, jetri, limfnim čvorovima i kralješcima te može uzrokovati neurološke simptome [56]. Mnogi pacijenti s  $\beta$ -talasemijom intermedia će kasnije u životu trebati transfuzije. Kada njihove potrebe za transfuzijom dosegnu  $> 8$  jedinica godišnje, reklasificiraju se kao TDT [55].

### 1.3.3. Dijagnoza

Na talasemiju treba posumnjati u osoba bilo koje dobi sa simptomatskom ili nerazjašnjenom mikrocitnom anemijom i odsutnošću manjka željeza, klasičnim znakovima na fizikalnom pregledu, pozitivnom obiteljskom anamnezom i/ili pozitivnim nalazom novorođenačkog probira. Negativna obiteljska anamneza ne isključuje dijagnozu [56,57]. U djece mlađe od 2 godine s teškom mikrocitnom anemijom, žuticom i hepatosplenomegalijom treba posumnjati na talasemiju major. Talasemija intermedia je vjerojatnija u osoba koje se prezentiraju nakon 2 godine sa sličnim, ali blažim hematološkim i kliničkim abnormalnostima [49].

Početna laboratorijska obrada uključuje kompletnu krvnu sliku, citološki razmaz periferne krvi, testove hemolize i status željeza (feritin u serumu). Određivanje razine željeza je potrebno radi isključivanja anemije zbog manjka željeza (sideropenične anemije) i/ili procjene opterećenosti željezom [57]. Prisutna je mikrocitna i hipokromna anemija, povišen broj eritrocita i neimuna hemoliza, ali ovi nalazi nisu specifični i mogu izostati u blagim oblicima talasemije. U talasemiji major izrazito su snižene vrijednosti Hb na  $<7$  g/dL, srednjeg volumena eritrocita (MCV, engl. *mean corpuscular volume*) na 50 – 70 fL i srednje količine Hb u eritrocitu (MCH, engl. *mean corpuscular hemoglobin*) na 12 – 20 pg. U talasemiji intermedia vrijednosti Hb su između 7 i 10 g/dL, MCV 50 – 80 fL i MCH 16 – 24 pg. U  $\beta$ -talasemiji minor krvna slika je uredna ili je prisutna blaga anemija i/ili mikrocitoza i hipokromija [49,57].

Na razmazu periferne krvi prisutna je mikrocitoza, hipokromija, anizocitoza, poikilocitoza i nukleirani eritrociti (eritroblasti). Broj eritroblasta korelira sa stupnjem anemije [49]. Najčešće se vide eritrociti u obliku mete (engl. *target cells*) i dakriociti [57]. U nositelja talasemije morfološke promjene su blage i ne vide se eritroblasti na razmazu periferne krvi [49].

Elektrofereza Hb sa sniženim HbA, povišenim HbA<sub>2</sub> i često prisutnim HbF, važna je za postavljanje dijagnoze te prepoznavanje nositelja i pacijenata s fenotipom intermedia i major.

Standardne tehnike koje se koriste za kvantitativne i kvalitativne analize (određivanje razine Hb i otkrivanje kombinacija  $\beta$ -talasemije s drugim hemoglobinskim varijantama) su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) i kapilarna elektroforeza [60,61]. HbA<sub>2</sub> je povišen u nositelja te varijabilan u  $\beta$ -talasemijskih homozigota i složenih heterozigota. U  $\beta^0$  homozigota HbF čini 92 – 95% ukupnog Hb. U  $\beta^+$  homozigota i složenih  $\beta^0/\beta^+$  heterozigota HbF iznosi 70 – 90% ukupnog HB, a HbA 10 – 30% [49].

Genetičko testiranje je najbolja potvrda dijagnoze i postaje sve značajnije u određivanju terapijskih ciljeva i prognozi talasemije.

#### **1.4. Molekularna osnova $\beta$ -talasemije**

Struktura, raspored i regulacija ekspresije globinskih gena spadaju u najbolje proučene u ljudskom genomu. Klaster  $\beta$ -globinskih gena (*HBB*), lociran je 11p15.5 i dugačak približno 70 kb. Sadrži embrionalne ( $\epsilon$ ), fetalne ( $A\gamma$  i  $G\gamma$ ) i adultne ( $\beta$  i  $\delta$ ) globinske gene koji kodiraju ne- $\alpha$  globinske lance, a raspoređeni su duž kromosoma prema redoslijedu njihove razvojne ekspresije [14]. Strukturni geni su odvojeni na oba kraja (3' i 5') promjenjivim dijelovima nekodirajuće deoksiribonukleinske kiseline (DNK) koja sadrži nekoliko vrsta regulatornih sekvenci: promotore, pojačivače (engl. *enhancer*), prigušivače (engl. *silencer*) i regiju kontrole lokusa (LCR, engl. *locus control region*) [62]. Za sintezu normalnog Hb potreban je integritet strukturnih gena te strukturni i prostorni integritet sekvenci promotora, prigušivača, pojačivača i LCR-a.

##### **1.4.1. Polimorfizmi $\beta$ -globinskih gena**

Varijacije u sekvenci DNK su vrlo česte i uglavnom se pojavljuju u intergenskim sekvencama. Vrlo mali broj rezultira patogenim i vjerojatno patogenim varijantama koje se nalaze gotovo uvijek unutar ili vrlo blizu genskog lokusa [63]. Za razliku od  $\alpha$ -talasemije, koja je uglavnom uzrokovana većim delecijama *HBA1* i *HBA2* gena, većina varijanti *HBB* su točkaste mutacije i uključuju uglavnom zamjene pojedinačnih nukleotida i male insercije ili delecije (engl. *indels*) koje dovode do pomaka okvira čitanja [49,64–66]. Više stadija ekspresije *HBB* gena može biti zahvaćeno širokim spektrom nedelecijjskih varijanti: transkripcija u glasničku ribonukleinsku kiselinu (RNK), transport glasničke RNK i translacija, stabilnost globinske glasničke RNK i translacija u globinski protein [63]. Većina  $\beta$ -talasemijskih varijanti su one koje utječu na

završetak translacije i RNK prekrajanje (engl. *splicing*). Veće delecije su vrlo rijetke u  $\beta$ -talasemiji i dijele se u delecije ograničene na *HBB* gen, delecije koje zahvaćaju i druge gene te delecije LCR-a [66].

Završni koraci u sintezi normalnog tetramera Hb su postranslacijsko spajanje četiri globinska lanca s četiri molekule hema i njihova međusobna interakcija, kako bi se formirali funkcionalni Hb i osigurala njihova stabilnost u eritrocitu [63]. Posttranslacijsko spajanje je olakšano u prisutnosti dva proteina: stabilizirajućeg proteina alfa-hemoglobina (AHSP, engl. *alpha-hemoglobin stabilizing protein*) i hem-reguliranoj kinazi faktora 2 eukariotske translacijske inicijacije (HRI, engl. *heme-regulated eukaryotic translational initiation factor 2 kinase*) [67].

Patogene varijante *HBB* gena široko se klasificiraju u tri kategorije prema stupnju smanjenja sinteze  $\beta$ -globinskog lanca: 1)  $\beta^0$  (potpuni izostanak sinteze  $\beta$ -globina); 2)  $\beta^+$  ( $\beta$ -globin se sintetizira u smanjenim količinama) i 3)  $\beta^{++}$  ili tihe varijante (blago smanjena sinteza  $\beta$ -globina) [68]. Tablica 4 prikazuje glavne tipove *HBB* varijanti i njihovu udruženost s težinom  $\beta$ -talasemije.

Tablica 4. Uzročne varijante  $\beta$ -globinskog gena [68]

Vrsta varijante $\beta$ -globinskog gena	Fenotip $\beta$ -talasemije
Točkaste mutacije	
Transkripcijske varijante	$\beta^+$ or $\beta^{++}$
Varijante koje zahvaćaju procesiranje RNK	$\beta^0$ , $\beta^+$ or $\beta^{++}$
Varijante koje zahvaćaju translaciju RNK	$\beta^0$
Delecije	$\beta^0$

Pokrate: RNK = ribonukleinska kiselina

Molekularni spektar  $\beta$ -talasemija različit je u različitim etničkim skupinama. Nadalje, prevalencija patogenih varijanti *HBB* gena pokazuje sličnosti unutar jedne regije i varijacije između različitih regija. Velike geografske migracije posljednjih desetljeća rezultirale su većom učestalosti  $\beta$ -talasemije u regijama svijeta u kojima je bila tradicionalno rijetka, kao u Sjevernoj Americi i zemljama sjeverne Europe. S druge strane, uvođenje probira i preventivnih programa smanjilo je prevalenciju i incidenciju  $\beta$ -talasemije u regijama s povijesno visokim brojem

nositelja i pacijenata [37]. Na globalnoj razini, samo 20 varijanti *HBB* gena uzrokuje više od 80% svih slučajeva  $\beta$ -talasemije, posljedično fenomenu geografskog grupiranja gdje svaka populacija ima nekoliko čestih i različit broj rijetkih varijanti *HBB* gena [69].

#### 1.4.2. Geni modifikatori

Iako je  $\beta$ -talasemija tipična monogenska bolest, kliničke manifestacije su vrlo heterogene sa širokim spektrom težine bolesti (poglavlje 3.2.). Vrsta patogene varijante *HBB* gena primarna je odrednica težine kliničke slike (korelacija genotip-fenotip). Međutim, genotipska varijabilnost u  $\beta$ -globinskim lokusima često ne može objasniti fenotipsku različitost koja je prisutna kod pacijenata s istim genotipom [70]. Ova fenotipska varijabilnost  $\beta$ -talasemija se, uz uzročne gene, može objasniti dodatnim genetskim modifikatorima. Modifikatori djeluju na tri razine. Primarni modifikatori su varijante sekvence koja zahvaćaju sam globinski gen i odgovorni su za smanjenu sintezu globinskog lanca. Sekundarni modifikatori predstavljaju promjene u lokusima koje utječu na ravnotežu  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinskih lanaca. Tercijarni modifikatori nisu izravno uključeni u sintezu globinskog lanca nego utječu na komplikacije bolesti [71].

Neravnoteža  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinskih lanaca u  $\beta$ -talasemiji može biti poboljšana smanjenom sintezom  $\alpha$ -globina ili povećanom sintezom  $\beta$ -nalik globina odnosno  $\gamma$ -globina. Udruženo nasljeđivanje  $\alpha$ -talasemije minima ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ,  $-\alpha/-\alpha$ ) ublažava kliničke manifestacije  $\beta$ -talasemije u homozigota i složenih heterozigota. U heterozigotnih nositelja ( $\beta^0$  ili  $\beta^+$ ) koji su bez simptoma, udruženo nasljeđivanje  $\alpha$ -talasemije minima najčešće normalizira MCV i MCH [72]. Genetski modifikatori koji povećavaju sintezu  $\gamma$ -globinskih lanaca štite od štetnog učinka viška slobodnih  $\alpha$ -lanaca, kao u udruženoj  $\delta/\beta$  talasemiji i HPFH. Dokazano je da polimorfizmi *Xmn1-HBG2* u  $\beta$ -globinskom klasteru te polimorfizmi *HBS1L-MYB* intergenske regije na 6q23 i *BCL11A* pojačivača na 2p16 povećavaju ekspresiju  $\gamma$ -globina [66]. Nasuprot tome, postoje i modifikatori koji pogoršavaju  $\beta$ -talasemijski fenotip. Primjerice, udruženo nasljeđivanje viška  $\alpha$ -globinskih gena ( $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ,  $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ,  $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) ima težu kliničku sliku, budući da suvišak  $\alpha$ -lanaca pogoršava  $\alpha/\beta$  neravnotežu [65,72].

Tercijarni geni modifikatori nalaze se izvan klastera  $\beta$ -globinskog gena i nemaju učinke na primarnu patofiziologiju  $\beta$ -talasemije, ali utječu na komplikacije bolesti koje uključuju metabolizam željeza, metabolizam bilirubina, osteoporozi i srčane komplikacije [65].

*UGT1A1* polimorfizmi, odgovorni za smanjenu aktivnost enzima bilirubin uridin difosfat-glukuronoziltransferaze (UDPGT) u Gilbertovoj bolesti, mogu povećati sklonost stvaranju

žučnih kamenaca [73]. *COL1A1* polimorfizam (polimorfizam SP1-veznog mjesta u regulatornoj regiji kolagen tipa I alfa 1 gena) povezan je snažno s osteoporozom u pacijenata s  $\beta$ -talasemijom major [74]. Varijante u genima *VDR* (receptor za vitamin D), *COL1A2* (kolagen tip I alfa 2) i *TGFBI* (transformirajući čimbenik rasta beta-1) mogu utjecati na koštanu masu u pacijenata s talasemijom [64]. Udruženo nasljeđivanje *HFE* (homeostatski regulator željeza, engl. *homeostatic iron regulator*) C282Y varijante koja je najčešći uzrok hereditarne hemokromatoze, može pogoršati opterećenje željezom [75]. Prisutnost apolipoproteina E (APOE)  $\epsilon 4$  je čimbenik rizika za zatajenje srca [76]. Polimorfizmi gena za glutation S-transferazu M1 (*GSTM1*) udruženi su s odlaganjem željeza u srce kod pacijenata s  $\beta$ -talasemijom major [77]. S druge strane, nositelji  $\beta$ -talasemije imaju povoljan profil lipidemije i krvnog tlaka, što može poboljšati kardiovaskularno zdravlje [78].

## 1.5. Principi liječenja

Liječenje ovisi o težini kliničke slike. Nositelji  $\beta$ -talasemije ne zahtijevaju terapiju, ali se upućuju na genetičko savjetovanje. Liječenje pacijenata s  $\beta$ -talasemijom major i intermedia treba biti individualizirano. Osnovne probleme u liječenju predstavljaju anemija, neučinkovita eritropoeza, opterećenje željezom i kasne komplikacije. Komponente standardne terapije su transfuzije, kelati željeza, splenektomija i transplantacija krvotvornih matičnih stanica (HSCT, engl. *hematopoietic stem cell transplantation*) [79,80]. Napredak u razumijevanju patofiziologije  $\beta$ -talasemije rezultirao je razvojem novih terapijskih modaliteta.

### 1.5.1. Standardna terapija

Kod pacijenata s TDT potrebne su redovite transfuzije eritrocitnih koncentrata kako bi se održala razina Hb u rasponu od 9 do 10,5 g/dL. Korekcija anemije je važna radi ublažavanja simptoma anemije te smanjenja ekstramedularne hematopoeze i intestinalne resorpcije željeza [49]. Interval između transfuzija se prilagođava kako bi se održala zadovoljavajuća razina Hb, a obično je svakih dva do pet tjedana. Transfuzijska terapija kod talasemije major obično započinje u ranom djetinjstvu. Indikacije za početak transfuzija kod talasemije intermedia su simptomatska anemija, znakovi popuštanja srca, zaostajanje u rastu, značajna ekstramedularna hematopoeza i pogoršanje kvalitete života [81].

Terapija keliranjem željeza koristi se za smanjenje opterećenja željezom i neizbježnog taloženja željeza u raznim organima. Zapčinje u djetinjstvu nakon prvih 10 do 20 transfuzija, najčešće

prije 6 godina, kada razina serumskog feritina premaši 1000 ng/mL [82]. U primjeni su tri kelatora željeza: deferoksamin, koji se aplicira parenteralno (najčešće potkožno), te oralni oblici deferipron i deferasiroks. Kelacija obično započinje s oralnim preparatom. Kod pacijenata s teškim opterećenjem željezom uvodi se kombinirana terapija [83].

Odstranjenje slezene (splenektomija) se razmatra kod pacijenata s teškom anemijom, progresivnim povećanjem potreba za transfuzijama, značajnim opterećenjem željezom unatoč terapiji kelatorima, kod pacijenata s hipersplenizmom s pogoršanjem anemije i smanjenjem broja leukocita i trombocita, povećanom slezenom s rizikom za rupturu te infarktom slezene ili trombozom slezenske vene. Glavne komplikacije splenektomije su teške infekcije, te povećan rizik od tromboembolije i plućne hipertenzije [56,81,84].

HSCT je rezervirana za pacijente s teškim oblicima bolesti. Sveukupna stopa preživljenja je gotovo 90% [56]. Najbolji rezultati postižu se kod transplantacija od identičnih srodnih darivatelja i kod mlađih od 14 godina [85]. Odluka o transplantacijskom liječenju je složena, posebice obzirom na nedostatak srodnih darivatelja i na posttransplantacijske komplikacije.

### **1.5.2. Nove terapije**

Novi lijekovi za  $\beta$ -talasemije klasificiraju se u tri skupine prema ciljnom patološkom zbivanju: lijekovi s djelovanjem na neučinkovitu eritropoezu, lijekovi koji moduliraju metabolizam željeza i lijekovi koji utječu na ekspresiju  $\beta$ -globinskog gena i neravnotežu  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinskih lanaca [86].

Luspatercept i sotatercept su rekombinantni fuzijski proteini koji se vežu za aktivin A i srodne članove obitelji transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- $\beta$ ). Potiču sazrijevanje eritroidnih stanica u kasnijim fazama i smanjuju potrebu za transfuzijama putem mehanizama koji nisu dovoljno razjašnjeni, a koji uključuju učinke na TGF- $\beta$  signalni put [80,81]. Inhibitori Janus kinaze-2 (*JAK2*) (ruksolitinib, fedratinib) sprječavaju proliferaciju talasemijskih eritroidnih stanica i smanjuju volumen slezene [36]. Mali alosterički aktivatori eritrocitne kinaze eritrocita (mitapivat, atavopivat) povećavaju proizvodnju adenozin-trifosfata (ATP), čime povoljno utječu na kasnu fazu neučinkovite eritropoeze [87,88].

Cilj genske terapije je popravak defektnih gena i time funkcije eritrocita. Strategije genske manipulacije pacijentovih krvotvornih matičnih stanica uključuju dodavanje modificiranog *HBB* gena pomoću lentiviralnih vektora (zamjena  $\beta$ -nalik globinskog gena, indukcija HbF) i uređivanje gena. Uređivanje gena omogućuje izmjenu DNK sekvence gena pomoću

endonukleaza koje prepoznaju specifičnu sekvencu i izazivaju dvolančane lomove na molekuli DNK: ZFN (engl. *zinc-finger nuclease*), efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije (TALEN, engl. *transcription activator-like effector nuclease*) i niz međusobno razdvojenih kratkih klasteriranih palindromskih ponavljanja povezanih s proteinom 9 (CRISPR/Cas9, engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated system 9*) [89,90].



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja je identificirati uzročne varijante  $\beta$ -globinskih gena u djece s talasemijskim sindromima i u njihovih prvih srodnika u populaciji Hrvatskog primorja i Istre.

Specifični ciljevi su:

1. Ispitati hematološke značajke u pojedinaca s talasemijskim sindromom
2. Ispitati biokemijske značajke (vrste Hb) u pojedinaca s talasemijskim sindromom
3. Utvrditi specifične varijante u  $\beta$ -globinskim genima u populaciji Hrvatskog primorja i Istre
4. Usporediti vrste patogenih varijanti u populaciji Hrvatskog primorja i Istre s patogenim varijantama  $\beta$ -talasemije drugih populacija, posebice u mediteranskom bazenu i na Balkanu
5. Utvrditi korelaciju genotipa i fenotipa
6. Prilagoditi algoritam za molekularno-genetičku dijagnostiku talasemija sukladno varijantama koje budu detektirane.

Hipoteze istraživanja su:

1. Uzročne varijante talasemijskih sindroma u populaciji Hrvatskog primorja i Istre su specifične.
2. U pojedinaca s talasemijskim sindromom postoji dobra korelacija genotipa i fenotipa.
3. Karakterizacija uzročnih varijanti omogućuje napredak u dijagnostici i terapijskom pristupu.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Materijal**

##### **3.1.1. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 112 ispitanika iz 65 obitelji koje nisu u međusobnom krvnom srodstvu s područja Hrvatskog primorja i Istre sa sumnjom na talasemiju, koji su imali mikrocitozu (nizak MCV) i hipokromiju (nizak MCH), mikrocitnu anemiju i/ili pozitivnu obiteljsku anamnezu na talasemiju. Istraživanje je provedeno u razdoblju od 1. srpnja 2021. do 30. lipnja 2023. godine na sedamdesetoro djece starije od 12 mjeseci, koja su zbog anemije upućena na hematološku obradu u Kliniku za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka, te na njihovih 42 člana obitelji prvog stupnja srodstva s anamnezom anemije ili s pozitivnom obiteljskom anamnezom na talasemiju.

Isključni kriteriji u istraživanju su bili: dob mlađa od 12 mjeseci, anemija dokazanog drugog uzroka, transfuzija unutar 4 mjeseca od uzorkovanja krvi, prisutnost drugih značajnih kliničkih obilježja (primjerice razvojno ili intelektualno zaostajanje), nepotpisan informirani pristanak.

Hematološka (krvna slika) i biokemijska analiza (elektroforeza hemoglobina) učinjene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Rijeka. Molekularno-genetičke analize urađene su na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Beograd, Srbija.

##### **3.1.2. Biološki materijal**

Svim pedijatrijskim ispitanicima je uzorkovana kapilarna krv u EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) mikroeprevete za analizu kompletne krvne slike (KKS). Ispitanicima sa sumnjom na talasemiju na osnovu hematoloških parametara uzorkovano je 3 mL venske krvi u epruvetu s EDTA za analizu Hb elektroforezom.

U svih ispitanika je na temelju sumnje (hematološki parametri, pozitivna obiteljska anamneza) ili postavljene dijagnoze talasemije (biokemijska dijagnoza – elektroforeza Hb), nakon pojašnjenja istraživanja i potpisanog informiranog pristanka, uzorkovano 3 mL venske krvi za molekularno-genetičke analize u epruvetu s 3,8% natrijevim citratom (odnos krvi i antikoagulansa 9:1). Uzorci su do analize pohranjeni u hladnjaku na temperaturi -20°C.

