

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja S. Ćirković

**ISPITIVANJE SENZITIVNOSTI GENOMA
KOD PACIJENATA SA BOLESTIMA
HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sanja S. Ćirković

**GENOME SENSITIVITY IN PATIENTS
WITH CHROMOSOMAL INSTABILITY
DISORDERS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR: Prof. dr Marija Gu -Š eki
Biološki fakultet u Beogradu

LANOVI KOMISIJE: Prof. dr Jelena Milašin
Stomatološki fakultet u Beogradu

Prof. dr Branka Vukovi -Ga i
Biološki fakultet u Beogradu

DATUM ODBRANE: 2012.

DATUM PROMOCIJE:

U medicinskoj genetici re : nasle e se uobi ajeno koristi da ozna i poreklo neke bolesti... Ono na šta mene ova re prvo asocira jeste znanje i povezanost me u ljudima.

U to ime najve u zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Mariji Gu -Š eki , bez ijeg bi znanja, zalaganja i podrške, ovaj rad ostao samo „dobra ideja za jednu disertaciju“. Posebno se zahvaljujem prof. dr Branki Vukovi -Ga i , Karolini Sunjog i dr Tatjani Srdi na svesrdnoj pomo i u izradi rada, kao i prof. dr Jeleni Milašin na korisnim savetima i sugestijama. Ne znam drugi na in kako da se zahvalim porodicama obolelih, njihovim lekarima, kao i svim kolegama iz NAŠE laboratorije (Maši, Daci, Nini, Marini i dr.) i kolegama iz Laboratorije Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, sem jedno veliko, iskreno: HVALA!!!

Rad posve ujem:
tati Selimiru, mami Srbijanki, sestri Danijeli, sestri inama Jovani i Jeleni,
i drugima...
koji nisu sumnjali...

**Naslov: ISPITIVANJE SENZITIVNOSTI GENOMA KOD PACIJENATA SA
BOLESTIMA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI**

Rezime:

U cilju ispitivanja senzitivnosti genoma i potvrde klini ki postavljene dijagnoze bolesti hromozomske nestabilnosti, koriš eni su uzorci dve grupe pacijenata sa klini kom slikom: Fankonijeve anemije (FA) i Nijmegenovog sindroma nestabilnosti (NSN) (eng. Nijmegen Breakage syndrome, NBS). Specifi na hipersenzitivnost elija obolelih od FA na diepoksibutan (DEB), odnosno kod obolelih od NSN na bleomicin (BLC), iskoriš ena je u diferencijalno dijagnosti ke svrhe.

Studija je obuhvatila ukupno 100 pacijenata: 90/100 sa klini kom slikom FA i 10/100 pacijenata sa klini kim znacima NSN, koji su dijagnostikovani na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan upi “. U detekciji DEB-om indukovane hromozomske nestabilnosti obolelih od FA primenjene su standardne citogeneti ke metode. Za potvrdu ili isklju enje mozai nog fenotipa FA koriš ene su dodatne metode: analiza ošte enja DNK komet testom i proto no citometrijska analiza zastoja elija u G2 fazi elijskog ciklusa. Hromozomska osetljivost elija obolelih od NSN je analizirana primenom bleomicinovog testa (BLC test). Molekularna analiza prisustva ili odsustva c.657_661del5 mutacije u *NBN* genu obolelih od NSN, ura ena je koriš enjem modifikovane PCR metode uz analizu heterodupleksa.

Kod 11,11% (10/90) pacijenata pod sumnjom da boluju od FA (*FA* grupa), otkrivena je pove ana hromozomska osetljivost na DEB u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitneyev test: $p < 0,05$), dok su kod 3,33% (3/90) pacijenata dobijene grani ne vrednosti iste analize (*FA** grupa). U cilju preciznijeg klasifikovanja pacijenata u *FA* grupi, primenjen je indeks hromozomske fragilnosti. Na ovaj na in je u *FA* grupi, kod 40% (4/10) pacijenata otkriven elijski fenotip FA nemozai nog tipa, dok je kod 60% (6/10) pacijenata dobijen mozai ni odgovor na DEB. Kod svih pacijenata sa mozai nim fenotipom FA, kao i kod dva pacijenta sa grani nim vrednostima diepoksibutanovog testa (DEB testa), daljim analizama primenom komet testa i analizom zastoja elija u G2 fazi, potvr ena je dijagnoza FA.

U drugoj grupi od 10 bolesnika sa sumnjom da boluju od NSN analizirana je BLC-om indukovana hromozomska nestabilnost, koja je bila pove ana kod 40% (4/10)

pacijenata (*NBS* grupa). Kod 30% (3/10) pacijenata dobijeni rezultati su se preklapali sa rezultatima kontrolne grupe (*ne-NBS* grupa), dok je kod preostala tri pacijenta analiza bila neuspješna zbog slabog mitotskog indeksa. Molekularnim analizama je otkriveno homozigotno prisustvo c.657_661del5 mutacije u *NBN* genu kod svih četiri pacijenta iz *NBS* grupe, kao i kod tri pacijenta kod kojih je citogenetička analiza bila neuspješna, i tako potvrđena konačna dijagnoza NSN.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su analize korištene u ovoj studiji omogućile potvrdu klinički postavljene dijagnoze FA i NSN, što opravdava njihovu dalju primenu u diferencijalnoj dijagnostici ovih oboljenja.

Cljučne riječi: Fankonijeva anemija (FA), Nijmegenov sindrom nestabilnosti (NSN), diepoksibutan (DEB), bleomicin (BLC), hromozomska nestabilnost, citogenetika, komet test, analiza elijskog ciklusa, c.657_661del5 mutacija

Naučna oblast: Biologija

Užana naučna oblast: Medicinska genetika

UDK broj: 575.113:575.224 (043.3)

Title: GENOME SENSITIVITY IN PATIENTS WITH CHROMOSOMAL
INSTABILITY DISORDERS

Abstract:

In order to determine the sensitivity of the genome and to confirm a clinical diagnosis of chromosomal instability disorders, blood samples from patients with clinical suspicion of Fanconi's anemia (FA) and Nijmegen Breakage syndrome (NBS), were collected for chromosome fragility evaluation by the diepoxybutane (DEB) and bleomycin (BLC) tests.

The study considered a total of 100 patients: 90/100 with the hematological and/or congenital phenotypic symptoms reminiscent of FA and 10/100 patients with clinical features of NBS, all diagnosed at the Mother and Child Health Care Institute of Serbia "Dr Vukan uipi ". The DEB-induced chromosomal fragility analysis in patients with FA symptoms was carried out by using standard cytogenetic methods. The additional methods, such as: DNA damage analysis by comet assay and flow cytometric analysis of G2 phase cell cycle arrest, were used in order to confirm FA phenotype in patients with mosaic cytogenetic response to DEB. Chromosomal sensitivity of cells in patients with NBS symptoms was analyzed using a BLC test. Molecular analysis for the presence of the c.657_661del5 mutation in *NBN* gene in patients with NBS was carried out using modified PCR method and heteroduplex analysis on PAGE gel.

In this study 11.11% (10/90) of patients with clinical suspicion of FA were found to have an increased chromosomal sensitivity to DEB (*FA* group), comparing to healthy controls (Mann-Whitney test: $p < 0.05$), while 3.33% (3/90) of patients showed borderline results of the same analysis (*FA** group). The chromosome fragility index was used in order to provide a clear cut-off diagnostic level distinguishing FA mosaic from other patients in the *FA* group. In this group, 40% (4/10) of *FA* patients revealed non-mosaic FA phenotype, while the remaining 60% (6/10) of *FA* patients showed a mosaic response to DEB. In all of *FA* mosaic patients, and two patients with borderline DEB-sensitivity, further analyses were performed using comet assay and analysis of G2 phase cell cycle arrest, in order to confirm the diagnosis of FA.

In the second group of 10 patients with clinical suspicion of NBS, the cytogenetic analysis revealed an increased chromosomal sensitivity to BLC in 40% (4/10) of them

(*NBS* group). The BLC-induced chromosome fragility values in 30% (3/10) of these patients were overlapping those in the control group (*non-NBS* group). In the remaining of three patients the cytogenetic analysis was unsuccessful, due to the low mitotic index. Molecular analysis confirmed the presence of homozygous c.657_661del5 mutation in all seven *NBS* patients, including three patients with unsuccessful cytogenetic analysis, which confirmed the final diagnosis of *NBS*.

Based on these results it can be concluded that the analyses used in this study are useful in confirmation of clinical diagnosis of FA and *NBS*, which justifies their further application in the differential diagnosis of these two diseases.

Keywords: Fanconi's anemia (FA), Nijmegen Breakage syndrome (NBS), diepoxybutane (DEB), bleomycin (BLC), chromosomal fragility, cytogenetic, comet assay, cell cycle, c.657_661del5 mutation

Scientific field: Biology / Medical genetics

UDC number: 575.113:575.224 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GENOM I HROMOZOMI	1
1.2. ELIJSKI CIKLUS I HROMOZOMI	2
1.3. POPRAVKA OŠTE ENJA DNK	3
1.4. GENETI KA NESTABILNOST I KANCER	5
1.5. BOLESTI HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI	6
1.5.1. VERNEROV SINDROM.....	7
1.5.2. BLUMOV SINDROM	8
1.5.3. KSERODERMA PIGMENTOZUM	8
1.5.4. ICF SINDROM	9
1.5.5. ROBERTSOV SINDROM.....	9
1.5.6. ATAKSIJA-TELANGIEKTAZIJA	10
1.6. FANKONIJEVA ANEMIJA	10
1.6.1. KLINI KE KARAKTERISTIKE FA.....	11
1.6.2. HROMOZOMSKA NESTABILNOST KOD OBOLELIH OD FA	12
1.6.3. MOLEKULARNA OSNOVA FA	12
1.6.4. PROTEINSKI KOMPLEKS FA – STRUKTURA I FUNKCIJA.....	14
1.6.5. DIJAGNOSTIKA FA.....	16
1.6.5.1. Analiza hromozomske nestabilnosti	17
1.6.5.2. Proto no citometrijska analiza elijskog ciklusa	18
1.6.5.3. Komet test za detekciju ošte enja DNK	18
1.6.5.4. Komplementacione analize.....	19
1.6.5.5. Mutacione analize u genima za FA.....	20
1.6.6. TERAPIJA OBOLELIH OD FA.....	20
1.7. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI	20
1.7.1. KLINI KE KARAKTERISTIKE NSN.....	21
1.7.2. HROMOZOMSKA NESTABILNOST KOD OBOLELIH OD NSN	22
1.7.3. MOLEKULARNA OSNOVA NSN.....	23
1.7.4. NIBRIN PROTEIN – STRUKTURA I FUNKCIJA	24
1.7.5. DIJAGNOSTIKA NSN	25
1.7.5.1. Analiza hromozomske nestabilnosti	26
1.7.5.2. Proto no citometrijska analiza elijskog ciklusa	27
1.7.5.3. Molekularna analiza mutacija u <i>NBN</i> genu	27
1.7.6. TERAPIJA OBOLELIH OD NSN.....	28
2. CILJEVI	29
2.1. FANKONIJEVA ANEMIJA	29

2.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI	30
3. MATERIJAL I METODE.....	31
3.1. MATERIJAL.....	31
3.2. METODE.....	31
3.2.1. FANKONIJEVA ANEMIJA.....	31
3.2.1.1. Metode citogeneti ke analize	31
3.2.1.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturi limfocita periferne krvi primenom DEB testa	31
3.2.1.1.2. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturi fibroblasta kože primenom DEB testa	34
3.2.1.2. Analiza ošte enja DNK primenom komet testa	35
3.2.1.2.1. Izolacija i zamrzavanje mononuklearnih elija periferne krvi	36
3.2.1.2.2. Odmrzavanje i kultivacija mononuklearnih elija.....	37
3.2.1.2.3. Metoda alkalnog komet testa	37
3.2.1.3. Proto no citometrijska metoda analize elijskog ciklusa	39
3.2.1.3.1. Kultivisanje limfocita periferne krvi i priprema za analizu.....	40
3.2.1.3.2. Kultura fibroblasta kože i priprema za analizu	40
3.2.1.3.3. Analiza elijskog ciklusa.....	41
3.2.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI.....	42
3.2.2.1. Metode citogeneti ke analize	42
3.2.2.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturi limfocita periferne krvi primenom BLC testa	42
3.2.2.2. Metode molekularne analize.....	43
3.2.2.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi.....	43
3.2.2.2.2. Detekcija c.657_661del5 mutacije	44
4. REZULTATI.....	46
4.1. FANKONIJEVA ANEMIJA.....	46
4.1.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM DIEPOKSIBUTANOVOG TESTA.....	46
4.1.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom FA primenom DEB testa	46
4.1.1.1.1. Analiza DEB-om indukovane hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi.....	47
4.1.1.1.2. Analiza spontane hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi	55
4.1.1.2. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturama fibroblasta kože primenom DEB-ovog testa.....	56
4.1.1.2.1. Analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa na fibroblastima kože zdravih osoba	56
4.1.1.2.2. Analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa na fibroblastima kože pacijenata sa mozai nim tipom FA	57
4.1.1.2.3. Analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa na fibroblastima kože grani nog FA* pacijenta	58
4.1.2. ANALIZA OŠTE ENJA DNK PRIMENOM ALKALNOG KOMET TESTA	59
4.1.2.1. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita zdravih osoba.....	59

4.1.2.2. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita <i>FA</i> pacijenata.....	60
4.1.2.3. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita <i>FA*</i> pacijenata.....	62
4.1.2.4. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita <i>ne-FA</i> pacijenata.....	62
4.1.2.5. Rezultati komet analize na limfocitima pacijenata sa klini kom slikom <i>FA</i>	63
4.1.3. PROTO NO CITOMETRIJSKA ANALIZA ELIJSKOG CIKLUSA	65
4.1.3.1. Analiza elijskog ciklusa u kulturi limfocita periferne krvi	65
4.1.3.1.1. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod zdravih osoba	65
4.1.3.1.2. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod <i>FA</i> pacijenata.....	66
4.1.3.1.3. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod <i>FA*</i> pacijenata.....	67
4.1.3.1.4. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod <i>ne-FA</i> pacijenata.....	68
4.1.3.1.5. Rezultati proto no citometrijske analize na limfocitima pacijenata sa klini kom slikom <i>FA</i>	69
4.1.3.2. Analiza elijskog ciklusa u kulturi fibroblasta kože	71
4.1.3.2.1. Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa kod zdravih osoba.....	71
4.1.3.2.2. Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa kod pacijenata sa mozai nom formom <i>FA</i>	71
4.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI	73
4.2.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM BLEOMICINOVOG TESTA.....	73
4.2.1.1. Rezultati analize BLC testom na limfocitima periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom <i>NSN</i>	73
4.2.2. ANALIZA PACIJENATA SA KLINI KOM SLIKOM <i>NSN</i> PRIMENOM METODA MOLEKULARNE GENETIKE	75
4.2.2.1. Identifikacija homozigotnog prisustva <i>c.657_661del5</i> mutacije kod pacijenata sa klini kom slikom <i>NSN</i>	75
4.2.2.2. Identifikacija heterozigotnog prisustva <i>c.657_661del5</i> mutacije kod lanova porodica obolelih od <i>NSN</i>	76
5. DISKUSIJA	77
5.1. FANKONIJEVA ANEMIJA.....	77
5.1.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM DIEPOKSIBUTANOVOG TESTA.....	77
5.1.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane <i>DEB</i> -om u kulturi limfocita periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom <i>FA</i>	78
5.1.1.1.1. Heterogenost odgovora na <i>DEB</i> : mozaicizam unutar <i>FA</i> grupe	80
5.1.1.1.2. Indeks indukovane fragilnosti hromozoma	82
5.1.1.1.3. Uticaj dužine trajanja indukcije <i>DEB</i> -om na hromozomsku nestabilnost kod pacijenata u <i>FA</i> i grani noj <i>FA*</i> grupi	84
5.1.1.2. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane <i>DEB</i> -om u kulturi fibroblasta kože	84
5.1.1.2.1. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane <i>DEB</i> -om u kulturi fibroblasta kože zdravih osoba.....	85
5.1.1.2.2. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane <i>DEB</i> -om u kulturi fibroblasta kože pacijenata sa mozai nim tipom <i>FA</i>	85
5.1.1.2.3. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane <i>DEB</i> -om u kulturi fibroblasta kože grani nog <i>FA*</i> pacijenata	86
5.1.2. ANALIZA OŠTE ENJA DNK PRIMENOM ALKALNOG KOMET TESTA	86
5.1.2.1. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita zdravih osoba.....	87
5.1.2.2. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita <i>FA</i> pacijenata.....	88

5.1.2.3. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita grani nih <i>FA*</i> pacijenata	89
5.1.2.4. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita <i>ne-FA</i> pacijenata	90
5.1.2.5. Prednosti analize komet testom u dijagnostici <i>FA</i>	90
5.1.3. PROTO NO CITOMETRIJSKA ANALIZA ELIJSKOG CIKLUSA	91
5.1.3.1. Analiza elijskog ciklusa u kulturama limfocita periferne krvi.....	91
5.1.3.1.1. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa zdravih osoba	92
5.1.3.1.2. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa <i>FA</i> grupe.....	92
5.1.3.1.3. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa grani ne <i>FA*</i> grupe	93
5.1.3.1.4. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa <i>ne-FA</i> grupe.....	94
5.1.3.2. Analiza elijskog ciklusa u kulturama fibroblasta kože.....	95
5.1.3.2.1 Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa zdravih osoba.....	95
5.1.3.2.2. Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa pacijenata sa mozai nom formom <i>FA</i>	95
5.1.3.3. Zna aj primene analize elijskog ciklusa u cilju potvrde fenotipa <i>FA</i>	96
5.1.4. ZNA AJ ISPITIVANJA SENZITIVNOSTI GENOMA U DIJAGNOZI <i>FA</i>	96
5.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI	97
5.2.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM BLEOMICINOVOG TESTA	97
5.2.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane BLC-om u kulturi limfocita periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom NSN	98
5.2.2. ANALIZA PACIJENATA SA KLINI KOM SLIKOM NSN PRIMENOM METODA MOLEKULARNE GENETIKE	99
5.2.2.1. Identifikacija homozigotnog prisustva c.657_661del5 mutacije kod pacijenata sa klini kom slikom NSN	99
5.2.2.2. Identifikacija heterozigotnog prisustva c.657_661del5 mutacije kod lanova porodica obolelih od NSN	99
6. ZAKLJU AK.....	101
6.1. FANKONIJEVA ANEMIJA.....	101
6.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI	103
7. LITERATURA.....	104

1. UVOD

Poznati nemački citolog Walther Flemming je još 1882. god. proučavao i opisao deobu uoio izvesne jedarne strukture, a on je pokušao da objasni vezuju ih za različite stupnjeve mitoze. Termin "hromozom"¹ uveden je šest godina kasnije od strane nemačkog anatoma Heinricha Waldeyera, a na osnovu specifičnog bojenja ovih struktura jedarnim bojama (Neitzel i Trimborn 2007). Od tada, pa sve do polovine 20. veka usledile su otkrića, kao što je linearan raspored osnovnih jedinica nasleđivanja (gena) duž hromozoma i to, koja se u kombinaciji sa Mendelovim pravilima i citološkim saznanjima, čini okosnicu hromozomske teorije nasleđivanja. Do 1953. god. bila je poznata funkcija i ponašanje genetičkog materijala hromozoma, ali ne i njegova molekulska struktura. Naučnici James Watson i Francis Crick (1953) su opisali i helikoidnu strukturu deoksiribonukleinske kiseline (DNK) – osnove naslednog materijala, započeli novo poglavlje genetike – molekularnu genetiku.

Pedestih godina prošlog veka kao rezultat brojnih istraživanja, utvrđeno je tačan broj hromozoma (Tjio i Levan 1956) i prvi put opisana aneuploidija kod čoveka (Lejeune i dr. 1959). Šezdesetih i sedamdesetih godina 20. veka dolazi do razvika novih tehnika *in vitro* kultivisanja hromozoma kao i različitih tehnika citogenetike, među kojima su najvažnije bile: preparacija hromozoma iz *in vitro* kultivisanih limfocita (Nowell 1969), tehnike diferencijalnog bojenja hromozoma kao i niza drugih metoda kojima je napravljen je značajan pomak u ovoj oblasti. Naglim razvitkom citogenetike došlo se do novih saznanja o strukturi i funkciji hromozoma čoveka, što je u narednim godinama, zahvaljujući savremenoj citogenetici koja dijagnostici dovelo do otkrića velikog broja hromozomskih sindroma.

1.1. GENOM I HROMOZOMI

Poznato je da se u zavisnosti od sastava i broja ponavljanja sekvence u genomu čoveka mogu razlikovati dve vrste DNK: sekvence koje se nalaze u po jednoj kopiji

¹ Hromozom - grčki: chromos što znači "boja" i soma što znači "telo"

(60%) i visoko repetitivne sekvence (40%). Na in pakovanja DNK u hromatin, odnosno hromozome je karakterističan za sve sisare, pa i za oveka, i može se vizuelizovati na svetlosnom mikroskopu primenom tehnika bojenja hromozoma kao što su: G-, R-, Q- i C-traka (Holmquist 1992; Korenberg i Rykowski 1988). Hromatinski domeni su na osnovu razlika u AT/GC sastavu, prisustva repetitivnosti DNK sekvenci, vremena replikacije i genske aktivnosti podeljeni u euhromatinske i heterohromatinske regione (Neitzel i Trimborn 2007). G-, R- i Q-trake definišu euhromatin, koji predstavlja difuzan deo hromatina, svetlije obojen, koji uglavnom sadrži kodirajuće sekvence DNK, za razliku od heterohromatina koji je kondenzovan, boji se tamno, kasno se replicira, i ostaje neaktivan tokom transkripcije.

U elijskom ciklusu oveka postoji tačno definisan redosled u replikaciji ovih domena. Najpre se sintetizuje euhromatinski, a zatim heterohromatinski regioni, što se može videti nakon inkorporacije sintetičkog timidina tokom S faze (Neitzel i Trimborn 2007).

1.2. ELIJSKI CIKLUS I HROMOZOMI

Deobni ciklus većine eukariotskih organizama ima četiri procesa: elijski rast, replikacija DNK, raspodela dupliciranih hromozoma u ćelije i elijska deoba (Cooper 2007). Elijanski ciklus (somatskih ćelija) kod oveka deli se na dva osnovna dela: mitozu i interfazu. Mitoza (elijska deoba; M faza) predstavlja stadijum elijskog ciklusa kada dolazi do pakovanja i razdvajanja dupliciranog genetičkog materijala, a završava se deobom na dve ćelije (Cooper 2007). Period između dve mitoze naziva se interfaza, u kojoj su hromozomi deokondenzovani, i koja se sastoji iz tri faze: G1, S i G2 faze. Faza G1 je faza rasta ćelije sa povećanom metaboličkom aktivnošću, koja se ogleda u povećanju količine citoplazme, odnosno pripremi ćelije za duplikaciju DNK tokom S faze (Neitzel i Trimborn 2007). Elijanski rast i aktivnosti vezane za pripremu ulaska u mitozu se nastavljaju u G2 fazi, tako da tokom M faze mogu nastati ćelije koje dobijaju replicirane hromatide (Neitzel i Trimborn 2007).

Kako je za genetičke procese od presudne važnosti očuvanje hromozomskog integriteta u svim fazama elijskog ciklusa, postoji složena mreža kontrolnih tačaka

(eng. checkpoints) kojom se prati struktura hromozoma i koordinira progresija elijskog ciklusa, kao i popravka DNK i formiranje deobnog vretena (Neitzel i Trimborn 2007). Pod kontrolnim ta kama se podrazumevaju uskla ene serije odgovora, koji odlažu prelazak u slede u fazu elijskog ciklusa, ukoliko nisu ispunjeni odgovaraju i uslovi za to. Ovo kašnjenje daje eliji vreme neophodno da popravi greške u molekulu DNK, pre nego u e u deobu ili podlegne apoptozi (Clarke i Gimenez-Abian 2000; Hartwell i Weinert 1989; Hartwell i Kastan 1994; Nurse 1997; Morrison i Rieder 2004).

Ulazak elije u mitozu se nalazi pod kontrolom strogo regulisane mreže kinaznih proteina, ciklina i fosfataznih proteina, kao što su: ciklin-zavisne kinaze (MPF² i dr.) i APC³ kompleks koji promovise anafazu (Pines i Rieder 2001).

1.3. POPRAVKA OŠTE ENJA DNK

Ošte enja na molekulu DNK mogu nastati pod uticajem razli itih spoljašnjih i unutrašnjih faktora sredine, kao i usled grešaka u procesu replikacije. Ovakva ošte enja mogu dovesti do zastoja u elijskom ciklusu, programirane elijske smrti (apoptoza), ili se mogu fiksirati u mutacije, i dovesti do geneti kog oboljenja ili do razvoja kancera. Spontana stopa mutacija varira od vrste do vrste, a kod oveka se procenjuje da iznosi oko 2×10^{-7} po genu po elijskoj deobi (Oller i dr. 1989).

Sredinski agensi mogu delovati kao mutageni, tako da mogu uticati na pove anje frekvence javljanja mutacija. U neke od najpoznatijih agenasa spadaju: ultravioletno (UV) svetlo, jonizuju e zra enje (IR⁴) i razni drugi karcinogeni. Izlaganje sredinskim faktorima se može u manjoj ili ve oj meri redukovati, za razliku od grešaka nastalih u procesu replikacije DNK ili ošte enja nastalih dejstvom normalnih produkata elijskog metabolizma i lipidne peroksidacije (Hisama i dr. 2003). Stoga je elija razvila mehanizme za popravku ošte enja DNK, kao jedan od glavnih izvora mutacija.

² MPF – eng. Mitosis Promoting Factor – prev. mitozni-promovišu i faktor

³ APC – eng. Anaphase Promoting Complex

⁴ IR – eng. Ionizing Radiation

U zavisnosti od vrste oštećenja na molekulu DNK, elija pokre e i razli ite mehanizme za njihovu popravku. Ukoliko je do lezije došlo samo na jednom lancu DNK, drugi lanac može poslužiti kao matrica za ispravku greške. Ponekad, zbog oštećenja nastalih u oba lanca, to nije mogu e, pa se pribegava mehanizmima koji nisu tako precizni i skloni su greškama (eng. „error-prone“) (Hisama i dr. 2003). Detekcija oštećenje DNK, od strane faktora uklju enih u procese reparacije, zasniva se na promeni konfiguracionog statusa helikoidne strukture. Nakon prepoznavanja, sledi niz reakcija vezivanja i aktivacije drugih molekula, koji formiraju kompleks koji e omogu iti popravku (Hisama i dr. 2003).

Prema vrsti DNK lezije i na inu ispravke, u mehanizme reparacije svrstavaju se:

- direktna reverzija – ispravljanje pirimidinskih dimera (indukovani UV svetlom) i metilovanih guanina direktnim delovanjem enzima kao što su: fotoliza, metil guanin metil transferaza (MGMT) i dr;
- ekscizionna reparacija – uklanjanje pojedina no oštećenje baze (bazna ekscizija (BER⁵)) ili nukleotida u okviru oligonukleotida (nukleotidna ekscizija (NER⁶));
- reparacija pogrešno sparenih baza (MMR⁷) – ispravlja greške nastale tokom replikacije;
- rekombinaciona reparacija – uklju uje najmanje tri mehanizma kojima se popravljaju dvolan ani prekidi, me u- i unutarlan ane DNK-unakrsne veze: mehanizam homologih rekombinacija, spajanje mikrohomologih krajeva i spajanje nehomologih krajeva;
- mehanizmi tolerancije – ispravljanje lezija koje zaustavljaju replikaciju translalezijskom sintezom smanjene specifi nosti.

⁵ BER – eng. Base Excision Repair

⁶ NER – eng. Nucleotide Excision Repair

⁷ MMR – eng. Mismatch Repair

1.4. GENETI KA NESTABILNOST I KANCER

Pojam stabilnosti genoma se u prvim molekularno biološkim studijama pominje u kontekstu kancerogeneze, koja se objašnjava nagomilavanjem mutacija u genima odgovornim za očuvanje integriteta i stabilnosti genoma (Zhang 2004). Rasprava na temu genetike nestabilnosti, kao potencijalnog uzročnika tumora kod čoveka, vodi se decenijama. Većina kancera se odlikuje nekom vrstom genomske nestabilnosti, ali je njeno prisustvo uočeno i u premalignim lezijama, tako da stepen ovih promena može imati dodatni prognostički značaj vezano za procese maligne transformacije (Lengauer i dr 1998; Tanic i dr. 2009). Ono što se sigurno zna je da se genetika nestabilnost u kancerima kod čoveka javlja na dva različita nivoa. U manjem procentu tumora primećena je genetika nestabilnost na nivou nukleotida, i odnosi se na promene u sekvenci: zamene baznih parova, delecije ili insercije. Kod većine drugih kancera prevalentna genetika nestabilnost koja se javlja je na nivou hromozoma (Lengauer i dr 1998).

Pod hromozomskom nestabilnošću podrazumeva se dinamično stanje kontinuiranih hromozomskih alteracija, kako numeričkog tako strukturnog tipa, sa stopom uestalosti većom nego u normalnim ćelijama (Gisselsson 2001; Hittelman 2001; Lengauer i dr 1998). Promene u broju hromozoma mogu biti posledica abnormalne segregacije tokom ćelijske deobe i mogu uključivati niz poremećaja u regulaciji gena vezanih za nastanak aneuploidija, hipo- i poliploidija. Hromozomski prekidi i disfunkcionalne telomere mogu s druge strane dovesti do nastanka različitih strukturnih rearanžmana: delecija, duplikacija, inverzija, insercija, translokacija i dr. (Zhang 2004). S obzirom da sve ove promene u manjoj ili većoj meri mogu povećati stopu gubitka heterozigotnosti, koji je u većini slučajeva karcinogenom, od presudnog je značaja efikasnost mehanizama kontrole ćelijskog ciklusa, popravke DNK i sprečavanja akumulacije hromozomskih aberacija. Visok nivo hromozomskih prekida i aberacija, karakterističan za niz sindroma hromozomske nestabilnosti, jedan je od najvažnijih faktora u procesu maligne transformacije ćelija i razvoja tumora kod obolelih osoba (Zhang 2004).

1.5. BOLESTI HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI

Bolesti hromozomske nestabilnosti ine grupu pojedina no retkih i klini ki vrlo heterogenih, ali geneti ki determinisanih oboljenja kao što su: Vernerov sindrom (eng. Werner's syndrome), Rotmund-Tomsonov sindrom (eng. Rothmund-Thomson's syndrome), Hutchinson-Gilfordova progerija (eng. Hutchinson-Gilford's progeria), Blumov sindrom (eng. Bloom's syndrome), kseroderma pigmentozum (Xeroderma pigmentosum), Kokejnov sindrom (Cockayne's syndrome), sindrom imunodeficijencije udružene sa nestabilnoš u centromera i facijalnim anomalijama (ICF⁸), Robertsov sindrom (Roberts syndrome), diskeratozis kongenita (dyskeratosis congenita), Ataksija-Telangiektazija (Ataxia-Telangiectasia), Nijmegenov sindrom nestabilnosti (eng. Nijmegen Breakage syndrome), Fankonijeva anemija (eng. Fanconi's anemia) i dr. (tabela 1) (Gordon i dr. 2011; Hisama i dr. 2003; Zhang 2004).

Tabela 1. Bolesti hromozomske nestabilnosti.

Oboljenje	Osnovne klini ke karakteristike	Predispozicija za razvoj kancera	Naziv gena
Vernerov sindrom	prerano starenje, katarakta	sarkom	<i>WRN</i>
Rotmund-Tomsonov sindrom	promene na koži, telangiektazija	osteosarkom	<i>RECQL4</i>
Hutchinson-Gilfordova progerija	osteoporoza, ubrzano starenje	-	<i>LMNA</i>
Blumov sindrom	fotosenzitivnost	leukemija, limfom, solidni tumori	<i>BLM</i>
Kseroderma pigmentozum	fotosenzitivnost, mentalna retardacija	kancer kože, maligni melanom	<i>XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG, XPV</i>
Kokejnov sindrom	zastoj u rastu, neurodegeneracija	-	<i>CS-A, CS-B</i>
ICF sindrom	imunodeficijencija	-	<i>DNMT3B</i>
Robertsov sindrom	zastoj u rastu i razvoju	-	<i>ESCO2</i>
Diskeratozis kongenita	promene u pigmentaciji kože	Hodgkinov limfom	<i>DKC1</i>
Ataksija-Telangiektazija	neurodegeneracija	leukemija	<i>ATM</i>
Nijmegenov sindrom nestabilnosti	zastoj u rastu, imunodeficijencija	limfom	<i>NBN</i>
Fankonijeva anemija	kongenitalne anomalije, pancitopenija	leukemija	<i>FANCA, -B, -C, BRCA2, FANCD2, -E, -F, -G, -I, BRIP1, -L, -M, PALB2, RAD51C i SLX4</i>

⁸ ICF – eng. Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies

Osim povećane učestalosti spontanih, odnosno indukovanih prekida na hromozomima, zajedničke karakteristike ovih bolesti, su i da se nasleđuju uglavnom autozomno recesivno, kao i da oboleli imaju povišenu predisponiranost za razvoj malignih oboljenja (izuzetak su neki sindromi) (tabela 1).

Iako su ove bolesti prvo opisane na osnovu kliničkih karakteristika, bez poznavanja mehanizama koji dovode do razvoja oboljenja, danas se zna da se u osnovi bolesti hromozomske nestabilnosti nalaze poremećeni mehanizmi popravke DNK, kontrole elijskog ciklusa ili apoptoze, koji mogu da dovedu do neoplastičnih procesa u eliji (Zhang 2004).

1.5.1. VERNEROV SINDROM

Vernerov sindrom (MIM ID #277700) (VS) je oboljenje koje se klinički karakteriše sklerodermalnim promenama na koži, posebno ekstremitetima, kataraktom, muskularnom atrofijom i često se opisuje kao sindrom preranog starenja (Oshima 2003; Zhang 2004). Ostali klinički znaci ovog oboljenja kao što su: diabetes mellitus, hipogonadizam, osteoporoza, arteroskleroza, kao i sklonost ka neoplaziji, mogu da variraju. Međutim, glavni uzrok smrti pacijenata obolelih od VS (10%) jesu različiti oblici kancera, i to pre svega: maligni sarkomi, meningiomi i ostali karcinomi.

Stopa spontanih hromozomskih prekida u elijama ovih pacijenata nije tako upečujljivo povećana, kao što je to slučaj kod ostalih bolesti ovog tipa, ali se u kulturama fibroblasta kože obolelih od VS mogu naći brojni hromozomski rearanžmani u vidu različitih translokacija. Takođe je primećena i znatno umanjena sposobnost ovih elija da se dele, u odnosu na kulture fibroblasta zdrave populacije, što je dovedeno u vezu sa smanjenom telomeraznom aktivnošću i skraćivanjem telomera (Wyllie i dr. 2000). Gen odgovoran za nastanak VS je *WRN* gen lociran na kratkom kraku hromozoma 8 (8p12) i kodira DNK helikazni protein koji pripada RecQ familiji proteina, a koji igraju važnu ulogu u procesima popravke, rekombinacije, transkripcije i replikacije molekula DNK (Yu i dr. 1996).

1.5.2. BLUMOV SINDROM

Blumov sindrom (MIM ID # 210900) (BS) je retko autozomno recesivno oboljenje iju klini ku sliku ine: zastoj u rastu i razvoju, osetljivost na sun eve zrake, promene u pigmentaciji kože, imunodeficijencija i sklonost za razvoj razli itih tipova maligniteta, uklju uju i leukemije, limfome i solidne tumore (Hisama i dr. 2003; Zhang 2004).

Simetri ne formacije kvadriradijalnih hromozomskih struktura pre mitoze, jedna su od prvo uo enih manifestacija geneti ke nestabilnosti u elijama pacijenata sa BS, nastale usled nejednake razmene delova hromatida u centromernom regionu homologih hromozoma. Ipak, najkarakteristi nija citogeneti ka odlika ove bolesti je zna ajno povišena stopa razmena sestrinskih hromatida (SCE⁹) kako u limfocitima, tako i u drugim elijama obolelih (10 puta više SCE nego kod zdravih osoba) (Zhang 2004). U osnovi BS nalazi se *BLM* gen smešten na hromozomu 15 (15q26.1), koji nosi informaciju za sintezu proteina RecQL3, uklju enog u procese reparacije i replikacije DNK tokom elijskog ciklusa, a posebno u formiranju sinaptonemalnog kompleksa i mejoti kih sinapsi (Ellis i dr. 1995; Walpita i dr. 1999). Mutacije u *BLM* genu uzrokuju gubitak enzimske funkcije RecQL3 helicaze, što narušava stabilnost kompleksa replikacione viljuške i izaziva pove anje stope rekombinacija (Karow i dr. 2000). Naj eš a mutacija koja je identifikovana u populaciji Aškenazi Jevreja (98%) je delecija 6bp / insercija 7bp u egzonu 10 *BLM* gena (c.2207_2212del insTAGATTC), što je našlo primenu u molekularnoj dijagnostici i potvrdi ove bolesti (Ellis i dr. 1998; Sanz i German 2010).

1.5.3. KSERODERMA PIGMENTOZUM

Kseroderma pigmentozum (KP) predstavlja autozomno recesivno oboljenje iju klini ku sliku ine: zastoj u rastu i razvoju, osetljivost na sun eve zrake, promene u pigmentaciji kože, imunodeficijencija i predispozicija za razvoj kancera (leukemije,

⁹ SCE – eng. Sister Chromatide Exchange

limfomi i solidni tumori) (Hisama i dr. 2003; Zhang 2004). Karcinomi skvamoznih i bazalnih elija u regionima izloženim sun evim zracima ine 90% slu ajeva neoplazmi pacijenata sa KP (Zhang 2004).

KP se javlja sa u estaloš u od oko 1:250 000 do 1:1000 0000 i do sada je otkriveno devet komplementacionih grupa (A, B, C, D, E, F, G, V i jedna grupa prethodno nazvana H), odnosno gena koji su lokalizovani i klonirani (Jaspers i dr. 2007; Kraemer i DiGiovanna 2012). Pove ana stopa spontanih prekida nije uo ena kod ovih pacijenata, ali je prime eno pove anje stope razmene sestrinskih hromatida nakon izlaganja UV zracima (Kraemer i Ruenger 2008). Naime, elije obolelih od KP zbog defektne DNK reparacije (NER) nisu u mogu nosti da adekvatno odgovore na ošte enja nastala UV zracima, tako da pribegavaju alternativnim putevima reparacije.

1.5.4. ICF SINDROM

ICF sindrom je bolest imunodeficijencije udružene sa nestabilnoš u centromera i facijalnim anomalijama. ICF sindrom predstavlja autozomno recesivno oboljenje, koje nastaje kao posledica mutacija u genu za DNK metiltransferazu 3B (*DNMT3B*) (Hansen i dr. 1999). Osnovna klini ka obeležja ovog sindroma su: redukovani nivo imunoglobulina u serumu i dismorfija lica (hipertelorizam, makroglosija i dr.). Na citogeneti kom nivou u limfocitima periferne krvi uo ljava je dekondezacija heterohromatina i formiranje multiradijalnih struktura u oblasti centromernog regiona hromozoma 1, 9 i 16, a na molekularnom nivou hipometilacija udružena sa nukleaznom hipersenzitivnoš u i skra enjem trajanja replikacije (Hansen i dr. 2000; Sumner i dr. 1998).

1.5.5. ROBERTSOV SINDROM

Robertsov sindrom (RBS) karakteriše prisustvo kraniofacijalnih anomalija, kao i prenatalni i postnatalni zastoj u rastu sa razli itim defektima ekstremiteta. Prerano razdvajanje centromera i dekondezacija u centromernom regionu hromozoma 1, 9 i 16 su neke od naj eš ih citogeneti kih anomalija koje se mogu uo iti u metafaznim

figurama kod oko 80% obolelih od RBS (Zhang 2004). *ESCO2* gen je jedini gen koji se vezuje za ovu bolest (Vega i dr. 2005).

1.5.6. ATAKSIJA-TELANGIEKTAZIJA

Ataksija-Telangiektazija (MIM ID # 208900) (A-T) je autozomno recesivno oboljenje sa cerebelarnom degeneracijom, telangiektazijama na koži, imunodeficijencijom, hromozomskom nestabilnošću, radiosenzitivnošću i predispozicijom za razvoj kancera. Pacijenti koji boluju od A-T najčešće razvijaju B-ćelijske limfome, leukemije T-ćelijskog tipa i solidne tumore, kao što su meduloblastomi i gliomi (Zhang 2004).

Uestalost javljanja A-T iznosi oko 1:89 000 i može da varira od populacije do populacije (Swift i dr. 1986; Swift i dr. 1991). Gen ije mutacije vode nastanku ove bolesti nazvan je *ATM* gen i lociran je na dugom kraku hromozoma 11 (11q22.3), a kodira protein pod nazivom ATM kinaza. Ovaj protein je jedan od ključnih enzima u reparaciji dvostranih prekida na molekulu DNK, koji učestvuje i u regrutovanju drugih proteina slične funkcije na mesta oštećenja, kao i u regulaciji ćelijskog ciklusa (Gatti 2010; Lavin 2008; Savitsky i dr. 1995).

Spontani hromozomski prekidi, a pogotovu rearanžirani koji uključuju hromozome 7 i 14 često mogu videti citogenetičkom analizom limfocita periferne krvi pacijenata sa A-T (Zhang 2004). X-zraci, kao i neki radiomimetici, kao što je bleomicin mogu povećati stopu fragilnosti hromozoma, ije uzroke treba tražiti u poremećenim procesima rekombinacija DNK.

Pored prethodno spomenutih, ujedne od najčešćih bolesti hromozomske nestabilnosti ubrajaju se još: Fankonijeva anemija i Nijmegenov sindrom nestabilnosti.

1.6. FANKONIJEVA ANEMIJA

Fankonijevu anemiju (FA) je 1927.god. prvi put opisao Guido Fanconi, kao oboljenje koje se karakteriše prisustvom makrocitoze, pancitopenije i kongenitalnih anomalija (Fanconi 1927). Naime, radi se o retkoj bolesti sa uglavnom autozomno

recesivnim na inom nasle ivanja (jedan redak oblik FA se nasle uje X-vezano) i frekvencom javljanja od oko 1:360 000 živoro ene dece (Swift 1971). U nekim populacijama kao što su Aškenazi Jevreji, Španski Romi i dr. u estalost heterozigotnih nosilaca je vrlo visoka i iznosi oko 1:67 (Callen i dr. 2005; Kutler i Auerbach 2004).

1.6.1. KLINI KE KARAKTERISTIKE FA

Osim razli itih kongenitalnih anomalija i pancitopenije, koje su prime ene ranije, klini ku sliku FA ine još i, insuficijencija kostne srži i pove an rizik za razvoj maligniteta (Alter i Kupfer 2011). Malformacije kao što su: nizak rast, promene u pigmentaciji kože poznatije pod nazivom: „mrlje bele kafe“ (fran. „café au lait“, eng. spots), anomalije pal eva na rukama ili pal eva i radijalnih kostiju, i niz drugih abnormalnosti koje uklju uju skeletni, gonadalni, urinarni i dr. organske sisteme, mogu biti prisutne kod oko 60% - 75% obolelih od FA (slika 1) (Alter i Kupfer 2011).



Slika 1. Pacijent oboleo od FA (izvor: Alter i Young 1993).

Izrazita heterogenost simptoma FA i njihove ekspresije dodatno otežava postavljanje dijagnoze, a samim tim i otpo injanje terapije ove teške bolesti. Naime, progresivno propadanje kostne srži sa pancitopenijom pacijenata obolelih od FA, obi no po inje trombocitopenijom ili leukopenijom u prvoj dekadi života, da bi sa 40 - 50 godina oko 90% njih razvilo aplaziju kostne srži, 10% - 30% hematološke malignitete (akutnu mijeloidnu leukemiju) i 25% - 30% solidne tumore (glave, vrata, kože,

urogenitalnog trakta i dr.) (Alter i Kupfer 2011; Butturini i dr. 1994; Kutler i dr. 2003). Veliki broj pacijenata sa FA karakteriše prisustvo različitih poremećaja endokrinog sistema, u prvom redu nedostatak hormona rasta (53%), zatim hipotireoidizam (37%), dislipidemija (55%) i dr. (Wajnrajch i dr. 2001).

1.6.2. HROMOZOMSKA NESTABILNOST KOD OBOLELIH OD FA

Pojava spontane hromozomske nestabilnosti u elijama obolelih od FA i autozomno recesivni na in nasleđivanja, prvi put su prepoznati i opisani u literaturi od strane Tanie Schroeder, i to sredinom šezdesetih godina prošloga veka (Schroeder i dr. 1964; Schroeder 1966; Swift i Hirschhorn 1966). Schuler i saradnici su 1969.god. ispitivanjem elija ovakvih bolesnika došli do zaključka da se pod dejstvom alkilirajućih agenasa povećava njihova senzitivnost. Kasnije se do istog zaključka došlo vezano za radiosenzitivnost, kao i za veliki broj drugih DNK-unakrsno vezujućih jedinjenja (kofein, hloramfenikol, aktinomycin D, MMS, HN2, mitomicin C, DCMMC, MNNG, 4NQO, 8-metoksipsoralen) (Higurashi i Conen 1971; Sasaki i Tonomura 1973). Unakrsno-vezujućih agensa reaguju sa molekulom DNK na dve različite pozicije, bilo u okviru istog ili na dva različita lanca, izazivaju i prekide, koji ukoliko se ne poprave, mogu dovesti do zastoja elijskog ciklusa ili apoptoze.

Hromozomska nestabilnost elija obolelih od FA ogleda se u povećanom prisustvu hromozomskih i hromatidnih prekida, dicentrika, ring-hromozoma, acentričnih fragmenata, a posebno radijalnih struktura nastalih putem inter- i intrahromatidnih razmena (Berger i dr. 1993). Posledice dejstva unakrsno-vezujućih agenasa u elijama FA, osim na citogenetičkom nivou, uočljive su i na molekularnom nivou.