### 3.1.3. Početnice

Specifične početnice (engl. *primers*) su korištene za lančanu reakciju polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) kako bi se umnažali ciljani dijelovi DNK. Kasnije su iste početnice upotrebljene za sekvenciranje radi određivanja redoslijeda nukleotida u DNK. Nazivi i sekvence korištenih početnica navedene su u tablicama 5-9.

Tablica 5. Kontrolne i zajedničke početnice korištene za detekciju najčešćih varijanti u kodirajućoj regiji  $\beta$ -globinskog gena

Naziv početnice	Sekvenca početnice
A	5'– CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC –3'
B	5'– GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA –3'
C	5'– ACCTCACCTGTGGAGCCAC –3'
R37	5'– CCAATCTACTCCCAGGAGCA –3'
R47	5'– CACTCAGTGTGGCAAAGGTG–3'

Tablica 6. Početnice korištene za detekciju najčešćih  $\beta$ -talasemijskih varijanti u populaciji Hrvatskog primorja i Istre<sup>1</sup>

Varijanta	Sekvenca početnice	S početnicom	bp
$\beta^+$ IVSI-110 (G→A)*	M: 5'- ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACT -3'	C	390
	N: 5'- ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC -3'	C	390
$\beta^0$ IVSI-1 (G→A)*	M: 5'- TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAT -3'	C	281
	N: 5'- TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAC -3'	C	281
$\beta^+$ IVSI-6 (T→C)*	M: 5'- TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG -3'	C	286
	N: 5'- TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATA -3'	C	286
$\beta^0$ 39 (C→T)*	M: 5'- CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTA -3'	C	436
	N: 5'- CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACTGTG -3'	C	436
$\beta^0$ IVSII-1 (G→A)*	M: 5'- AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT -3'	C	634
	N: 5'- AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC -3'	C	634
$\beta^+$ IVSII-745 (C→G)**	M: 5'- TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGG -3'	B	738
	N: 5'- TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC -3'	B	738

<sup>1</sup> Fragment AxB = 861 bp se koristi kao kontrolni za analize (\*) varijanti

Fragment R37xR47 = 527 bp se koristi kao kontrolni za analize (\*\*) varijanti

Pokrate: bp – parovi baza

Tablica 7. Početnice korištene za detekciju hemoglobinske varijante Hb Lepore Boston-Washington

Naziv početnice	Sekvenca početnice
Lep A	5'-GTTTTCTACCCTCAGATT-3'
Lep B	5'-AATCATTCGTCTGTTTCCCA-3'
R37	5'- CCAATCTACTCCCAGGAGCA -3'

Tablica 8. Početnice korištene za umnažanje cjelokupnog *HBB* gena

Naziv početnice	Sekvenca početnice	Umnažana regija <i>HBB</i> gena
C	5'– ACCTCACCCCTGTGGAGCCAC –3'	Egzon 1 Intron 1 Egzon 2
Lep B	5'–AATCATTCGTCTGTTTCCCA–3'	
β <sup>+</sup> IVSII-745 N	5'– TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC –3'	Egzon 3
R61	5'– CACTGACCTCCCACATTCCC –3'	
IVS2 F	5'– <u>AGAACTTCAGGGT</u> GAGTCTATGGG–3'	Intron 2
IVS2 R	5'–TGTGGGAGGAAGATAAGAGGTAG–3'	

Pokrate: bp – parovi baza

Tablica 9. Početnice korištene za umnažanje promotorske regije *HBG2* gena

Naziv početnice	Sekvenca početnice
GgF	5'– GAACTGTTGCTTTATAGGATTTT –3'
GgR	5'– GCAGGAGCTTATTGATAACTCAGAC–3'

Analizirane sekvence su uspoređene s referentnom sekvencom *HBB* gena iz NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) baze, GenBank: U01317 [91].

### 3.2. Metode

Podaci prikupljeni u svrhu ovog istraživanja dobiveni su iz Integriranog bolničkog informacijskog sustava (IBIS) i iz arhive Klinike za pedijatriju KBC-a Rijeka.

#### 3.2.1. Hematološki parametri

Analizirani su slijedeći hematološki parametri: Hb, MCV i MCH. Analiza je učinjena na aparatu Sysmex XN-1000 (SYSMEX EUROPE GmbH, Norderstedt, Njemačka). Vrijednosti navedenih hematoloških parametara su uspoređene s normalnim vrijednostima u zdrave djece

ovisno o dobi (do 12 godina), odnosno o dobi i spolu u ispitanika starijih od 12 godina (Tablica 10) [92,93].

Tablica 10. Normalne vrijednosti hematoloških parametara u djece i adolescenata [92,93]

Dob	Hb (g/dL)		MCV (fL)		MCH (pg)	
	Donja granica	Gornja granica	Donja granica	Gornja granica	Donja granica	Gornja granica
<b>6 mjeseci do &lt; 2 godine</b>	11,0	13,5	73	85	24	30
<b>2 do &lt; 6 godina</b>	11,0	13,7	75	86	25	31
<b>6 do &lt; 12 godina</b>	11,2	14,5	78	90	25	32
<b>12 do &lt; 18 godina</b>						
Ženski spol	11,4	14,7	80	96	26	32
Muški spol	12,4	16,4	80	96	26	32

Pokrate: Hb = hemoglobin; MCV = srednji volumen eritrocita; MCH = srednja količina hemoglobina u eritrocitu

### 3.2.2. Elektroforeza hemoglobina

Analiza Hb učinjena je metodom kapilarne elektroforeze na aparatu Sebia Capillarys 2 Flex Piercing (SEBIA, Lisses, Francuska). Kapilarna zonska elektroforeza je metoda u kojoj se nabijene čestice kreću u tekućem mediju (puferu) pod utjecajem električnog polja u smjeru od anode prema katodi. Za razdvajanje pojedinih ionskih vrsta prema njihovom naboju koristi se snaga elektroosmotskog tijeka koji je snažniji od elektroforetskog. Ova metoda omogućuje otkrivanje i kvantificiranje brojnih hemoglobinskih varijanti. Hemolizati eritrocita se automatski priređuju u samom analizatoru. Zatim uzorci budu aspirirani u kapilaru gdje se elektroforetski razdvoje varijante Hb uz visoki napon od 9600 V. Nakon završenog

elektroforetskog razdvajanja očitaju se udjeli detektiranih Hb u relativnim postocima [94]. Vrijednosti su uspoređene s referentnim intervalima bolničkog laboratorija. Kod zdrave djece starije od 2 godine, HbA čini više od 96% ukupnog Hb, HbA<sub>2</sub> 2,5 do 3,5%, a HbF manje od 1% ukupnog Hb. Povišenim vrijednostima smatrale su se razine HbA<sub>2</sub> ≥4,0 % i HbF >2% [95].

### **3.2.3. DNK**

#### **3.2.3.1. Izolacija DNK iz periferne krvi**

Izolacija DNK iz periferne krvi učinjena je prema uputstvima proizvođača QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka [96]. U epruvetu za centrifugu od 1,5 mL se pipetira 20 µL QIAGEN Proteaze, 200 µL krvi i 200 µL pufera AL, koji se miješaju pulsним vrtloženjem (engl. *vortexing*) kroz 15 sekundi da se osigura učinkovita liza stanica. Smjesa se zatim inkubira na 56°C kroz 10 minuta kako bi se maksimizirao prinos DNK. Slijedi dodavanje 200 µL 100%-tnog etanola u lizirani uzorak i ponovno miješanje pulsним vrtloženjem kroz 15 sekundi. Smjesa se pažljivo nanosi na QIAamp kolonu i centrifugira na 8000 okretaja u minuti (rpm, engl. *revolutions per minute*) kroz 1 minutu. Eluat se odbacuje obzirom da DNK ima afinitet vezanja za kolonu, a kolona se prebacuje u novu kolekcijsku cijev za sakupljanje eluata. Potom se dodaje 500 µL pufera AW1 i vrši centrifugiranje na 8000 rmp kroz 1 minutu kako bi se DNK koja je vezana na kolonu isprala od nečistoća. Eluat se ponovo odbacuje i kolona se prebacuje u novu kolekcijsku cijev za sakupljanje eluata. Zatim se dodaje pufer AW2 i centrifugira na 14 000 rmp kroz 3 minute. Eluat se odbacuje, a kolona prebacuje u novu kolekcijsku cijev i ponavlja centrifugiranje na 14 000 rmp kroz 1 minutu da se ukloni ostatak pufera AW2. Zatim se kolona prebacuje u čistu epruvetu za centrifugu od 1,5 mL, u koju se dodaje 200 µL pufera AE koji oslobađa DNK s kolone. Na kraju se kolona inkubira na sobnoj temperaturi 1 minutu kako bi se povećao prinos DNK, te zatim kroz 1 minutu centrifugira na 8000 rmp za eluciju DNK.

#### **3.2.3.2. Kvantifikacija izolirane DNK**

Kvantifikacija izolirane DNK učinjena je pomoću seta Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države) [97]. Navedeni postupak koristi fluorescentne boje koje se specifično vežu za dvostruku uzvojnici DNK i omogućuju precizno mjerenje koncentracije izolirane DNK iz uzorka periferne krvi. Za pripremu radne otopine miješa se 199 µL pufera Qubit™ dsDNA HS i 1 µL reagensa po uzorku.

Pipetira se 10  $\mu\text{L}$  Standarda 1 u prvu epruvetu i 10  $\mu\text{L}$  Standarda 2 u drugu epruvetu, a zatim se u svaku od epruveta sa standardima dodaje 190  $\mu\text{L}$  pripremljene radne otopine. U svaku epruvetu namijenjenu uzorcima, dodaje se 1-10  $\mu\text{L}$  uzorka DNK i 199  $\mu\text{L}$  radne otopine, nakon čega se promiješa pipetiranjem da se osigura homogena otopina. Otopina se potom ostavlja 2 minute na sobnoj temperaturi u tami radi inkubacije i bolje reakcije s DNK. Završno se na fluorimetru mjere zasebno standardi i epruvete s uzorcima, čiji su rezultati prikazani kao koncentracija DNK u  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.2.3.3. Reakcija lančane polimeraze**

PCR je laboratorijska tehnika koja omogućava *in vitro* umnažanje specifičnih sekvenci DNK, simulirajući prirodni proces DNK replikacije. Ova reakcija koristi dva oligonukleotida (početnice), koji su komplementarni krajevima sekvence koja se želi umnožiti. Početnice su orijentirane u suprotnim smjerovima i imaju duljinu od 15 do 20 nukleotida. PCR se sastoji od 20 do 40 ciklusa koji uključuju denaturaciju DNK, hibridizaciju početnica i ekstenziju hibridiziranih početnica uz pomoć termostabilne DNK polimeraze, čime je omogućeno eksponencijalno umnažanje specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplificiranog fragmenta definirani su 5' krajevima početnica, dok veličina fragmenta ovisi o udaljenosti između sekvenci koje početnice prepoznaju.

#### **3.2.3.3.1. Alel specifični PCR**

Alel specifični PCR ili sustav za umnažanje mutiranog alela (ARMS, engl. *amplification refractory mutation system*) je tehnika PCR-a koja se koristi za detekciju prisutnosti ili odsutnosti specifičnog alela (varijante gena) u uzorku DNK, koristeći parove početnica dizajniranih tako da se vežu samo na specifične sekvence. Naime, početnica se može dizajnirati tako da u sebi sadrži točkastu mutaciju i samim time se veže samo za promijenjenu sekvencu u slučaju prisustva mutacije [98].

Za ARMS PCR se pripremaju dvije odvojene reakcijske smjese, svaka sa specifičnim setom početnica koje se razlikuju samo za jedan nukleotid. Jedna smjesa sadrži početnicu specifičnu za normalni alel (divlji tip, engl. *wild type*), dok druga smjesa sadrži početnicu specifičnu za defektni alel. Ukoliko je specifični alel prisutan u uzorku DNK, početnica će se vezati i započinje amplifikacija (umnažanje) ciljane regije DNK. Ukoliko alel nije prisutan, početnica se neće vezati i izostaje amplifikacija. Izvođenje PCR-a s dvije odvojene reakcijske smjese koje



sadrže specifični set početnica omogućuje detekciju heterozigota. Oba seta početnica se koriste skupa sa zajedničkom konzervativnom početnicom koja služi kao druga veza za sintezu DNK lanca. Dodatno se koriste još dvije početnice, čiji produkt je kontrolni fragment koji potvrđuje uspješnost PCR reakcije.

Finalna reakcijska smjesa od 25  $\mu$ L sadrži 100 – 300 ng DNK, 1 x PCR pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 1 x Q pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 200  $\mu$ M dNTP, 1U HotStarTaq<sup>®</sup> polimerazu (QIAGEN, Hilden, Njemačka) te početnice kontrolne reakcije, zajedničku početnicu i početnicu M ili N, u koncentraciji specifičnoj za pojedini ARMS PCR (Tablica 11 A i B).

Tablica 11. Koncentracije početnica za detekciju najčešćih uzročnih varijanti  $\beta$ -talasemijskih sindroma

A.

Varijanta	Početnica A	Početnica B	Početnica C	Početnica M ili N
$\beta^{\circ}39$	20 pmol	20 pmol	9 pmol	9 pmol
$\beta^{\circ}IVSII-1$	20 pmol	20 pmol	20 pmol	20 pmol
$\beta^{\circ}IVSI-1$	20 pmol	20 pmol	25 pmol	25 pmol
$\beta^+IVSI-110$	20 pmol	20 pmol	15 pmol	15 pmol
$\beta^+IVSI-6$	20 pmol	20 pmol	50 pmol	50 pmol

B.

Varijanta	Početnica R37	Početnica R47	Početnica B	Početnica M ili N
$\beta^+IVSII-745$	30 pmol	30 pmol	25 pmol	25 pmol

Reakcija se provodi u termocikleru, uređaju koji omogućuje cikluse denaturacije (razdvajanje dvolančane DNK), vezivanja početnice (engl. *annealing*) i elongacije (produljenje lanca DNK).

Temperaturni profil reakcije je sljedeći:

1. 15 minuta na 95°C – aktivacija HotStartTaq<sup>®</sup> polimeraze

2. 35 ciklusa:
  - a. 1 minuta na 95°C – denaturacija
  - b. 1 minuta na 63°C – vezivanje
  - c. 1 minuta na 72°C – elongacija
3. 10 minuta na 72°C – završna elongacija

Nakon završetka ciklusa, analiza PCR produkta se vrši na 2%-tnom agaroznom gelu vizualizacijom pod ultraljubičastim (UV) svjetlom.

### 3.2.3.3.2. Gap PCR

Gap PCR je tehnika PCR-a koja se koristi za detekciju većih strukturnih promjena u genomu, poput delecije u Hb Lepore Boston-Washington (BW) [99]. Za detekciju ove varijante analiza se radi s početnicama LepA, LepB i R37 (Tablica 7). Početnica LepA potiče iz  $\delta$ -globinskog gena, a početnica LepB je smještena iza  $\beta$ -globinskog gena. PCR produkt LepA i LepB početnica je dužine 356 parova baza (bp, engl. *base pair*) i detektira isključivo fuzijski  $\delta\beta$ -globinski (Lepore) gen. Početnica R37 se nalazi u promotorskom dijelu normalnog *HBB* alela, a u slučaju rekombinacije ne postoji radi delecije. PCR produkt LepB i R37 početnice dugačak je 751 bp i detektira samo normalan *HBB* gen.

Finalna reakcijska smjesa od 25  $\mu$ L sadrži 100 - 300 ng DNK, 1 x PCR pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Q pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 200  $\mu$ M dNTP, 1U HotStarTaq<sup>®</sup> polimerazu (QIAGEN, Hilden, Njemačka) te početnice R37 (0,24  $\mu$ g), LepA (0,32  $\mu$ g) i LepB (0,4  $\mu$ g).

Temperaturni profil reakcije je sljedeći:

1. 15 minuta na 95°C – aktivacija HotStartTaq<sup>®</sup> polimeraze
2. 35 ciklusa:
  - a. 1 minuta na 95°C – denaturacija
  - b. 1 minuta na 55°C – vezivanje
  - c. 1 minuta na 72°C – elongacija
3. 10 minuta na 72°C – završna elongacija

Analiza PCR produkta vrši na 2%-tnom agaroznom gelu vizualizacijom pod UV svjetlom.

### 3.2.3.3.3. Reakcija umnažanja cjelokupnog *HBB* gena

S ciljem analize ostalih varijanti *HBB* gena, bilo je potrebno isti umnožiti isti PCR metodom.

Finalna reakcijska smjesa od 25  $\mu$ L sadrži 100 - 300 ng DNK, 1x PCR pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Q pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 200  $\mu$ M dNTP, 1U HotStarTaq<sup>®</sup> polimerazu (QIAGEN, Hilden, Njemačka) te početnice C i LepB za egzon 1, intron 1 i egzon 2, odnosno  $\beta$ \*IVSII-745 N i R61 za egzon 3 te IVS2 F i IVS2 R za intron 2.

Temperaturni profil reakcije je sljedeći:

1. 15 minuta na 95°C – aktivacija HotStartTaq<sup>®</sup> polimeraze
2. 35 ciklusa:
  - a. 1 minuta na 95°C – denaturacija
  - b. 1 minuta na 57°C – vezivanje
  - c. 1 minuta na 72°C – elongacija
3. 10 minuta na 72°C – završna elongacija

Očekivani produkt reakcije je dug 720 bp za egzon 1, intron 1 i egzon 2, 453 bp za egzon 3 i 860 bp za intron 2. Analiza PCR produkta vrši na 2%-tnom agaroznom gelu vizualizacijom pod UV svjetlom. Dobiveni PCR produkti se pročišćavaju na koloni. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja u kojoj su korištene iste početnice kao i za PCR reakciju.

### 3.2.3.3.4. Reakcija umnažanja promotorske regije *HBG2* gena

S ciljem analize varijanti u promotorskoj regiji *HBG2* gena, bilo je potrebno istu umnožiti PCR metodom.

Finalna reakcijska smjesa od 25  $\mu$ L sadrži 100 - 300 ng DNK, 1x PCR pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Q pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka), 200  $\mu$ M dNTP, 1U HotStarTaq<sup>®</sup> polimerazu (QIAGEN, Hilden, Njemačka) te početnice GgF i GgR u koncentraciji od 30 pmol.

Temperaturni profil reakcije je sljedeći:

1. 15 minuta na 95°C – aktivacija HotStartTaq<sup>®</sup> polimeraze
2. 35 ciklusa:
  - a. 1 minuta na 95°C – denaturacija

- b. 1 minuta na 55°C – vezivanje
  - c. 1 minuta na 72°C – elongacija
3. 10 minuta na 72°C – završna elongacija

Očekivani produkt reakcije je dug 658 bp. Analiza PCR produkta vrši na 2%-tnom agaroznom gelu vizualizacijom pod UV svjetlom. Dobiveni PCR produkt se pročišćava na koloni pomoću seta QIAquick® PCR Purification Kit prema uputstvima proizvođača QIAGEN, Hilden, Njemačka [100]. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja u kojoj se koriste iste početnice kao i za PCR reakciju.

#### **3.2.3.4. Analiza DNK na agaroznom gelu**

Agarozna gel-elektroforeza je specifična metoda koja koristi električno polje za razdvajanje molekula DNK različitih veličina kroz agarozni gel. DNK i RNK molekule su negativno nabijene zbog fosfatnih grupa u njihovoj strukturi. Kada se primijeni električno polje, molekule putuju prema pozitivno nabijenoj anodi. Brzina kretanja molekula ovisi o njihovoj veličini: manje molekule se kreću brže kroz pore gela, a veće molekule se kreću sporije.

DNK analiza se provodi na horizontalnom agaroznom gelu s koncentracijom od 1 do 2%, ovisno o veličini DNK fragmenata koje treba razdvojiti. Za pripremu gelova koristi se 1 x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Fluorescentna boja etidijev bromid se dodaje u gel u konačnoj koncentraciji od 0,5 µg/µL, gdje se veže između baza DNK, omogućujući njezinu vizualizaciju pod UV svjetlom. Elektroforeza se vrši pri struji od 80 mA i naponu od 80 V. Veličina DNK fragmenata određuje se pomoću odgovarajućih tvorničkih biljega.

#### **3.2.3.5. Sekvenciranje PCR produkata**

Sekvenciranje DNK po Sangeru ili metoda dideoksisekvenciranja je klasična tehnika koja se koristi za određivanje redoslijeda nukleotida DNK. Temelji se na sintezi novog DNK lanca pomoću DNK polimeraze, s nekoliko ključnih modifikacija koje omogućuju prekidanje lanca na specifičnim točkama. Naime, pored deoksinukleotida (dNTP), koriste se i dideoksinukleotidi (ddNTP) koji nemaju slobodnu 3'-OH grupu. Time se zaustavlja daljnja elongacija jer sljedeći nukleotid ne može biti vezan. Rezultat je mješavina DNK fragmenata različitih duljina, od kojih svaki završava s ddNTP na različitoj poziciji u sekvenci. Dobiveni fragmenti se razdvajaju pomoću kapilarne elektroforeze, gdje se manji fragmenti kreću brže kroz gel od većih. Svaki

od četiri ddNTP-a označen je različitom fluorescentnom bojom, što omogućuje detekciju i automatsko očitavanje sekvence DNK putem sekvencera.

DNK koji se želi sekvencirati umnaža se pomoću PCR-a. Nakon provjere PCR produkta na 1-2%-tnom agaroznom gelu, vrši se pročišćavanje na koloni pomoću seta Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države) [101]. Smjesa za sekvenciranje od 8 µL sadrži 3 – 10 ng pročišćenog PCR produkta, 3,2 pmol početnice za sekvenciranje te 3 µL Ready Reaction Mix-a. Za reakcije sekvenciranja se koriste iste početnice kao za PCR (Tablice 5-9).

Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje je sljedeći:

1. 1 minuta na 96°C
2. 25 ciklusa:
  - a. 10 sekundi na 96°C
  - b. 5 sekundi na 50°C
  - c. 4 minute na 60°C
3. ∞ minuta na 4°C

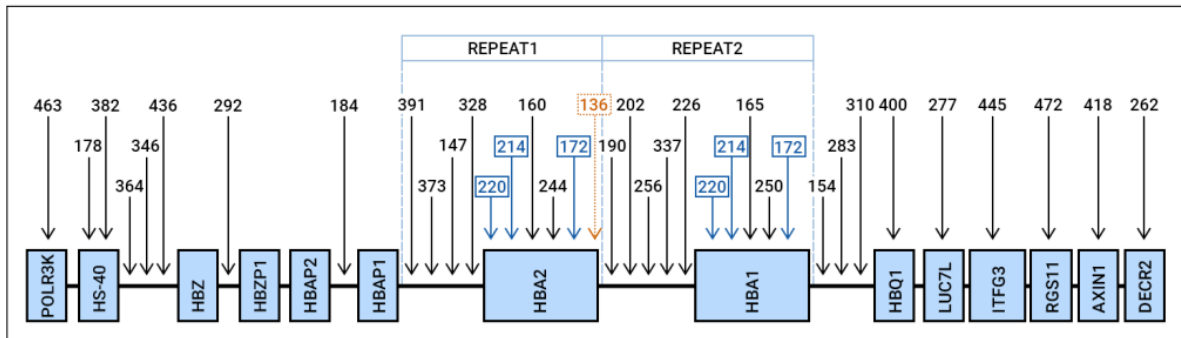
Nakon završenog sekvenciranja, uzorcima se dodaje 40 µL natrijevog acetata, dobro se promiješa, a zatim centrifugira 20 minuta pri 13 000 rpm. Supernatant se pažljivo uklanja nakon centrifugiranja. Talogu se dodaje 200 µL 70%-tnog etanola i ponovo se centrifugira 10 minuta na 13 000 rpm. Nakon toga se supernatant ponovo uklanja. Postupak se još jednom ponavlja. Osušeni talog se zatim otapa u 25 µL HiDi formamida i cijela otopina se prenosi na ploču za sekvenciranje. Sekvenciranje DNK je rađeno pomoću seta BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države) [102]. Po završetku reakcije, sekvence su očitane u programu SnapGene Viewer.

### **3.2.4. Metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda za detekciju varijanti u *HBA* genu**

Metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda (MLPA, engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) je molekularna tehnika koja omogućava istovremenu amplifikaciju više sekvenci koristeći samo jedan par početnica. Koristi se za detekciju varijacija broja kopija (CNV, engl. *copy number variations*), delecija i duplikacija genoma.

MLPA analiza je izvedena prema protokolu SALSA® MLPA® Probemix P140-HBA proizvođača MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska [103]. SALSA® MLPA® Probemix

sadrži 45 MLPA sonde s amplifikacijskim produktima između 130 i 481 nukleotida. Set uključuje 34 sonde za klaster gena  $\alpha$ -globina i njegove okolne regije, uključujući jednu sondu specifičnu za mutaciju Hb Constant Spring u genu *HBA2*.



Slika 3. Ciljne lokacije sonde u SALSA® MLPA® Probemixu P140-C1 HBA i veličine amplifikacije (broj nukleotida) za pojedine sonde [103]

Metoda je obuhvaćala nekoliko uzastopnih koraka pripreme reakcijskih smjesa i inkubacijskih reakcija te PCR amplifikacije. Najmanje tri različita kontrolna uzorka korištena su prilikom izvođenja MLPA analize.

U prvom koraku denaturacije DNK, 120 ng genomske DNK, u konačnom volumenu od 5  $\mu$ L (10mM Tris-HCl, pH 8,5) denaturirano je na temperaturi od 98°C tijekom 5 minuta, a zatim ohlađeno do temperature od 25°C.

U drugom koraku hibridizacije sonde, u 5  $\mu$ L ohlađenog genomske DNK dodano je 3  $\mu$ L reakcijske smjese za hibridizaciju izravno u mikroeprevete u PCR uređaju. Smjesa za hibridizaciju sadržavala je 1,5  $\mu$ L MLPA pufera i 1,5  $\mu$ L mješavine specifičnih sonde (Probemix P140-HBA). Konačna reakcijska smjesa od 8  $\mu$ L prvo je inkubirana 1 minutu na 95°C, a zatim ostavljena radi hibridizacije na temperaturi od 60°C tijekom 16 – 20 sati.

U trećem koraku izvršena je ligacija. Smjesa za ligaciju (32  $\mu$ L) sadržavala je: 25  $\mu$ L redestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O, engl. *double distilled water*), 3  $\mu$ L Ligase pufera A, 3  $\mu$ L Ligase pufera B i 1  $\mu$ L enzima Ligase-65. Neposredno prije dodavanja smjese za ligaciju, hibridizacijska smjesa ohlađena je na 54°C. Smjesa za ligaciju izravno je dodana u mikroeprevete koje su bile u PCR uređaju na temperaturi od 54°C. Sadržaj je inkubiran na 54°C tijekom 15 minuta. U sljedećem koraku, enzim je inaktiviran kratkom inkubacijom na 98°C tijekom 5 minuta, nakon čega je smjesa ohlađena na 20°C.

U četvrtom koraku sonde su amplificirane u PCR reakciji. Smjesa za PCR amplifikaciju (10  $\mu$ L) izravno je dodana u mikroeprevete koje su bile u uređaju na temperaturi od 20°C. Smjesa za PCR amplifikaciju sadržavala je: 7,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L SALSА PCR primer mix, 0,5  $\mu$ L SALSА polimeraze. Zatim je pokrenut PCR program: 35 ciklusa (30 sekundi na 95°C; 30 sekundi na 60°C i 60 sekundi na 72°C) nakon čega je slijedila finalna elongacija na 72°C tijekom 20 minuta i hlađenje na 15°C.

S obzirom da se probe razdvajaju na osnovu veličine tijekom kapilarne elektroforeze, korišten je biljeg standarda za veličinu (engl. *size standard*). U posebnoj epruveti pripremljena je smjesa (10  $\mu$ L) koja je sadržavala 0,7  $\mu$ L PCR produkta, 0,2  $\mu$ L biljega za veličinu GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države), dopunjena s 9  $\mu$ L HiDi formamida. Smjesa je inkubirana 3 minute na 86°C, a zatim ohlađena na 4°C tijekom 2 minute. Razdvajanje sonde (fragmentna separacija) izvršeno je kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru SeqStudio™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države). Obrada i analiza podataka izvršena je korištenjem softvera Coffalyser.Net (MRC Holland, Amsterdam, Nizozemska).

### **3.2.5. Procjena težine talasemijskog fenotipa**

Za procjenu težine kliničke slike talasemijskih sindroma korišten je Mahidol sustav bodovanja, koji boduje šest neovisnih kriterija: vrijednost Hb, dob primjene prve transfuzije, potrebe za transfuzijama krvi, dob početka simptoma i znakova bolesti, veličinu slezene te rast i razvoj [104]. Prema zbroju bodova razlikuju se blaga, umjerena i teška klinička slika (Tablica 12 A i B).

Tablica 12. Mahidol sustav bodovanja [104]

A.

Klinički kriteriji	Bodovi			
	0	0,5	1	2
Hemoglobin (g/dL)	>7,5		6 – 7,5	<6
Dob primjene prve transfuzije (godine)	>10		5 – 10	<5
Potrebe za transfuzijom krvi	Nikad		Povremeno	Redovito
Veličina slezene (cm)	<3		3 – 10	>10 ili splenektomija
Dob prvih simptoma (godine)	>10	3 – 10	<3	
Rast i razvoj (percentile)	>25.	3. – 25.	<3.	

B.

Težina kliničke slike	Bodovi
Blaga	0 - 3,5
Umjerena	4 - 7
Teška	7,5 - 10

### 3.3. Statistička obrada podataka

Za unos podataka korišten je Microsoft Excel 2019 (v16.0). Podaci su prikazani tabelarno. Kategorijske varijable su prikazane kao apsolutni brojevi i postotak unutar skupine. Kontinuirane varijable su prikazane kao srednje vrijednosti, medijani i rasponi.



Statistička obrada podataka učinjena je pomoću softvera MedCalc, v23.0.2 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

Usporedba varijabli između pojedinih skupina učinjena je primjenom Mann-Whitney U-testa. Za sve analize statistička značajnost definirana je na razini p vrijednosti manjoj od 0,05.

### **3.4. Etički aspekti istraživanja**

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka (br. 2170-29-02/1-21-2; 31. svibnja 2021.). U istraživanju su poštivani bioetički standardi, odnosno četiri temeljna bioetička načela (osobni integritet – autonomnost, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost), te oni iz njih izvedeni (privatnost, povjerenje). Provedeno je u skladu s Nürnberškim kodeksom, najnovijom revizijom Helsinške deklaracije i ostalim mjerodavnim dokumentima. Medicinski podaci su se prikupljali u skladu s bioetičkim standardima. Osigurana je privatnost (medicinska tajna) ispitanika i zaštita tajnosti podataka. Djeca starija od 13 godina i njihovi roditelji ili staratelji bili su detaljno upoznati s istraživanjem. Svoj pristanak za sudjelovanje u istraživanju potvrdili su potpisivanjem obrasca Informirane suglasnosti.

## 4. REZULTATI

Istraživanje je obuhvatilo 112 ispitanika (70 djece i 42 prva srodnika) iz 65 nesrodnih obitelji, kojima je postavljena dijagnoza talasemijskog sindroma ili sumnja na talasemijski sindrom, u razdoblju od 1. srpnja 2021. do 30. lipnja 2023. godine. Šezdeset pet (58,0%) ispitanika je bilo muškog, a 47 (42,0%) ženskoga spola. Sedamdeset (62,5%) ispitanika je bilo mlađe od 18 godina. Tablica 13 prikazuje spol, prosječnu dob, medijan i raspon dobi ispitanika.

Tablica 13. Spolna i dobna distribucija ispitanika

Ispitanici	Prosječna dob (godine)	Medijan (godine)	Raspon (godine)
Svi (N=112)	17,8	12,2	1,0 – 56,7
Muški spol (N=65)	16,1	11,8	1,0 – 50,5
Ženski spol (N=47)	20,2	14,4	1,0 – 56,7

Pokrate: N = broj ispitanika

### 4.1. Genotipske analize

Dijagnoza  $\beta$ -talasemijskog sindroma je postavljena u 46 ispitanika (30 djece i 16 prvih srodnika) iz 24 obitelji koje nisu u krvnom srodstvu. Svi ispitanici su bili heterozigoti (nositelji). Identificirana je jedna hemoglobinska varijanta i osam patogenih varijanti *HBB* gena. Dvadeset pet (54,3%) ispitanika s  $\beta$ -talasemijom je bilo muškog i 21 (45,7%) ženskoga spola. Prosječna dob ispitanika iznosila je 16,9 godina (medijan 11,3; raspon 1,0 – 47,6). Prosječna dob ispitanika ženskog spola iznosila je 19,1 godinu (medijan 12,2; raspon 1,0 – 47,6), dok je prosječna dob ispitanika muškog spola iznosila 15,1 godinu (medijan 10,1; raspon 1,0 – 45,5). Dobna i spolna distribucija svih ispitanika s potvrđenom dijagnozom  $\beta$ -talasemijskog sindroma prikazana je u Tablici 14. Od tridesetoro djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom, 18 (60,0%) je bilo muškog, a 12 (40,0%) ženskoga spola. Prosječna dob djece iznosila je 6,3 godine (medijan 4,0; raspon 1,0 – 18,0). Prosječna dob djece muškog spola iznosila je 6,5 godina (medijan 4,0;

raspon 1,0 – 17,5), a ženskog spola 6,0 godina (medijan 4,0; raspon 1,0 – 18,0). Dobna i spolna distribucija djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom prikazana je u Tablici 15.

Tablica 14. Spolna i dobna distribucija ispitanika s  $\beta$ -talasemijskim sindromom

<b>Ispitanici</b>	<b>Prosječna dob (godine)</b>	<b>Medijan (godine)</b>	<b>Raspon (godine)</b>
<b>Svi (N=46)</b>	16,9	11,3	1,0 – 47,6
<b>Muški spol (N=25)</b>	15,1	10,1	1,0 – 45,5
<b>Ženski spol (N=21)</b>	19,1	12,2	1,0 – 47,6

Pokrate: N = broj ispitanika

Tablica 15. Spolna i dobna distribucija djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom

<b>Ispitanici</b>	<b>Prosječna dob (godine)</b>	<b>Medijan (godine)</b>	<b>Raspon (godine)</b>
<b>Svi (N=30)</b>	6,3	4,0	1,0 – 18,0
<b>Muški spol (N=18)</b>	6,5	4,0	1,0 – 17,5
<b>Ženski spol (N=12)</b>	6,0	4,0	1,0 – 18,0

Pokrate: N = broj ispitanika

Prema kvantitativno-kvalitativnoj klasifikaciji, 31 ispitanik iz 17 nesrodnih obitelji (70,8%) bili su nositelji kvantitativnog poremećaja, od čega su 15 ispitanika iz 9 (37,5%) obitelji nositelji  $\beta^0$  varijante u heterozigotnom obliku, a 16 ispitanika iz 8 (33,3%) obitelji nositelji  $\beta^+$  varijante u heterozigotnom obliku. Preostalih 15 ispitanika iz 7 (29,2%) nesrodnih obitelji su nositelji specifične kvantitativno-kvalitativne hemoglobinske varijante (Tablica 16).

Tablica 16. Učestalost patogenih varijanti *HBB* gena

Vrsta varijante	Obitelji		Ispitanici	
	N	%	N	%
$\beta^0$	9	37,5	15	32,6
$\beta^+$	8	33,3	16	34,8
Hb varijanta	7	29,2	15	32,6
<b>UKUPNO</b>	<b>24</b>	<b>100</b>	<b>46</b>	<b>100</b>

Pokrate: Hb = hemoglobin; N = broj ispitanika

Hb Lepore-BW (NG\_000007.3:g.63632\_71046del) je najčešća uzročna varijanta talasemijskog sindroma u populaciji Hrvatskog primorja i Istre, s udjelom od 29,2%, nakon čega slijede varijante IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A) s učestalosti 20,8% i IVSII-1 (HBB:c.315+1G>A) s učestalosti 16,6%. Sljedeće dvije varijante po učestalosti su IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A) i Codon 39 (HBB:c.118C>T) s jednakim udjelom od 8,3%. Sveukupno, ovih pet varijanti činilo je 83,2% svih patogenih varijanti *HBB* gena. Varijante IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) i IVSII-745 (HBB:c.316-106C>G) i IVSII-745 (HBB:c.316-106C>G) su imale istu učestalost od 4,2%.

Također su otkrivene dvije rijetke varijante *HBB* gena, Hb Monroe i Poly A (A>G) s pojedinačnom učestalosti od 4,2% (Tablica 17).

Tablica 17. Vrste i učestalost uzročnih varijanti  $\beta$ -talasemijskih sindroma

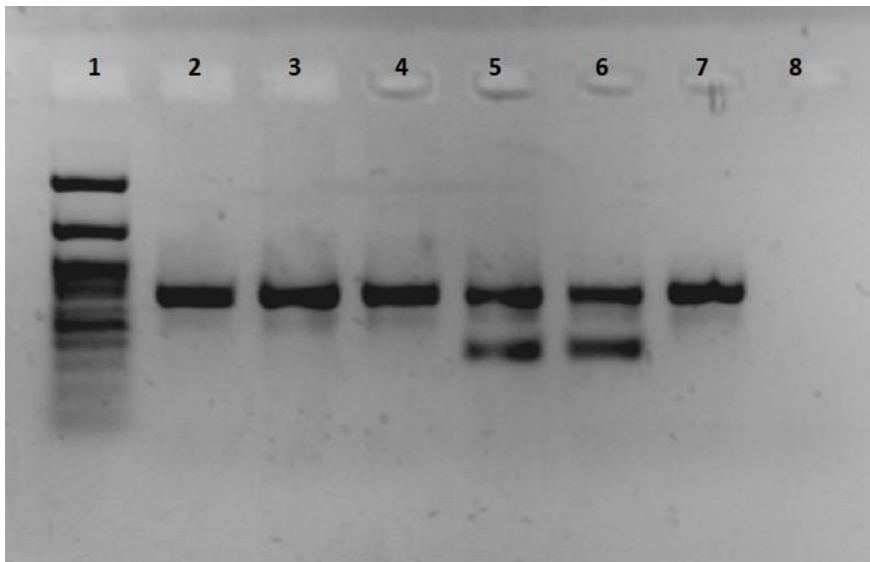
Uzročna varijanta	HGVS nomenklatura*	Vrsta uzročne varijante	Obitelji		Ispitanici	
			N	%	N	%
Hb Lepore-BW	NG_000007.3:g.63632_71046del	Varijanta Hb	7	29,2	15	32,6
IVSI-110	HBB:c.93-21G>A	$\beta^+$	5	20,8	9	19,6
IVSII-1	HBB:c.315+1G>A	$\beta^0$	4	16,6	6	13,1
IVSI-1	HBB:c.92+1G>A	$\beta^0$	2	8,3	5	10,9
IVSI-6	HBB:c.92+6T>C	$\beta^+$	2	8,3	2	4,3
IVSII-745	HBB:c.316-106C>G	$\beta^+$	1	4,2	4	8,7
Codon 39	HBB:c.118C>T	$\beta^0$	1	4,2	2	4,3
Hb Monroe	HBB:c.92G>C	$\beta^0$	1	4,2	2	4,3
Poly A (A>G)	HBB:c.*111A>G	$\beta^+$	1	4,2	1	2,2
<b>UKUPNO</b>			<b>24</b>	<b>100</b>	<b>46</b>	<b>100</b>

\* <https://hgvs-nomenclature.org/> [105]

Pokrate: Hb = hemoglobin; HGVS = nomenklatura genskih varijanti (engl. *Human Genome Variation Society*); N = broj ispitanika

#### 4.1.1. Uzročna varijanta Hb Lepore-BW (NG\_000007.3:g.63632\_71046del)

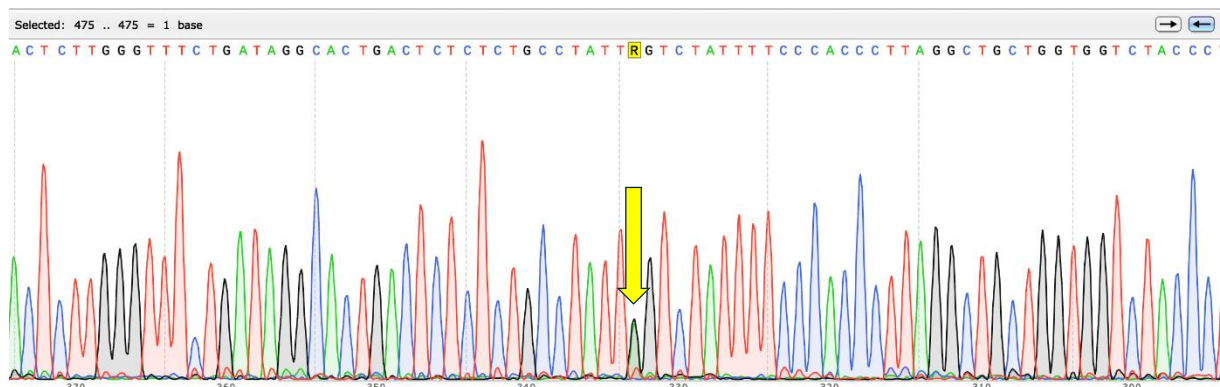
Ova varijanta predstavlja specifičnu genetsku promjenu u *HBB* genu koja uključuje deleciju segmenta DNK od pozicije 63,632 do 71,046 na referentnom genomu (poznatom kao NG\_000007.3), što uzrokuje prekid u normalnom kodiranju *HBB* gena i rezultira stvaranjem abnormalnog Hb. Segment brisanja pokriva područje koje uključuje regulacijske elemente i intronske sekvence važne za pravilnu sintezu  $\beta$ -globinskog lanca (Slika 4).



Slika 4. Elektroforeza hemoglobina na 2%-tnom agaroznom gelu. Kolona 1 predstavlja DNK biljeg od 100 bp, dok kolone 2 - 7 predstavljaju uzorke hemoglobina različitih ispitanika. Kolona 8 predstavlja kontrolni uzorak bez DNK. Kolone 2 - 4 predstavljaju normalan hemoglobin (HbA). Kolone 5 i 6 predstavljaju varijantu Hb Lepore-BW u heterozigotnom obliku (vidljive su dvije trake - gornja za HbA i donja za Hb Lepore-BW).

#### 4.1.2. Uzročna varijanta IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A)

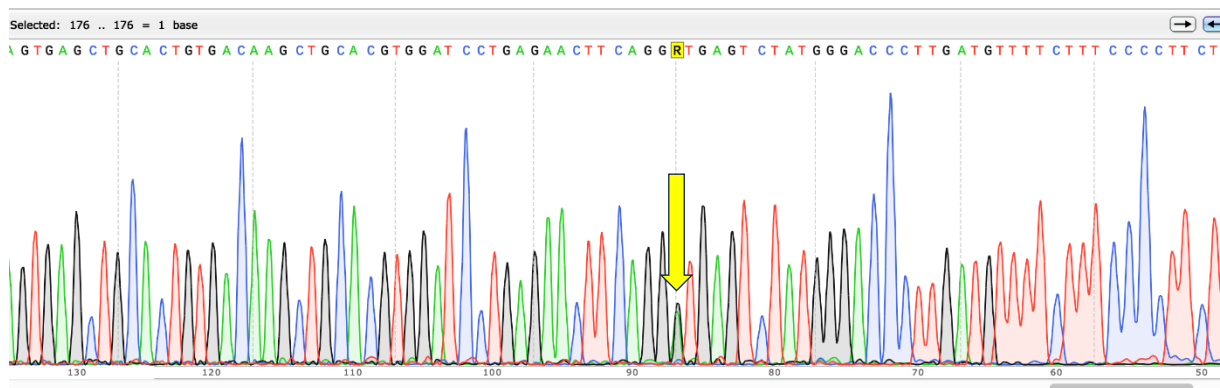
Ova patogena varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije guanina (G) s adeninom (A) u poziciji 21 prije početka egzona 1. Promjena se događa unutar intronskog dijela gena, 21 bp ispred nukleotida 93 u kodirajućem dijelu (Slika 5). Navedena varijanta može utjecati na pravilno prekranje pre-glasničke RNK (mRNK), što može rezultirati poremećenim stvaranjem funkcionalnog  $\beta$ -globina.