1.6.3. MOLEKULARNA OSNOVA FA

Prve komplementacione analize u hibridima elija sa hipersenzitivnim odgovorom na DNK-unakrsno-vezujućih agenasa, kod četiri pacijenta obolela od FA, pokazale su postojanje najmanje dve (Duckworth-Rysiecki i dr. 1985), odnosno četiri (Strathdee i dr. 1992a) komplementacione grupe ove bolesti. Identifikovan je i prvi gen FA koji je

pripadao komplementacionoj grupi C, i stoga dobio ime *FACC* (Strathdee i dr. 1992b), koje je kasnije promenjeno u *FANCC*. Hipotezu o postojanju većeg broja gena FA, koji kodiraju produkte jednog jedinog biohemijskog puta, podržalo je i otkriće drugog gena FA: *FANCA* (Lo Ten Foe i dr. 1996). Zatim, je usledio niz otkrića i drugih gena odnosno, komplementacionih grupa (poređane po abecednom redu): FA-B, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G, FA-I, FA-J, FA-L, FA-M, FA-N, FA-O i FA-P (tabela 2) (de Winter i dr. 2000; Joenje i dr. 1997; Joenje i dr. 2000; Joenje i Patel 2001; Kim i dr. 2011; Levitus i dr. 2004; Meetei i dr. 2003; Meetei i dr. 2004; Nagase i dr. 2000; Timmers i dr. 2001; Vaz i dr. 2010; Waisfisz i dr. 1999b; Xia i dr. 2007).

Tabela 2. Komplementacione grupe i geni FA.

Komplementaciona grupa	Naziv gena	Uestalost	Lokacija gena
FA-A	FANCA	60%-70%	16q24.3
FA-B	FANCB	~2%	Xp22.3
FA-C	FANCC	~14%	9q22.3
FA-D1	BRCA2	~3%	13q12.3
FA-D2	FANCD2	~3%	3p25.3
FA-E	FANCE	~3%	6p22-p21
FA-F	FANCF	~2%	11p15
FA-G	FANCG	~10%	9p13
FA-I	FANCI	~1%	15q25-q26
FA-J	BRIP1	~2%	17q22
FA-L	FANCL	~0.2%	2p16.1
FA-M	FANCM	~0.2%	16p12
FA-N	PALB2	~0.7%	14q21.3
FA-O	RAD51C	~0.2%	17q22
FA-P	SLX4	~0.2%	16p13.3

Kao što se u tabeli 2. može videti, do sada je otkriveno ukupno 15 gena čiji produkti učestvuju u procesima reparacije DNK, u okviru biohemijskog puta, poznatog kao: FA/BRCA put ili put FA (eng. FA/BRCA pathway), kojim se reguliše ćelijska rezistentnost na DNK-unakrsno vezujuće agense (Taniguchi i D'Andrea 2006). Mutacije u nekom od ovih gena, kada se nađu u homozigotnom stanju (sem mutacija u *FANCB* genu, koje se ispoljavaju u hemizigotnom stanju zbog X-vezanog nasleđivanja) dovode do narušavanja puta FA i razvoja ćelijskih, odnosno kliničkih anomalija karakterističnih za ovu bolest (Garcia-Higuera i dr. 2001). Najveći broj

obolelih od FA pripada: FA-A (60% - 70%), FA-C (~14%) i FA-G (~10%) grupama, dok su ostale komplementacione grupe zastupljene u znatno manjem procentu (tabela 2) (Shimamura i Alter 2010).

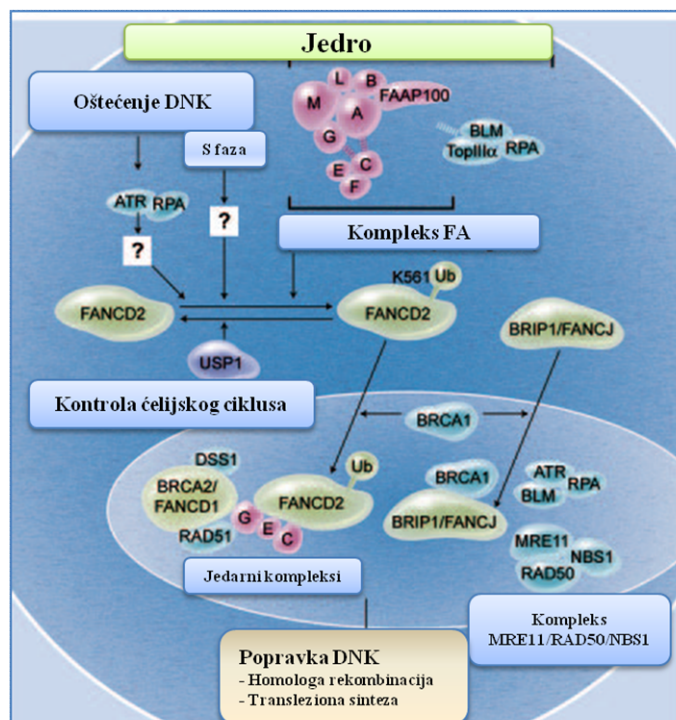
Pored većeg broja gena, geneti koja heterogenosti ovog oboljenja, doprinosi i činjenica da postoji i veliki broj do sada detektovanih mutacija, različitog tipa. Ipak, za izvesne mutacije je ustanovljeno da se javljaju i u određenim populacijama:

- mutacije u *FANCA* genu: c.1115_1118del i c.3788_3790del kod osoba poreklom iz Severne Evrope (Levrán i dr. 1997; Morgan i dr. 1999; Wijker i dr. 1999),
- mutacije u *FANCC* genu: c.345+4A>T u populaciji Aškenazi Jevreja, a c.1642C>T i c.67delG kod naroda Severne Evrope (Whitney i dr. 1993),
- mutacije u *FANCG* genu: c.307+1G>C u Koreji i Japanu, c.925-2A>G u Brazilu, c.1480+1G>C u Kanadi, a c.1183-1192del i c.1480+1G>C mutacije u Severnoj Evropi (Demuth i dr. 2000; Nakanishi i dr. 2002).

1.6.4. PROTEINSKI KOMPLEKS FA – STRUKTURA I FUNKCIJA

Osam proteina FA (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL* i *FANCM*), zajedno sa još dva: *FAAP24* (Ciccía i dr. 2007) i *FAAP100* (Ling i dr. 2007) čine jedarni kompleks, koji se naziva proteinski kompleks FA (eng. FA core complex). Šematski prikaz modela, kojim se opisuje funkcija ovog kompleksa, a koji je vezan za reparaciju DNK putem homologih rekombinacija, prikazan je na slici 2. (Kennedy i dr. 2005; Thompson i dr. 2005).

Naime, specifična oštećenja na molekulu DNK, pokrenuta bilo dejstvom alkilirajućih agenasa bilo unutar elijskim faktorima (u S fazi), dovode do formiranja ubikvitin-ligaznog kompleksa FA, kojeg čine tri subkompleksa: *FANCA-FANCG*, *FANCC-FANCE-FANCF* i *FANCB-FANCL-FAAP100* (García-Higuera i dr. 2001). *FANCL* protein koji je po funkciji E3 ubikvitin-ligaza, vrši monoubikvitinaciju (dodavanje jednog molekula ubikvitina) *FANCD2* i *FANCI* proteina u jedru, aktivirajući ih za dalji proces reparacije DNK u vidu *FANCD2-I* kompleksa (García-Higuera i dr. 2001; Meetei i dr. 2005; Moldovan i D'Andrea 2009).



Slika 2. Šematski prikaz puta FA (izvor: Taniguchi i D'Andrea 2006).

Monoubikvitinacija FANCD2-I proteina zauzima centralno mesto u biohemijskom putu FA. Na ovaj način je omogućena njihova interakcija sa molekulom DNK na mestu gde postoji oštećenje, zajedno sa FANCD1, FANCI, FANCN i nizom drugih proteina uključenim u procese popravke DNK (Garcia-Higuera i dr. 2001; Moldovan i D'Andrea 2009). Iako, nije poznata tačna funkcija FANCD2-I kompleksa, prema dosadašnjim istraživanjima mnogobrojni proteini pokazuju zajedničko prisustvo sa FANCD2 proteinom (Moldovan i D'Andrea 2009). Neki od tih proteina su: ATR¹⁰ kinaza (Andreassen i dr. 2004), proteinske komponente homologe rekombinacije (RAD51, BRCA1, BRCA2) (Taniguchi i dr. 2002), proteini puta reparacije DNK spajanjem nehomologih krajeva (NHEJ¹¹) (Nakanishi i dr. 2002; Pichierri i dr. 2004), BLM helikaza i delimično ostali proteini FA (FANCE, FANCC, FANCI) (Pace i dr.

¹⁰ ATR – eng. Ataxia Telangiectasia and Rad3-related

¹¹ NHEJ – eng. Non-Homologous End-Joining

2002; Taniguchi i D'Andrea 2006). FANCM može da se veže direktno za molekul DNK, sli no kao FANCI i FANCD1, koji nisu neophodni u procesu monoubikvitinacije FANCD2 (Ciccio i dr. 2007; Park i dr. 2005). Poznato je da je ATR kinaza, tako e neophodna za izmeštanje i monoubikvitinaciju FANCD2. Aktivacija FANCD2 proteina zavisi pre svega od celovitosti strukture i funkcije kompleksa FA, ali i od prisustva drugih inilaca mehanizama reparacije, kao što je nibrin, ime se implicira regulatorna povezanost kompleksa MRE11/RAD50/nibrin sa proteinima FA i u eš e u NHEJ reparaciji (Anderssen i dr. 2004; Nakanishi i dr. 2002).

1.6.5. DIJAGNOSTIKA FA

Specifi na hipersenzitivnost elija FA na DNK-unakrsno-vezuju e mutagene, kao što su: diepoksibutan (DEB), mitomicin C (MMC) i dr, iskoriš ena je u diferencijalnoj dijagnozi ove bolesti, u vidu testova za detekciju hromozomske nestabilnosti, ali i za detekciju zastoja elija FA u G2 fazi elijskog ciklusa. Poligenska osnova FA, kao i veliki broj razli itih mutacija, dodatno otežavaju potvrdu ovog oboljenja na molekularnom nivou. Stoga citogeneti ka analiza fragilnosti hromozoma indukovane DEB-om ili MMC-om, pre svega u kulturama limfocita periferne krvi, predstavlja „zlatni standard“ u inicijalnom skriningu elijskog fenotipa FA kod pacijenata sa klini kom slikom ove bolesti. Kod pacijenata sa pove anom osetljivoš u elija na DNK-unakrsno-vezuju e agense indikovano je sprovo enje komplementacione analize u cilju identifikacije mutiranog gena FA, kao i identifikacija mutacije/mutacija (mutacione analize, analiza sekvence).

U pojedinim slu ajevima citogeneti ka analiza na limfocitima, nakon tretmana može da pokaže postojanje dve populacije elija: elije sa hromozomskim aberacijama i elije bez hromozomskih aberacija, i ta pojava se naziva somatski mozaicizam. Kod ovakvih pacijenata, kao i kod pacijenata sa negativnim rezultatom citogeneti kog testa, a kod kojih više klini kih parametara ukazuje na FA, neophodno je uraditi dodatne analize na istom, odnosno još jednom tkivu pacijenta, u cilju potvrde ili isklju enja mozaika.

1.6.5.1. Analiza hromozomske nestabilnosti

Analiza fragilnosti hromozoma je citogeneti ki test koji je zbog svoje jednostavnosti našao široku primenu u dijagnostici geneti ki vrlo heterogenih naslednih oboljenja. FA je jedna od ovih bolesti, kod kojih broj spontano nastalih hromozomskih aberacija može veoma da varira, tako da na osnovu ovog parametra esto nije mogu e postaviti dijagnozu FA. U tu svrhu se koriste specifi ni mutageni, kao napr. DEB ili MMC, koji mogu da indukuju pove anje stope hromozomskih promena i do nekoliko desetina puta (Wegner i Stumm 1999). Hromozomske aberacije koje se javljaju u elijama FA naj eš e su po tipu: hromozomskih i hromatidnih prekida, acentri nih fragmenata, dicentrika, ring-hromozoma i dr, a posebno je zapaženo prisustvo radijalnih hromozomskih struktura, nastalih razmenama izme u i unutar hromozoma, odnosno hromatida.

DEB je bifunkcionalni alkiliraju i agens, koji može da indukuje formiranje monoalkilovanih produkata DNK, kao i DNK-unakrsnih veza, koje podrazumevaju unakrsne veze tipa: DNK-DNK i DNK-protein (Wen i dr. 2011). Zdrave elije izložene dejstvu DEB-a, ispravljaju ošte enja nastala na molekulu DNK, posredstvom mehanizama reparacije (homologe rekombinacije), dok u elijama FA to nije mogu e. Upravo iz ovih rszloga pacijenti oboleli od FA mogu imati i do nekoliko desetina puta ve i broj hromozomskih aberacija u kariotipu, nakon indukcije DEB-om.

U 15% - 20% pacijenata obolelih od FA na jednom od stupnjeva hematopoeze dolazi do reverzije mutacije, što e rezultirati u pojavi odre enog procenta limfocita bez hromozomskih aberacija u perifernoj krvi (Auerbach i Alter 1989) ovakvih bolesnika. Somatski mozaicizam je pojava koja se vezuje i za druge bolesti hematopoetskih tkiva, a ne samo za FA. Mozai ni fenotip FA se može dijagnostikovati diepoksibutanovim testom (DEB test) na limfocitima periferne krvi, a proveriti ponavljanjem ovog testa na fibroblastima kože kod ovakvih pacijenata (Lo Ten Foe i dr. 1997; Soulier i dr. 2005).

1.6.5.2. Proto no citometrijska analiza elijskog ciklusa

Prou avaju i limfocite FA, Dutrillaux i dr. (1982) su uo ili da postoji izvestan poreme aj u njihovom elijskom ciklusu u odnosu na zdrave elije, odnosno da u G2/M fazi ima oko dva puta više FA elija i da im je ciklus sporiji, u pore enju sa kontrolama. Pojava spontanog zastoja elija obolelih od FA, u G2/M fazi, koji je mogao biti indukovano dejstvom DNK-unakrsno vezuju ih agenasa, je našla primenu u dijagnostici FA (Fabio i dr. 2000; Kaiser i dr. 1982; Kubbies i dr. 1985; Miglierina i dr. 1991). Proto no citometrijskom analizom mogu e je detektovati elije kojima je zbog nemogunosti ispravke ošte enja DNK, posredstvom razli itih regulatornih mehanizama, odložen prelazak iz G2 u M fazu elijskog ciklusa (Schindler i Hoehn 1999). Ovom metodom se relativno brzo može analizirati veliki broj elija, ali je ona ponekad nedovoljno precizna (Schindler i Hoehn 1999).

1.6.5.3. Komet test za detekciju ošte enja DNK

Ostling i Johanson (1984) su bili prvi koji su primenili metod mikrogel-elektroforeze za potrebe merenja jednolan anih prekida na molekulu DNK, koji je kasnije modifikovan (alkalni uslovi) (Singh i dr. 1988) i ozna en kao „gel elektroforeza pojedina nih elija“ (SCGE¹²). Metod se zasniva na kombinaciji dva svojstva DNK: razli ita elektroforetska pokretljivost u zavisnosti od veli ine molekula i mogunost vizuelizacije DNK na gelu (obeležavanje fluorescentnim bojama). Tokom kratke elektroforeze kojoj su bile izložene pojedina ne elije u agaroznom mikrogelu, ošte eni fragmenti negativno naelektrisanog molekula DNK, su putovali brže, odnosno brže migrirali ka anodi, u odnosu na neošte enu DNK. Ova pojava se mogla videti pod fluorescentnim mikroskopom, nakon bojenja, gde je bilo mogu e kvantifikovati relativnu koli inu ošte ene DNK koja je migrirala, u svakoj eliji ponaosob. Metod je modifikovan 1990.god od strane Olive i saradnika i preimenovan u analizu „kometa“ (eng. Comet Assay) zbog vizuelnog efekta DNK (Olive 1989; Olive i dr. 1990). Naime, „glava“ komete koja se sastojala iz kompaktne, neošte ene DNK ve e molekulske mase

¹² SCGE – eng Single Cell Gel Electrophoresis

i „rep“ komete kojeg su inili migriraju u fragmenti, mogli su biti zabeleženi (putem digitalnih slika) i mereni koriš enjem softvera, koji je razvijen posebno u tu svrhu (Olive i dr. 1990; Olive i Banáth 2006). Kombinacijom dva parametra: relativna koli ina DNK u repu i dužina repa, dobijen je moment repa (engl. Tail Moment), kojim se uobi ajeno kvantifikuju ošte enja na molekulu DNK (Olive i dr.1990).

S obzirom na to da je potrebno svega nekoliko hiljada elija za analizu i da je mogu e meriti ošte enje u bilo kojoj vrsti elija sa jedrom, komet test se široko primenjuje (Müller 2007), pogotovu za merenje genotoksi nog dejstva razli itih agenasa na molekul DNK (Olive i Banáth 2006). Alkalnim komet testom mogu e je detektovati kako jednolan ane, tako i dvolan ane prekide i dr. ošte enja DNK. Jonizuju im zra enjem ili delovanjem unakrsno-vezuju ih agenasa, mogu e je indukovati ošte enja u elijama FA, koja su, u odnosu na kontrolne uzorke, znatno ve a, a zatim meriti koli inu ošte enosti, odnosno efikasnost mehanizama popravke DNK (Djuzenova i dr. 2001; Mohseni-Meybodi i dr. 2009; Olive i Banáth 2006). Prednosti komet testa su: jednostavna, laka i brza primena u detekciji ošte enja u svim fazama elijskog ciklusa (ne samo tokom deobe), bez prethodnog kultivisanja elija. Me utim, ova metoda ima izvesna ograni enja koja podrazumevaju uticaj drugih faktora na rezultate analize, kao što su godine ispitanika, zaga enje životne sredine i dr. (Moller i dr. 2000; Moller 2006; Müller 2007).

1.6.5.4. Komplementacione analize

Geneti ka subtipizacija, odnosno determinacija komplementacione grupe FA obi no se sprovodi koriš enjem analize reverznog elijskog fenotipa (senzitivnost na MMC ili analiza zastoja u G2 fazi), dobijenog nakon uvo enja kopije „zdravog“ gena FA u elije obolelog pacijenta, putem retroviralnih vektora (Casado i dr. 2007; Chandra i dr. 2005; Hanenberg i dr. 2002). U nekim slu ajevima, u dijagnosti ke svrhe se može koristiti i „Western blot“ (WB) analiza ekspresije odgovaraju eg gena ili analiza monoubikvitiranog FANCD2 proteina, u cilju otkrivanja uzroka defektne funkcije proteinskog kompleksa FA (Pilonetto i dr. 2009; Soulier i dr. 2005). WB analiza kod obolelih od FA može da utvrdi nedostatak monoubikvitinirane forme FANCD2 ili potpuno odsustvo FANCD2 proteina, što daje neophodne informacije vezane za

pojedine komplementacione grupe. Važno je napomenuti da ova analiza ima izvesna ograničenja (ne mogu se detektovati pacijenti koji pripadaju FA-D1, FA-J i FA-N grupama), zbog čega se preporučuje njeno korišćenje u dijagnostičke svrhe, isključivo uz upotrebu citogenetičkih, citometrijskih i drugih molekularnih testova.

1.6.5.5. Mutacione analize u genima za FA

Komplementacionu grupu kod obolelog od FA, moguće je odrediti i analizom mutacija koje se već javljaju u određenim populacijama (Ameziane i dr. 2008). Mutacione analize su neophodne kako za subtipizaciju pacijenta, tako i za konačnu potvrdu dijagnoze FA (Chandra i dr. 2005). S obzirom na veliki broj komplementacionih grupa i još veći broj različitih mutacija u genima za FA, u upotrebi je nekoliko tehnika molekularne genetike. Za detekciju mutacija u vidu amplifikacija kodiraju ih sekvenci obično se koristi tehnika denaturišuće visokoperformantne te ne hromatografije (DHPLC¹³), dok se detekcija velikih delecija obično vrši primenom tehnike amplifikacije multipnih ligand-zavisnih proba (MLPA¹⁴) (Alter 2008).

1.6.6. TERAPIJA OBOLELIH OD FA

Terapija pacijenata sa FA se zasniva na lečenju simptoma bolesti i usmerena je na popravljavanje funkcije kostne srži. Najviše korišćena za suzbijanje simptoma bolesti je androgena terapija (Diamond i Shahidi 1967; Shahidi i Diamond 1961), dok je transplantacija kostne srži jedina terapija kojom je moguće izlečiti ovakve pacijente. U tom smislu je od presudnog značaja brzo i precizno postavljanje dijagnoze FA kod obolelih još u dečijem uzrastu, odnosno pre nego se razviju teški znaci bolesti.

1.7. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI

Nijmegenov sindrom nestabilnosti (NSN) (eng. Nijmegen Breakage syndrome) (MIM ID # 210900) je retko autozomno recesivno oboljenje čija učestalost varira i

¹³ DHPLC – eng. Denaturing High Performance Liquid Chromatography

¹⁴ MLPA – eng. Multiple Ligation-dependent Probe Amplification

kreće se od 1:95 000 do 1:100 000, zavisno od populacije (Concannon i Gatti 2011). Ovo oboljenje je prvi put opisao naučnik C.M. Weemaes 1981.god i do danas je njegova incidenca ostala nepromenjena, mada najveći broj opisanih slučajeva u literaturi potiče iz Poljske i Češke (Chrzanowska i dr. 1995; Digweed i Sperling 2004; Weemaes i dr. 1981).

1.7.1. KLINIČKE KARAKTERISTIKE NSN

Najčešće fenotipske odlike NSN su prisustvo progresivne mikrocefalije, intrauterini i postnatalni zastoj u rastu i razvoju, nizak rast, rekurentne sinopulmonarne infekcije, kao i veoma povećana predispozicija za razvoj malignih tumora limfnog sistema. Jedna od karakterističnih stigmata ove bolesti je i hipoplazija donje vilice ovih pacijenata, koja se opisuje kao „lice ptičijeg izgleda“, a osim mikrocefalije mogući su i poremećaji u pigmentaciji kože, ovarijalna disgeneza i druge kongenitalne anomalije (slika 3) (Concannon i Gatti 2011).



Slika 3. Pacijent oboleo od NSN (izvor: Chrzanowska i Janniger 2012).

estepulmonarne infekcije kod obolelih od NSN povezane su sa izraženom imunodeficijencijom, kako ćelijskog tako i humoralnog tipa. Kod oko trećine pacijenata javlja se agamaglobulinemija, a smanjen je i procenat CD3+ i CD4+ T-ćelija, koje su

uglavnom otporne na dejstvo mitogena (fitohemoaglutinin), kod ve ine bolesnika (Digweed i Sperling 2004; Hiel i dr. 2000).

Za pacijente NSN je karakteristi no prisustvo spontane, ali i indukovane hromozomske nestabilnosti, sa izraženom osetljivoš u na jonizuju e zra enje, kao i pove anim rizikom za razvoj kancera limfnog sistema (non-Hodgkinov limfom, limfomi T- elija, meduloblastomi, rabdomiosarkomi, akutna limfoblastna leukemija i dr.) (Digweed i Sperling 2004).

1.7.2. HROMOZOMSKA NESTABILNOST KOD OBOLELIH OD NSN

Pacijenti oboleli od NSN imaju približno dva puta ve u osetljivost na jonizuju e zra enje u odnosu na zdrave ljude (van der Burgt i dr. 1996; Weemaes i dr. 1981).

elijska hipersenzitivnost NSN se tako e odnosi i na izlaganje razli itim radiomimetim kim agensima, kao što su: bleomicin, streptonigrin, etopozid i dr, kao i DNK-unakrsno vezuju im agensima (mitomicin C i dr.) (Nove i dr. 1986; Kraakman-van der Zwet i dr. 1999; Sullivan i dr. 1997). Dejstvo ovih faktora se zasniva na produkciji dvolan anih prekida, putem razli itih mehanizama, koje ove elije nisu u mogu nosti da isprave.