Slika 5. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante IVSI-110 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i adenina (A)

#### 4.1.3. Uzročna varijanta IVSII-1 (HBB:c.315+1G>A)

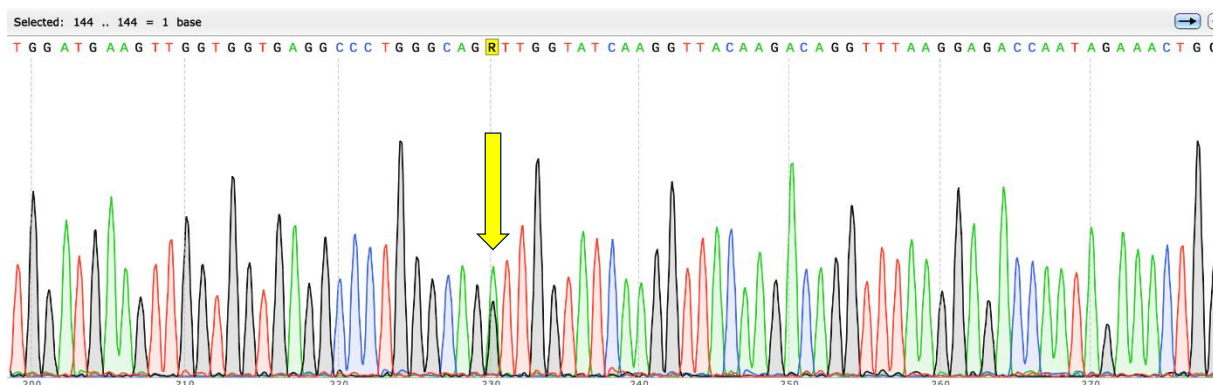
Ova patogena varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije guanina (G) s adeninom (A) na poziciji koja je +1 u intronu, neposredno nakon pozicije 315 u kodirajućem dijelu gena (Slika 6). Navedena pozicija je ključna jer se nalazi na samom mjestu spajanja između egzona i introna, u regiji koja je bitna za pravilno uklanjanje introna tijekom procesa prekrajanja mRNA (*splicing*). Posljedično, supstitucija nukleotida na toj poziciji može narušiti normalno prekrajanje, što često rezultira aberantnom mRNA koja ne može kodirati funkcionalni  $\beta$ -globinski protein.



Slika 6. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante IVSII-1 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i adenina (A)

#### 4.1.4. Uzročna varijanta IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A)

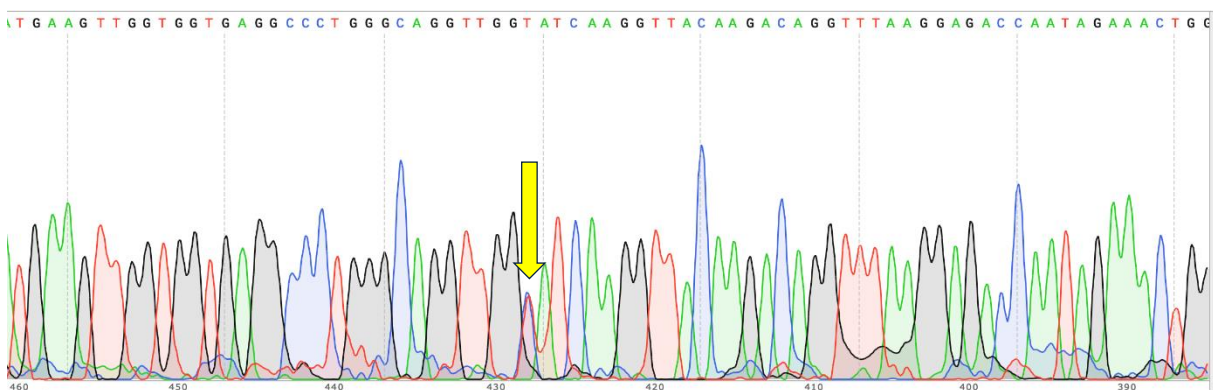
Ova patogena varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije guanina (G) s adeninom (A) na intronu neposredno nakon egzona 2 u kodirajućem dijelu *HBB* gena na poziciji +1 od granice između egzona i introna (Slika 7). Navedena pozicija je ključna za pravilno prekrajanje pre-mRNA, što može dovesti do nastanka nefunkcionalne mRNA koja ne može kodirati normalan  $\beta$ -globinski protein.



Slika 7. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante IVSI-1 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i adenina (A)

#### 4.1.5. Uzročna varijanta IVSI-6 (*HBB*:c.92+6T>C)

Ova patogena varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije timina (T) s citozinom (C) na poziciji +6 u intronu nakon kodirajućeg dijela egzona 2 (Slika 8). Promjena uzrokuje nepravilno spajanje egzona i introna, što može dovesti do stvaranja neispravne mRNK i posljedične sinteze nefunkcionalnog  $\beta$ -globinskog proteina.



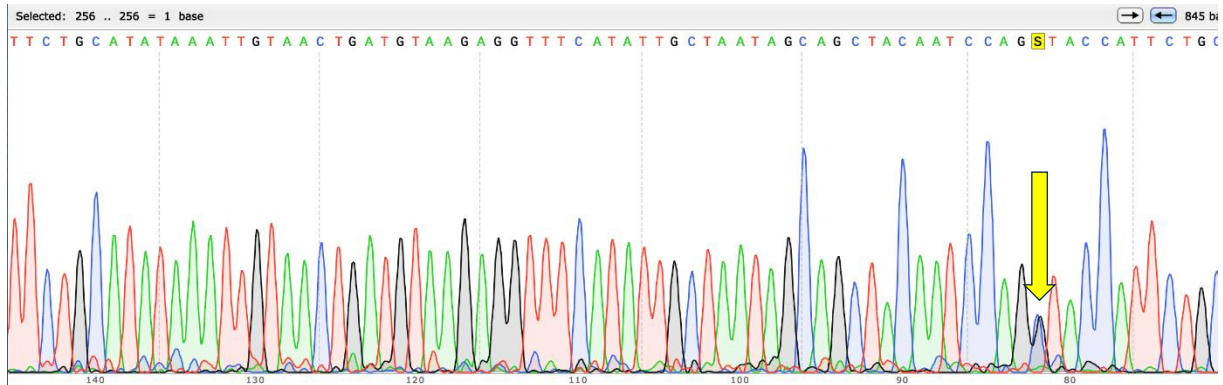
Slika 8. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante IVSI-6 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida timina (T) i citozina (C)

#### 4.1.6. Uzročna varijanta IVSII-745 (*HBB*:c.316-106C>G)

Ova varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije citozina (C) s guaninom (G) na -106 u odnosu na kodirajući dio gena, u intronskom dijelu neposredno prije egzona 3 (Slika 9). Navedena pozicija je važna za pravilno prekranje pre-mRNK, što može



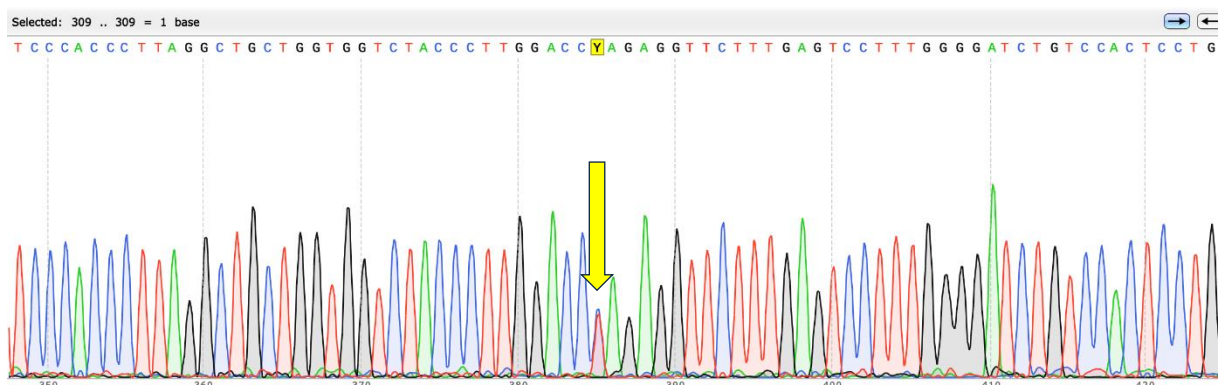
omesti normalno prekravanje i dovesti do nastanka nefunkcionalne mRNK koja posljedično ne može kodirati normalan  $\beta$ -globinski protein.



Slika 9. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante IVSII-745 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i citozina (C)

#### 4.1.7. Uzročna varijanta Codon 39 (*HBB*:c.118C>T)

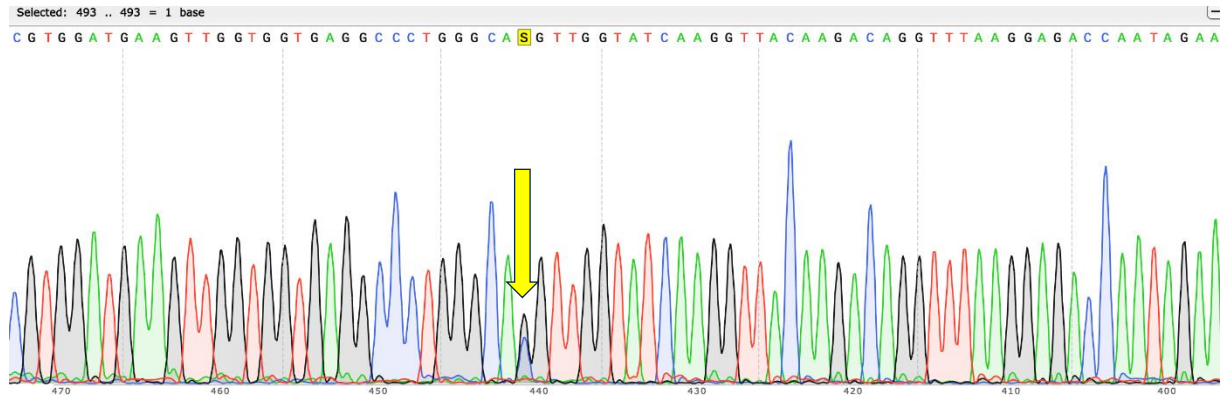
Ova varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije citozina (C) s timinom (T) na poziciji 118 kodirajućeg dijela gena, unutar Codona 39 koji se odnosi na specifični triplet nukleotida u mRNK, koji kodira aminokiselinu glutamin u  $\beta$ -globinskom proteinu (Slika 10).



Slika 10. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante Codon 39 u heterozigotnom obliku na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida timina (T) i citozina (C)

#### 4.1.8. Uzročna varijanta Hb Monroe (HBB:c.92G>C)

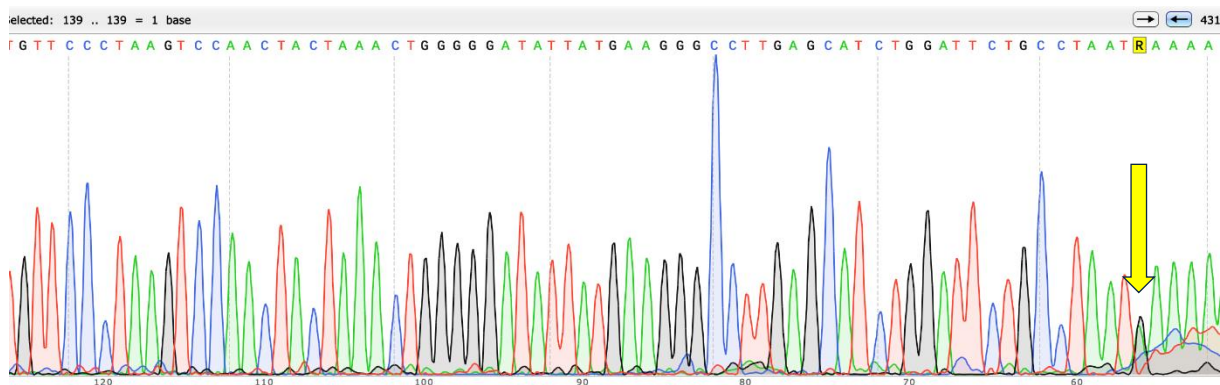
Ova varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije guanina (G) s citozinom (C) na poziciji 92 u kodirajućem dijelu gena (Slika 11). Navedena pozicija utječe na kodon koji kodira aminokiselinu glutamin u  $\beta$ -globinskom proteinu.



Slika 11. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante Hb Monroe u heterozigotnom obliku na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i citozina (C)

#### 4.1.9. Uzročna varijanta Poly A (A>G) (HBB:c.\*111A>G)

Ova varijanta predstavlja promjenu na *HBB* genu u kojoj dolazi do supstitucije adenina (A) s guaninom (G) na poziciji \*111 u ne-kodirajućem dijelu gena, unutar 3' neprevedene regije (3' UTR) *HBB* gena koja uključuje poli-A rep, što može smanjiti stabilnost mRNK ili utjecati na njezinu sposobnost za pravilan izlaz iz jezgre i prijenos u citoplazmi (Slika 12).



Slika 12. Dio sekvence *HBB* gena kod varijante Poly A (A>G) u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida adenina (A) i guanina (G)

## 4.2. Geni modifikatori

U svih ispitanika učinjena je MLPA metodom analiza na prisutnost  $\alpha$ -talasemije, kao potencijalnog sekundarnog modifikatora. Nisu dokazane varijante tipa delecija uzročnika  $\alpha$ -talasemije, uključujući i najučestaliju -3.7bp deleciju.

U osam ispitanika s povišenom razinom HbF >5%, kod kojih je otkrivena prisutnost  $\beta$ -talasemijskog sindroma, učinjena je analiza i na prisutnost -158 C>T polimorfizma u promotorskoj regiji *HBB* gena (XmnI polimorfizam), koji je udružen s povišenom razinom HbF u uvjetima eritroidnog stresa. U svih ovih ispitanika je otkrivena prisutnost XmnI polimorfizma, potencijalnog sekundarnog modifikatora, koji može doprinijeti povišenoj razini HbF (Tablica 18).

Tablica 18. Prisutnost XmnI varijante u ispitanika s  $\beta$ -talasemijskim sindromom s povišenom razinom hemoglobina F (HbF >5%)

<i>HBB</i> varijanta	Razina HbF (%)	XmnI varijanta
Hb Lepore-BW	30,8	+/-
IVSI-1	11,5	+/-
Hb Monroe	11,5	+/-
IVSI-110	10,1	+/-
IVSII-1	8,0	+/-
Hb Lepore-BW	6,5	+/-
Hb Lepore-BW	5,9	+/+
Codon 39	5,3	+/-

Pokrate: *HBB* =  $\beta$ -globinski gen; Hb = hemoglobin

## 4.3. Laboratorijske i kliničke značajke u nositelja $\beta$ -talasemijskog sindroma

Hematološki i biokemijski parametri u svih ispitanika pokazali su karakteristične značajke fenotipa  $\beta$ -talasemije, kako je prikazano u Tablicama 19 i 20. Vrijednosti MCV-a i MCH-a bile

su niže u svih ispitanika u usporedbi s normalnim vrijednostima za odgovarajuću dob i spol, neovisno o uzročnim varijantama  $\beta$ -talasemijskog sindroma. Blaga anemija je bila prisutna u 18/30 (60,0%) ispitanika, a rjeđe je bila zastupljena u ispitanika s Hb Lepore-BW (3/9), Hb Monroe (0/1) i PolyA (0/1), kako je prikazano u Tablici 19.

U Tablici 20 prikazane su vrijednosti hematoloških parametara u djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom prema dobnim skupinama. U svim dobnim skupinama bile su snižene vrijednosti MCV-a i MCH-a, a blaga anemija je bila češća u dobnim skupinama do 2 godine, od 6 do 12 godina te u ženskog spola dobi od 12 do 18 godina.

Tablica 19. Zastupljenost sniženih hematoloških parametara prema pojedinim uzročnim varijantama  $\beta$ -talasemijskih sindroma

<b>Varijanta</b>	<b>Snižen Hb (N)</b>	<b>Snižen MCV (N)</b>	<b>Snižen MCH (N)</b>
Hb Lepore-BW	3/9	9/9	9/9
IVSI-110	4/7	7/7	7/7
IVSI-1	3/3	3/3	3/3
IVSI-6	3/3	3/3	3/3
IVSII-1	3/3	3/3	3/3
IVSII-745	1/1	1/1	1/1
Codon 39	1/2	2/2	2/2
Hb Monroe	0/1	1/1	1/1
PolyA	0/1	1/1	1/1
<b>Ukupno</b>	<b>18/30</b>	<b>30/30</b>	<b>30/30</b>

Pokrate: Hb = hemoglobin; N = broj ispitanika

Tablica 20. Hematološki parametri u djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom po dobnim skupinama

<b>Dobna skupina</b>	<b>Dob (godine)</b>	<b>Hb (g/L)</b>	<b>MCV (fL)</b>	<b>MCH (pg)</b>
<2 godine (N=12)	1,3 (1,0 – 1,8)	103 (91 – 121)	56,4 (51,6 – 64,7)	18,3 (16,5 – 22,0)
2 – 6 godina (N=5)	3,5 (2,6 – 5,1)	117 (110 – 121)	61,6 (55,9 – 68,5)	19,6 (18,1 – 21,8)
6 – 12 godina (N=7)	9,6 (6,2 – 11,8)	109 (103 – 123)	61,0 (59,1 – 64,4)	20,0 (19,3 – 20,7)
12 – 18 godina ženski spol (N=2)	15,1 (12,2 – 18,0)	110 (106 – 113)	62,7 (61,4 – 64,1)	20,0 (19,9 – 20,1)
12 – 18 godina muški spol (N=4)	15,9 (12,3 – 17,5)	128 (118 – 138)	64,5 (54,4 – 67,6)	21,3 (17,8 – 22,5)

Pokrate: Hb = hemoglobin; MCV = srednji volumen eritrocita; MCH = srednja količina hemoglobina u eritrocitu; N = broj ispitanika

Razine HbA<sub>2</sub> bile su povišene u 17 (60,7%) ispitanika s  $\beta$ -talasemijskih sindromom (6 ispitanika s IVSI-110, 3 s IVSI-1, 3 s IVSII-1, 2 s IVSI-6, 1 s IVSII-745, 1 s Codon 39 i 1 ispitanik s Hb Monroe). HbF je bio povišen u 21 (75,0%) ispitanika (9 ispitanika s Hb Lepore-BW, 3 s IVSI-110, 3 s IVSI-1, 3 s IVSII-1, 1 s IVSII-745, 1 s Codon 39 i 1 ispitanik s Hb Monroe). Istovremeno povišene vrijednosti i HbA<sub>2</sub> i HbF imalo je 12 (42,9%) ispitanika (3 ispitanika s IVSI-110, 3 s IVSI-1, 3 s IVSII-1, 1 s IVSII-745, 1 s Codon 39 i 1 ispitanika s Hb Monroe), kako je prikazano u Tablici 21. U Tablici 22 prikazane su vrijednosti HbA<sub>2</sub> (medijan 4,2%; raspon 1,8 – 5,7%) i HbF (medijan 3,8%; raspon 0,0 – 30,8%) u djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom.

Tablica 21. Učestalost povišenih biokemijskih parametara prema pojedinim uzročnim varijantama  $\beta$ -talasemijskih sindroma

<b>Varijanta</b>	<b>Povišen HbA<sub>2</sub> (N)</b>	<b>Povišen HbF (N)</b>	<b>Povišen HbA<sub>2</sub> i HbF (N)</b>
Hb Lepore-BW	0/9	9/9	0/9
IVSI-110	6/6	3/6	3/6
IVSI-1	3/3	3/3	3/3
IVSI-6	2/3	0/3	0/3
IVSII-1	3/3	3/3	3/3
IVSII-745	1/1	1/1	1/1
Codon 39	1/1	1/1	1/1
Hb Monroe	1/1	1/1	1/1
PolyA	0/1	0/1	0/1
<b>Ukupno</b>	<b>17/28</b>	<b>21/28</b>	<b>12/28</b>

Pokrate: N = broj ispitanika

Tablica 22. Biokemijski parametri u djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom

<b>Svi</b>	<b>Dob (godine)</b>	<b>HbA<sub>2</sub> (%)</b>	<b>HbF (%)</b>
(N=28)	3,2 (1,0 – 17,2)	4,2 (1,8 – 5,7)	3,8 (0,0 – 30,8)

Pokrate: N = broj ispitanika

Tablica 23 prikazuje vrijednosti HbA<sub>2</sub>, HbF i Hb Lepore za pojedine uzročne varijante  $\beta$ -talasemijskih sindroma.

Tablica 23. Biokemijski parametri u djece s  $\beta$ -talasemijskim sindromom prema varijantama *HBB* gena (N=28)

<b>Varijanta (N = 28)</b>	<b>Dob (godine)</b>	<b>HbA<sub>2</sub> (%)</b>	<b>HbF (%)</b>	<b>Hb Lepore (%)</b>
Hb Lepore-BW (N=9)	6,4 (1,0 – 14,7)	2,6 (1,8 – 2,7)	5,1 (2,3 – 30,8)	9,6 (4,7 – 10,8)
IVSI-110 (N=6)	1,5 (1,0 – 10,9)	5,0 (4,1 – 5,5)	2,6 (0,0 – 10,1)	/
IVSI-1 (N=3)	1,2 (1,1 – 7,9)	5,0 (4,3 – 5,3)	11,3 (4,1 – 20,9)	/
IVSI-6 (N=3)	1,8 (1,5 – 6,2)	4,0 (3,9 – 4,0)	1,2 (1,2 – 1,9)	/
IVSII-1 (N=3)	9,6 (1,5 – 11,8)	5,5 (5,0 – 5,5)	8,0 (3,2 – 9,9)	/
IVSII-745 (N=1)	1,0	5,7	2,4	/
Codon 39 (N=1)	17,2	5,6	5,3	/
Hb Monroe (N=1)	2,6	4,5	11,5	/
PolyA (N=1)	2,9	3,6	0,4	/

Pokrate: Hb = hemoglobin; N = broj ispitanika

Kod Hb Lepore-BW nositelja, vrijednosti Hb (medijan 117, raspon 103 – 138) su bile statistički značajno više u usporedbi s nositeljima drugih *HBB* varijanti (medijan 106; raspon 91 – 124),  $p=0,049$ . Također, kod Hb Lepore-BW nositelja su vrijednosti MCH-a (medijan 20,2; raspon 19,3 – 22,5) bile statistički značajno više u usporedbi s nositeljima drugih *HBB* varijanti (medijan 19,3; raspon 16,5 – 21,8),  $p=0,002$  (Tablica 24).

Tablica 24. Hematološki parametri u djece s Hb Lepore-BW i ostalim varijantama *HBB* gena (N=30)

<b>Varijanta (N=30)</b>	<b>Dob (godine)</b>	<b>Hb (g/L)</b>	<b>MCV (fL)</b>	<b>MCH (pg)</b>
Hb Lepore-BW (N=9)	6,4 (1,0 – 14,7)	117 (103 – 138)	61,6 (55,9 – 67,6)	20,2 (19,3 – 22,5)
Ostale varijante <i>HBB</i> gena (N=21)	2,6 (1,0 – 18,0)	106 (91 – 124)	58,4 (51,6 – 68,5)	19,3 (16,5 – 21,8)

Pokrate: Hb = hemoglobin; MCV = srednji volumen eritrocita; MCH = srednja količina hemoglobina u eritrocitu; N = broj ispitanika

Od 30 djece s potvrđenim  $\beta$ -talasemijskim sindromom, u njih 22 (73,3%) je prethodno provedena peroralna terapija željezom.

Pozitivnu obiteljsku anamnezu imalo je 5 (16,7%) djece s kasnije potvrđenom dijagnozom talasemijskog sindroma.

Težina kliničke slike je procijenjena prema Mahidol sustavu bodovanja. Svaki ispitanik je imao zbroj bodova 0, odnosno blagi fenotip  $\beta$ -talasemijskog sindroma.



## 5. DISKUSIJA

Talasemijski sindromi su heterogena skupina nasljednih hemolitičkih anemija karakterizirana smanjenom ili odsutnom sintezom globinskih lanaca Hb. Posljedična neravnoteža globinskih lanaca glavno je patofiziološko obilježje bolesti [5,56]. Talasemijski sindromi su uzrokovani patogenim i vjerojatno patogenim varijantama u genima za globinske lance, kojih je danas identificirano preko 1800 [22]. Fenotipska varijabilnost je prvenstveno rezultat ove velike genotipske varijabilnosti.

Talasemijski sindromi se klasificiraju prema vrsti genetske promjene, tipu globinskog lanca čija je sinteza poremećena i kliničkom fenotipu [56]. Najčešće su monogenske bolesti u svijetu. Iako su prisutne u svim populacijama i geografskim regijama, tradicionalno su najučestalije u Mediteranskom bazenu te tropskim i suptropskim područjima Afrike i Azije. Tzv. „talasemijski pojas“ proteže se od Atlantskog do Tihog oceana, a obuhvaća subsaharsku Afriku, Mediteran, Bliski istok, te južnu, jugoistočnu i istočnu Aziju [34,106]. Prevalencija talasemija u ovim geografskim područjima iznosi 2,5 do 15% [28].

$\beta$ -talasemija je posebice rasprostranjena među narodima Mediterana. Ova geografska povezanost odražava se i u nazivu bolesti, koji potječe od grčke riječi *thalassa* (more). Najveća prevalencija je na Cipru, u Grčkoj i Italiji, uključujući velike mediteranske otoke: Siciliju, Sardiniju i Kretu [107]. Na Cipru je 15% populacije (obje etničke grupe, grčka i turska) nositelj gena za  $\beta$ -talasemiju, a 10% su nositelji gena za  $\alpha$ -talasemiju, što se povezuje s geografskom izolacijom Cipra u prošlosti i visokom stopom brakova u krvnom srodstvu [108].

Za karakterističnu geografsku rasprostranjenost talasemijskih sindroma prvenstveno je odgovorna malarija (tzv. malarična hipoteza) i talasemijski pojas se podudara s endemskim malaričnim područjima [109]. Pretpostavlja se da udruženost talasemije i malarije odražava prirodnu pozitivnu selekciju talasemijskih heterozigota, posredovanu relativnom rezistencijom prema uzročniku malarije *Plasmodium falciparum* (tzv. heterozigotna prednost). Novija ispitivanja pokazuju da su mehanizmi pomoću kojih talasemija štiti od malarije puno složeniji. Tome u prilog govori činjenica da mnoga geografska područja u kojima je talasemija i danas učestala više nisu žarišta malarije. Istraživanja su dodatno komplicirana čestom udruženosti polimorfizama *HBB* gena s drugim polimorfizmima koji mogu poništiti zaštitu protiv malarije. Primjerice, heterozigotnost za  $\beta$ -talasemiju je zaštitna, ali ako osoba ima udružene patogene varijante gena za HbS, kombinacija ova dva polimorfizama poništava zaštitu [110].

Predloženi mehanizmi kojima polimorfizimi gena za  $\alpha$ - i  $\beta$ -talasemiju štite od malarije dijele se u dvije grupe: imunološki posredovane i stanične. Ovi mehanizmi uključuju bolji imunološki klirens parazita, smanjeno preživljavanje parazita u eritrocitima i smanjenu sposobnost invazije parazita u eritrocite [111].

Malarija je kroz povijest predstavljala zdravstveni problem i na našim područjima. Prema arhivskoj građi, u Istri je datirala od XIV. stoljeća, stoljećima se bila održala u endemskom obliku na južnom i zapadnom dijelu istarskog poluotoka, a gotovo potpuno je eradikirana tek pred Drugi svjetski rat [112]. Smatrala se endemskom i na otocima Krku, Rabu i Pagu [113]. Od 1958. godine u Hrvatskoj nema autohtonih infekcija, a 1964. godine malarija je službeno proglašena iskorijenjenom [114].

Prevalencija talasemija se razlikuje ne samo među različitim geografskim područjima i različitim populacijama, nego i među populacijama unutar istog područja [115–117]. Ispitivanja ovih specifičnosti, posebice u velikim populacijama, doprinose razvoju i osnaživanju preventivnih i terapijskih programa.

Posljednjih desetljeća su velike migracije stanovništva iz afričkih i azijskih zemalja s visokom prevalencijom talasemije značajno promijenile rasprostranjenost bolesti, pa talasemije danas predstavljaju globalni zdravstveni problem [33,56]. Migracije izbjeglica iz endemskih područja (najviše iz Sirije i Afganistana) u Europu posljednjih godina, promijenile su profil prevalencije talasemija u nekim europskim zemljama (Italija, Njemačka, Grčka, Turska) [38]. Incidencija i prevalencija  $\beta$ -talasemije je značajno povećana u Sjedinjenim Američkim Državama zbog imigracijskog priljeva s azijskog područja i zbog povećanog broja posvojenja djece s  $\beta$ -talasemijom iz Kine i susjednih zemalja [118]. Prema bazi podataka američke Zaklade za Cooleyjevu anemiju (Cooley's Anemia Foundation), 12% pacijenata s  $\beta$ -talasemijom posvojeno je iz drugih zemalja [119].

Hrvatska se nalazi na raskrižju Srednje Europe, Balkana i Mediterana [120]. Iako na rubu talasemijskog pojasa, u Hrvatskoj do sada nisu provedena sveobuhvatna epidemiološka ispitivanja [60]. Postoji nekoliko prikaza slučajeva i jedno nedavno objavljeno ispitivanje na populaciji Srednje Dalmacije [121]. Najveće populacijsko istraživanje koje je uključilo i Hrvatsku (422 ispitanika), bilo je dvadesetpetogodišnje istraživanje na gotovo 29 000 osoba (26 765 školske djece, 800 vojnika i 1629 radnika) s područja bivše Jugoslavije. Učestalost heterozigotne talasemije u Hrvatskoj (prije proglašenja nezavisnosti) iznosila je 0,8%.

U Bosni i Hercegovini učestalost je bila 1,5%, u Srbiji 1,8%, u Crnoj Gori 1,9% i u Sjevernoj Makedoniji 2,9% (s rasponom od 1,0% do 7,8% u različitim regijama, najvećom u blizini granice s Grčkom) [122]. Zadnje veliko epidemiološko ispitivanje učestalosti talasemija na Mediteranu, u koje je uključena 21 zemlja na europskoj, afričkoj i azijskoj obali Mediterana s populacijom od 522 milijuna, temeljeno je na bazama podataka IthaGenes [123] i CTGA (Catalogue for Transmission Genetics in Arabs) [124]. Rezultati upućuju da je stopa incidencije talasemije na 100 000 poroda u Hrvatskoj (2,9%) slična incidenciji u susjednoj Bosni i Hercegovini (4,1%) i Sloveniji (5,4%) te u Izraelu (3,0%). Prevalencija nositelja  $\beta$ -talasemije u Hrvatskoj se procjenjuje do 3%, kao i u susjednim zemljama Bosni i Hercegovini, Sloveniji i Crnoj Gori [107]. Istraživanje na 3000 novo prijavljenih dobrovoljnih darivatelja krvi na području Srednje Dalmacije (Šibensko-kninska i Splitsko-dalmatinska županija) procjenjuje učestalost minor forme (nositelja) na 0,16% [121]. Ovako nisku prevalenciju treba tumačiti s oprezom obzirom na selekcioniranu skupinu ispitanika: 10% potencijalnih darivatelja se odbija upravo zbog nižih vrijednosti Hb, dio se zbog anemije niti ne prijavljuje za dobrovoljnog darivatelja, a ispitanici su bili u dobi od 18 do 65 godina.

Prema kliničkoj slici,  $\beta$ -talasemije se tradicionalno dijele u tri oblika ili forme: minor, intermedia i major oblik.  $\beta$ -talasemija minor (trait) je status nositelja koji ima jedan defektni *HBB* gen (heterozigot za  $\beta^+$  ili  $\beta^0$ ), dok je *HBB* gen na drugom kromosomu normalan. Nositelji su tipično bez simptoma. Prema novoj klasifikaciji minor oblik spada u NTDT. Osnovna obilježja su mikrocitoza i hipokromija. Broj eritrocita može biti povišen. Broj retikulocita je normalan ili blago povišen, ali nema značaja u postavljanju dijagnoze. Anemija je ponekad prisutna i uvijek je blaga, s Hb nižim do 2 g/dL u odnosu na zdrave osobe iste dobi i spola [28,57]. Značajna anemija s Hb <7 g/dL može se razviti u trudnica, najčešće u trećem trimestru [55]. Na citološkom razmazu periferne krvi eritrociti su manji (mikrociti), svjetliji (hipokromni eritrociti), nejednake veličine (anizociti) i nejednakog oblika (poikilociti). Dijagnoza se najčešće postavlja kvantificiranjem Hb (prvenstveno frakcije HbA<sub>2</sub>) pomoću elektroforeze. Kod minor forme, vrijednosti HbA<sub>2</sub> variraju između 3,6% i 7%. Vrijednosti HbF mogu biti blago povišene (> 1% i < 5%) [28,125]. Navedeni hematološki i biokemijski parametri mogu varirati kod nekih podtipova  $\beta$ -talasemije minor, primjerice kod heterozigota za blage ili vrlo blage  $\beta$ -varijante (IVS1-6, -87, 101), kod dvostrukih heterozigota za  $\beta$ - i  $\delta$ -talasemiju ili kod udruženog nasljeđivanja  $\alpha$ -talasemije [126,127].

$\beta$ -talasemija minor se najčešće otkriva u okviru obrade članova obitelji nositelja ili u okviru populacijskih istraživanja, zatim u trudnica u zadnjem trimestru ili u stanjima nefiziološkog stresa (opsežni kirurški zahvati, veliki tjelesni naponi) [28,56].

U diferencijalnoj dijagnozi treba razmotriti sideropeničnu anemiju, koja je najčešća mikrocitna i hipokromna anemija, te rjeđe uzroke poput deficita cinka, sideroblastične anemije, trovanje olovom, sideropenične anemije refraktorne na željezo (IRIDA, *engl.* iron refractory iron deficiency anaemia) te rijetke anemije uzrokovane genetskim poremećajima u metabolizmu željeza. RDW (širina distribucije volumena eritrocita, *engl.* red cell distribution width), koji mjeri varijaciju u veličini eritrocita, obično je povišen kod sideropenične anemije, a kod talasemije je normalan zbog uniformne populacije mikrocita [127]. Za izračunavanje talasemijskog indeksa i za razlikovanje sideropenične anemije od talasemije u uporabi je nekoliko formula, koje se temelje na hematološkim parametrima [128]. Najčešće se koristi Mentzer-ov indeks (MI):  $MI = MCV / \text{broj eritrocita}$ . Ako je  $MI > 13$ , vjerojatna dijagnoza je sideropenična anemija, dok  $MI < 13$  upućuje na nositelja  $\beta$ -talasemije [129]. U osoba s mikrocitnom anemijom je potrebno odrediti status željeza u krvi. Najvažniji parametar je vrijednost serumskog feritina; vrijednosti feritina ispod  $15 \mu\text{g/L}$  u odsustvu upale/infekcije potvrđuju dijagnozu sideropenične anemije [92].

U našem istraživanju je u sve djece s talasemijom inicijalno učinjena KKS. Hematološki parametri su bili kako je očekivano, karakteristični za minor fenotip: zapažene su niže vrijednosti MCV-a i MCH-a u odnosu na zdravu djecu iste dobi i spola.

Elektroforeza Hb je učinjena u 28 ispitanika. Svi ispitanici su imali snižen HbA, što je karakteristično za beta talasemije, u 17 (60,7%) ispitanika su bile povišene vrijednosti HbA<sub>2</sub> ( $\geq 4\%$ ), a 21 (75,0%) ispitanik je imao povišene vrijednosti HbF ( $>2\%$ ). Povišene vrijednosti i HbA<sub>2</sub> i HbF imalo je 12 (42,9%) ispitanika. Nositelji Hb Lepore-BW imali su značajno niže razine HbA<sub>2</sub> u usporedbi s nositeljima drugih varijanti *HBB* gena. Ovi rezultati odgovaraju prethodnim ispitivanjima i mogu se objasniti smanjenom sintezom  $\alpha$ -globinskih lanaca zbog varijanti u  $\alpha$ -globinskim genima [28,130]. Veći postotak ispitanika s povišenim vrijednostima HbF u našem uzorku možemo također tumačiti s većom zastupljenosti Hb Lepore. Hb Lepore je rijetka delecijaska hemoglobinska varijanta građena od dva  $\alpha$ - i dva fuzijska  $\delta/\beta$  lanca. U heterozigota čini 10 do 15% ukupnog Hb, a klinički fenotip nalikuje talasemiji minor. Opisana su tri podtipa koja se razlikuju u regijama križanja (*engl.* cross-over): Hb Lepore-BW, Baltimore i Hollandia [131]. Hb Lepore-BW je opisan pretežno na Mediteranu (najviše u južnoj

Italiji) [132]. Složeni heterozigoti Hb Lepore ispoljavaju veću kliničku varijabilnost i opisani su slučajevi s povišenim HbF [133].

Normalna razina HbA<sub>2</sub> ne isključuje status nositelja  $\beta$ -talasemije, posebice ako je istovremeno prisutan manjak željeza koji može sniziti razine HbA<sub>2</sub> na normalne vrijednosti. Nadalje, vrijednosti HbA<sub>2</sub> mogu biti granične zbog blagih ili "tihih" varijanti *HBB* gena i kod osoba koje imaju udruženu  $\beta$ -talasemiju s  $\alpha$ - ili  $\delta$ -talasemijom. U ovakvim slučajevima, točna dijagnoza se može postaviti jedino molekularno-genetičkim testiranjem [134–136].

Prvi važan korak u proučavanju korelacije genotipa i fenotipa je precizna definicija fenotipova. Za procjenu težine kliničke slike pojedinaca s talasemijom najčešće se koristi Mahidol sustav bodovanja [104]. Ovaj sustav koristi šest neovisnih kriterija: vrijednost Hb u stabilnom stanju, dob početka simptoma i znakova bolesti, dob primjene prve transfuzije, potrebe za transfuzijama krvi, veličinu slezene te rast i razvoj. Svaki kriterij se ocjenjuje s 0, 0,5, 1 ili 2 boda. Zbroj bodova od 0 do 3,5 je blaga, zbroj od 4 do 7 umjerena, a zbroj od 7,5 do 10 je teška klinička slika. Pokazano je da je ovaj sustav jednostavan, siguran i učinkovit način za klasifikaciju težine talasemije intermedia [137]. Svi naši ispitanici bili su bez simptoma i nisu imali kliničke znakove talasemije. Prema Mahidol sustavu bodovanja svakom ispitaniku je zbroj bodova bio 0 i pripadali su blagom obliku. Rezultati upućuju na dobru korelaciju genotipa (heterozigotni nositelji) i fenotipa.

Detaljno uzeta obiteljska anamneza je od iznimne važnosti za prepoznavanje nasljednih bolesti, u koje spadaju i talasemijski sindromi. Negativna obiteljska anamneza ne isključuje postojanje bolesti, budući da oba roditelja mogu biti nositelji defektnog gena. U našem uzorku samo je petoro (16,7%) djece s kasnije potvrđenom dijagnozom  $\beta$ -talasemije upućeno na pregled zbog pozitivne obiteljske anamneze. Ovaj podatak može upućivati na postojanje nedijagnosticiranih ili krivo dijagnosticiranih slučajeva talasemije u populaciji Hrvatskog primorja i Istre, ali i na nedostatnu svjesnost nositelja o vlastitoj dijagnozi.

Diferencijalna dijagnoza sideropenične anemije je ključna, prvenstveno radi izbjegavanja nepotrebnog liječenja željezom i odustajanja od nepotrebnih pretraga. U našem istraživanju, u 22 ispitanika s talasemijom (73,3%) je provedena peroralna terapija željezom prije upućivanja na hematološku obradu. Djeca su primala terapiju u dnevnoj dozi od 3 – 5 mg/kg elementarnog željeza u razdoblju od 3 tjedna do 4 mjeseca, nakon čega su im ponovljeni krvni nalazi. U niti jednog djeteta nije zabilježeno poboljšanje Hb i eritrocitnih indeksa, stoga su bili upućeni pedijatrijskom hematologu na daljnju evaluaciju. Ovaj podatak može upućivati da među

zdravstvenim djelatnicima nema dovoljnog znanja o postojanju i hematološkim obilježjima talasemije minor.

Talasemijski sindromi posljedica su velikog broja vrlo heterogenih promjena  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinskih gena, koje su odgovorne za smanjenu ili odsutnu sintezu  $\alpha$ - i/ili  $\beta$ -globinskih lanaca. Talasemije su prve bolesti proučavane na nivou DNK i korištene su kao model za molekularnu patogenezu monogenских bolesti [138]. Upravo su klasteri globinskih gena i njihovi globinski produkti najbolje proučeni u ljudskom genomu na razini njihove strukture i funkcije, te redosljeda ekspresije tijekom života.

Molekularni profil talasemijskih sindroma različit je u različitim populacijama i u različitim geografskim područjima. Brojna ispitivanja molekularne osnove  $\beta$ -talasemija provedena su u puno zemalja, a rezultati su korisni za izradu preventivnih programa i terapijskih strategija. Iako na globalnoj razini pokazuju ekstremnu varijabilnost, samo 20 varijanti *HBB* gena uzrokuje više od 80% svih slučajeva  $\beta$ -talasemije. Ovo se tumači fenomenom geografskog grupiranja, gdje svaka populacija i subpopulacija ima nekoliko čestih i različit broj rijetkih uzročnih varijanti *HBB* gena [69].

U Hrvatskoj do sada nisu provedena veća istraživanja talasemijskog genotipa. Jedina objavljena genetička analiza učinjena je na 14 ispitanika s  $\beta$ -talasemijom minor [139]. U spomenutom istraživanju Efremova i suradnika koje je uključilo i tadašnju Hrvatsku, identificirano je 18 različitih varijanti, od kojih su tri (IVS-I-110, IVS-I-6 i IVS-I-1) činile 70% svih slučajeva [122]. Otkriveno je pet novih varijanti (prema originalnom opisu: -87 C→A; IVS-II-850 G→C, mutacija u inicijacijskom kodonu T→A; mutacija u poliadenilacijskoj sekvenciji AATAAA→AATGAA i jedna nova delecija od 1605 bp). Dvije trećine dijagnosticiranih slučajeva je bilo iz Makedonije i Hrvatske, a trećina iz svih ostalih zemalja bivše Jugoslavije.