Indukovanje dvolan anih prekida dovodi do zastoja u nekoj od faza elijskog ciklusa, koji se ogleda u odlaganju prelaska u narednu fazu, što je regulisano kontrolnim ta kama u elijskom ciklusu. Pored toga, zna ajna karakteristika elijskog fenotipa NSN je i redukovana inhibicija sinteze DNK nakon jonizuju eg zra enja, pojava poznata pod imenom „radiorezistentna sinteza DNK“ (RDS) (Houldsworth i dr. 1980; Taalman i dr. 1983).

Spontana hromozomska nestabilnost u T-limfocitima obolelih od NSN ogleda se u prisustvu estih rearanžmana izme u hromozoma 7 i 14, i to u 10% - 50% metafaza, u regionima gde su locirani geni za imunoglobuline i T- elijski receptor: 7p13, 7q35, 14q11 i 14q32 (Chrzanowska i dr. 1995; Concannon i Gatti 2011; van der Burgt i dr. 1996). Kulture limfocita ovakvih pacijenata pokazuju pove anu u ustalost hromatidnih i hromozomskih prekida, dicentrika i drugih aberacija, u odnosu na normalne elije, što se nakon dejstva mutagenih agenasa višestruko uve ava.

1.7.3. MOLEKULARNA OSNOVA NSN

Metodom pozicionog kloniranja 1998.god. mapiran je gen na dugom kraku hromozoma 8 (8q21.3), čija mutacija dovodi do nastanka NSN. Ovaj gen je ubrzo po otkrivanju nazvan NBS1 (Varon i dr. 1998), ali kada je ustanovljeno da je ovo jedini gen koji se vezuje za NSN, ime gena je preinačeno u *NBN* gen (Concannon i Gatti, 2011). *NBN* gen ima 16 egzona i oko 50 kb genomske DNK. Analize su pokazale da *NBN* gen nosi informaciju za dve vrste iRNK: od 2,4 i 4,4 kb (Carney i dr. 1998; Varon i dr. 1998). U ovarijumu i testisima otkriven je povećan nivo 2,4-kb-iRNK što je ukazivalo na moguću ulogu ovog gena u mejoti kod rekombinacija (Carney i dr. 1998; Matsuura i dr. 1998; Varon i dr. 1998). Protein, kodiran od strane *NBN* gena sastoji se od 754 aminokiseline sa dva domena karakteristična za proteine kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa (karboksi-terminalni i fosfopeptid-prepoznajući domen) i naziva se nibrin. Iste godine kad je grupa naučnika na čelu sa R.Varon klonirala NBS1 gen, jedna druga grupa istraživača (Carney i dr. 1998) otkrila je gen koji kodira protein reparacionog kompleksa dvolanjskih prekida (MRE11/RAD50) prethodno označen kao p95. Poređenjem komplementarnih DNK p95 i NBS1 došlo se do zaključka da su istovetni (Carney i dr. 1998; Varon i dr. 1998).

Molekularne analize pacijenata obolelih od NSN su pokazale da je delecija 5 bp u egzonu 6 (c.657_661del5) (tabela 3), najčešća mutacija u *NBN* genu, čije homozigotno prisustvo uzrokuje ispoljavanje bolesti kod čak > 90% bolesnika slovenskog porekla (Poljska, Češka, Rusija, Ukrajina i dr.) (Matsuura i dr. 1998; Resnick i dr. 2003; Tekin i dr. 2002; Varon i dr. 1998). Manji broj ovih pacijenata su složeni heterozigotni nosioci za c.657_661del5 i neku drugu mutaciju, a još je ređaja pojava da su homozigotni nosioci drugih retkih mutacija (Concannon i Gatti 2011). Kod obolelih iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) c.657_661del5 mutacija je u 70% slučajeva prisutna u homozigotnom stanju, dok se u 15% javlja u kombinaciji sa drugim retkim mutacijama, koje se u homozigotnom stanju nalaze kod preostalih 15% bolesnika (tabela 3) (Concannon i Gatti 2011; Warcoin i dr. 2009). Razlog visoke učestalosti c.657_661del5 mutacije u populacijama Slovena leži u poreklu ove populacione grupe (prisustvu mutacije u

osniva koj populaciji slovenske grupe naroda i efektu osniva a) (Concannon i Gatti 2011).

Tabela 3. Mutacije u NBN genu.

Mutacija	Egzon	Promena aminokiseline u proteinu	Broj porodica sa obolelim od NSN – poreklo
c.330T>G	4	p.Tyr110X	1
c.643C>T	6	p.Arg215Trp	1 - eško
c.657_661del5 (657del5)	6	p.Lys219AsnfsX15	>90% - Slovensko
c.681delT	6	p.Phe228LeufsX3	1 - Rusko
c.698_701del4	6	p.Lys233SerfsX4	2 - Englesko
c.741_742dup (742insGG)	7	p.Glu248GlyfsX5	1 - Italijansko
c.835_838del4	7	p.Gln279ProfsX1	1 - Italijansko
c.842insT	7	p.Leu281PhefsX3	1 - Meksi ko
c.900del25	8	p.Gly301LysfsX5	1 - Marokansko
c.976C>T	8	p.Gln326X	1 - Dansko
c.1089C>A	9	p.Tyr363X	3 - Pakistansko
c.1125G>A	10	p.W375X	1
c.1142delC	10	p.Pro381GlnfsX22	2 - Kanadsko

1.7.4. NIBRIN PROTEIN – STRUKTURA I FUNKCIJA

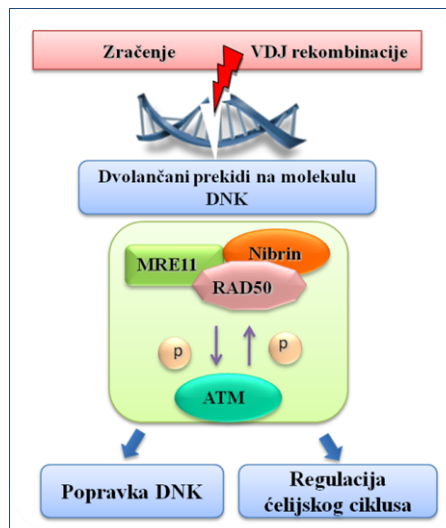
Nibrin (p95) je protein koji se sastoji od 754 aminokiseline i eksprimira se u svim tkivima (Concannon i Gatti 2011). Na svom N-terminalnom kraju nibrin sadži dva domena: domen koji služi za prepoznavanje fosfopeptida (FHA¹⁵) i domen koji je zajedno sa prethodnim uključen u procese regulacije ćelijskog ciklusa (BRCT¹⁶) (Dong i dr 1999). Naime, nibrin predstavlja deo MRE11-RAD50-nibrin proteinskog kompleksa koji igra važnu ulogu u prepoznavanju i popravci dvolananih prekida DNK, a njegovo odsustvo ima letalni efekat (Hisama i dr. 2003).

¹⁵ FHA – eng. „forkhead associated“

¹⁶ BRCT – eng. „breast cancer carboxy-terminal“

Posledica naj eš e mutacije, delecije 5 bp u egzonu 6 *NBN* gena (c.657_661del5) je pomeranje okvira itanja, što u procesu transkripcije, odnosno translacije uzrokuje ranu terminaciju originalnog proteinskog lanca (Digweed i Sperling 2004). Kao rezultat ove promene dobijaju se dva proteinska fragmenta: kratki, najverovatnije nefunkcionalni „N-terminalni“ protein od oko 26 kDa i dugi „C-terminalni“ protein od oko 70 kDa, nastao alternativnim okvirom itanja (Uhrhammer i dr. 2002). C-terminalni proteinski fragment je delom aktivan, što najverovatnije ima suprimiraju e dejstvo na letalni efekat nedostatka obe normalne kopije gena (Digweed i Sperling 2004).

Dvolan ani prekidi molekula DNK predstavljaju lezije kriti ne za opstanak elije i važan su izvor mutacija i hromozomskih aberacija, kao i V(D)J rekombinacija gena za imunoglobuline i T- elijske receptore (slika 4) (Ries i Digweed, 1999).



Slika 4. Šematski prikaz funkcije nibrina.

U eliji postoje kontrolni mehanizmi za detekciju i ispravku dvolan anih prekida u ijem središtu se nalazi ataksija-telangiektazija-mutirana (ATM^{17}) protein kinaza. ATM svojom kinaznom funkcijom aktivira itav niz regulatornih proteina (p53, CHK1, CHK2, BRCA1) me u kojima je i nibrin, a u zavisnosti od njihovog odgovora dešava se zastoj u G1 ili G2 fazi elijskog ciklusa radi reparacije ošte enja, ili elija podleže

¹⁷ ATM – engl. ataxia-telangiectasia mutated,

apoptozi (Digweed i Sperling 2004). Fosforilacija nibrina, inicirana FHA i BRCT domenima, dovodi do konformacione promene MRE11-RAD50-nibrin kompleksa, interakcije sa H2AX histonom i njegovog regrutovanja na mesto popravke dvostranog prekida.

S obzirom da proteinu nibrinu, u obojama obolelih od NSN, nedostaje dugi fragment sa regulatornim domenima, onemogućena je interakcija sa H2AX histonom, kao i aktivacija nibrina putem ATM kinaze. Defektna funkcija MRE11-RAD50-nibrin kompleksa rezultira u poremećajima u odgovoru na dvostrane prekinute DNK i regulaciji elijskog ciklusa, kao i u povišenim nivoima reaktivnih vrsta kiseonika (eng. Reactive Oxygen Species, ROS) koji dovode do oksidativnog stresa (Krenzlin i dr. 2012). Krajnja posledica ovih promena je aktivacija onkogenih i kancerogeneza.

Homologe rekombinacije u mejozi, u osnovi su inicirane, tako i dvostranim prekidima, što u slučaju NSN dovodi do defekta mejoze i najverovatnije vodi ka gonadalnoj disgenezi i infertilitetu (Digweed i Sperling 2004). Uzroke imunodeficijencije ovih pacijenata treba tražiti u ulozi nibrina u rekombinacijama V, D i J gena za lake i teške lance imunoglobulina, kao i za receptore B- i T-limfocita, a koje su osnovni izvor varijabilnosti ovih proteina i osnova potentnosti imunog odgovora (Digweed i Sperling 2004; Kracker i dr. 2005). Poremećena funkcija nibrina dovodi do defekata i oštećenih grešaka u sistemu V(D)J rekombinacija, što za posledicu ima smanjenje nivoa efikasnosti imunog odgovora (Digweed i Sperling 2004; Kracker i dr. 2005).

1.7.5. DIJAGNOSTIKA NSN

S obzirom na kliničku heterogenost NSN i dosadašnje podatke vezane za elijski fenotip i molekularnu osnovu, nekoliko metoda je našlo primenu u dijagnostici ove bolesti, a to su: analiza hromozomske nestabilnosti, protinocitometrijska analiza elijskog ciklusa i molekularna analiza prisustva/odsustva mutacija u *NBN* genu.

1.7.5.1. Analiza hromozomske nestabilnosti

Analiza hromozomskih prekidina i rearanžirana predstavlja jednu od najčešće primenjenih metoda u dijagnostici bolesti hromozomske nestabilnosti, među kojima je

i NSN. Spontana stopa hromozomskih aberacija, koje uključuju hromozomske i hromatidne prekide, acentrične fragmente, dicentrike i dr., a posebno translokacije, inverzije, izohromosome i druge rearanžirane izme u hromozoma 7 i 14, može da varira i kreće se od 10% do 50% (Concannon i Gatti 2011). Ova inicijalna hromozomska nestabilnost može biti povešana kako dejstvom jonizujućeg zračenja (dva puta), tako i dejstvom različitih radiomimetika, kojoj grupi pripada i bleomicin (Kraakman-van der Zwet i dr. 1999).

Bleomicin je po strukturi glikopeptid sa svojstvom antibiotika, a izaziva jednolanane i dvolanane prekide u molekulu DNK, posredstvom svog helatnog kompleksa i kiseonika, odnosno produkcijom slobodnih radikala (Chen i dr. 2008). Zbog slabog odgovora limfocita na mitogeno dejstvo fitohemoaglutinina i samim tim smanjene proliferacije elija, citogenetičku analizu je ponekad teško sprovesti. Tada se pribegava drugim metodama dijagnostikovanja NSN, kao što je analiza elijskog ciklusa ili molekularna analiza prisustva/odsustva najčešće c.657_661del5 mutacije.

1.7.5.2. Prototipna citometrijska analiza elijskog ciklusa

Zastoj elija u G2 fazi elijskog ciklusa predstavlja, pored hromozomske nestabilnosti još jedan od indikatora neispravljenog oštećenja molekula DNK. Prototipni citometrijski test ima dve velike prednosti: analizom su obuhvaćene elije u svim fazama elijskog ciklusa i može se detektovati veliki broj elija (50.000 – 100.000) (Schindler i Hoehn 1999). Bazični zastoj u G2 fazi može biti povešan primenom jonizujućeg zračenja ili dejstvom hemijskih mutagena. Nedostaci ove metode su da nije uvek precizna i da nije moguća detekcija dijagnostički relevantnog prisustva rearanžirane izme u hromozoma 7 i 14 (Schindler i Soneck 1999).

1.7.5.3. Molekularna analiza mutacija u *NBN* genu

Kada je 1998.god. identifikovan i sekvenciran gen odgovoran za sintezu nibrina, identifikovane su i mutacije koje dovode do nastanka NSN (Varon i dr. 1998). S obzirom da se za mutaciju c.657_661del5 može reći da je daleko najučestalija mutacija u *NBN* genu, pogotovo kod bolesnika slovenskog porekla, to dodatno olakšava pristup u molekularnoj dijagnostici NSN (Concannon i Gatti 2011; Drábek i dr. 2002). Samo je

detekcijom mutacije u *NBN* genu obolelog mogu e i definitivno potvrditi dijagnozu NSN. Ovom analizom pored homozigotnih, mogu e je detektovati i heterozigotne nosioce mutacije, što može biti iskoriš eno u prenatalnoj dijagnostici u porodicama obolelih.

1.7.6. TERAPIJA OBOLELIH OD NSN

Uprkos zna ajnom napretku medicine, za NSN koje predstavlja veoma teško oboljenje sa letalnim posledicama, trenutno ne postoji terapija. Ve ina obolelih je dijagnostikovana kasno, sa ve razvijenom neoplazijom, esto i kao sekundarna posledica radio- ili hemoterapije.

Rano postavljanje precizne dijagnoze kod obolelih od ovih teških bolesti, kao što su: NSN i FA, od presudnog je zna aja za budu i tretman bolesnika, pre svega u smislu prevencije razvitka tumora. S obzirom na veliku heterogenost i variranje parametara klini ke slike kod ovakvih pacijenata, neophodno je sprovo enje laboratorijskih testova u cilju potvrde ili isklju enja dijagnoze kod svih pacijenata sa klini kom sumnjom da boluju od jedne od ovih bolesti.

2. CILJEVI

Cilj ove studije je bio da se kod pacijenata sa kliničkom FA i NSN, primenom savremenih metoda citogenetike, citometrije i molekularne genetike, omogući neophodna potvrda ili isključenje kliničkih postavljene dijagnoze bolesti.

2.1. FANKONIJEVA ANEMIJA

Kod bolesnika sa kliničkim znacima FA postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi u cilju potvrde ili isključenja FA kroz:
 - a) proučavanje spontane hromozomske osetljivosti na osnovu sledećih parametara: procenat aberantnih elija, broj prekida/ eliji, indeks fragilnosti hromozoma;
 - b) proučavanje DEB-om indukovane hromozomske osetljivosti (DEB test), određivanjem vrednosti parametara kao što su: procenat aberantnih elija, broj prekida/ eliji, broj prekida/aberantnoj eliji, broj prekida/multiaberantnoj eliji i indeks fragilnosti hromozoma, u cilju:
 - definisanja raspona vrednosti ovih parametara,
 - klasifikovanja bolesnika,
 - razlikovanja pacijenata sa mozaičnim fenotipom u odnosu na nemozaičan oblik FA,
 - utvrđivanja uticaja dužine trajanja indukcije na hromozomsku nestabilnost.
2. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u kulturama fibroblasta kože u cilju potvrde ili isključenja mozaičnog fenotipa FA dobijenog na limfocitima: definisanje parametara hromozomske osetljivosti (procenat aberantnih elija i broj prekida/ eliji) u fibroblastima.

3. Analiza oštećenja DNK u limfocitima periferne krvi primenom komet testa: određivanje raspona vrednosti Olive-momenta repa.
4. Analiza zastoja limfocita periferne krvi i fibroblasta kože u G2 fazi ćelijskog ciklusa: utvrđivanje vrednosti procenta ćelija u G2 fazi.
5. Izdvajanje pacijenata sa fenotipom FA dijagnostikovanim na osnovu svih gore navedenih analiza, u cilju određivanja komplementacionih grupa i potvrde konačne dijagnoze FA.

2.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI

Ciljevi citogenetičkih i molekularnih analiza kod bolesnika sa kliničkom slikom NSN su bili:

1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi u cilju potvrde ili isključenja fenotipa NSN:
 - a) određivanje raspona vrednosti parametara hromozomske osetljivosti limfocita indukovane BLC-om: procenat aberantnih ćelija, broj prekida/ćelija, procenat ćelija sa strukturnim aberacijama i dr,
 - b) klasifikacija bolesnika na osnovu gore navedenih parametara.
2. Molekularna analiza prisustva ili odsustva c.657_661del5 mutacije kod pacijenata sa NSN u cilju konačne potvrde dijagnoze bolesti, kao i utvrđivanje statusa nosioca za ovu mutaciju u porodicama obolelih.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

U ovoj studiji su korišteni uzorci periferne krvi i biopsije kože od ukupno 100 pacijenata sa kliničkim znacima FA (90) i NSN (10), koji su bili upućeni u Laboratoriju za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Upi“, u cilju potvrde kliničke dijagnoze.

Klinički parametri kao što su: aplastična anemija, pancitopenija, nizak rast i druge anomalije, koji su ukazivali na FA, bili su prisutni kod ukupno 90 bolesnika pretežno dečijeg uzrasta. Preostalih deset bolesnika, takođe mladih od 18 godina, imalo je kliničke znake NSN, kao što su: mikrocefalija, izrazita imunodeficijentnost, lice „ptičijeg izgleda“ i dr. Za potrebe analize, kao kontrolni uzorci korišćeni su limfociti periferne krvi i fibroblasti kože preko 100 klinički zdravih osoba, uglavnom zdravih članova porodice (roditelji) obolelih.

3.2. METODE

3.2.1. FANKONIJEVA ANEMIJA

3.2.1.1. Metode citogenetičke analize

3.2.1.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturi limfocita periferne krvi primenom DEB testa

Analiza senzitivnosti limfocita pacijenata sa kliničkom slikom FA, na DNK-unakrsno vezujuće dejstvo DEB-a, sprovedena je korišćenjem standardnih metoda uz izvesne modifikacije (Auerbach 1988; Auerbach 2003; Wegner i Stumm 1999). Postavljane su netretirane i DEB-om tretirane kulture limfocita periferne krvi pacijenata, pod istim uslovima kao i kulture limfocita zdravih osoba (članova porodice).

Limfociti su tretirani DEB-om poslednjih 24h i 48h kultivacije u finalnoj koncentraciji od 0,1 µg/ml (Wegner i Stumm 1999). Nakon 70h kultivacije dodavan je

kolcemid (finalna koncentracija: 2,5 µg/ml) i preparacija hromozoma je urađena prema standardnom protokolu (Wegner i Stumm 1999).

Za svakog pacijenta, za dva različita vremena indukcije DEB-om analizirano je po 50 – 100 metafaznih figura na prisustvo hromozomskih/hromatidnih prekida i aberacija. Analiza kariotipa svih pacijenata urađena je primenom tehnike G traka (ISCN¹⁸ (2009)). Hromatidni i hromozomski prekidi, kao i acentrični fragmenti računani su kao jedan prekid, dicentrični i ring hromozomi kao dva prekida, a radijalne strukture su brojane kao dva i više prekida u zavisnosti od broja hromozoma uključenih u formiranje strukture (Wegner i Stumm 1999). Parametri procene hromozomske nestabilnosti bili su: procenat aberantnih elija, broj prekida po eliji, broj prekida po aberantnoj eliji, broj prekida po multiaberantnoj eliji, indeks fragilnosti hromozoma i dr. (Auerbach 1988; Auerbach 2003; Castella i dr. 2011; Wegner i Stumm 1999).

3.2.1.1.1.1. Kultivisanje limfocita periferne krvi i indukcija DEB-om

Uzorak od 3 ml periferne krvi (0,5 ml rastvora heparina¹⁹ sa 2,5 ml krvi) se zasadi u šest sterilnih epruveta sa po 4,5 ml prethodno pripremljene hranljive podloge (RPMI 1640 sa 20% seruma (FBS²⁰), 1% antibiotika (streptomycin i penicilin) i 1% fitohemoaglutinina (PHA²¹)) i položi u termostat na 37 °C. Dve limfocitne kulture (u epruvetama) se ostave netretirane, dok se u dve kulture nakon 24h kultivacije (48-časovni tretman), a u preostale dve epruvete nakon 48h kultivacije (24-časovni tretman) dodaje po 50 µl radnog rastvora DEB-a (10 µg/ml), da bi se postigla finalna koncentracija od 0,1 µg/ml, i ostave u mraku.

¹⁸ ISCN – eng. International System for Cytogenetic Nomenclature (prev. Internacionalni sistem za citogenetičku nomenklaturu)

¹⁹ Rastvor heparina (antikoagulansa) - 20% rastvor heparina (5000 i.j.) u fiziološkom rastvoru

²⁰ FBS – eng. Foetal Bovine Serum

²¹ PHA – eng. phytohaemoagglutinin

3.2.1.1.1.2. Preparacija hromozoma iz limfocita periferne krvi

Nakon 70 h kultivacije u netretirane i DEB-om tretirane kulture se ubaci kolcemid (radni rastvor 12,5 µg/ml) u finalnoj koncentraciji od 2,5 µg/ml. Dva sata od ubacivanja kolcemida, kulture u epruvetama se resuspenduju i centrifugiraju 10 min na 25000 obrtaja. Odlije se supernatant i talogu doda 1ml hipotoni nog rastvora (5,6% KCl i 3,8% Na-citrat u odnosu 1 : 1), resuspenduje, doda još 9 ml istog hipotoni nog rastvora i ostavi u termostatu 20 min na 37°C. U svaku epruvetu se doda po 5 kapi tritona i centrifugira na 2500 obrtaja 10 min. Supernatant se odlije, a talogu doda 1 ml fiksativa (CH₃COOH i CH₃OH u odnosu 1 : 3), resuspenduje, dopuni fiksativom do 10 ml i ostavi na sobnoj temperaturi 20 min. Zatim sledi centrifugiranje na 2500 obrtaja 10 min, supernatant se odlije, talogu doda 1 ml fiksativa, resuspenduje i centrifugira na 2500 obrtaja 10 min. Supernatant se odlije, a talogu, zavisno koliko ga ima, doda 3 – 4 kapi fiksativa i 3 – 4 kapi 60% sir etne kiseline. Na istu prethodno ohla enu i opranu staklenu plo icu stavi se 2 – 3 kapi materijala i suši preko plamena.

Bojenje hromozoma po Gimzi se vrši tako što se „Gimza“ boja rastvori u fosfatnom puferu pH 7,6 (4,14 g Na₂HPO₄ i 0,35 g KH₂PO₄ u 500 ml destilovane vode) u odnosu 1 : 10 i tako napravljenim rastvorom preparat boji 7 – 10 min.