Naše istraživanje je najveće do sada provedeno molekularno-genetičko istraživanje uzročnih varijanti talasemijskih sindroma na području Hrvatske. Osim što je najveće, provedeno je na selekcioniranoj skupini ispitanika kod kojih je uočena mikrocitoza i hipokromija, anemija i/ili patološka zastupljenost hemoglobinskih frakcija. U dijelu naših ispitanika je (nepotrebno) provedena terapija peroralnim željezom, koja nije bila učinkovita (izostanak poboljšanja hematoloških parametara). Istraživanje je također obuhvatilo i članove obitelji ispitanika prvog stupnja srodstva koji su imali podatak o anemiji. Molekularno istraživanje potaknuto je činjenicom da Hrvatska pripada mediteranskom bazenu, u kojem je genotip talasemijskih

sindroma detaljno ispitan. U analize su uključene mediteranske varijante, varijante u susjednim zemljama i varijante karakteristične za populacije s kojima smo povijesno povezani.

Molekularnu dijagnozu talasemije smo potvrdili u 46 ispitanika (30 ispitanika s mikrocitozom i hipokromijom i/ili mikrocitnom anemijom, od kojih je u 28 ispitanika dijagnoza postavljena elektroforezom Hb, te u njihovih 16 prvih srodnika) iz 24 obitelji koje nisu u međusobnom krvnom srodstvu. Svi ispitanici su imali  $\beta$ -talasemiju minor (NTDT).

U poglavlju 4 (4.1.1. do 4.1.9.) je za svaku uzročnu varijantu  $\beta$ -talasemije otkrivenu u našem istraživanju opisan smještaj na *HBB* genu, priroda genetske alteracije i specifična uloga u sintezi globinskog lanca koja uzrokuje talasemijski fenotip.

Hb Lepore je talasemijska hemoglobinska varijanta koja je rezultat fuzije *HBB* i *HBD* gena. Najčešći je tip  $\beta$ -talasemijskog sindroma u Hrvatskom primorju i Istri, prisutan u 7 obitelji koje nisu u krvnom srodstvu, s učestalošću od 29,2%. Isključivo je detektirana heterozigotna forma Hb Lepore-BW. Učestalost je slična onoj u susjednoj Srbiji, gdje je incidencija Hb Lepore-BW 26,2% [140]. U starijem istraživanju Beksedić i suradnika, opisana je učestalost hemoglobinopatija u Srbiji od 1,9%, od čega je gotovo 45% predstavljao Hb Lepore-BW [141]. Visoke stope učestalosti Hb Lepore-BW kao u Hrvatskoj i Srbiji, nisu opisane niti u jednoj drugoj populaciji.

Vučak je u 14 ispitanika s područja srednje Dalmacije s postavljenom dijagnozom  $\beta$ -talasemije pronašao 6 patogenih i vjerojatno patogenih varijanti  $\beta$ -talasemije: HBB:c.92+2T>C (IVS I-2), HBB:c.92+1G>A (IVS I-1), HBB:c.93-21G>A (IVS I-110), HBB:c.316-106C>G (IVS II-745), HBB:c.238G>A (D79N) i HBB:c.170delG (350delG) [121]. Iako regija Hrvatskog primorja graniči s Dalmacijom, genotipski profil talasemije se razlikuje. Ovim susjednim hrvatskim regijama zajedničke su tri varijante: IVS I-2, IVS I-2 i IVS II-745. Varijanta IVS-I-110 je bila prisutna u 9 ispitanika iz Hrvatskog primorja i Istre (19,6% svih ispitanika) iz 5 različitih obitelji (20,8% svih obitelji), a u dva ispitanika u Srednjoj Dalmaciji (14,3%). Različit je klinički fenotip ove varijante: u Hrvatskom primorju i Istri su svi bili nositelji, dok je u srednjoj Dalmaciji jedan ispitanik imao minor, a drugi intermedia fenotip. Varijanta IVS I-1 je otkrivena u 5/46 (10,9%) ispitanika Hrvatskog primorja i Istre iz 2 različite obitelji (8,3%), a u srednjoj Dalmaciji u 2/14 (14,3%) ispitanika. Svi ispitanici su imali minor fenotip. Varijanta IVS II-745 je detektirana u 2/14 (14,6%) ispitanika s minor fenotipom u srednjoj Dalmaciji te u 2/46 (4,3%) ispitanika u Hrvatskom primorju i Istri iz jedne obitelji (4,2%). U istraživanju Vučka je u 145 ispitanika s mikrocitozom učinjena elektroforeza Hb. Patološki nalaz je imalo 9 ispitanika, od

kojih je troje (33,3%) imalo Hb Lepore, što je usporedivo s učestalosti u Hrvatskom primorju i Istri (rezultat treba tumačiti s oprezom zbog malog uzorka). Genotipizacija nositelja Hb Lepore nije učinjena.

Najčešće uzročne varijante *HBB* gena (bez talasemijske varijante Hb Lepore) u populaciji Hrvatskog primorja i Istre su sljedeće: HBB:c.93-21G>A ( $\beta^+$  IVS-I-110), HBB:c.315+1G>A ( $\beta^0$  IVS-II-1), HBB:c.92+1G>A ( $\beta^0$  IVS-I-1) i HBB:c.92+6T>C ( $\beta^+$  IVS-I-6). Ove četiri varijante čine 52% svih uzročnih varijanti. Naši rezultati sveukupnog genotipskog profila  $\beta$ -talasemija su vrlo slični rezultatima iz Bugarske, Crne Gore, Grčke, Italije, Mađarske, Makedonije, Rumunjske i Srbije (abecednim redom) [28,122,140,142–146]. Poznata distribucija pet najčešćih  $\beta$ -talasemijskih uzročnih varijanti za mediteranske i balkanske zemlje navedena je, slijedom učestalosti, u Tablici 25. Tablica uključuje i podatke za Hrvatsku na osnovu rezultata našeg istraživanja.



Tablica 25. Zastupljenost patogenih i vjerojatno patogenih varijanti *HBB* gena u mediteranskim i balkanskim zemljama [142,143,146–152]

Zemlja	Uzročne varijante $\beta$ -talasemije				
Bugarska	IVSI-110 24%	Codon 39 22%	IVSI-6 10%	IVSII-745 10%	Codon 8 5%
Cipar	IVSI-110 72%	IVSI-6 12%	IVSI-1 5%	IVSII-745 3%	Codon 39 2%
Grčka	IVSI-110 43%	Codon 39 17%	IVSI-1 13%	IVSI-6 7%	IVSII-745 7%
<b>Hrvatska*</b>	<b>IVSI-110 21%</b>	<b>IVSII-1 17%</b>	<b>IVSI-1 8%</b>	<b>IVSI-6 8%</b>	<b>Codon 39 4%</b>
Italija	Codon 39 44%	IVSI-110 22%	IVSI-1 10%	IVSII-6 8%	IVSII-745 5%
Mađarska	IVSI-1 29%	Codon 39 29%	IVSII-1 12%	IVSII-745 6%	IVSI-6 6%
Rumunjska	IVSI-110 40%	IVSII-745 17%	Codon 39 16%	IVSI-6 11%	IVSI-1 7%
Srbija i Crna Gora	Codon 39 33%	IVSI-110 24%	IVSII-745 18%	IVSI-6 4%	IVSI-1 4%
Sjeverna Makedonija	IVSI-110 45%	IVSI-6 29%	IVSI-1 10%	Poly A 4%	Codon 39 4%
Turska	IVSI-110 39%	IVSI-6 18%	IVSII-1 12%	Codon 8 7%	Codon 39 4%

\*Rezultati se odnose na područje Hrvatskog primorja i Istre

Zastupljenost Codon 39 varijante (*HBB*:c.118C>T) je relativno visoka u zemljama u hrvatskom okruženju (Italija 44%, Srbija i Crna Gora 33%, Mađarska 29%, Bugarska 22%, Grčka 17% i Rumunjska 16%) [28]. U ispitivanoj populaciji Hrvatskog primorja i Istre učestalost varijante Codon 39 je samo 4,3% i vjerojatno je rezultat genetskog otklona (engl. *drift*).

Nova varijanta u našem istraživanju nije otkrivena. Također nije dijagnosticiran  $\alpha$ -talasemijski sindrom u niti jednoj obitelji.

Zastupljenost češćih uzročnih varijanti  $\beta$ -talasemijskih sindroma u populaciji Hrvatskog primorja i Istre podudara se s varijantama opisanim u mediteranskim i balkanskim zemljama. Ova sličnost može se objasniti prvenstveno geografskom blizinom i tzv. protokom gena (engl. *gene flow*), ali i kolonizacijama i migracijama kroz povijest (primjerice grčka kolonizacija jadranskih otoka i istočne obale Jadrana, dolazak Slavena na Balkan kao dio seobe naroda) i ratova. Visoka učestalosti Hb Lepore-BW u Hrvatskoj i Srbiji može se objasniti protokom gena, zajedničkom poviješću i mogućim zajedničkim podrijetlom. Četiri od najčešćih pet otkrivenih varijanti u našoj populaciji (Hb Lepore, IVSII-1, IVSI-1 i Codon 39) ubrajaju se među šest čestih mediteranskih varijanti. Varijanta IVSI-110, prijavljena kao varijanta bliskoistočnog podrijetla, vjerojatno odražava povijesne migracije preko Balkanskog poluotoka.

Pet varijanti *HBB* gena čini preko 80% svih uzročnih varijanti  $\beta$ -talasemijskih sindroma u populaciji Hrvatskog primorja i Istre. Naši rezultati su u skladu s opažanjima da u svakoj populaciji postoji nekoliko čestih varijanti [69,153]. Saznanja da u populacijama i subpopulacijama postoji specifična zastupljenost pojedinih patogenih varijanti sekvence u  $\alpha$ - i  $\beta$ -globinskim genima koji su odgovorni za nastanak bolesti, omogućila su primjenu brzih i ciljanih metoda za dijagnozu talasemijskih sindroma u pojedinim populacijama (PCR, sekvenciranje po Sangeru). Osim testiranja, poznavanje uzročnih varijanti talasemije doprinijelo je razradi prikladnih programa probira pojedine populacije. Točna i pravovremena dijagnoza je od velike važnosti u težim oblicima talasemije, kako bi se što ranije započelo s liječenjem (talasemija major) i/ili promjenom životnog stila (talasemija intermedia), s ciljem sprječavanja progresije ili ublažavanja posljedica bolesti [154].

Svi naši ispitanici su bili heterozigoti za  $\beta^0$ - i  $\beta^+$ - talasemiju (nositelji) i svi su bili bez kliničkih simptoma i znakova bolesti. Molekularne osnove većine  $\beta$ -talasemija bile su u skladu s eksprimiranim fenotipom. U svih ispitanika je bila prisutna mikrocitoza i hipokromija. Uz niže eritocitne indekse, 18 (60%) ispitanika (7  $\beta^0$ , 8  $\beta^+$  i 3 Hb Lepore-BW varijante) je imalo anemiju. Blaga anemija je bila prisutna u svih nositelja  $\beta^0$  varijanti IVSII-1, IVSI-1 i Hb Monroe, te u svih nositelja  $\beta^+$  varijanti IVSI-6, IVSII-745 i Poly A. Najmanje učestale (33,3%) i najblaže hematološke abnormalnosti su bile prisutne su nositelja Hb Lepore-BW, koji su svi imali uredne vrijednosti HbA<sub>2</sub> i povišen HbF. Nositelji IVSI-110 varijante imali su varijabilan hematološki profil; njih 43% nije bilo anemično, dok je u 57% bila prisutna blaga anemija te

umjereno povišene vrijednosti HbA<sub>2</sub> i HbF. Svi nositelji β<sup>0</sup> IVSI-1 varijante imali su niže vrijednosti Hb te više vrijednosti HbA<sub>2</sub> i HbF u odnosu na druge varijante.

Poznato je da se heterogenost kliničkih manifestacija β-talasemijskih sindroma ne može uvijek objasniti različitim genotipovima i da u nekim slučajevima iste genske alteracije imaju različite kliničke slike. Za ovu fenotipsku varijabilnost odgovorni su geni modifikatori, koji djeluju na tri razine i koji su detaljno opisani u Uvodu (1.1.4.). U niti jednog nositelja β-talasemijskog sindroma nije otkrivena varijanta za α-talasemiju, kao potencijalnog sekundarnog modifikatora.

U našem istraživanju različite biokemijske abnormalnosti zamijećene su unutar skupina nositelja varijanti Hb Lepore-BW, IVSI-110, IVSII-1, IVSI-1, Codon 39 i Hb Monroe. U ovih ispitanika s povišenom razinom HbF > 5% dokazana je prisutnost -158 C>T polimorfizma u promotorskoj regiji HBG2 gena (XmnI polimorfizam), kao potencijalnog sekundarnog modifikatora koji može doprinijeti povišenoj razini HbF. Klinički značaj udruženosti heterozigotne β-talasemije i sekundarnih modifikatora u našoj skupini ispitanika nije mogao biti utvrđen, jer su kod heterozigotnih nositelja u dječjoj dobi kliničke manifestacije izrazito blage. Pažljivo praćenje nositelja može utvrditi da li povišena razina HbF utječe na simptome/znakove koji mogu biti prisutni kod odraslih heterozigotnih nositelja β-talasemijskih varijanti.

Talasemijski sindromi, kao globalni zdravstveni problem, zahtijevaju preventivne strategije. Sveobuhvatni preventivni programi uključuju javne edukativne kampanje s ciljem podizanja svijesti o talasemijama u općoj populaciji, probir u populaciji i genetičko savjetovanje.

Populacijski probir određuje rizik za talasemiju u specifičnoj populaciji asimptomatskih pojedinaca, a nakon pozitivnog nalaza treba se učiniti dijagnostičko genetičko testiranje. Probir se dijeli na reproduktivni (prije-koncepcijski i prenatalni) i nereproduktivni (novorođenački probir i probir nositelja u rizičnim populacijama tijekom života). Probir na talasemijske sindrome je složen, obzirom na velik broj i različitost genetskih promjena koje rezultiraju širokim spektrom hematoloških, biokemijskih i kliničkih manifestacija.

Primjeri dobro organiziranih programa probira na hemoglobinopatije u Europi su Italija, Grčka i Cipar (zemlje u kojima je β-talasemija povijesno endemska), te Francuska i Velika Britanija (zemlje s velikim brojem imigranata iz endemskih područja). U Italiji su dostupni besplatni dobrovoljni probiri statusa nositelja, te prenatalna i preimplantacijska dijagnostika rizičnih parova. Na Sardiniji je četrdesetgodišnji program probira postigao izvrsne rezultate, sa smanjenjem broja novorođenčadi s β-talasemijom od 110 (1975.) na 3 – 5 godišnje (2018.);

glavni razlozi su zadnjih godina bili lažno očinstvo i odbijanje prenatalnog probira/prekida trudnoće [154]. Na Siciliji je tridesetgodišnji preventivni program smanjio učestalost  $\beta$ -talasemije major i bolesti srpastih stanica za 85% (s 1 na 245 živorođenih na 1 na 2000) [156]. Grčki nacionalni preventivni program za talasemiju i druge hemoglobinopatije također je rezultirao značajnim smanjenjem broja bolesne novorođenčadi, s 150 – 200 na manje od 5 slučajeva godišnje do 2010. godine [157]. Programi probira se trebaju prilagoditi lokalnim potrebama, socioekonomskom statusu, te kulturološkim i vjerskim običajima. Postojeći programi često nisu strukturirani i sudjelovanje je dobrovoljno. Prijekoncepcijski (predbračni) probir je obavezan u Libanonu, Turskoj, Saudijskoj Arabiji, Ujedinjenim Arapskim Emiratima i Bahreinu [38,158]. Od uvođenja ovog probira u Saudijskoj Arabiji 2004. godine, prevalencija  $\beta$ -talasemije se smanjila s 32,9 /1000 na 9 /1000 pojedinaca u 2009. godini [159].

U Hrvatskoj ne postoji nacionalni preventivni program za hemoglobinopatije. Obzirom na nisku učestalost bolesti za sada nije potreban, ali zbog migracije iz azijskih zemalja kojoj zadnjih godina svjedočimo, ovu će potrebu trebati povremeno reevaluirati. Na osnovu rezultata našeg istraživanja, možemo preporučiti uvođenje edukativnih programa opće populacije i zdravstvenih djelatnika.

Genetičko savjetovanje je sastavni dio genetičkog testiranja.  $\beta$ -talasemije se nasljeđuju autosomno recesivno. Ako su oba roditelja heterozigoti za patogenu varijantu *HBB* gena, svako dijete u obitelji ima pri začeću 25% šanse da bude pogođeno bolešću ( $\beta$ -talasemija intermedia ili major), 50% šanse da bude nositelj i 25% šanse da bude potpuno zdravo. Ako je jedan roditelj heterozigot za patogenu varijantu *HBB* gena, a drugi roditelj je homozigot, svako dijete u obitelji ima 50% šanse da naslijedi dvije patogene varijante *HBB* gena ( $\beta$ -talasemija intermedia ili major) i 50% šanse da naslijedi jednu patogenu varijantu *HBB* gena i bude nositelj [58].

Heterogenost genotipova talasemijskih sindroma i nerijetka udruženost s drugim hemoglobinskim varijantama otežava utvrđivanje statusa nositelja (npr. udruženost s  $\alpha$ - i  $\delta$ -talasemijom i nekim blagim i „tihim“ varijantama *HBB* gena,  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemija, Corfù  $\delta\beta$ -talasemija, alteracije *KLF1* gena) i genetičku informaciju [49]. Optimalno vrijeme za procjenu genetičkog rizika je prije trudnoće. Prikladno je ponuditi genetičko testiranje (uključujući informacije o dostupnosti prenatalnog testiranja, potencijalnim rizicima za potomstvo i reproduktivnim mogućnostima) mladim odraslim osobama koje su nositelji. Prednost ima testiranje parova (ne pojedinaca), zbog veće kliničke koristi jer se rijetko nalazi ista genska alteracija u oba partnera. Nadalje, ovakav pristup olakšava parovima donošenje zajedničke reproduktivne odluke [160].

### 5.1. Algoritam za postavljanje dijagnoze $\beta$ -talasemije minor

Rezultati našeg istraživanja upućuju da na dijagnozu  $\beta$ -talasemijskog sindroma treba posumnjati u svakog djeteta starijeg od 12 mjeseci s mikrocitnom hipokromnom anemijom koje nema manjak željeza. Nalaz normalnog MCV-a u kombinaciji s normalnim MCH-om isključuje većinu talasemijskih sindroma (heterozigotni nositelji za HbS, HbC i HbD mogu imati normalan MCV i MCH) i u principu ne zahtjeva dodatnu obradu.

Detaljna obiteljska anamneza pomaže u postavljanju dijagnoze talasemije, ali negativna anamneza ne isključuje dijagnozu. Citološki razmaz periferne krvi može pobuditi sumnju na talasemiju (mikrocitoza, hipokromija, poikilocitoza) [161]. Potrebno je odrediti status željeza (razina feritina u serumu) ne samo radi isključenja dijagnoze anemije zbog manjka željeza, nego i radi procjene opterećenosti željezom kod težih oblika talasemije. Pravodobno postavljenom dijagnozom talasemije izbjegava se nepotrebna terapija peroralnim željezom. S druge strane, nositelji  $\beta$ -talasemije imaju vrlo blagu ili odsutnu anemiju. U nositelja s razvojem anemije potrebna je evaluacija zbog mogućih dodatnih uzroka (istovremeni manjak željeza, deficit glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze koji ima geografsku distribuciju sličnu talasemiji) [81].

Dijagnoza talasemijskog sindroma se postavlja elektroforezom Hb (kapilarna elektroforeza ili HPLC) u pojedinca starijeg od 12 mjeseci. U heterozigota za  $\beta$ -talasemiju su najčešće snižene vrijednosti HbA (>88%), povišene vrijednosti HbA<sub>2</sub> (>4%) i normalne ili blago povišene vrijednosti HbF (<5%). U odgovarajućem kliničkom (i etničkom) kontekstu, povišena razina HbA<sub>2</sub> smatra se dijagnostičkom za status nositelja  $\beta$ -talasemije. Osim kvantitativne analize Hb, elektroforezom se otkrivaju kombinacije  $\beta$ -talasemije s hemoglobinskim varijantama. Treba imati na umu da postoje zamke u hematološkoj i biokemijskoj identifikaciji  $\beta$ -talasemijskih nositelja, primjerice kod  $\alpha$ -talasemijskih nositelja,  $\beta^+$  tihih varijanti te udruženog nasljeđivanja  $\alpha$ - i  $\delta$ -talasemije) [58,61,162]. U ovim slučajevima preporuča se molekularno-genetičko testiranje.

Molekularno-genetičkim testiranjem postavlja se točna dijagnoza i precizno određuje genotip, uključujući blage i tihe  $\beta$ -talasemijske varijante. Osim toga, ovo testiranje omogućuje postavljanje dijagnoze i u djece mlađe od 12 mjeseci.

Genetičko testiranje na  $\beta$ -talasemijske sindrome je indicirano ako su oba partnera nositelji  $\beta$ -talasemije, ako je jedan partner nositelj  $\beta$ -talasemije i drugi nositelj hemoglobinske varijante, ako je jedan partner nositelj  $\beta$ -talasemije i drugi nositelj  $\alpha$ -talasemije, te ako oba partnera imaju niski MCV i MCH, s urednim statusom željeza i normalnim Hb [162].

Optimalno vrijeme za određivanje genetičkog rizika je prije trudnoće (prijekoncepcijsko i prenatalno testiranje). Prikladno je ponuditi genetičko testiranje mladim odraslim osobama koje su nositelji. Testiranje bi trebalo biti dostupno ne samo u slučajevima trudnoća visokog rizika, nego i u trudnoćama u kojih se rizik ne može odrediti (engl. *indeterminate-risk pregnancies*). Trudnoće s neodređenim rizikom su one u kojima je jedan roditelj heterozigot, a drugi ima hematološke nalaze slične  $\beta$ -talasemiji, ili u slučaju kada je majka heterozigot, a klinički/genetički status oca je nepoznat ili je otac nedostupan za testiranje, posebice ako pripada etničkoj populaciji s visokim rizikom za status nositelja [58].