3.2.1.1.1.3. Tehnika G traka

Bojenje hromozoma tehnikom G traka se radi tako što se preparat izloži dejstvu rastvora 0,25% tripsina i GKN-a (80 mg NaCl, 4 mg KCl i 10 mg glukoze u 10 ml destilovane vode) u odnosu 1 : 1 u trajanju od 1 – 2 sekunde, zatim ispira fosfatnim puferom pH 6,8 (2,78 g Na₂HPO₄ i 0,48 g limunske kiseline u 500 ml destilovane vode) i boji rastvorom Gimze 7 – 10 min.

3.2.1.1.1.4. Analiza kariotipa i hromozomskih aberacija

Analizira se 50 – 100 metafaznih figura obojenih Gimza rastvorom (prebrojavanje i konvencionalna analiza hromozoma) na prisustvo: hromatidnih i hromozomskih prekida, dicentrika, acentri nih fragmenata, ring hromozoma, radijalnih struktura i dr, a potom se hromozomi oboje tehnikom G traka i analizira kariotip bolesnika na 11 metafaza (finiji strukturni rearanžmani).

3.2.1.1.1.5. Statisti ke analize

² testom (u Microsoft Excel programu) se testira polazna hipoteza da su nalazi pacijenata i kontrole isti, i to upore ivanjem procenta aberantnih elija pacijenata sa procentom na enim u kontroli. Rezultat analize DEB testom se smatra pozitivnim (odbacuje se polazna hipoteza) ukoliko je vrednost verovatno e, da su nalazi pacijenta i kontrole isti, manja od 0,05 ($p < 0,05$). *t*-nezavisnim i Mann-Whitneyjevim testovima (u Statistica programu) se proverava polazna hipoteza da nema razlike me u nalazima bolesnika grupisanih prema vrednostima: procenta aberantnih elija, broja prekida po eliji i dr. (pozitivni i negativni na DEB testu). Smatra se da izme u odre enih grupa bolesnika postoji statisti ki zna ajna razlika (odbacuje se polazna hipoteza) ukoliko je vrednost verovatno e manja od 0,05 ($p < 0,05$).

3.2.1.1.2. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturi fibroblasta kože primenom DEB testa

U cilju potvrde ili isklju enja mozaika kod pacijenata sa klini kim znacima FA ura ena je analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa u kulturi fibroblasta kože koriš enjem standardnog protokola (Auerbach 2003) uz izvesne modifikacije. Kao kontrolni uzorci koriš eni su fibroblasti kože zdravih osoba. U poslednjih 24 h kultivacije fibroblasti su tretirani DEB-om u finalnoj koncentraciji od 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (Auerbach 2003). Kulturama je dva sata pre preparacije dodavan kolcemid (finalna koncentracija: 5 $\mu\text{g/ml}$) i preparacija hromozoma je sprovedena prema standardnom protokolu (Auerbach 2003).

Analizirano je najmanje 20, a najviše 100 metafaznih figura iz svake kulture na prisustvo hromozomskih aberacija, a parametri procene hromozomske nestabilnosti su bili: procenat aberantnih elija, broj prekida po eliji i dr. (Auerbach 2003).

3.2.1.1.2.1. Kultivisanje fibroblasta kože i indukcija DEB-om

Uzorak dobijen biopsijom kože se ise e sterilnim skalpelom na sitne komade i prebaci u dva sterilna suda (Nunc – 25 cm^3), koji se ostave da odstoje 4h-6h, kako bi se komadi i kože zalepili za dno suda. Potom se sudovi naliju sa 5ml hranljive podloge (HAM F-10 sa 20% FBS i 1% antibiotika) i kultivišu u termostatu na 37°C. Podešavanje

pH u kulturama fibroblasta kože se postiže aeriranjem smešom gasa (CO₂ 4,8 vol%, O₂ 4,8 vol% i do 100 vol% N₂), a podloga se u sudovima menja u zavisnosti od rasta elija. Pasaža kulture se vrši tripsin-EDTA rastvorom kojim se elije odlepe sa dna suda, zatim im se doda hranljiva podloga i prebace se u potreban broj sudova.

Kultura fibroblasta se ostavi netretirana u bar jednom sudu, dok se u dve kulture 24 h pre preparacije doda po 50 µl rastvora DEB-a (1 µg/ml), da bi se postigla finalna koncentracija od 0,01 µg/ml, i tretirane kulture se ostave u mraku.

3.2.1.1.2.1. Preparacija hromozoma iz fibroblasta kože

Dva sata pre preparacije u kulture fibroblasta se ubacuje kolcemid u finalnoj koncentraciji 5 µg/ml. Nakon dejstva kolcemida kulturama se dodaje rastvor tripsin-EDTA (2 ml), kako bi se elije odlepili sa dna suda. Zatim se elijama u rastvoru tripsina doda hranljiva podloga i itav sadržaj suda prebaci u epruvete. elije se centrifugiraju 5 min na 1600 obrtaja. Supernatant se dekantira, doda 3 – 4 kapi hipotoni nog rastvora (kao kod preparacije limfocita), zatim nalije do 2 ml ovog istog rastvora, resuspenduje i stavi u termostat 20 min na 37 °C. Smeša se centrifugira 5 min na 1600 obrtaja, supernatant dekantira, a talogu doda fiksativ do 1 ml, resuspenduje i ostavi na sobnoj temperaturi 20 min. Ponovo se centrifugira 5 min na 1600 obrtaja, supernatant dekantira, a talogu doda 2 – 3 kapi fiksativa i 1 – 3 kapi 60% CH₃COOH. Materijal se na kraju nanosi u kapima na hladne i oprane staklene plo ice i suši na plamenu.

Bojenje hromozoma po Gimzi, tehnika G traka i analiza hromozomskih aberacija se sprovodi isto kao i u kulturi limfocita.

3.2.1.2. Analiza ošte enja DNK primenom komet testa

Analiza elektroforezom pojedina nih elija, nazvana još i analiza komet testom, je metoda koja se koristi za izu avanje ošte enja na molekulu DNK, a koju su 1984. god razvili nau nici O. Ostling i K.J. Johanson. Singh i saradnici (1988) su modifikovali metodu tako da se pored dvolan anih, mogu detektovati i jednolan ani prekidi DNK,

koriš enjem alkalnih uslova elektroforeze pri kojima dolazi do denaturacije molekula DNK.

Iz uzorka periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom FA i zdravih osoba (kontrola) na gradijentu inertnog rastvora polisaharida (Histopaque 1077) izolovani su limfociti (i dr. mononuklearne elije) koji su odmah zamrznuti na -196 C° . Ovako zamrznuti uzorci su uvani do dve godine, a zatim odmrzavani i kultivisani. U kulturama odmrznutih limfocita ispitivana je senzitivnost elija na DEB, pod istim uslovima kao i u kulturi svežih limfocita periferne krvi.

Alkalnim komet testom analizirana su spontana i DEB-om indukovana ošte enja u kulturama limfocita pacijenata i zdravih kontrola. U svakom uzorku je analizirano po 50 elija, i to za vrednosti momenta repa prema Olive i saradnicima (1990) (OTM²²). U prikazu rezultata je koriš ena srednja vrednost momenta repa svih elija u analiziranom uzorku (OTM).

3.2.1.2.1. Izolacija i zamrzavanje mononuklearnih elija periferne krvi

U izolaciji mononuklearnih elija (limfocita) iz periferne krvi koriš ena je metoda centrifugiranja na gradijentu inertnog polisaharida (Histopaque 1077) (Boyum 1968) uz izvesne modifikacije. Uzorak krvi dobijen od pacijenata i zdravih kontrola u proseku je iznosio od 6 – 8 ml, i sadržao je dovoljan broj limfocita (više od 2×10^6), neophodnih za dalje analize.

Histopaque 1077 se sipa u sterilne epruvete (po 4 ml). Dobijeni uzorak od 6 ml periferne krvi (1 ml antikoagulansa sa 5 ml krvi) se razblaži fiziološkim rastvorom u odnosu 1 : 2. Razblažena krv se polako sipa u epruvete sa Histopaqueom do 10 ml, tako da se ne probije gradijent (odnos Histopaquea i razblažene krvi je 1 : 1,5). Zatim se centrifugira 10 min, na 1200 obrtaja, i odmah potom 15 min na 3000 obrtaja. Pipetom se polako pokupi prsten limfocita i prebaci u sterilnu epruvetu. Zatim se elijama doda hranljiva podloga (HAM F-10) i centrifugiraju se 10 min na 2000 obrtaja, odlije se

²² OTM – eng. Olive Tail Moment

supernatant i talogu doda 1 ml hranljive podloge. elije se broje na hemocitometru i u koncentraciji od 1×10^6 /ml hranljive podloge (HAM F-10) sa 10% FBS, prebacuju u krioeprovete, u koje se dodaje 8% DMSO, i elije podležu dubokom zamrzavanju u automatizovanom sistemu.

3.2.1.2.2. Odmrzavanje i kultivacija mononuklearnih elija

Uzorci limfocita koji su uvani na $-196\text{ }^\circ\text{C}$ u te nom azotu, se odmrzavaju i kultivišu po istom principu kao i limfociti iz sveže krvi.

Epruvete sa zamrznutim elijama se trenutno odmrznu izlaganjem temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ i elijama se odmah doda hranljiva podloga (HAM F-10). Zatim se centrifugiraju 10 min na 1800 obrtaja. Odlije se supernatant i talogu doda hranljiva podloga, resuspenduje i ponovo centrifugira 10 min na 1800 obrtaja. elije se izbroje na hemocitometru i podesi koncentracija od $> 300\ 000$ elija u 1 ml kompletne podloge (RPMI 1640 sa 20% FBS, 1% antibiotika i 1% PHA) za 72- asovnu kultivaciju u termostatu na $37\text{ }^\circ\text{C}$. elije se tretiraju DEB-om kao i u slu aju kulture limfocita iz sveže krvi. Dejstvo DEB-a se prekida ispiranjem elija podlogom (centrifugiranje 10 min na 2000 obrtaja i odbacivanje supernatanta). Talog elija se, zatim rastvori u 1 ml hranljive podloge, elije se izbroje na hemocitometru i podesi koncentracija od 200 000 do 500 000 elija/ml.

3.2.1.2.3. Metoda alkalnog komet testa

Metodom alkalnog komet testa (Singh i dr. 1988) analizirano je prisustvo ošte enja DNK u netretiranim i DEB-om (24h i 48h) tretiranim kulturama odmrznutih limfocita pacijenata i zdravih kontrola.

I dan:

- priprema staklenih plo ica i gela:
 - ✓ staklene plo ice se urone u apsolutni metanol i tako stoje 3 h,
 - ✓ zatim se plo ice spale, suve potope u 1% agarozu sa normalnom ta kom topljenja (eng. normal melting point, NMP) i ostave da se suše preko no i.

II dan:

- dalja priprema plo ica i nanošenje elija:
 - ✓ na ovako pripremljene plo ice se nanese sloj 1% NMP agaroze (80 μ l) i preko se stavi pokrovno staklo,
 - ✓ plo ice se stave u frižider na +4 °C 5 min, nakon ega se uklanja pokrovno staklo,
 - ✓ elije u hranljivoj podlozi se prebace u ependorf-epruvete i centrifugiraju 10min na 2000 obrtaja,
 - ✓ supernatant se dekantira, a talog od 60 μ l resuspenduje i podeli u dve ependorf-epruvete (po 30 μ l),
 - ✓ 30 μ l elija se pomeša sa 70 μ l 1% LMP (eng. low melting point) agaroze sa niskom ta kom topljenja, nanosi na sloj 1% NMP agaroze na plo ici i pokriva pokrovnim staklom,
 - ✓ plo ice se stave u frižider na +4 °C 5 min, nakon ega se uklanja pokrovno staklo.
- Liza elija:
 - ✓ plo ice se zatim stave u kadicu za lizu,
 - ✓ preko plo ica se sipa rastvor za lizu pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris i 1% Triton X-100), i tako ostave 1 h na +4 °C u mraku,
- alkalna denaturacija DNK:
 - ✓ odlije se rastvor za lizu i plo ice prebace u kadicu za elektroforezu,
 - ✓ zatim se u kadicu doda 1 L elektroforetskog pufera (30 ml 10 M NaOH, 5 ml 0,2 M EDTA i do 1 L dest. vode) i ostavi na +4 °C 20 min.
- elektroforeza:
 - ✓ elektroforeza traje 20 min na +4 °C pri naponu od 0,5 – 1 V/cm;

- neutralizacija:
 - ✓ neutralizacija se vrši 15 min u puferu za neutralizaciju pH 7,5 (48,44 g Tris i do 800 ml dest. vode);
- bojenje:
 - ✓ na svaki gel se nanosi po 20 μ l etidijum bromida (5 μ g/ml u dest. vodi) i pokrije se pokrovnim staklom;
- analiza kometa:
 - ✓ pod fluorescentnim mikroskopom se analiziraju oštećenja DNK u vidu kometa, u 50 nasumično izabranih ćelija, primenom softvera Comet IV;
- statističke analize:
 - ✓ u Microsoft Excel programu se računaju osnovni statistički parametri (srednja vrednost, standardna devijacija i dr.) i vrednost oštećenja DNK u uzorku ćelija predstavlja u vidu srednje vrednosti Olive-momenta repa (OTM) za svih 50 ćelija,
 - ✓ testiranje grupa bolesnika vršeno je u Statistica programu, kao u prethodnim analizama.

3.2.1.3. Protočno citometrijska metoda analize ćelijskog ciklusa

Protočno citometrijska analiza DNK predstavlja metodu kojom se meri sadržina DNK u ćeliji, te na osnovu toga određuje faza ćelijskog ciklusa i broj ćelija u njoj (Ormerod 2000). S obzirom da je poznato (Dutrillaux i dr. 1982) da u ćelijama obolelih od FA dolazi do specifičnog zastoja u G2 fazi, za potrebe analize postavljane su kulture ćelija bolesnika sa kliničkom slikom FA i zdravih kontrola, i ispitan njihov ćelijski ciklus prema nešto modifikovanoj proceduri (Moreira i dr. 2008; Ormerod 2000; Schindler i Hoehn 1999).

3.2.1.3.1. Kultivisanje limfocita periferne krvi i priprema za analizu

Uzorci periferne krvi (3ml krvi sa rastvorom heparina) pacijenata i kontrola se zasade u hranljivoj podlozi (RPMI 1640, 20% FBS, 1% antibiotika i 1% PHA) sli no kao u slu aju citogeneti ke analize DEB testom (u šest epruveta). Dve kulture se ostave netretirane 72h, a u etiri kulture se odmah po sa enju dodaje DEB (finalna koncentracija 0,1 µg/ml). Tretman se prekida u dve kulture posle 24 h, a u preostale dve nakon 48 h, i to ispiranjem elija u fiziološkom rastvoru (po 5 ml i centrifugiranjem na 2000 obrtaja 5 min).

Priprema suspenzije limfocita:

- ✓ elije se centifugiraju u zagrejanom fiziološkom rastvoru 10 min na 2000 obrtaja i reuspenduju,
- ✓ supernatant se odlije, talogu elija doda 1 ml fiziološkog rastvora i resuspenduje,
- ✓ zatim se do 10 ml doda fiksativ i centrifugira na 2000 obrtaja 10 min (ovaj korak ponoviti još jednom),
- ✓ kada talog bude beli ast doda se 70% etanola do 10 ml i centrifugira na 2000 obrtaja 10 min,
- ✓ odlije se supernatant, talogu se doda 2 ml 96% etanola i uva se na -20 °C do analize.

3.2.1.3.2. Kultura fibroblasta kože i priprema za analizu

Fibroblasti kože se prema ve opisanoj proceduri kultivišu u tri suda: jedan su je netretiran, u jednom se DEB (finalna koncentracija 0,01 µg/ml) drži 24 h i jedan sud gde tretman DEB-om traje 48 h. Dejstvo DEB-a se prekida ispiranjem elija u fiziološkom rastvoru (po 5 ml i centrifugiranjem na 2000 obrtaja 5min).

Priprema suspenzije fibroblasta:

- ✓ elije se centifugiraju u zagrejanom fiziološkom rastvoru 10 min 2000 obrtaja i reuspenduju,

- ✓ supernatant se odlije, talogu doda po 10 ml 70% etanola i centrifugira na 2000 obrtaja 10 min,
- ✓ odlije se supernatant, talogu doda 2 ml 96% etanola i čuva na -20 °C do analize.

3.2.1.3.3. Analiza elijskog ciklusa

U analizi elijskog ciklusa koristi se jedna je proto citometrijska metoda za analizu DNK (limfocita i fibroblasta) (Ormerod 2000), koja je delimično modifikovana.

Analiza elijskog ciklusa na Becton-Dickinson (BD) FACSCaliburovom citometru:

- suspenzija elija u apsolutnom alkoholu se prebaci u epruvete, doda se 2 ml rastvora fosfatnog pufera (PBS²³) pH 7,4 (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,78 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O i 0,27 g KH₂PO₄ u 1 L dest. vode) i centrifugira 5 min na 2000 obrtaja,
- supernatant se odlije, talogu elija se doda 270 ml PBS rastvora, koji se zatim resuspenduje i prebaci u epruvete za protočni citometar (12 x75 mm),
- suspenziji elija se zatim doda 80 µl svežeg rastvora RNAze (koncentracije 1 mg/ml u PBS), resuspenduje i inkubira na 37 °C 20 min,
- zatim se doda 50 µl rastvora propidijum jodida (PI) (koncentracije 400 µg/ml u PBS) i ostavi u mraku 10 min na sobnoj temperaturi,
- DNK elija se zatim analizira na BD citometru pri niskoj brzini protoka (eng. "low flow"), gde se sakupi po 10.000 elija i na osnovu količine DNK (2N, 4N) u eliji odredi u kojoj se fazi elijskog ciklusa nalazi,

²³ PBS – eng. Phosphate buffered saline

- broj elija po fazama se određuje postavljanjem graničnika na histogramu DNK koji odvajaju tri grupe elija označene sa M1, M2 i M3,
- da bi se dobio procenat elija po fazama vrši se dekonvolucija histograma DNK, i to tako što se:
 - ✓ G0/G1 faza računana kao M1-M2/4
 - ✓ S faza kao M2x2
 - ✓ G2/M faza se računana kao M3-M2/4.
- broj elija u G2/M fazi se izražava u vidu procenta elija u G2 fazi.

3.2.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI

3.2.2.1. Metode citogenetičke analize

3.2.2.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturi limfocita periferne krvi primenom BLC testa

Analiza BLC testom u kulturi limfocita periferne krvi je urađena prema standardnom protokolu (Wegner i Stumm 1999). Upoređo sa kulturama limfocita zdravih osoba, postavljane su netretirane i BLC-om tretirane kulture limfocita periferne krvi bolesnika sa kliničkom slikom NSN.

BLC je dodavan kulturama elija u finalnoj koncentraciji od 1 µg/ml, četiri sata pre preparacije (Wegner i Stumm 1999). Nakon 70 h kultivacije (dva sata od ubacivanja BLC-a) elijama je dodavan kolcemid (finalna koncentracija: 2,5µg/ml) i preparacija hromozoma sprovedena je po standardnom postupku (Wegner i Stumm 1999).

Analizirano je od 20 – 50 metafaznih figura svake kulture na prisustvo hromozomskih i hromatidnih prekida, i drugih strukturnih aberacija. Zatim je analiziran kariotip bolesnika primenom tehnike G traka na svim prethodno konvencionalno analiziranim metafazama (ISCN (2009)). Broj hromatidnih/hromozomskih prekida je računat kao i u analizi hromozomske nestabilnosti pacijenata sa kliničkim znacima FA,

a parametri procene su bili: procenat aberantnih elija, broj prekida po eliji i dr. (Wegner i Stumm 1999).

3.2.2.1.1.1. Kultivisanje limfocita periferne krvi i indukcija BLC-om

Uzorak od 5ml periferne krvi (1 ml rastvora heparina sa 4 ml krvi) se zasadi u 10 sterilnih epruveta sa po 4,5 ml prethodno pripremljene hranljive podloge (RPMI 1640 sa 20% seruma (FBS), 1% PHA i 1% antibiotika) i položi u termostat na 37°C. Pet limfocitnih kultura se ostavi netretirano, a u pet epruveta se nakon 68 h kultivacije menja hranljiva podloga (RPMI 1640) kojoj se dodaje po 200 µl radnog rastvora BLC-a (5 µg/ml), da bi se postigla finalna koncentracija od 1 µg/ml, i ostavi u mraku 4h.

Preparacija i bojenje hromozoma, analiza kariotipa i hromozomskih aberacija, kao i statističke analize se vrše isto kao i u kulturi limfocita u prethodno opisanoj analizi DEB testom.

3.2.2.2. Metode molekularne analize

3.2.2.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi

U izolaciji DNK iz periferne krvi koristi se metoda "isoljavanja" (Miller i dr. 1988) uz neznatne modifikacije.

I dan:

- uzorak periferne krvi (1ml antikoagulansa (4,5% EDTA/0,7% NaCl) sa 5 – 10 ml krvi) se rastvori u 10 ml liti kog pufera, pH 7,4 (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1 mM EDTA)
- smeša se inkubira 30 min na +4 °C i centrifugira na 5000 obrtaja 15 min na +4 °C;
- zatim se odbaci supernatant, talog resuspenduje u 10 ml liti kog pufera; centrifugira (15 min, +4 °C, 5000 obrtaja); ovaj korak se još jednom ponovi;

- odbaci se supernatant, talog resuspenduje u 12 ml liti kog pufera, pH 8,0 (10 mM TrisHCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA), 140 µl 10% proteinase K i 800 µl 10% SDS;
- smeša se inkubira u vodenom kupatilu sa šejkerom, na 37 °C, preko noći.

II dan:

- smeša se inkubira u vodenom kupatilu sa šejkerom, na 55 °C, 60 min;
- doda se 4 ml 6 M NaCl i centrifugira 15 min, na +4 °C, na 5000 obrtaja;
- supernatant se prebaci u novu epruvetu i centrifugira 15 min, +4 °C, 5000 obrtaja;
- zatim se supernatant prebaci u novu epruvetu, doda 10 ml apsolutnog etanola i istaloži DNK;
- DNK se ispira sa 70% etanolom i prebacuje u sterilnu ependorf-epruvetu sa odgovarajućom količinom redestilovane vode;
- uzorci se uvaju na +4 °C ili -20 °C.

3.2.2.2.2. Detekcija c.657_661del5 mutacije

Za detekciju c.657_661del5 mutacije u *NBN* genu, a na osnovu poznavanja sekvence (Varon i dr. 1998), konstruisani su prajmeri za dobijanje produkata reakcije lananog umnožavanja (PCR²⁴), koji su mogli da se analiziraju sistemom vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (PAGE²⁵). S obzirom da ova metoda nije ranije korišćena za dijagnostiku ovog oboljenja, za uspostavljanje novog protokola i utvrđivanje pojedinosti reakcije (koncentracije i količine osnovnih sastojaka PCR smeše, dužina trajanja pojedinih temperatura PCR ciklusa i dr.) primenjene su metode

²⁴ PCR – eng. Polymerase Chain Reaction

²⁵ PAGE – eng. Polyacrylamide Gel Electrophoresis

(analiza heterodupleksa) korišćene u dijagnostici cistične fibroze (Kerem i dr. 1989; Radivojević i dr. 2004; Rommens i dr. 1990).

PCR analiza:

- PCR reakcionu smešu (25 µl po uzorku) su činile sledeće komponente: 200 – 300 ng izolovane DNK, 0,2 µM prajmera NBSF i NBSR, 0,2 mM dNTPs, 2 U Taq DNK polimeraze, 3 mM MgCl₂, 10 x koncentrovani reakcioni pufer (TRIS, NH₄SO₄, BSA) i ddH₂O;
- korišćeni su oligonukleotidi sa sledećim sekvencama:
NBS-F 5' CCA CCT CTT gAT gAA CCA TCT ATT g 3'
NBS-R 5' ACA TAA TTA CCT gTT Tgg CAT TCA AA 3'
- uslovi PCR-a su bili sledeći: denaturacija uzorka na 95° C 5 min, 32 ciklusa (95°C, 15 sekundi; 57°C, 20 sekundi; 72°C, 30 sekundi) i finalna elongacija na 72°C 10min;
- analiza heterodupleksa se radi nakon završenog PCR-a, tako što se u nove ependorf-epruvete prebaci po 10 µl od svakog PCR produkta (pacijenta, pozitivne i negativne kontrole) i u posebnim epruvetama se napravi smeša PCR produkata svakog pacijenta sa PCR produktom pozitivne i negativne kontrole (10 µl + 10 µl). Uzorci se inkubiraju 5 min na 94°C i 5 min na 65°C, nakon čega se brzo prebace na led;
- PCR produkti se nanose sa 7 µl boje (15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblue, 0,25% Xylene-cyanolFF) na poliakrilamidni gel (8% akrilamid/bisakrilamidni gel) u sistemu vertikalne elektroforeze. U poslednje ležište na gelu se sipa 10 µl DNK markera, a uzorci putuju oko 135 min, pri naponu struje od 180 V;
- vizuelizacija produkata se vrši bojenjem gela sa rastvorenim EtBr (1 ml 10% EtBr rastvoren u 1 L destilovane vode), i posmatranjem na UV transiluminatoru, dok je mutacija identifikovana poređenjem sa kontrolnim uzorcima.

4. REZULTATI

4.1. FANKONIJEVA ANEMIJA

4.1.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM DIEPOKSIBUTANOVOG TESTA

Spontana hromozomska nestabilnost u elijama obolelih od FA, može biti poveana dejstvom specifi nih mutagena kao što su: mitomicin C, mefalan ili diepoksibutan. U diferencijalnoj dijagnostici FA kod bolesnika ija je klini ka slika ukazivala na ovo oboljenje, koriš ena je citogeneti ka analiza diepoksibutanovim testom (DEB test).

4.1.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom FA primenom DEB testa

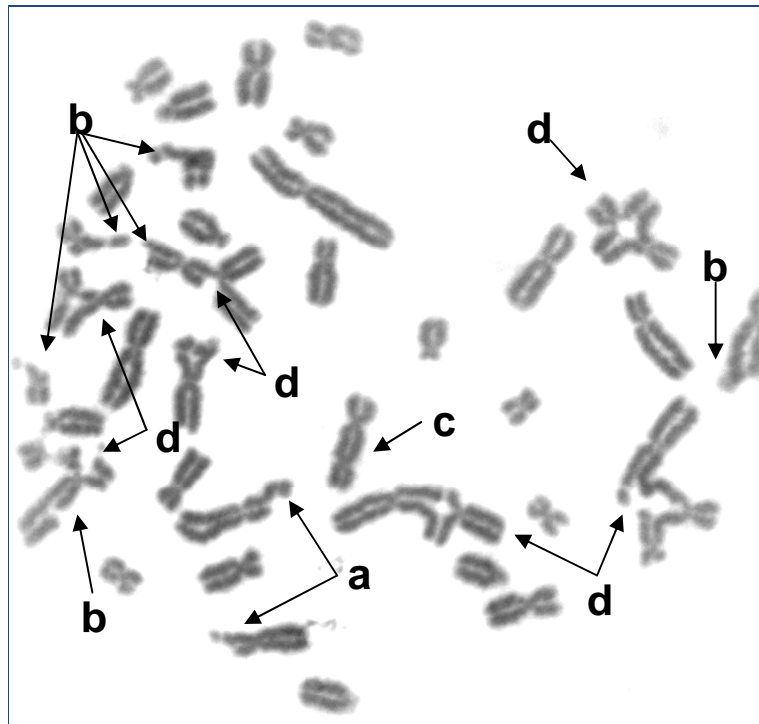
U Laboratoriji za medicinsku genetiku, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan upi“, sprovedeni su citogeneti ki testovi za detekciju hromozomske nestabilnosti kod 90 bolesnika sa klini kim znacima FA. Na limfocitima periferne krvi svakog od njih ispitivana je spontana i DEB-om (24h i 48h) indukovana nestabilnost hromozoma. Parametri analize su bili:

- procenat aberantnih elija,
- broj prekida po eliji,
- broj prekida po aberantnoj eliji,
- broj prekida po multiaberantnoj eliji (sa dva i više prekida) i
- indeks fragilnosti hromozoma (CFI²⁶).

²⁶ CFI – eng. Chromosome Fragility Index

4.1.1.1.1. Analiza DEB-om indukovane hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi

Kod 10 od 90 (11,11%) bolesnika je uo eno pove anje procenta aberantnih elija i broja prekida po eliji, indukovanih DEB-om (u trajanju od 24h), u odnosu na zdrave osobe (χ^2 test: $p < 0,05$) (slika 5).



Slika 5. DEB-om indukovane aberacije hromozoma kod bolesnika sa Fankonijevom anemijom: a – hromozomski prekid, b – hromatidni prekid, c – dicentri ni hromozom, d – radijalna struktura.

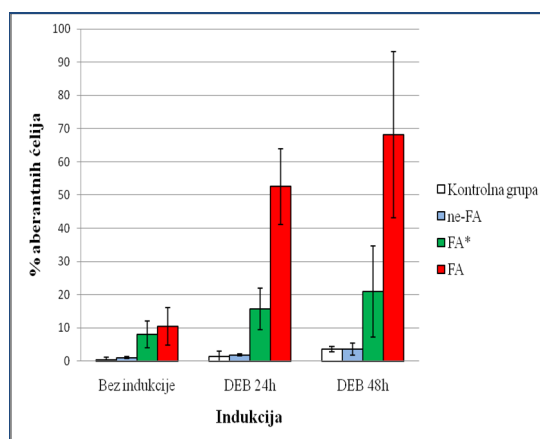
Ova grupa je shodno tome ozna ena kao *FA* grupa pacijenata (DEB-pozitivni pacijenti) (tabela 4). U pore enju sa kontrolama, 77 (77/90 ili 85,56%) bolesnika nije pokazalo zna ajnija DEB-om (24h) indukovana ošte enja na nivou hromozoma (χ^2 test: $p > 0,05$), pa su stoga svrstani u *ne-FA* grupu pacijenata (DEB-negativni pacijenti) (tabela 4). Kod preostala tri od 90 (3,33%) ispitivanih bolesnika zabeležene su vrednosti parametara indukovane hromozomske nestabilnosti koje su se nalazile izme u intervala vrednosti *FA* i *ne-FA* grupe, tako da su svrstani u grani nu *FA** grupu pacijenata (tabela 4).

Tabela 4. Spontana i DEB-om indukovana (24h) hromozomska nestabilnost u limfocitima pacijenata u FA, grani noj FA*, ne-FA i kontrolnoj grupi.

Grupa	N	N° prekida/ eliji			Aberantne elije (%)			N° prekidi/ aberantnoj eliji		
		\bar{x}		Interval	\bar{x}		Interval	\bar{x}		Interval
Spontana hromozomska nestabilnost										
FA	10	0,14	0,13	0,00 - 0,39	10,50	9,17	0,00 - 29,00	1,11	0,43	0,00 -1,50
FA*	3	0,08	0,03	0,06 - 0,12	8,00	3,61	5,00 - 12,00	1,07	0,12	1,00 -1,20
Ne-FA	77	0,01	0,01	0,00 - 0,06	0,98	1,27	0,00 - 6,00	0,57	0,59	0,00 -2,00
Kontrola	87	0,00	0,01	0,00 - 0,03	0,38	0,69	0,00 - 3,00	0,26	0,45	0,00 -1,50
DEB-om indukovana (24h) hromozomska nestabilnost										
FA	10	1,47	1,16	0,48 - 4,39	52,52	18,50	32,00 - 82,00	2,58	0,17	1,20 -5,35
FA*	3	0,20	0,06	0,15 - 0,26	15,67	5,51	12,00 - 22,00	1,33	0,29	1,15 -1,67
Ne-FA	77	0,02	0,03	0,00 - 0,08	1,82	1,53	0,00 - 6,00	0,86	0,48	0,00 -2,67
Kontrola	87	0,02	0,02	0,00 - 0,17	1,41	1,60	0,00 - 8,00	0,74	0,78	0,00 -3,40

N-broj, \bar{x} -srednja vrednost, -standardna devijacija.

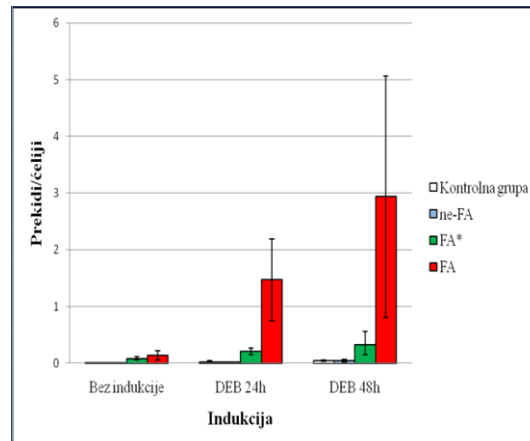
Procenat DEB-om 24h indukovanih aberantnih elija u FA grupi se kretao u rasponu od 32% do 82% sa srednjom vrednoš u²⁷ 52,52% ± 18,50%, dok je u ne-FA grupi srednja vrednost iznosila 1,82% ± 1,53%, sa intervalom vrednosti od 0% do 6%, bez me usobnog preklapanja (tabela 4; slika 6).



Slika 6. Procenat aberantnih limfocita kod pacijenata u FA, grani noj FA*, ne-FA i kontrolnoj grupi: bez i sa indukcijom DEB-om (24h i 48h).

²⁷ Srednja vrednost predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm$).

Analizom broja prekida po eliji utvrđeno je da se rasponi vrednosti ovog parametra u *FA* i *ne-FA* grupi pod indukcijom DEB-om (24h), tako e nisu preklapali (slika 7). Me utim, intervali broja indukovanih prekida/aberrantnoj eliji u ove dve grupe se nisu jasno razdvojili, tako da na osnovu ovog parametra nije bilo mogu e razlikovati *FA* pacijente od *ne-FA* (tabela 4).



Slika 7. Broj prekida/ eliji u limfocitima pacijenata u *FA*, grani noj *FA, *ne-FA* i kontrolnoj grupi: bez i sa indukcijom DEB-om (24h i 48h).**

Na osnovu dobijenih rezultata Kolmogorov-Smirnov testa ($p < 0,05$) u statisti koji analizi vrednosti indukovane hromozomske nestabilnosti u *FA* i *ne-FA* grupi, koriš en je Mann-Whitneyjev neparametrijski test. Mann-Whitneyjev test je pokazao da se vrednosti u *FA* i *ne-FA* grupi pacijenata statisti ki zna ajno razlikuju ($p < 0,01$) kako i procentu aberrantnih elija, tako i u broju prekida/ eliji.

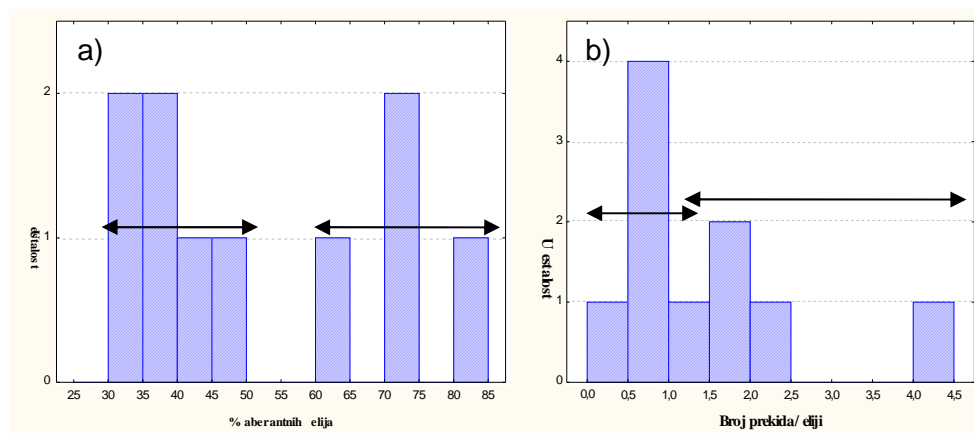
Procenat aberantnih elija i broj prekida/ eliji, indukovanih DEB-om (24h), u grupi FA* grani njih pacijenata su bili oko 8 odnosno, 10 puta ve i od prose njih vrednosti u ne-FA grupi. Me utim, FA* pacijente nije bilo mogu e pojedina no statisti ki zna ajno razlikovati u odnosu na kontrole (χ^2 test: $p > 0,05$) (tabele 4 i 5).

Tabela 5. Spontane i DEB-om indukovane (24h) hromozomske aberacije pacijenata u grani noj FA* grupi.

Pacijent	Spontane hromozomske aberacije			DEB-indukovane (24 h) hromozomske aberacije		
	N ^o prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	N ^o prekida/ aberantnoj eliji	N ^o prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	N ^o prekida/ aberantnoj eliji
FA*-1.	0,06	5,00	1,20	0,26	22,00	1,18
FA*-2.	0,12	12,00	1,00	0,15	13,00	1,15
FA*-3.	0,07	7,00	1,00	0,20	12,00	1,67
\bar{x}	0,08	8,00	1,07	0,20	15,67	1,33
	0,03	3,61	0,12	0,06	5,51	0,29

4.1.1.1.1. Heterogenost odgovora na DEB: mozaicizam unutar FA grupe

Na osnovu krivi distribucije procenta aberantnih elija i broja prekida/ eliji u FA grupi pod 24- asovnom indukcijom DEB-om (slika 8), utvr eno je postojanje dve podgrupe FA pacijenata.



Slika 8. Distribucija vrednosti: a) procenta aberantnih limfocita i b) broja prekida/ eliji pod dejstvom DEB-a (24h) u FA grupi pacijenata.

REZULTATI

Jedna podgrupa koju su činili četiri FA pacijenta (N° FA-1, -7, -8 i -10) je imala procent aberantnih elija > 60% i broj prekida/ eliji od 1,31 do 4,39 (tabela 6). Vrednosti procenta aberantnih elija kod preostalih šest FA pacijenata (N° FA-2, -3, -4, -5, -6 i -9) su se kretale u intervalu od 32% do 49%, sa brojem prekida/ eliji od 0,48 do 1,50 (tabela 6).

Tabela 6. Spontane i DEB-om indukovane (24h) hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata u FA grupi.

Pacijent	Spontane hromozomske aberacije			DEB-indukovane (24h) hromozomske aberacije		
	N° prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	N° prekida/ aberantnoj eliji	N° prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	N° prekida/ aberantnoj eliji
FA-1.	0,01	1,00	1,00	2,15	72,22	2,97
FA-2.	0,07	5,00	1,40	1,50	49,00	3,06
FA-3.	0,00	0,00	0,00	0,95	32,00	2,97
FA-4.	0,08	8,00	1,00	0,68	35,00	1,94
FA-5.	0,27	18,00	1,50	0,58	41,00	1,41
FA-6.	0,12	9,00	1,33	0,48	40,00	1,20
FA-7.	0,18	15,00	1,20	1,75	73,00	2,40
FA-8.	0,39	29,00	1,34	4,39	82,00	5,35
FA-9.	0,03	3,00	1,00	0,91	37,00	2,46
FA-10.	0,22	17,00	1,29	1,31	64,00	2,05
\bar{x}	0,14	10,50	1,11	1,47	52,52	2,58
	0,13	9,17	0,43	1,16	18,50	1,17

Napomena: podgrupa nemozai nih FA (FA-1, FA-7, FA-8, FA-10) i podgrupa mozai nih FA pacijenata (FA-2, FA-3, FA-4, FA-5, FA-6, FA-9).

FA pacijenti iz podgrupe sa procentom aberantnih elija > 30% i < 50% su označeni kao mozai ni FA pacijenti, dok su pacijenti sa vrednostima višim od 60% svrstani u podgrupu nemozai nih FA pacijenata (tabela 7). Kada je kao parametar analize korišćen broj prekida po multiaberantnoj eliji, razlika između mozai nog i nemozai nog tipa FA je bila značajno manja (t -test: $p > 0,05$) i iznosila je u proseku manje od jednog i po puta (tabela 7).

Tabela 7. DEB-om (24h) indukovane hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata u *ne-FA*, *FA i *FA* grupama, kao i u *FA* podgrupama: mozai njih i nemozai njih *FA* pacijenata.**

Parametar	Grupa	N	\bar{x}		Interval
N° prekida/ eliji	<i>FA</i>	10	1,47	1,16	0,48 - 4,39
	Nemozai na <i>FA</i>	4	2,40	1,37	1,31 - 4,39
	Mozai na <i>FA</i>	6	0,85	0,37	0,48 - 1,51
	Grani na <i>FA*</i>	3	0,20	0,06	0,15 - 0,26
	<i>Ne-FA</i>	77	0,02	0,03	0,00 - 0,08
Aberantne elije (%)	<i>FA</i>	10	52,52	18,50	32,00 - 82,00
	Nemozai na <i>FA</i>	4	72,81	7,36	64,00 - 82,00
	Mozai na <i>FA</i>	6	39,00	5,90	32,00 - 49,00
	Grani na <i>FA*</i>	3	15,67	5,51	12,00 - 22,00
	<i>Ne-FA</i>	77	1,82	1,53	0,00 - 6,00
N° prekida/ multiaberantnoj eliji	<i>FA</i>	10	3,70	1,30	2,33 - 6,78
	Nemozai na <i>FA</i>	4	4,51	1,63	3,12 - 6,78
	Mozai na <i>FA</i>	6	3,16	0,75	2,33 - 4,32
	Grani na <i>FA*</i>	3	2,00	0,00	2,00 - 2,00
	<i>Ne-FA</i>	77	0,55	1,85	0,00 - 2,67

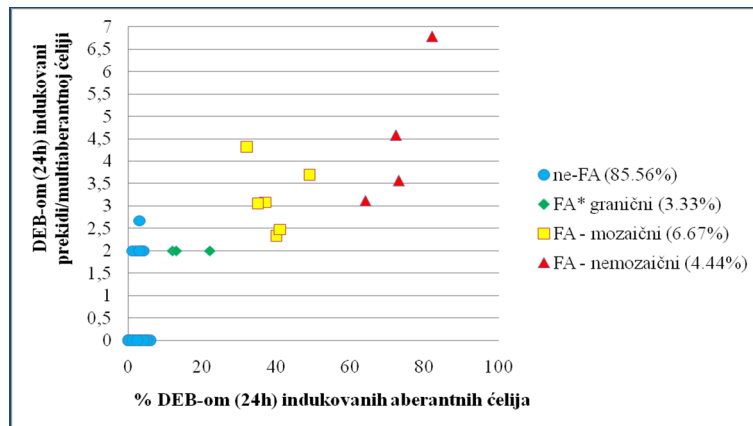
4.1.1.1.1.2. Indeks indukovane fragilnosti hromozoma

Kombinovanjem dva parametra: procenat aberantnih elija i broj prekida/multiaberantnoj eliji dobijene su vrednosti indeksa fragilnosti hromozoma (CFI), a prema formuli (Castella i dr. 2011): $[CFI = (\% \text{ aberantnih elija}) \times (\text{broj prekida/ multiaberantnoj eliji})]$, u *ne-FA*, *FA**, mozai noj *FA* i nemozai noj *FA* podgrupi pacijenata (tabela 8).

Tabela 8. Indeks DEB-om (24h) indukovane fragilnosti hromozoma (I-CFI) limfocita u: *neFA*, *FA grupi i *FA* podgrupama: nemozai njih *FA* i mozai njih *FA* pacijenata.**

Grupa	N	\bar{x}		Raspon
<i>FA</i>	10	197,48	150,66	73,99 – 555,96
<i>Nemozai na FA</i>	4	336,75	115,64	199,68 – 555,96
<i>Mozai na FA</i>	6	104,63	21,46	73,99 – 138,24
<i>Grani na FA*</i>	3	31,33	11,02	24,00 – 44,00
<i>Ne-FA</i>	77	0,53	1,82	0,00 – 8,00

Rasponi I-CFI²⁸ vrednosti, pri indukciji DEB-om, za *FA*, grani nu *FA** i *ne-FA* grupu se nisu me usobno preklapali (tabela 8). Na osnovu dobijenih vrednosti ovog parametra u *FA* grupi bolesnika bilo je mogu e, tako e jasno razlikovati mozai ne od nemozai nih *FA* pacijenata (slika 9).



Slika 9. Distribucija I-CFI vrednosti indukovanih DEB-om (24h) u limfocitima pacijenata u *ne-FA*, *FA, mozai noj *FA* i nemozai noj *FA* podgrupi.**

U uzorku od 90 pacijenata sa klini kom slikom *FA*, analizom hromozomske nestabilnosti u limfocitima, primenom DEB testa, utvr eno je da:

- *FA* pacijenti (11,11%) imaju I-CFI > 73 i to: nemozai ni *FA* (4,44%) imaju I-CFI > 199, a mozai ni *FA* (6,67%) pacijenti imaju 73 < I-CFI < 139,
- *ne-FA* pacijenti (85,56%) imaju I-CFI < 9,
- grani ni *FA** pacijenti (3,33%) imaju 23 < I-CFI < 45.

²⁸ I-CFI – eng. Induced-CFI

4.1.1.1.3. Uticaj dužine trajanja indukcije DEB-om na hromozomsku nestabilnost kod pacijenata u FA i grani noj FA* grupi

Pore enjem vrednosti procenta aberantnih elija kod etiri pacijenta iz FA i grani ne FA* grupe za dva razli ita vremena indukcije DEB-om: 24h i 48h, uo eno je neznatno pove anje (oko 1,43 puta) u korist 48- asovne indukcije (tabela 9).

Tabela 9. DEB-om indukovane (24h i 48h) hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata u FA, grani noj FA*, ne-FA i kontrolnoj grupi.

Grupa	N	N° prekida/ eliji			Aberantne elije (%)		
		\bar{x}		Interval	\bar{x}		Interval
<i>24h -indukovane hromozomske aberacije</i>							
FA	10	1,47	1,16	0,48 - 4,39	52,52	18,50	32,00 - 82,00
FA*	3	0,20	0,06	0,15 - 0,26	15,67	5,51	12,00 - 22,00
ne-FA	77	0,02	0,03	0,00 - 0,08	1,82	1,53	0,00 - 6,00
Kontrolna	87	0,02	0,02	0,00 - 0,17	1,41	1,60	0,00 - 8,00
<i>48h -indukovane hromozomske aberacije</i>							
FA	4	2,01	1,70	0,56 - 4,47	55,53	21,05	38,00 - 86,11
FA*	2	0,32	0,17	0,20 - 0,44	22,00	9,90	14,00 - 28,00
Ne-FA	10	0,04	0,04	0,01 - 0,08	3,60	3,03	1,00 - 8,00
Kontrolna	6	0,04	0,01	0,02 - 0,06	3,67	0,82	2,00 - 4,00

Upore ivanjem broja prekida po eliji u FA i grani noj FA* grupi pacijenata, nakon indukcije DEB-om u trajanju od 48h, zabeležene su vrednosti ovog parametra, koje su u proseku bile oko 1,50 puta ve e u odnosu na 24- asovnu indukciju.