Od izuzetne je važnosti detaljno informirati nositelje. Iako  $\beta$ -talasemija minor tipično ne zahtjeva liječenje ili intervenciju tijekom cijelog života, prema podacima Međunarodnog saveza za talasemiju (TIF, Thalassaemia International Federation), 8 od 10 nositelja  $\beta$ -talasemije nije svjesno dijagnoze niti će na nju posumnjati, osim ako ne naprave specifične hematološke pretrage [163].

Molekularno-genetičko testiranje poboljšava zdravstvenu skrb za odrasle nositelje  $\beta$ -talasemije. Osim reproduktivne koristi kao komponente rutinske skrbi za sve pojedince s bilo kojim oblikom  $\beta$ -talasemije, nositeljima se mogu ponuditi dodatna genetička testiranja (geni koji sudjeluju u metabolizmu željeza, bilirubina i kosti) i metode sekundarne prevencije.

Na kraju, ali ne manje važno, ispitivanje vrsti i frekvencije  $\beta$ -talasemijskih genotipova u hrvatskoj populaciji preduvjet je razvoja optimalnih metoda otkrivanja statusa nositelja i drugih preventivnih strategija, te izrade prijedloga i provedbe javnozdravstvenih programa.

## 6. ZAKLJUČAK

U populaciji Hrvatskog primorja i Istre prisutni su  $\beta$ -talasemijski sindromi u heterozigotnom obliku (nositelji, minor forma ili NTDT). Za otkrivanje većine heterozigotnih nositelja početna laboratorijska obrada uključuje kompletnu krvnu sliku iza koje slijedi elektroforeza Hb. Tipična hematološka obilježja  $\beta$ -talasemijskih sindroma su mikrocitoza i hipokromija te blaga anemija. Elektroforeza Hb najčešće otkriva povišene vrijednosti HbA<sub>2</sub> i normalne ili blago povišene vrijednosti HbF. Molekularno-genetičko testiranje ima sve veći značaj u postavljanju precizne dijagnoze, otkrivanju statusa nositelja, definiranju terapijskih ciljeva i prognozi bolesti.

U 30 ispitanika i njihovih 16 prvih srodnika iz 24 obitelji s područja Hrvatskog primorja i Istre koje nisu u međusobnom krvnom srodstvu postavljena je dijagnoza  $\beta$ -talasemijskog sindroma u heterozigotnom obliku. Otkriveno je devet patogenih i vjerojatno patogenih varijanti *HBB* gena. Nove varijante nisu otkrivene. Pet varijanti čini više od 80% svih uzročnih varijanti (slijedom učestalosti): Hb Lepore-BW, IVSI-110, IVSII-1, IVSI-1 i IVSI-6. Naši rezultati potvrđuju opažanja o postojanju specifičnog profila talasemijskog genotipa u pojedinim populacijama i regijama.

Uzročne varijante u populaciji Hrvatskog primorja i Istre pretežito su mediteranskog podrijetla i podudaraju se s varijantama opisanim u mediteranskim i balkanskim zemljama. Navedenu genotipsku sličnost tumačimo geografskom blizinom i zajedničkom poviješću ovih naroda. Sve otkrivene varijante su blage ili tihe i sve su bile udružene s blagim kliničkim fenotipom.

U ispitanika s povišenom razinom HbF >5% dokazana je prisutnost XmnI polimorfizma, kao potencijalnog sekundarnog modifikatora. Niti jedan ispitanik nije bio nositelj  $\alpha$ -talasemijske varijante.

Molekularno-genetičko testiranje omogućuje napredak u dijagnostici i terapijskom pristupu od najranije životne dobi, precizno određuje status nositelja, omogućuje razvoj preventivnih programa i javnozdravstvenih mjera, te pruža mogućnost genetičkog savjetovanja. Stoga je vrijedno nastaviti istraživanja na molekularnoj karakterizaciji uzročnih varijanti  $\beta$ -talasemijskih sindroma na području cijele Hrvatske.

## 7. LITERATURA

1. Faggiano S, Ronda L, Bruno S i sur. From hemoglobin allostery to hemoglobin-based oxygen carriers. *Mol Aspects Med* 2022;84:101050.
2. Sakai H, Kure T, Taguchi K, Azuma H. Research of storable and ready-to-use artificial red blood cells (hemoglobin vesicles) for emergency medicine and other clinical applications. *Front Med Technol* 2022;4:1048951.
3. Forget BG, Bunn HF. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(2):a011684.
4. Dahal P. Hemoglobin: Structure, Types, Functions, Diseases [Internet]. 2023 Aug [cited 2024 Jun 14]. Available from: <https://microbenotes.com/hemoglobin/>
5. Old J. Hemoglobinopathies and Thalassemias. U: Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B, ur. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 6th ed. San Diego: Academic Press; 2013.
6. Steinberg MH. Structure and function of normal hemoglobins - UpToDate [Internet]. 2024 Apr [cited 2024 Jun 14]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/structure-and-function-of-normal-hemoglobins>
7. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem* 2020;94:345–82.
8. Radmilovic M. Varijante u genima-modifikatorima  $\beta$ -talasemijskih sindroma kao regulatori genske ekspresije i populaciono-genetički markeri [doktorski rad]. [Beograd]: Univerzitet u Beogradu; 2011.
9. Marengo-Rowe AJ. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc Bayl Univ Med Cent* 2006;19(3):239–45.
10. Kennelly PJ, Rodwell VW. Proteins: Myoglobin & Hemoglobin. U: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil P, ur. Harper's Illustrated Biochemistry, 29th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2009, str. 131-152.
11. Shibayama N. Allosteric transitions in hemoglobin revisited. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2020;1864(2):129335.



12. Benner A, Patel AK, Singh K, Dua A. Physiology, Bohr Effect. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Internet]. 2023 Aug [cited 2024 Jun 16]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526028/>
13. Doyle J, Cooper JS. Physiology, Carbon Dioxide Transport. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Internet]. 2023 Jul [cited 2024 Jun 16]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532988/>
14. Hardison RC. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a011627.
15. Jaing TH, Chang TY, Chen SH, Lin CW, Wen YC, Chiu CC. Molecular genetics of  $\beta$ -thalassemia: A narrative review. *Medicine (Baltimore)* 2021;100(45):e27522.
16. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T, Gafarova S, Abdulalimov E. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. *Clin Chem Lab Med* 2018;57(2):165–74.
17. Harteveld CL, Achour A, Arkesteijn SJG i sur. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *Int J Lab Hematol* 2022;44(S1):28–36
18. Eyth E, Naik R. Hemoglobin A1C. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Internet]. 2023 Mar [cited 2024 Jun 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549816/>
19. Wong P, Weerakul J, Sritippayawan S. Hemoglobin Analysis in the First Year of Life. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016;8(1):e2016012.
20. Makkawi M, Alasmari S, Hawan AA, Shahrani MMA, Dera AA. Hemoglobinopathies: An update on the prevalence trends in Southern Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2021;42(7):784–9.
21. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(3):a011858.
22. HbVar [Internet]. [cited 2024 Jun 24]. Available from: <https://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>
23. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151(9):839–45.

24. Maakaron JE. Sick Cell Disease (SCD): Practice Essentials, Background, Genetics [Internet]. 2023 Dec [cited 2024 Jun 24]; Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/205926-overview?form=fpf>
25. Steinberg MH. Unstable hemoglobin variants - UpToDate [Internet]. 2023 Oct [cited 2024 Jun 25]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/unstable-hemoglobin-variants>
26. Yudin J, Verhovsek M. How we diagnose and manage altered oxygen affinity hemoglobin variants. *Am J Hematol* 2019;94(5):597–603.
27. Josef T Prchal JT. Methemoglobinemia - UpToDate [Internet]. 2024 Jan [cited 2024 Jun 25]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/methemoglobinemia>
28. Pavlović S. Talasemijski sindromi - molekularna genetika u savremenoj dijagnostici (Molecular Genetics and Modern Diagnostics of Thalassemia Syndromes). Beograd: Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo; 2006.
29. Lu D, Xu Z, Peng Z i sur. Induction of Fetal Hemoglobin by Introducing Natural Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Mutations in the  $\gamma$ -Globin Gene Promoters for Genome Editing Therapies for  $\beta$ -Thalassemia. *Front Genet* 2022;13:881937.
30. Chen D, Zuo Y, Zhang X i sur. A Genetic Variant Ameliorates  $\beta$ -Thalassemia Severity by Epigenetic-Mediated Elevation of Human Fetal Hemoglobin Expression. *Am J Hum Genet* 2017;101(1):130–8.
31. Nuinon M. Interaction of Thalassemia and Hb Variants in Southeast Asia: Genotype-Phenotype Relationship. U: Zakaria M, Hassan T, Sherief L, Erhabor O, ur. *Thalassemia Syndromes - New Insights and Transfusion Modalities*. IntechOpen [Internet]. 2023 Feb [cited 2024 Jun 26]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/85956>
32. Soteriades S, Angastiniotis M, Farmakis D, Eleftheriou A, Maggio A. The Need for Translational Epidemiology in Beta Thalassemia Syndromes: A Thalassemia International Federation Perspective. *Hematol Oncol Clin North Am* 2023;37(2):261–72.
33. Tuo Y, Li Y, Li Y i sur. Global, regional, and national burden of thalassemia, 1990–2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *eClinicalMedicine* 2024;72:102619.
34. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood* 2010;115(22):4331–6.

35. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008;86(6):480–7.
36. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *The Lancet* 2018;391(10116):155–67.
37. Lamptey H, Seidu Z, Lopez-Perez M i sur. Impact of haemoglobinopathies on asymptomatic Plasmodium falciparum infection and naturally acquired immunity among children in Northern Ghana. *Front Hematol* 2023;2:1150134.
38. Kattamis A, Forni GL, Aydinok Y, Viprakasit V. Changing patterns in the epidemiology of  $\beta$ -thalassemia. *Eur J Haematol* 2020;105(6):692–703.
39. Taher AT, Saliba AN. Iron overload in thalassemia: different organs at different rates. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2017;2017(1):265–71.
40. Benz EJ. Pathophysiology of thalassemia - UpToDate [Internet]. 2024 Jun [cited 2024 Jul 1]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-of-thalassemia>
41. Farashi S, Najmabadi H. Diagnostic pitfalls of less well recognized HbH disease. *Blood Cells Mol Dis* 2015;55(4):387–95.
42. Chui DHK. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054:25–32.
43. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2010;12(2):61–76.
44. Needs T, Gonzalez-Mosquera LF, Lynch DT. Beta Thalassemia. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Internet]. 2023 May [cited 2024 Jul 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531481/>
45. AMBOSS GmbH. Thalassemia [Internet]. 2024 Feb [cited 2024 Jul 3]. Available from: <https://next.amboss.com/us/article/tT0Xs2>
46. Gardenghi S, Rivella S. New insight on the management of ineffective erythropoiesis and iron overload in  $\beta$ -thalassemia and related hemoglobinopathies. U: Hematology Education: the education programme for the annual congress of the European Hematology Association 2012; 6(1):331-8.
47. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5(1):11.

48. Sanchez-Villalobos M, Blanquer M, Moraleda JM, Salido EJ, Perez-Oliva AB. New Insights Into Pathophysiology of  $\beta$ -Thalassemia. *Front Med* 2022;9:880752.
49. Origa R.  $\beta$ -Thalassemia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2017;19(6):609–19.
50. Cappellini MD, Porter JB, Viprakasit V, Taher AT. A paradigm shift on beta-thalassaemia treatment: How will we manage this old disease with new therapies? *Blood Rev* 2018;32(4):300–11.
51. Nienhuis AW, Nathan DG. Pathophysiology and Clinical Manifestations of the  $\beta$ -Thalassemi-  
as. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(12):a011726–a011726.
52. Gupta R, Musallam KM, Taher AT, Rivella S. Ineffective Erythropoiesis: Anemia and Iron Overload. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32(2):213–21
53. Frazer DM, Wilkins SJ, Darshan D, Badrick AC, McLaren GD, Anderson GJ. Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. *Br J Haematol* 2012;157(5):615–26.
54. Bou-Fakhredin R, Rivella S, Cappellini MD, Taher AT. Pathogenic Mechanisms in Thalassemia I: Ineffective Erythropoiesis and Hypercoagulability. *Hematol Oncol Clin North Am* 2023;37(2):341–51.
55. Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. *Blood* 2011;118(13):3479–88
56. Cappellini MD. The Thalassemias. U: Goldman L, Schafer AI, ur. *Goldman’s Cecil Medicine*, 24th ed. Philadelphia: Elsevier, 2012; str. 1060–6.
57. Benz EJ, Angelucci E. Diagnosis of thalassemia (adults and children) - UpToDate [Internet]. 2024 Apr [cited 2024 Jul 6]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-thalassemia-adults-and-children>
58. Langer AL. Beta-Thalassemia. U: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM i sur, ur. *GeneReviews*®. Seattle: University of Washington; 1993 [Internet]. 2024 Feb [cited 2024 Jul 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>
59. Adly AA, Ismail EA. Management of Children With  $\beta$ -Thalassemia Intermedia: Overview, Recent Advances, and Treatment Challenges. *J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40(4):253–68.

60. Dordevic A, Ugrin M, Sutic IM, Roganovic J, Pavlovic S. The Relevance of  $\beta$ -Thalassemia Heterozygosity in Pediatric Clinical Practice: Croatian Experience. *Child Basel Switz* 2024;11(7):785.
61. Barrett AN, Saminathan R, Choolani M. Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;39:27–40
62. Cao A, Moi P. Regulation of the globin genes. *Pediatr Res* 2002;51(4):415–21.
63. Benz EJ. Molecular genetics of the thalassemia syndromes - UpToDate [Internet]. 2024 Aug [cited 2024 Aug 30]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/molecular-genetics-of-the-thalassemia-syndromes>
64. Thein SL. Molecular basis of  $\beta$  thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 2018;70:54–65.
65. Tesio N, Bauer DE. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2023;37(2):273–99.
66. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32(2):177–91.
67. Bank A. Understanding globin regulation in beta-thalassemia: it's as simple as alpha, beta, gamma, delta. *J Clin Invest* 2005;115(6):1470–3.
68. Lee JS, Cho SI, Park SS, Seong MW. Molecular basis and diagnosis of thalassemia. *Blood Res* 2021;56(S1):S39–43.
69. Rao E, Kumar Chandraker S, Misha Singh M, Kumar R. Global distribution of  $\beta$ -thalassemia mutations: An update. *Gene* 2024 Feb;896:148022.
70. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol* 2004;124(3):264–74.
71. Nasreen F, Khalid A, Zafar L, Ahmad S, Shaikh A. Frequency of secondary modifiers in Beta Thalassemia intermedia in patients from Northern Punjab. *Pak J Med Sci* 2023;39(5):1517–20.
72. Galanello R. Genetic modifiers of  $\beta$ -thalassemia. U: Hematology Education: the education programme for the annual congress of the European Hematology Association 2012;6:339-44.

73. AlFadhli S, Al-Jafer H, Hadi M, Al-Mutairi M, Nizam R. The Effect of UGT1A1 Promoter Polymorphism in the Development of Hyperbilirubinemia and Cholelithiasis in Hemoglobinopathy Patients. Wikman H, editor. PLoS ONE 2013;8(10):e77681.
74. Singh K, Agarwal S, Gupta S. An SP1-binding site polymorphism in the COL1A1 gene: May be a strong predictor for low bone density in thalassemia major. Gene Ther Mol Biol 2013;15:112–9.
75. Martins R, Picanço I, Fonseca A i sur. The role of HFE mutations on iron metabolism in beta-thalassemia carriers. J Hum Genet 2004;49(12):651–5.
76. Dimou NL, Pantavou KG, Bagos PG. Apolipoprotein E Polymorphism and Left Ventricular Failure in Beta-Thalassemia: A Multivariate Meta-Analysis. Ann Hum Genet 2017;81(5):213–23.
77. Wu KH, Chang JG, Ho YJ, Wu SF, Peng CT. Glutathione S-Transferase M1 Gene Polymorphisms are Associated with Cardiac Iron Deposition in Patients with  $\beta$ -Thalassemia Major. Hemoglobin 2006;30(2):251–6.
78. Triantafyllou AI, Vyssoulis GP, Karpanou EA i sur. Impact of  $\beta$ -thalassemia trait carrier state on cardiovascular risk factors and metabolic profile in patients with newly diagnosed hypertension. J Hum Hypertens 2014;28(5):328–32.
79. Saliba AN, Musallam KM, Taher AT. How I treat non-transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. Blood 2023;142(11):949–60.
80. Motta I, Bou-Fakhredin R, Taher AT, Cappellini MD. Beta Thalassemia: New Therapeutic Options Beyond Transfusion and Iron Chelation. Drugs 2020;80(11):1053–63.
81. Benz EJ, Angelucci E. Management of thalassemia - UpToDate [Internet]. 2024 Aug [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/management-of-thalassemia>
82. Adramerina A, Economou M. Challenges of Iron Chelation in Thalassemic Children. Thalass Rep 2024 Feb;14(1):1–9.
83. Galanello R, Agus A, Campus S, Danjou F, Giardina PJ, Grady RW. Combined iron chelation therapy. Ann N Y Acad Sci 2010;1202(1):79–86.
84. Piga A, Serra M, Longo F i sur. Changing patterns of splenectomy in transfusion-dependent thalassemia patients. Am J Hematol 2011;86(9):808–10.

85. Baronciani D, Angelucci E, Potschger U i sur. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000-2010. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(4):536–41.
86. Ferraresi M, Panzieri DL, Leoni S, Cappellini MD, Kattamis A, Motta I. Therapeutic perspective for children and young adults living with thalassemia and sickle cell disease. *Eur J Pediatr* 2023;182(6):2509–19.
87. Longo F, Piolatto A, Ferrero GB, Piga A. Ineffective Erythropoiesis in  $\beta$ -Thalassaemia: Key Steps and Therapeutic Options by Drugs. *Int J Mol Sci* 2021;22(13):7229.
88. Biswas S, Smrity SZ, Bhuia MdS i sur. Beta-Thalassemia: A Pharmacological Drug-Based Treatment. *Drugs Drug Candidates* 2024;3(1):126–47.
89. Glavan T. Genska terapija - temeljni principi, klinička primjena i budućnost [diplomski rad]. [Rijeka]: Sveučilište u Rijeci; 2023.
90. Hu J, Zhong Y, Xu P i sur.  $\beta$ -Thalassemia gene editing therapy: Advancements and difficulties. *Medicine (Baltimore)* 2024;103(18):e38036.
91. Human beta globin region on chromosome 11 [Internet]. 2008 [cited 2024 Jul 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U01317.1>
92. Powers JM, Sandoval C. Approach to the child with anemia - UpToDate [Internet]. 2023 Jan [cited 2024 Jul 17]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/approach-to-the-child-with-anemia>
93. American College of Clinical Pharmacy. Pediatric Self-Assessment Program: Reference values for common laboratory tests [Internet]. 2020 May [cited 2024 Jul 18]. Available from: [https://www.accp.com/docs/sap/Lab\\_Values\\_Table\\_PedSAP.pdf](https://www.accp.com/docs/sap/Lab_Values_Table_PedSAP.pdf)
94. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2008;130(5):824–31.
95. Little RR, Rohlfing CL, Hanson SE i sur. The effect of increased fetal hemoglobin on 7 common Hb A1c assay methods. *Clin Chem* 2012;58(5):945–7.
96. Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka. QIAamp DNA Mini Blood Mini Handbook; 2024.

97. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države. Qubit™ dsDNA HS Assay Kit; 2022.
98. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE i sur. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17(7):2503–16.
99. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 1994;83(6):1673–82.
100. Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka. QIAquick® PCR Purification Kit; 2018.
101. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države. GeneJET PCR Purification Kit; 2015.
102. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; 2010.
103. MRC Holland B.V., Amsterdam, Nizozemska. MLPA® General Protocol. 2022.
104. Sripichai O, Makarasara W, Munkongdee T i sur. A scoring system for the classification of  $\beta$ -thalassemia/Hb E disease severity. *Am J Hematol* 2008;83(6):482–4.
105. HGVS Nomenclature [Internet]. 2024 Aug [cited 2024 Aug 30]. Available from: <https://hgvs-nomenclature.org/stable/>
106. Weatherall DJ. The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32(2):165–75.
107. Bellis G, Parant A. Beta-thalassemia in Mediterranean countries. Findings and outlook. *Investig Geográficas* 2022;(77):129.
108. Ashiotis T, Zachariadis Z, Sofroniadou K, Loukopoulos D, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia in Cyprus. *Br Med J* 1973;2(5857):38-42.
109. Weatherall DJ. Common genetic disorders of the red cell and the ‘malaria hypothesis.’ *Ann Trop Med Parasitol* 1987;81(5):539–48.
110. Leffler EM, Band G, Busby GBJ i sur. Resistance to malaria through structural variation of red blood cell invasion receptors. *Science* 2017;356(6343):eaam6393.