4.1.1.1.2. Analiza spontane hromozomske nestabilnosti u kulturama limfocita periferne krvi

Citogeneti ka analiza u kulturi limfocita periferne krvi, u ispitivanom uzorku pacijenata sa klini kom slikom FA, pokazala je da se intervali vrednosti svih parametara spontane hromozomske nestabilnosti u FA, grani noj FA* i ne-FA grupi, me usobno preklapaju (tabele 10 i 11).

Tabela 10. Spontane hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata u ne-FA i FA* grupama, kao i u FA podgrupama: mozai nih i nemozai nih FA pacijenata.

Parametar	Grupa	N	\bar{x}		Raspon
N° prekida/ eliji	FA	10	0,14	0,13	0,00 - 0,39
	Nemozai na FA	4	0,20	0,15	0,01 - 0,39
	Mozai na FA	6	0,10	0,09	0,00 - 0,27
	Grani na FA*	3	0,08	0,03	0,06 - 0,12
	Ne-FA	77	0,01	0,01	0,00 - 0,06
Aberantne elije (%)	FA	10	10,50	9,17	0,00 - 29,00
	Nemozai na FA	4	15,50	11,47	1,00 - 29,00
	Mozai na FA	6	7,17	6,24	0,00 - 18,00
	Grani na FA*	3	8,00	3,61	5,00 - 12,00
	Ne-FA	77	0,98	1,27	0,00 - 6,00
N° prekida/ multiaberantnoj eliji	FA	10	1,57	1,12	0,00 - 2,80
	Nemozai na FA	4	1,73	1,18	0,00 - 2,50
	Mozai na FA	6	1,47	1,18	0,00 - 2,80
	Grani na FA*	3	0,67	1,15	0,00 - 2,00
	Ne-FA	77	0,18	0,58	0,00 - 2,00

Napomena: Stopa spontane hromozomske nestabilnosti je u FA grupi bila uve ana oko 10 puta prema procentu aberantnih elija i 14 puta prema broju prekida/ eliji, u odnosu na vrednosti odgovaraju ih parametara ne-FA grupe.

Analizom spontanih hromozomskih aberacija je utvr eno da se grupe FA, grani nih FA* i ne-FA pacijenata ne mogu me usobno razlikovati, na osnovu parametara ove analize.

Tabela 11. Indeks spontane fragilnosti hromozoma (S-CFI) u limfocitima pacijenata u: *ne-FA*, *FA grupi, i *FA* podgrupama: nemozai njih i mozai njih *FA* pacijenata.**

Grupa	N	\bar{x}		Raspon
<i>FA</i>	10	22,64	24,50	0,00 – 70,47
<i>Nemozai na FA</i>	4	35,49	28,81	0,00 – 70,47
<i>Mozai na FA</i>	6	14,07	19,04	0,00 – 50,40
Grani na <i>FA*</i>	3	3,33	5,77	0,00 – 10,00
<i>Ne-FA</i>	77	0,34	1,60	0,00 – 10,00

Napomena: Indeks spontane fragilnosti hromozoma u *FA* grupi je bio oko sedam puta veći od indeksa *ne-FA* grupe, ali su se intervali vrednosti ove dve grupe preklapali.

4.1.1.2. Analiza hromozomske nestabilnosti u kulturama fibroblasta kože primenom DEB testa

U grupi od 10 pacijenata sa klini kom slikom *FA*, koji su se na osnovu rezultata citogeneti ke analize DEB testom na limfocitima izdvojili od ostalih pacijenata, uo ene su dve podgrupe: *FA* pacijenti ozna eni kao nemozai ni tip *FA* i *FA* pacijenti sa mozai nom formom ove bolesti. Pacijenti koji su u odgovoru na DEB pokazali grani ne vrednosti procenta aberantnih elija i broja prekida/ eliji (*FA**) posmatrani su, tako e kao mozai ni *FA* pacijenti. U cilju potvrde ili isklju enja mozai nog fenotipa *FA* dobijenog na limfocitima, bilo je neophodno uraditi ovu istu analizu na fibroblastima kože.

4.1.1.2.1. Analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa na fibroblastima kože zdravih osoba

U cilju utvr ivanja vrednosti parametara hromozomske nestabilnosti u kulturama fibroblasta kože zdravih osoba, sprovedena je citogeneti ka analiza na uzorcima sedam ovakvih osoba (kontrolna grupa). Procenat aberantnih elija indukovan DEB-om (24h) u ovoj grupi se kretao u rasponu od 0% - 6%, dok je interval broja prekida/ eliji iznosio: 0,00 – 0,06 (tabela 12).

Tabela 12. Spontane i DEB-om indukovane (24h) hromozomske aberacije u fibroblastima pacijenata u FA, FA* i kontrolnoj grupi.

Hromozomske aberacije	Parametar	Pacijenti	N	\bar{x}		Interval
Spontane	N° prekida/ eliji	Mozai ni FA	6	0,04	0,06	0,00 - 0,15
		Grani ni FA*	1	0,32	-	-
		Kontrolni	7	0,01	0,01	0,00 - 0,02
	Aberantne elije (%)	Mozai ni FA	6	4,00	5,90	0,00 - 15,00
		Grani ni FA*	1	24,00	-	-
		Kontrolni	7	0,57	0,68	0,00 - 2,00
24h DEB-om indukovane	N° prekida/ eliji	Mozai ni FA	6	0,18	0,14	0,02 - 0,38
		Grani ni FA*	1	0,58	-	-
		Kontrolni	7	0,02	0,02	0,00 - 0,06
	Aberantne elije (%)	Mozai ni FA	6	15,50	12,13	2,00 - 34,00
		Grani ni FA*	1	38,70	-	-
		Kontrolni	7	1,86	1,95	0,00 - 6,00

4.1.1.2.2. Analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa na fibroblastima kože pacijenata sa mozai nim tipom FA

Kod šest pacijenata iz mozai ne FA podgrupe (FA-2, -3, -4, -5, -6 i -9) analizirana je hromozomska osetljivost na DEB u fibroblastima kože. Pove ane vrednosti hromozomskih aberacija u fibroblastima pod indukcijom u odnosu na kontrolnu grupu, uo ene su kod etiri (4/6 ili 66,67%) FA pacijenta (FA-2, -5, -6 i -9) (tabela 12). Kod pacijenta ozna enog kao FA-4, na ene su grani ne vrednosti, dok su se vrednosti pacijenta FA-3, nalazile u granicama kontrolne grupe (tabela 13).

Srednje vrednosti procenta aberantnih fibroblasta i broja prekida/ eliji u mozai noj FA podgrupi pacijenata su bile oko osam, odnosno devet puta ve e nego u kontrolnoj grupi (tabela 12). Iako je u ove dve grupe zabeleženo delimi no preklapanje raspona dobijenih vrednosti, postojala je statisti ki zna ajna razlika izme u njih (Mann-Whitneyjev test: $p < 0,01$).

Tabela 13. Spontane i DEB-om indukovane (24h) hromozomske aberacije u fibroblastima pacijenata u mozai noj FA podgrupi.

Pacijent	Spontane hromozomske aberacije			DEB-indukovane (24h) hromozomske aberacije		
	N ^o prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	N ^o prekida/ aberantnoj eliji	N ^o prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	N ^o prekida/ aberantnoj eliji
FA-2.	0,06	6,00	1,00	0,38	34,00	1,12
FA-3.	0,00	0,00	0,00	0,02	2,00	1,00
FA-4.	0,00	0,00	0,00	0,08	6,00	1,33
FA-5.	0,03	3,00	1,00	0,10	10,00	1,00
FA-6.	0,00	0,00	0,00	0,17	16,00	1,06
FA-9.	0,15	15,00	1,00	0,30	25,00	1,20
\bar{x}	0,04	4,00	0,50	0,18	15,50	1,12
	0,06	5,90	0,55	0,14	12,13	0,13

Na osnovu ovih rezultata kod četiri od ukupno šest pacijenata koji su nakon DEB testa na limfocitima periferne krvi svrstani u mozai nu FA podgrupu, potvr en je fenotip FA i na fibroblastima kože.

4.1.1.2.3. Analiza hromozomske nestabilnosti primenom DEB testa na fibroblastima kože grani nog FA* pacijenta

Kod jednog (FA*-2) od tri bolesnika sa grani nim vrednostima DEB testa na limfocitima, nakon analize fibroblasta kože na eno je pove ano prisustvo kako spontanih, tako i 24h DEB-om indukovanih hromozomskih aberacija, u odnosu na odgovaraju e vrednosti kontrolne grupe (tabela 12). Citogeneti kom analizom fibroblasta kože kod ovog pacijenta je potvr en fenotip FA.

4.1.2. ANALIZA OŠTE ENJA DNK PRIMENOM ALKALNOG KOMET TESTA

U citogenetičkoj analizi (DEB test) limfocita periferne krvi bolesnika sa kliničkom slikom FA, tri od ukupno 90 pacijenata nije bilo moguće svrstati u FA ili u *ne-FA* grupu, pa su stoga označeni kao granični FA* pacijenti. U cilju precizne klasifikacije ovakvih bolesnika, ispitivana su oštećenja na nivou genomske DNK (komet test), prvo kod klinički zdravih osoba, a zatim kod citogenetički potvrđenih FA pacijenata, kao i kod pacijenata iz *ne-FA* grupe.

U Laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta u Beogradu, primenom alkalnog komet testa za detekciju jednolanjanih i dvolanjanjanih oštećenja molekula DNK analizirani su uzorci limfocita: šest zdravih osoba (kontrolna grupa), pet pacijenata iz FA grupe (FA-nemozai: FA-8 i -10; FA-mozai: FA-4, -6 i -9), dva pacijenta iz granične FA* grupe (FA*-1 i -2), kao i 10 pacijenata iz *ne-FA* grupe. Analizirana su spontana i DEB-om indukovana (24h i 48h) oštećenja DNK. Kao parametar analize korišćen je Olive-moment repa, odnosno srednja vrednost Olive-momenta repa u uzorku pacijenta (OTM).

4.1.2.1. Analiza oštećenja DNK u kulturama limfocita zdravih osoba

U cilju korišćenja komet testa za detekciju oštećenja DNK na nivou pojedinačnih ćelija i potvrdu, odnosno isključenje fenotipa FA, bilo je pre svega potrebno odrediti intervale variranja OTM vrednosti u kontrolnoj grupi. Ovom analizom su formirane granične vrednosti spontanijih i DEB-om indukovanih oštećenja molekula DNK zdravih osoba (negativnih na komet testu), koje je bilo moguće uporediti sa odgovarajućim vrednostima kod bolesnika sa kliničkim znacima FA (tabela 14).

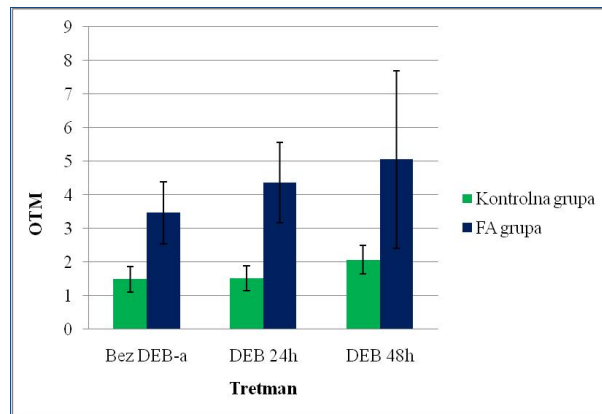
Tabela 14. Spontana i DEB-om indukovana (24h i 48h) ošte enja DNK limfocita u: FA, FA*, ne-FA i kontrolnoj grupi, izražena u OTM vrednostima uzorka.

Grupa	N	OTM		
		\bar{x}		Interval
<i>Spontana DNK ošte enja</i>				
<i>FA</i>	5	3,14	0,51	2,63 – 3,93
<i>FA*</i>	2	3,31	2,52	1,53 – 5,10
<i>Ne-FA</i>	10	1,77	0,96	0,81 – 3,58
Kontrolna	6	1,49	0,39	0,94 – 1,85
<i>24h indukovana DNK ošte enja</i>				
<i>FA</i>	5	4,27	1,44	2,72 – 6,04
<i>FA*</i>	2	3,32	2,06	1,86 – 5,56
<i>Ne-FA</i>	10	2,21	1,24	0,87 – 4,21
Kontrolna	6	1,53	0,37	0,84 – 1,83
<i>48h indukovana DNK ošte enja</i>				
<i>FA</i>	5	5,46	2,73	2,09 – 9,19
<i>FA*</i>	2	2,42	0,85	1,82 – 3,03
<i>Ne-FA</i>	10	2,34	0,82	1,08 – 3,73
Kontrolna	6	2,07	0,42	1,35 – 2,50

4.1.2.2. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita FA pacijenata

Kao što se u tabeli 14. može videti, svih pet FA pacijenata je pokazalo pove ane vrednosti ošte enja DNK nastalih bez indukcije u odnosu na kontrole (oko dva puta više) (tabela 14). Intervali OTM vrednosti u ove dve grupe su se jasno razdvojili tako da ih je bilo mogu e statisti ki zna ajno razlikovati (t -test $p < 0,01$) (tabela 14).

Analizom uzoraka limfocita u FA grupi pacijenata, utvr eno je pove anje vrednosti ošte enja DNK pod indukcijom (DEB u trajanju od 24h i 48h) u odnosu na spontano nastala ošte enja (u proseku oko 1,3 do 1,7 puta više) (tabela 14). Srednja OTM vrednost indukovana DEB-om u grupi FA pacijenata je bila preko dva i po puta ve a nego u kontrolnoj grupi (tabela 14). Rasponi OTM vrednosti u ove dve grupe, dobijeni nakon 24- asovnog dejstva DEB-a, se nisu preklapali i razlika izme u grupa je bila statisti ki zna ajna (t -test: $p < 0,01$). Mada su se intervali istih vrednosti pod 48- asovnom indukcijom u ispitivanim grupama delimi no preklapali, ipak ih je bilo mogu e statisti ki zna ajno razlikovati (t -test: $p = 0,01$) (slika 10).



Slika 10. Oštećenja DNK u FA i kontrolnoj grupi pacijenata nastala spontano i DEB-om indukovano 24h i 48h.

Analiza komet testom je potvrdila elijski fenotip FA kod svih pet pacijenata kod kojih je otkrivena povećana hromozomska osetljivost, odnosno pozitivan odgovor na DEB, bilo mozaičnog ili nemozaičnog tipa (tabela 15). Rezultati dobijeni u kontrolnoj i FA grupi pacijenata su korišćeni kao referentne vrednosti pri klasifikovanju pacijenata sa kliničkim znacima FA, koji su citogenetičkom analizom (DEB test) dali negativne rezultate (*ne-FA* grupa) ili negativne rezultate (*ne-FA* grupa).

Tabela 15. Spontana i DEB-om indukovana (24h i 48h) oštećenja DNK limfocita kod pet FA pacijenata.

Podgrupe FA pacijenata	Pacijent	OTM		
		Spontana oštećenja	DEB-om 24h indukovana oštećenja	DEB-om 48h indukovana oštećenja
Nemozaična	FA-8.	2,63	5,56	6,97
	FA-10.	2,87	3,65	2,09
	$\bar{x} \pm$	2,75±0,17	4,60±1,35	4,53±3,45
Mozaična	FA-4.	3,34	2,72	4,99
	FA-6.	2,93	3,39	4,04
	FA-9.	3,93	6,04	9,19
	$\bar{x} \pm$	3,40±0,51	4,05±1,76	6,07±2,74
UKUPNO	\bar{x}	3,14	4,27	5,46
		0,51	1,44	2,73

4.1.2.3. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita *FA** pacijenata

U cilju potvrde, odnosno isklju enja fenotipa FA, komet analiza sprovedena na uzorcima dva pacijenta sa grani nim vrednostima DEB testa (N° *FA**-1 i -2) pokazala je pove ana ošte enja DNK kod jednog od njih (*FA**-2; tabela 16). Naime, OTM vrednosti ovog pacijenta su se nalazile u granicama vrednosti na enim u *FA* grupi (tabele 14 i 16), tako da je na osnovu rezultata ove analize potvr en fenotip FA. Kod drugog *FA** pacijenta (*FA**-1) nisu na ena zna ajna ošte enja DNK, u odnosu na kontrolnu grupu (tabela 16).

Tabela 16. Spontana i DEB-om indukovana (24h i 48h) ošte enja DNK limfocita kod dva *FA grani na pavijenta.**

Pacijent	OTM		
	Spontana ošte enja	DEB-om 24h indukovana ošte enja	DEB-om 48h indukovana ošte enja
<i>FA*</i> -1.	1,53	1,86	1,82
<i>FA*</i> -2.	5,10	4,78	3,03
\bar{x}	3,31	3,32	2,42
	2,52	2,06	0,85

4.1.2.4. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita *ne-FA* pacijenata

S obzirom na osetljivost alkalnog komet testa, pre svega u pogledu mogu nosti detekcije ošte enja DNK u svim fazama elijskog ciklusa, a ne samo tokom deobe, ova metoda je koriš ena za ispitivanje eventualnih ošte enja genomske DNK kod pacijenata koji su imali klini ke znake FA, a koji su bili negativni na DEB testu (*ne-FA* grupa).

Od ukupno 77 pacijenata u *ne-FA* grupi, kod 10 pacijenata iji su uzorci limfocita bili dostupni za dalje analize, primenjen je alkalni komet test. Analize su pokazale da se etiri pacijenta (N° *ne-FA*-3, -4, -5 i -7) izdvojilo u pogledu ošte enja DNK pod indukcijom (DEB, 24h), u odnosu na ostale (tabela 17). Kod ovih pacijenata OTM vrednosti su bile u intervalu odgovaraju ih vrednosti *FA* grupe (tabele 14 i 17). Preostalih šest *ne-FA* pacijenata (N° *ne-FA*-1, -2, -6, -8, -9 i -10) (tabela 17) je pokazalo OTM vrednosti u granicama kontrolnih uzoraka, tako da je kod njih i ovom vrstom analize potvr eno da se radi o *ne-FA* pacijentima (negativni na komet testu).

Tabela 17. Spontana i DEB-om indukovana (24h i 48h) ošte enja DNK limfocita kod 10 *ne-FA* pacijenata.

Pacijent	OTM		
	Spontana ošte enja	DEB-om 24h indukovana ošte enja	DEB-om 48h indukovana ošte enja
<i>ne-FA-1.</i>	1,39	1,22	2,17
<i>ne-FA-2.</i>	1,12	1,88	1,83
<i>ne-FA-3.</i>	2,79	3,23	2,82
<i>ne-FA-4.</i>	3,58	3,21	3,73
<i>ne-FA-5.</i>	1,72	3,57	2,20
<i>ne-FA-6.</i>	0,98	0,87	2,21
<i>ne-FA-7.</i>	2,87	4,21	3,60
<i>ne-FA-8.</i>	1,43	1,93	1,99
<i>ne-FA-9.</i>	0,81	0,92	1,08
<i>ne-FA-10.</i>	1,01	1,03	1,79
\bar{x}	1,77	2,21	2,34
	1,41	1,90	2,19

4.1.2.5. Rezultati komet analize na limfocitima pacijenata sa klini kom slikom FA

Analiza komet testom, kojom je obuhva eno ukupno 17 pacijenata sa klini kom slikom FA (pet *FA*, dva *FA** i 10 *ne-FA*), pokazala je da 10 pacijenata (pet *FA*, jedan *FA** i etiri *ne-FA*) ima pove ana DEB-om (24h) indukovana ošte enja DNK (komet-pozitivni, K+) (tabele 18 i 19). Preostalih sedam pacijenata (jedan *FA** i šest *ne-FA*) ima negativne rezultate ovog testa (K-) (tabele 18 i 19).

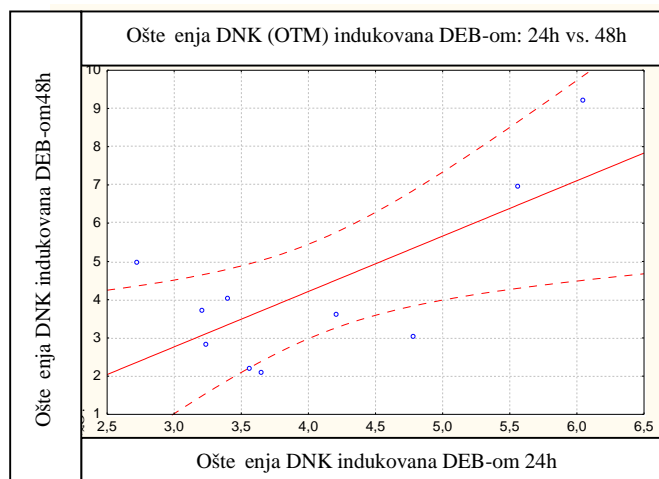
Tabela 18. Spontana i DEB-om indukovana (24h i 48h) ošte enja DNK u limfocitima pacijenata pozitivnih (K+) i negativnih na komet testu (K-) u: *FA*, *FA i *ne-FA* grupama pacijenata.**

Ošte enja DNK	Grupa	N	OTM		
			\bar{x}		Interval
Spontana	K+	10	3,17	0,90	2,63 – 5,10
	K-	7	1,18	0,27	0,81 – 1,53
24h DEB-om indukovana	K+	10	4,04	1,09	2,72 – 6,04
	K-	7	1,39	0,48	0,87 – 1,93
48h DEB-om indukovana	K+	10	4,27	2,25	2,09 – 9,19
	K-	7	1,84	0,38	1,08 – 2,21

Tabela 19. Rezultati analize komet testom u zavisnosti od grupa pacijenata prema rezultatima citogeneti ke analize (DEB test).

Grupa (prema citogeneti koj analizi)	Rezultati analize komet testom (24h-DEB-om indukovana ošte enja)		UKUPNO
	K+	K-	
<i>FA</i>	5	0	5
<i>FA*</i>	1	1	2
<i>Ne-FA</i>	4	6	10
UKUPNO	10	7	17

U grupi pacijenata sa pozitivnim rezultatima komet analize postojala je slaba pozitivna korelacija izme u OTM vrednosti dobijenih u kulturama bez i sa indukcijom DEB-om (24h) koja nije bila statisti ki zna ajna (Pearsonov test: $r > 0,30$; $p > 0,05$). Uo ena je i pozitivna korelacija (Pearsonov test: $r = 0,70$) OTM vrednosti kod DEB-om 24h tretiranih uzoraka K+ pacijenata, u odnosu na 48h tretirane, koja se u ovom slu aju pokazala kao statisti ki zna ajna ($p = 0,02$) (slika 11).



Slika 11. Korelacija ošte enja DNK indukovanih 24h DEB-om sa ošte enjima indukovanim 48h u K+ grupi pacijenata.

4.1.3. PROTO NO CITOMETRIJSKA ANALIZA ELIJSKOG CIKLUSA

Kod pacijenata koji su analizom hromozomske nestabilnosti DEB testom dali grani ne (*FA** grupa) i negativne vrednosti (*ne-FA* grupa), a komet analizom pokazali fenotip FA sa značajnim oštećenjima DNK, bilo je neophodno utvrditi da li dolazi do zastoja njihovih elija u G2 fazi elijskog ciklusa, u cilju konačne potvrde ili isključenja elijskog fenotipa FA. Primenom ove analize prvo na kulturama limfocita periferne krvi zdravih osoba, a zatim i kod pacijenata u *FA*, grani naj *FA** i *ne-FA* grupi, i njihovim međusobnim poređenjem bilo bi moguće, i dodatno potvrditi ili isključiti fenotip FA. Kod *FA* pacijenata, kod kojih nije bio dostupan uzorak periferne krvi, analiza elijskog ciklusa je sprovedena u kulturama fibroblasta kože. Dobijeni rezultati su prikazani u vidu procenta elija u G2 fazi elijskog ciklusa kojim su pored G2/M bile obuhvaćene još i, G0/G1 i S faza.