111. Goheen MM, Campino S, Cerami C. The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. *Br J Haematol* 2017;179(4):543–56.
112. Radošević M. Malarija u Istarskoj provinciji 1918.-1943: konačni poraz višestoljetne pošasti. U: *Zbornik javnih predavanja 4*. Pazin: Državni arhiv u Pazinu; 2017, str. 31–8.
113. Bakašun V. Suzbijanje malarije na otocima Hrvatskog primorja. *Jubilarni zbornik, Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije Rijeka 1900-2000*; 2000, str. 141–50.
114. Mulić R, Aljinović L, Gizdić Ž, Nadan MP. Malarija u Hrvatskoj: nekad, danas i sutra. *Liječnički vjesnik: glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora* 2000;122(3-4):51–5.
115. Wang M, Zhang X, Zhang Y, Xiao M. Prevalence and Genetic Analysis of Thalassemia and Hemoglobinopathy in Different Ethnic Groups and Regions in Hainan Island, Southeast China. *Front Genet* 2022;13:874624.
116. Tan JAMA, Lee PC, Wee YC i sur. High Prevalence of Alpha- and Beta-Thalassemia in the Kadazandusuns in East Malaysia: Challenges in Providing Effective Health Care for an Indigenous Group. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:1–5.
117. Yu Y, Lu C, Gao Y i sur. Molecular Spectrum, Ethnic and Geographical Distribution of Thalassemia in the Southern Area of Hainan, China. *Front Pediatr* 2022;10:894444.
118. Vichinsky EP, MacKlin EA, Waye JS, Lorey F, Olivieri NF. Changes in the epidemiology of thalassemia in North America: a new minority disease. *Pediatrics* 2005;116(6):e818-825.
119. Cooley's Anemia Foundation. Resources on Adoption of Children with Thalassemia [Internet]. 2024 Jul [cited 2024 Aug 19]. Available from: <https://www.thalassemia.org/adoption/>
120. Geography of Croatia - Wikipedia [Internet]. 2024 Aug [cited 2024 Aug 20]. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Geography\\_of\\_Croatia](https://en.wikipedia.org/wiki/Geography_of_Croatia)
121. Vučak J. Učestalost beta talasemije minor i mutacije beta globinskog gena u srednjoj Dalmaciji [doktorski rad]. [Zagreb]: Sveučilište u Zagrebu; 2024.
122. Efremov GD. Hemoglobinopathies in Yugoslavia: an update. *Hemoglobin* 1992;16(6):531–44.

123. Kountouris P, Lederer CW, Fanis P, Feleki X, Old J, Kleantous M. IthaGenes: An Interactive Database for Haemoglobin Variations and Epidemiology. De Brevern AG, editor. PLoS ONE 2014;9(7):e103020.
124. Tadmouri GO. CTGA: the database for genetic disorders in Arab populations. Nucleic Acids Res 2006;34(90001):D602–6.
125. Khan A, Rehman A. Laboratory Evaluation of Beta Thalassemia. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Internet]. 2023 Aug [cited 2024 Sep 6]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585044/>
126. Paglietti ME, Satta S, Sollaino MC i sur. The Problem of Borderline Hemoglobin A2 Levels in the Screening for  $\beta$ -Thalassemia Carriers in Sardinia. Acta Haematol 2016;135(4):193–9.
127. Brancaloni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. Int J Lab Hematol 2016;38 Suppl 1:32–40.
128. Turudic D, Vucak J, Kocheva S, Milosevic D, Bilic E. Differentiating between non-transfusion dependant  $\beta$ -thalassemia and iron deficiency anemia in children using ROC and logistic regression analysis: two novel discrimination indices designed for pediatric patients. Front Pediatr 2024;11:1258054.
129. Institute of Medicine (US) Committee on the Prevention, Detection, and Management of Iron Deficiency Anemia Among U.S. Children and Women of Childbearing Age. U: Earl R, Woteki CE, ur. Iron Deficiency Anemia: Recommended Guidelines for the Prevention, Detection, and Management Among U.S. Children and Women of Childbearing Age. Washington (DC): National Academies Press [Internet] 1993 [cited 2024 Aug 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236488/>
130. Pasangna J, George E, Nagaratnam M. Haemoglobin Lepore in a Malay family: a case report. Malays J Pathol 2005;27(1):33–7.
131. Zhuang J, Zhang N, Zheng Y i sur. Molecular characterization of similar Hb Lepore Boston-Washington in four Chinese families using third generation sequencing. Sci Rep 2024;14(1):9966.
132. Ricchi P, Ammirabile M, Spasiano A i sur. Molecular and clinical analysis of haemoglobin Lepore in Campania, a region of Southern Italy. Hematology 2017;22(7):437–43.

133. Gonçalves I, Henriques A, Raimundo A i sur. Fetal hemoglobin elevation in Hb Lepore heterozygotes and its correlation with beta globin cluster linked determinants. *Am J Hematol* 2002;69(2):95–102.
134. Thilakarathne S, Jayaweera UP, Premawardhena A. Unresolved laboratory issues of the heterozygous state of  $\beta$ -thalassemia: a literature review. *Haematologica* 2024;109(1):23–32.
135. Colaco S, Colah R, Nadkarni A. Significance of borderline HbA2 levels in  $\beta$  thalassemia carrier screening. *Sci Rep* 2022;12(1):5414.
136. Kattamis C. The Normal HbA2 Hematological Phenotype of  $\beta$ -Thalassemia Trait. Problems in Detection and Measures to Improve Sensitivity of Screening Tests. *J Hematol Transfus* 2017;5(3):1068.
137. Mannan J, Naveed M, Ahdi SG. Mahidol Scoring for Assessing Various Grades of  $\beta$  Thalassemia Intermedia. *J Coll Physicians Surg Pak* 2019;29(7):635–8.
138. Weatherall D. 2003 William Allan Award address. The Thalassemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Am J Hum Genet* 2004;74(3):385–92.
139. Vucak J, Turudic D, Milosevic D i sur. Genotype-phenotype Correlation of  $\beta$ -Thalassemia in Croatian Patients: A Specific HBB Gene Mutations. *J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40(2):e77–82.
140. Radmilovic M, Zukic B, Stankovic B i sur. Thalassemia syndromes in Serbia: an update. *Hemoglobin* 2010;34(5):477–85.
141. Beksedić D, Cuharska T, Stojimirović E, Dinić B. Rasprostranjenost hemoglobinopatija u SR Srbiji. U: *Hemoglobin i hemoglobinopatije*. Beograd: Zavod za transfuziju krvi SR Srbije; 1980, str. 119–35.
142. Cherry L, Calo C, Talmaci R, Perrin P, Gavrilă L.  $\beta$ -Thalassemia Haplotypes in Romania in the Context of Genetic Mixing in the Mediterranean Area. *Hemoglobin* 2016;40(2):85–96.
143. Petkov GH, Efremov GD. Molecular basis of beta-thalassemia and other hemoglobinopathies in Bulgaria: an update. *Hemoglobin* 2007;31(2):225–32.

144. Papachatzopoulou A, Kourakli A, Stavrou EF i sur. Region-specific genetic heterogeneity of HBB mutation distribution in South-Western Greece. *Hemoglobin* 2010;34(4):333–42.
145. Gorello P, Arcioni F, Palmieri A i sur. The Molecular Spectrum of  $\beta$ - and  $\alpha$ -Thalassemia Mutations in Non-Endemic Umbria, Central Italy. *Hemoglobin* 2016;40(6):371–6.
146. Ringelhann B, Szelenyi JG, Horanyi M i sur. Molecular characterization of beta-thalassemia in Hungary. *Hum Genet* 1993;92(4):385–7.
147. Kountouris P, Kousiappa I, Papasavva T i sur. The molecular spectrum and distribution of haemoglobinopathies in Cyprus: a 20-year retrospective study. *Sci Rep* 2016;6:26371.
148. Kattamis C, Hu H, Cheng G i sur. Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br J Haematol* 1990;74(3):342–6.
149. Pirastu M, Saglio G, Camaschella C i sur. Delineation of specific beta-thalassemia mutations in high-risk areas of Italy: a prerequisite for prenatal diagnosis. *Blood* 1988;71(4):983–8.
150. Pavlovic S, Urosevic J, Poznanic J i sur. Molecular basis of thalassemia syndromes in Serbia and Montenegro. *Acta Haematol* 2005;113(3):175–80.
151. Dimovski A, Efremov DG, Jankovic L i sur. Beta-thalassemia in Yugoslavia. *Hemoglobin* 1990;14(1):15–24.
152. Oner R, Altay C, Gurgey A i sur. Beta-thalassemia in Turkey. *Hemoglobin* 1990;14(1):1–13.
153. Zahed L. The Spectrum of beta-Thalassemia Mutations in the Arab Populations. *J Biomed Biotechnol* 2001;1(3):129–32.
154. Dejhalla E, Pereza N, Ostojić S, Peterlin B, Dević Pavlić S. Genetičko testiranje recesivnih monogenih bolesti: od dijagnostičkog testiranja do suvremenog proširenog genomskog probira nositelja. *Med Flum* 2021;57(1):25–34.
155. Monni G, Peddes C, Iuculano A, Ibba RM. From Prenatal to Preimplantation Genetic Diagnosis of  $\beta$ -Thalassemia. Prevention Model in 8748 Cases: 40 Years of Single Center Experience. *J Clin Med* 2018;7(2):35.
156. Giambona A, Damiani G, Vinciguerra M i sur. Incidence of haemoglobinopathies in Sicily: the impact of screening and prenatal diagnosis. *Int J Clin Pract* 2015;69(10):1129–38.

157. Ladis V, Karagiorga-Lagana M, Tsatra I, Chouliaras G. Thirty-year experience in preventing haemoglobinopathies in Greece: achievements and potentials for optimisation. *Eur J Haematol* 2013;90(4):313–22.
158. World Health Organization. Management of Haemoglobin Disorders [Internet]. 2008 [cited 2024 Aug 30]. Available from: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43969/9789241597128\\_eng.pdf;jsessionid=80ADF163330C3855E197DFDFFC2C1101?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43969/9789241597128_eng.pdf;jsessionid=80ADF163330C3855E197DFDFFC2C1101?sequence=1)
159. Samavat A, Modell B. Iranian national thalassaemia screening programme. *BMJ* 2004;329(7475):1134–7.
160. Petrou M. Genetic counselling. U: Old J, ur. Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders. Nicosia: Thalassaemia International Federation; 2013.
161. Bain BJ. *Blood Cells: A Practical Guide*, 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2015.
162. Langlois S, Ford JC, Chitayat D, Prenatal Diagnosis Committee of the Canadian College of Medical Geneticists (CCMG), Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC). Carrier screening for thalassaemia and hemoglobinopathies in Canada. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30(10):950–9.
163. Thalassaemia International Federation. Know your status [Internet]. 2022 Apr [cited 2024 Aug 30]. Available from: [https://thalassaemia.org.cy/wp-content/uploads/itd2022/brochures/KnowYourStatus/KnowYourStatus\\_EN.pdf](https://thalassaemia.org.cy/wp-content/uploads/itd2022/brochures/KnowYourStatus/KnowYourStatus_EN.pdf)

## ILUSTRACIJE

### Popis slika

Slika 1. Struktura adultnog hemoglobina.....	1
Slika 2. Redoslijed sinteze humanih hemoglobina u embrionalnom, fetalnom i adultnom stadiju.....	5
Slika 3. Ciljne lokacije sonde u SALSA® MLPA® Probemixu P140-C1 HBA i veličine amplifikacije (broj nukleotida) za pojedine sonde.....	36
Slika 4. Elektroforeza hemoglobina na 2% agaroznom gelu.....	43
Slika 5. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante IVSI-110 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i adenina (A).....	44
Slika 6. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante IVSII-1 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i adenina (A).....	44
Slika 7. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante IVSI-1 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i adenina (A).....	45
Slika 8. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante IVSI-6 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida timina (T) i citozina (C).....	46
Slika 9. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante IVSII-745 u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i citozina (C).....	46
Slika 10. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante Codon 39 u heterozigotnom obliku na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida timina (T) i citozina (C).....	47
Slika 11. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante Hb Monroe u heterozigotnom obliku na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida guanina (G) i citozina (C).....	47
Slika 12. Dio sekvence <i>HBB</i> gena kod varijante Poly A (A>G) u heterozigotnom obliku, na kojoj je vidljivo istovremeno prisustvo nukleotida adenina (A) i guanina (G).....	48

## Popis tablica

Tablica 1. Ljudski hemoglobini.....	2
Tablica 2. Vrste i zastupljenost abnormalnih hemoglobina.....	7
Tablica 3. Klasifikacija talasemijskih sindroma.....	13
Tablica 4. Uzročne varijante $\beta$ -globinskog gena.....	18
Tablica 5. Kontrolne i zajedničke početnice korištene za detekciju najčešćih varijanti u kodirajućoj regiji $\beta$ -globinskog gena.....	25
Tablica 6. Početnice korištene za detekciju najčešćih $\beta$ -talasemijskih varijanti u mediteranskoj populaciji.....	26
Tablica 7. Početnice korištene za detekciju hemoglobinske varijante Hb Lepore-BW.....	26
Tablica 8. Početnice korištene za umnažanje cjelokupnog <i>HBB</i> gena.....	27
Tablica 9. Početnice korištene za umnažanje promotorske regije <i>HBG2</i> gena.....	27
Tablica 10. Normalne vrijednosti hematoloških parametara u djece i adolescenata.....	28
Tablica 11. Koncentracije početnica za detekciju najčešćih uzročnih varijanti $\beta$ -talasemijskih sindroma.....	31
Tablica 12. Mahidol sustav bodovanja.....	38
Tablica 13. Spolna i dobna distribucija ispitanika.....	40
Tablica 14. Spolna i dobna distribucija ispitanika s $\beta$ -talasemijskim sindromom.....	41
Tablica 15. Spolna i dobna distribucija djece s $\beta$ -talasemijskim sindromom.....	41
Tablica 16. Učestalost patogenih varijanti <i>HBB</i> gena.....	41
Tablica 17. Vrste i učestalost uzročnih varijanti $\beta$ -talasemijskih sindroma.....	42
Tablica 18. Prisutnost XmnI varijante u ispitanika s $\beta$ -talasemijskim sindromom s povišenom razinom hemoglobina F (HbF > 5%).....	49

Tablica 19. Zastupljenost sniženih hematoloških parametara prema pojedinim uzročnim varijantama $\beta$ -talasemije.....	50
Tablica 20. Hematološki parametri u djece s $\beta$ -talasemijskim sindromom po dobnim skupinama.....	51
Tablica 21. Učestalost povišenih biokemijskih parametara prema pojedinim uzročnim varijantama $\beta$ -talasemijskih sindrom.....	52
Tablica 22. Biokemijski parametri u djece s $\beta$ -talasemijskim sindromom.....	52
Tablica 23. Biokemijski parametri u djece s $\beta$ -talasemijskim sindromom prema varijantama <i>HBB</i> gena .....	53
Tablica 24. Hematološki parametri u djece s Hb Lepore-BW i ostalim varijantama <i>HBB</i> gena.....	54
Tablica 25. Zastupljenost patogenih i vjerojatno patogenih varijanti <i>HBB</i> gena u mediteranskim i balkanskim zemljama.....	62



## POPIS POKRATA

A – adenin

AHSP – stabilizirajući protein alfa-hemoglobina (engl. *alpha-hemoglobin stabilizing protein*)

APOE – apolipoprotein E

ARMS – Sustav za umnažanje mutiranog alela (engl. *amplification refractory mutation system*)

ATP – adenzin-trifosfat

BMP – koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenetic protein*)

bp – parovi baza (engl. *base pairs*)

2,3-BPG – 2,3-bisfosfoglicerat

C – citozin

CNV – varijacije broja kopija (engl. *copy number variations*)

CRISPR/Cas9 – niz međusobno razdvojenih kratkih klasteriranih palindromskih ponavljanja povezanih s proteinom 9 (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated system 9*)

del – delecija

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksiribonukleozid-trifosfat

ddNTP – dideoksiribonukleozid-trifosfat

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

Fe<sup>2+</sup> – atom dvovalentnog željeza (fero oblik željeza)

Fe<sup>3+</sup> – atom trovalentnog željeza (feri oblik željeza)

G – guanin

GSTM1 – glutation S-transferaza M1

Hb – hemoglobin

HbA – hemoglobin A (adultni hemoglobin)

HbA<sub>1c</sub> – glikozilirani hemoglobin A

*HBA1* – alfa-globinski gen 1

HbA<sub>2</sub> – hemoglobin A<sub>2</sub> (adultni hemoglobin)

*HBA2* – alfa-globinski gen 2

*HBB* – beta-globinski gen

HbC – hemoglobin C

HbD – hemoglobin D

*HBD* – delta-globinski gen

HbE – hemoglobin E

*HBE* – epsilon-globinski gen

HbF – hemoglobin F (fetalni hemoglobin)

*HBG1* – gama-globinski gen 1

*HBG2* – gama-globinski gen 2

HbH – hemoglobin H

HbM – methemoglobin

HbS – hemoglobin S

*HBZ* – zeta-globinski gen

Hb Lepore-BW – hemoglobin Lepore-Boston-Washington

HGVS – nomenklatura genskih varijanti (engl. *Human Genome Variation Society*)

HIF-2 $\alpha$  – aktivirani hipoksijom inducirani faktor 2 alfa (engl. *hypoxia-inducible factor-2 alpha*)

HPFH – hereditarno perzistiranje fetalnog hemoglobina (engl. *hereditary persistence of fetal hemoglobin*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HRI – hem-regulirana kinaza faktora 2 eukariotske translacijske inicijacije (engl. *heme-regulated eukaryotic translational initiation factor 2 kinase*)

HSCT – transplantacija krvotvornih matičnih stanica (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*)

IBIS – Integrirani bolnički informacijski sustav

IMGGI – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd, Srbija.

IVS – intron (engl. *intervening sequence*)

JAK2 – Janus kinaza-2

KKS – kompletna krva slika

LCR – regija kontrole lokusa (engl. *locus control region*)

MCH – srednja količina hemoglobina u eritrocitima (engl. *mean corpuscular hemoglobin*)

MCV – volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*)

MLPA – metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MI – Mentzer-ov indeks

mRNK – glasnička ribonukleinska kiselina

NTDT – talasemije neovisne o transfuzijama (engl. *non-transfusion-dependent thalassemia*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

R stanje – relaksirano stanje hemoglobina (engl. *relaxed*)

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

T – timin

T stanje – napeto stanje hemoglobina (engl. *tense*)

TALEN – efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije (engl. *transcription activator-like effector nuclease*)

TDT – talasemije ovisne o transfuzijama (engl. *transfusion-dependent thalassemia*)

TGF- $\beta$  – transformirajući faktor rasta beta

TIF – Međunarodni Savez za talasemiju (engl. *Thalassaemia International Federation*)

UDPGT – bilirubin uridin difosfat-glukuronoziltransferaza

UI – raspon nesigurnosti (engl. *uncertainty interval*)

UV svjetlo – ultraljubičasto svjetlo

ZFN – cinkov prst nukleaza (engl. *zinc-finger nuclease*)

## **ŽIVOTOPIS**

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Ana Đorđević  
Adresa: Miserkino 5, 51215 Kastav, Hrvatska  
E-mail: [ana\\_dordevic@hotmail.com](mailto:ana_dordevic@hotmail.com)  
Državljanstvo: Hrvatsko  
Datum rođenja: 10.03.1993.

### RADNO ISKUSTVO

2017. – Jadran-Galenski Laboratorij d.d.  
Voditelj upravljanja partnerima i projektima u Globalnom Razvoju Poslovanja

### ŠKOLOVANJE

2022. – 2023. Master II. stupnja, Fakultet farmaceutskih znanosti, Sveučilište u Perugi, Italija  
(Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia)

2011. – 2016. Fakultet farmacije, Sveučilište u Trstu, Italija  
(Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Trieste)

### STRUČNE AKTIVNOSTI I PUBLIKACIJE

#### **Znanstvene publikacije:**

1. **Dordevic A**, Ugrin M, Sutic IM, Roganovic J, Pavlovic S. The Relevance of  $\beta$ -Thalassemia Heterozygosity in Pediatric Clinical Practice: Croatian Experience. *Children*. 2024; 11(7):785.
2. Šegulja S, Vranešević K, **Đorđević A**, Roganović J. Infections in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Medicina*. 2024; 60(9):1395.

3. Roganovic J, Saric L, Segulja S, **Dordevic A**, Radosevic M. Panhypopituitarism caused by a suprasellar germinoma: A case report. *World J Clin Cases*. 2024; 12(10):1844-1850.
4. **Đorđević A**, Grahovac B, Šegulja S, Bilić Zulle L, Roganović J. Inherited Thrombophilia and Risk of Thrombosis in Children with Cancer: a Single-center Experience. *Acta Med Acad*. 2023; 52(3):161-168.
5. Roganović J, Brgodac E, **Đorđević A**. Parenteral iron therapy in children with iron deficiency anemia. *Paediatrics Today*. 2014; 11(1):24-29.
6. Roganovic J, Barisic I, Jonjic N, Fumic K, **Dordevic A**. Angiokeratoma in Fabry Disease: Diagnostic but not Treatment Effectiveness Marker. *Global J Med Clin Case Reports*. 2014; 2(1):012-013.

#### **Sudjelovanja na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima**

1. **Đorđević A**, Grahovac B, Bilić Zulle L, Roganović J. Inherited thrombophilia and risk of thrombosis in children with cancer: A single-center experience. 32<sup>nd</sup> Meeting of the European Society of Paediatric Clinical Research (ESPCR), Opatija, 24-25.5.2024.
2. **Đorđević A**, Maletić A, Roganović J, Mrakovčić-Šutić I. Talasemijski sindromi u djece. 15. Kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva i 14. Kongres pedijatrijskih medicinskih sestara, Rovinj, 12-15.10.2023.
3. **Đorđević A**, Maletić A, Roganović J, Mrakovčić-Šutić I. Thalassaemia in children: A single center experience“. 15<sup>th</sup> Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Hematology-Oncology Meeting, Opatija, 3-5.11.2022.
4. **Đorđević A**, Maletić A, Roganović J, Mrakovčić-Šutić I. Thalassaemia in children: A single center experience“. 30<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Pediatric Clinical Research, Brno (Češka), 16-17.6.2022.
5. **Đorđević A**, Grahovac B, Bilić Zulle L, Roganović J. Frequency of Factor II, Factor V Leiden and MTHFR mutations in children with cancer. 10th Europaediatrics, Zagreb, 7-9.10.2021.
6. **Đorđević A**. Farmaceutici u otpadnim vodama. Sanitas 2021., 21-22.5.2021.