4.1.3.1. Analiza elijskog ciklusa u kulturi limfocita periferne krvi

Analiza elijskog ciklusa je urađena na uzorcima limfocita: dve zdrave osobe (kontrolna grupa), pet pacijenata *FA* grupe (*FA*-4, -6, -8, -9 i -10), dva pacijenta grani ne *FA** grupe (*FA**-1 i -2), kao i sedam pacijenata *ne-FA* grupe. U kulturama limfocita periferne krvi ovih osoba, ispitivan je spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj elijskog ciklusa u G2 fazi.

4.1.3.1.1. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod zdravih osoba

Pre analize elijskog ciklusa *FA* i grani njih *FA** pacijenata, bilo je neophodno uraditi ovu analizu na uzorcima zdravih osoba, kako bi se utvrdile vrednosti procenta elija u G2 fazi elijskog ciklusa u kontrolnoj grupi. U tu svrhu su korišćene netretirane i DEB-om tretirane (24h i 48h) kulture limfocita periferne krvi dve klinički zdrave osobe.

Rezultati su pokazali da se $2,83\% \pm 1,80\%$ limfocita zdravih kontrola nalazi u G2 fazi pod indukcijom DEB-om u trajanju od 24h, a da se vrednosti kreću u intervalu od 1,56% – 4,11%, dok su se pod osnovnom indukcijom vrednosti zastoja kretale u rasponu od 4,34% – 7,21% (srednja vrednost: $5,78\% \pm 2,03\%$) (tabela 20).

Tabela 20. Spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj limfocita (procenat elija) u G2 fazi elijskog ciklusa pacijenata u FA, FA*, ne-FA i kontrolnoj grupi.

Zastoj u G2 fazi	Grupa	N	\bar{x}		Raspon
Spontani	FA	5	14,63	2,73	11,20 – 18,48
	FA*	2	11,88	8,98	5,53 – 18,24
	ne-FA	7	7,67	3,08	3,69 – 13,73
	kontrolna	2	6,77	1,29	5,86 – 7,68
24h DEB-om indukovani	FA	5	7,76	2,24	4,41 – 10,45
	FA*	2	6,03	1,30	5,11 – 6,95
	ne-FA	7	3,80	1,51	0,69 – 5,31
	kontrolna	2	2,83	1,80	1,56 – 4,11
48h DEB-om indukovani	FA	5	13,42	8,76	4,31 – 26,95
	FA*	2	7,98	3,14	5,76 – 10,20
	ne-FA	7	8,85	3,44	4,01 – 15,63
	kontrolna	2	5,78	2,03	4,34 – 7,21

4.1.3.1.2. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod FA pacijenata

U cilju analize zastoja limfocita u G2 fazi korišteni su uzorci pet pacijenata FA grupe, pozitivnih na DEB testu (FA-4, -6, -8, -9 i -10).

Srednja vrednost procenta limfocita, spontano zaustavljenih u G2 fazi elijskog ciklusa, u FA grupi je iznosila: 14,63% ± 2,73%, sa rasponom vrednosti od 11,20% – 18,48% (tabele 20 i 21). Zastoj limfocita ovih pacijenata indukovan DEB-om bio je nešto niži, i iznosio je: 7,76% ± 2,24% pri 24- asovnom dejstvu DEB-a i 13,42% ± 8,76% pri 48- asovnoj indukciji, ali je u oba slučaja bio oko dva i po puta, odnosno dva puta veći nego u kontrolnoj grupi (tabele 20). U slučaju spontanog i DEB-om 24h indukovanog zastoja intervali procenta elija u G2 fazi u ove dve grupe se nisu preklapali (tabela 20).

Tabela 21. Spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod pet FA pacijenata.

Pacijent	elije u G2 fazi (%)		
	Spontani zastoj u G2 fazi	DEB-om 24h indukovani zastoj u G2 fazi	DEB-om 48h indukovani zastoj u G2 fazi
FA-4.	15,02	10,45	13,15
FA-6.	11,20	4,41	15,39
FA-8.	18,48	7,71	4,31
FA-9.	15,38	8,92	7,31
FA-10.	13,08	7,32	26,95
\bar{x}	14,63	7,76	13,42
	2,73	2,24	8,76

Kod svih pet FA pacijenata je potvrđen fenotip FA u vidu povećanog zastoja limfocita periferne krvi u G2 fazi elijskog ciklusa indukovano 24-satnim dejstvom DEB-a. Analiza *t*-nezavisnim testom je pokazala značajnu razliku između kontrolne i FA grupe pacijenata ($p < 0,05$). Pri indukciji zastoja limfocita DEB-om u trajanju od 48h došlo je do delimičnog preklapanja vrednosti, tako da na osnovu ovog parametra nije bilo moguće izdvojiti FA pacijente od zdravih kontrola (tabela 21).

4.1.3.1.3. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod FA* pacijenata

Kulture limfocita periferne krvi dva pacijenta (FA*-1 i -2) sa granicnim vrednostima DEB testa, analizirane su protočno citometrijskim metodama u cilju potvrde ili isključenja elijskog fenotipa FA. Rezultati su pokazali da se procenti limfocita u G2 fazi pod 24-satnom indukcijom DEB-om kod oba pacijenta nalaze na donjoj granici raspona vrednosti istog parametra u FA grupi (tabele 20 i 22).

Protočno citometrijskom analizom kod oba pacijenta (FA*-1 i -2) je utvrđeno da dolazi do zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa, što je karakteristično za fenotip FA (tabela 22).

Tabela 22. Spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoje limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod dva FA* grani na pacijenta.

Pacijent	elije u G2 fazi (%)		
	Spontani zastoje u G2 fazi	DEB-om 24h indukovani zastoje u G2 fazi	DEB-om 48h indukovani zastoje u G2 fazi
FA*-1.	18,24	6,95	10,20
FA*-2.	5,53	5,11	5,76
\bar{x}	11,88	6,03	7,98
	8,98	1,30	3,14

4.1.3.1.4. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod ne-FA pacijenata

Kod pacijenata sa negativnim rezultatima DEB testa na limfocitima, a s obzirom na rezultate alkalnog komet testa, primenjena je proto no citometrijska analiza u cilju ispitivanja procenta elija u G2 fazi elijskog ciklusa, odnosno fenotipa FA.

Analiza elijskog ciklusa ura ena kod sedam pacijenata iz ne-FA grupe, kod kojih je sproveden i komet test, pokazala je da se intervali procenata DEB-om tretiranih (24h) limfocita u G2 fazi ovih, ne-FA i pacijenata FA grupe, delimi no preklapaju (tabela 20). Ipak, statisti kom analizom (*t*-nezavisni test) je utvr eno postojanje zna ajne razlike me u ispitivanim grupama ($p < 0,05$). Uzrok delimi nog preklapanja je bio u vrednostima indukovnog (DEB, 24h) zastoja dva ne-FA pacijenta (28,57% 2/7) (ne-FA-2 i -5) (tabela 23), koji se nalazio na donjoj granici intervala istih vrednosti u FA grupi (tabela 20). Kod preostalih pet (71,43% 5/7) ne-FA pacijenata (ne-FA-1, -3, -4, -6 i -7) nije utvr eno da dolazi do zastoja elijskog ciklusa nakon 24- asovnog dejstva DEB-a (tabele 20 i 23).

Tabela 23. Spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa kod sedam pacijenata *ne-FA* grupe.

Pacijent	elije u G2 fazi (%)		
	Spontani zastoj u G2 fazi	DEB-om 24h indukovani zastoj u G2 fazi	DEB-om 48h indukovani zastoj u G2 fazi
<i>ne-FA-1.</i>	13,73	4,24	15,63
<i>ne-FA-2.</i>	8,70	4,87	8,85
<i>ne-FA-3.</i>	3,69	4,17	7,89
<i>ne-FA-4.</i>	7,57	0,69	4,01
<i>ne-FA-5.</i>	6,57	5,31	8,51
<i>ne-FA-6.</i>	6,35	4,01	8,20
<i>ne-FA-7.</i>	7,07	3,32	8,93
\bar{x}	7,76	3,80	8,85
	3,08	1,51	3,44

Pore njem rezultata komet testa, kao i rezultata analize elijskog ciklusa, kod pacijenta *ne-FA-5* kod koga su na ena pove ana ošte enja DNK, uo en je i 24h DEB-om indukovani zastoj limfocita u okviru raspona vrednosti istog parametra karakteristi nog za elije *FA* pacijenata. Pacijent *ne-FA-2*, iji je procenat limfocita u G2 fazi odgovarao vrednostima *FA* grupe, nije pokazao ošte enja DNK u limfocitima analiziranim komet testom (tabele 17 i 23). Me utim, kod tri bolesnika: *ne-FA-3*, -4 i -7, kod kojih su komet testom na ena pove ana ošte enja na molekulu DNK, analizom elijskog ciklusa nije utvr eno da dolazi do pove anog zastoja limfocita u G2 fazi (tabele 17 i 23).

4.1.3.1.5. Rezultati proto no citometrijske analize na limfocitima pacijenata sa klini kom slikom *FA*

Proto no citometrijska analiza limfocita periferne krvi ura ena kod ukupno 14 pacijenata sa klini kim znacima *FA* (pet *FA*, dva *FA** i sedam *ne-FA*), pokazala je da devet od 14 bolesnika (pet *FA*, dva *FA** i dva *ne-FA*) ima pove ani DEB-om (24h) indukovani zastoj limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa (G2+) (tabele 24 i 25). Vrednosti istog parametra kod preostalih pet *ne-FA* pacijenata se nisu razlikovale od vrednosti dobijenih u kontrolnoj grupi (G2-) (t-test: $p < 0,05$).

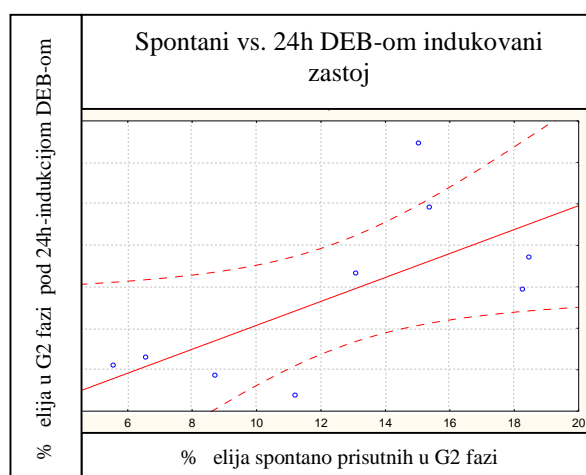
Tabela 24. Spontani i DEB-om indukovani (24h) zastoje limfocita u G2 fazi u G2+ i G2- grupi pacijenata.

Zastoj limfocita u G2 fazi	Grupa	N	elije u G2 fazi (%)		
			\bar{x}		Interval
Spontani	G2+	9	12,47	4,79	5,53 – 18,48
	G2-	5	7,68	3,70	3,69 – 13,73
24h DEB-om indukovani	G2+	9	6,78	2,05	4,41 – 10,45
	G2-	5	3,28	1,49	0,69 – 4,24

U grupi pacijenata sa pove anim zastojem (G2+), postoji pozitivna korelacija izme u procenta elija u G2 fazi u netretiranim i DEB-om (24h) tretiranim kulturama limfocita periferne krvi, koja je bila statisti ki zna ajna (Pearsonov test: $r = 0,68$; $p < 0,05$) (slika 12).

Tabela 25. Rezultati proto no citometrijske analize u zavisnosti od grupa pacijenata prema rezultatima DEB-ovog testa (citogeneti kom analizom).

Grupa (prema citogeneti koj analizi)	Rezultati zastoja limfocita u G2 fazi (DEB, 24h)		UKUPNO
	G2+	G2-	
<i>FA</i>	5	0	5
<i>FA*</i>	2	0	2
<i>Ne-FA</i>	2	5	7
UKUPNO	9	5	14



Slika 12. Korelacija spontanog i 24h DEB-om indukovanog zastoja limfocita u G2 fazi kod devet G2+ pacijenata.

4.1.3.2. Analiza elijskog ciklusa u kulturi fibroblasta kože

U cilju ispitivanja zastoja elija u G2 fazi, kao i potvrde fenotipa FA, kod pacijenata sa pozitivnim, ali mozai nim odgovorom limfocita na DEB (FA grupa), proto no citometrijska analiza je ura ena na kulturama fibroblasta kože. U tu svrhu su koriš eni uzorci etiri pacijenta FA grupe sa mozai nim tipom bolesti i uzorci dve zdrave osobe (kontrolne).

4.1.3.2.1. Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa kod zdravih osoba

Analiza elijskog ciklusa u kulturi fibroblasta kože je prvo sprovedena na uzorcima dve zdrave osobe. Ispitivan je spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa kako bi se odredili rasponi vrednosti ovih parametara u kontrolnoj grupi. Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 26. definisane su vrednosti procenta elija u G2 fazi, karakteristi ne za zdrave kontrole.

Tabela 26. Spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj fibroblasta kože (procent elija) u G2 fazi elijskog ciklusa pacijenata u FA i kontrolnoj grupi.

Zastoj u G2 fazi	Grupa	N	\bar{x}		Raspon
Spontani	FA	4	11,68	2,55	9,03– 15,00
	Kontrolna	2	12,19	0,61	11,76 – 12,62
24h DEB-om indukovani	FA	4	15,74	7,18	7,12– 24,66
	Kontrolna	2	7,20	3,86	4,48 – 9,93
48h DEB-om indukovani	FA	4	15,01	3,37	11,61 – 19,46
	Kontrolna	2	4,45	2,17	2,92 – 5,99

4.1.3.2.2. Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa kod pacijenata sa mozai nom formom FA

Kod etiri pacijenta iz FA grupe sa mozai nim tipom bolesti analiziran je elijski ciklus fibroblasta kože, i to: dva pacijenta (N° FA-3 i -5) kod kojih periferna krv nije bila dostupna za ovu vrstu analize i dva FA pacijenta (N° FA-6 i -9) kod kojih je ve uo en pove an DEB-om indukovani zastoj limfocita u G2 fazi (tabela 20).

Rezultati analize su pokazali da se intervali procenata fibroblasta pacijenta *FA* grupe, u G2 fazi, bilo spontano ili 24h-DEB-om indukovano, delimično preklapaju sa nalazima kontrolne grupe (tabele 26 i 27).

Tabela 27. Spontani i DEB-om indukovani (24h i 48h) zastoj fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa kod pet *FA* pacijenata.

Pacijent	elije u G2 fazi (%)		
	<i>Spontani zastoj u G2 fazi</i>	<i>DEB-om 24h indukovani zastoj u G2 fazi</i>	<i>DEB-om 48h indukovani zastoj u G2 fazi</i>
<i>FA-3.</i>	12,11	16,11	13,45
<i>FA-5.</i>	15,00	24,66	19,46
<i>FA-6.</i>	10,57	15,06	15,52
<i>FA-9.</i>	9,03	7,12	11,61
\bar{x}	11,68	15,74	15,01
	2,55	7,18	3,37

Međutim, zastoj fibroblasta indukovano 48-časovnim dejstvom DEB-a kod četiri *FA* pacijenta se kretao u rasponu od 11,61% – 19,46%, bez preklapanja sa odgovarajućim vrednostima u kontrolnoj grupi (tabela 27). Na osnovu rezultata, dobijenih pod 48-časovnom indukcijom, bilo je moguće razlikovati *FA* grupu mozaičnih pacijenata od kontrolne grupe (*t*-test: $p < 0,05$), čime je dodatno potvrđen elijski fenotip *FA* ovih pacijenata.

4.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI

4.2.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM BLEOMICINOVOG TESTA

Poznato je da pacijenti oboleli od NSN, u svom kariotipu imaju spontano prisutne hromozomske aberacije iji se procenat može specifi no pove ati primenom razli itih radiomimetika, kao što je BLC. Ovo svojstvo elija pacijenata sa NSN je iskoriš eno u diferencijalnoj dijagnozi ovog oboljenja.

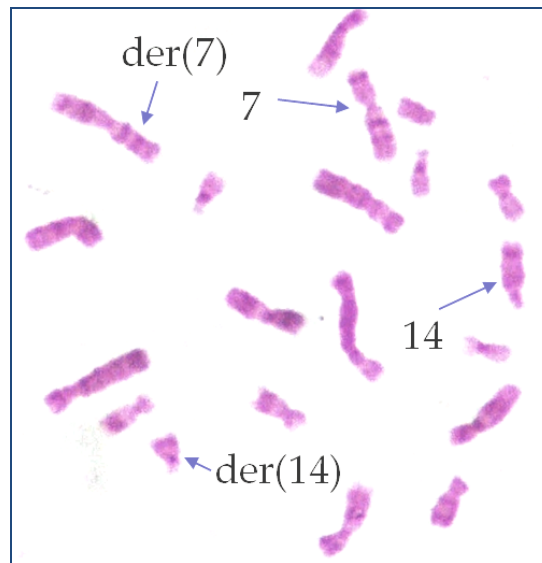
4.2.1.1. Rezultati analize BLC testom na limfocitima periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom NSN

Analiza hromozomske nestabilnosti primenom BLC testa uspešno je ura ena kod sedam od 10 pacijenata sa klini kom slikom NSN, dok kod preostala tri pacijenata zbog malog mitotskog indeksa, nije bilo mogu e uraditi ovu analizu. Kod svakog pacijenata, u odvojenim kulturama limfocita periferne krvi analizirane su spontane i BLC-om indukovane hromozomske aberacije (hromozomski i hromatidni prekidi, kao i strukturne aberacije koje uklju uju hromozome 7, 14 i dr.). Osnovni parametri koji su analizirani u cilju procene hromozomske nestabilnosti bili su:

- procenat aberantnih elija,
- broj prekida po eliji i
- procenat elija sa strukturnim rearanžmanima hromozoma.

etiri od sedam (57,14%) pacijenata sa klini kim znacima NSN je pokazalo pove an procenat aberantnih elija i broja prekida po eliji, kao i niz hromozomskih rearanžmana indukovanih BLC-om, koji su uklju ivali hromozome 7 i 14 (slika 13), u odnosu na zdrave osobe kontrolne grupe (tabela 28). Ova grupa pacijenata, koja je imala pozitivan odgovor na BLC ozna ena je kao *NBS*²⁹ grupa (tabele 28 i 29).

²⁹ NBS – eng. Nijmegen Breakage syndrome



Slika 13. BLC-om indukovane aberacije hromozoma u limfocitima pacijenata sa NSN: translokacija 7;14 (p14;q11).

Kod preostala tri pacijenta procenat BLC-om indukovanih hromozomskih aberacija se nije statistički (χ^2 test) razlikovao u odnosu na kontrolnu grupu, tako da je ta grupa pacijenata označena kao *ne-NBS* grupa (tabela 28).

Tabela 28. Spontane i BLC-om indukovane hromozomske aberacije u limfocitima pacijenata u NBS, ne-NBS i kontrolnoj grupi.

Hromozomske aberacije limfocita	Parametar	Grupa	N	\bar{x}		Raspon
Spontane	Prekidi/ eliji	NBS	4	0,22	0,28	0,00 – 0,60
		Ne-NBS	3	0,02	0,00	0,02 – 0,02
		Kontrolna	6	0,01	0,02	0,00 – 0,06
	Aberantne elije (%)	NBS	4	12,5	15,52	0,00 – 32,00
		Ne-NBS	3	1,67	0,58	1,00 – 2,00
		Kontrolna	6	1,14	2,27	0,00 – 6,00
Indukovane	Prekidi/ eliji	NBS	4	0,56	0,24	0,27 – 0,81
		Ne-NBS	3	0,04	0,02	0,02 – 0,06
		Kontrolna	6	0,05	0,04	0,02 – 0,13
	Aberantne elije (%)	NBS	4	33,67	5,69	26,67 – 40,00
		Ne-NBS	3	4,00	2,00	2,00 – 6,00
		Kontrolna	6	3,86	1,86	2,00 – 6,00

U *NBS* grupi procenat aberantnih elija indukovanih BLC-om, odnosno broj prekida/ eliji je bio oko osam, odnosno 14 puta ve i nego odgovaraju e vrednosti u *ne-NBS* grupi (tabele 28 i 29). Rasponi vrednosti u ove dve grupe se nisu preklapali, kako u pogledu procenta aberantnih elija, tako i prema broju prekida/ eliji (tabela 28).

Tabela 29. Spontane i BLC-om indukovane hromozomske aberacije u limfocitima *NBS* pacijenata

Pacijent	Spontane hromozomske aberacije			BLC-indukovane hromozomske aberacije		
	<i>N</i> ^o prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	elije sa strukturnim aberacijama (%)	<i>N</i> ^o prekida/ eliji	Aberantne elije (%)	elije sa strukturnim aberacijama (%)
<i>NBS</i> -1.	0,00	0,00	0,00	0,47	32,00	10,00
<i>NBS</i> -2.	0,60	32,00	24,00	0,81	40,00	10,00
<i>NBS</i> -3.	0,23	23,08	0,00	0,27	26,67	0,00
<i>NBS</i> -4.	0,26	18,00	8,00	0,68	35,00	14,00
\bar{x}	0,22	12,50	8,00	0,56	33,67	8,50
	0,28	15,52	0,43	0,24	5,69	5,97

4.2.2. ANALIZA PACIJENATA SA KLINI KOM SLIKOM NSN PRIMENOM METODA MOLEKULARNE GENETIKE

4.2.2.1. Identifikacija homozigotnog prisustva c.657_661del5 mutacije kod pacijenata sa klini kom slikom NSN

Molekularnom analizom je obuhva eno ukupno sedam pacijenata sa klini kom slikom NSN: etiri pacijenta iz *NBS* grupe i tri pacijenata kod kojih citogeneti ka analiza bila neuspešna. Kod svih sedam pacijenata je dokazano da su homozigotni nosioci c.657_661del5 mutacije u *NBN* genu i potvr ena je dijagnoza NSN (slika 14).



Slika 14. PCR produkti egzona 6 u *NBN* genu na PAGE gel elektroforezi za detekciju mutacije c.657_661del5: 1 – pacijent (homozigot za c.657_661del5), 2 i 3 – roditelji pacijenta (heterozigoti za c.657_661del5), 4 – kontrolni uzorak (homozigot za c.657_661del5) i 5 – kontrolni uzorak (nije nosilac mutacije).

4.2.2.2. Identifikacija heterozigotnog prisustva c.657_661del5 mutacije kod lanova porodica obolelih od NSN

U cilju identifikacije heterozigotnog statusa za mutaciju c.657_661del5 ura ena je i molekularna analiza kod ukupno 13 lanova porodica obolelih od NSN (12 roditelja i jedan brat). Kod svih 13 ispitivanih lanova porodica, potvr eno je heterozigotno prisustvo c.657_661del5 mutacije u *NBN* genu.

5. DISKUSIJA

5.1. FANKONIJEVA ANEMIJA

5.1.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM DIEPOKSIBUTANOVOG TESTA

Postavljanje dijagnoze FA na bazi kliničkih nalaza je veoma teško, zbog velike fenotipske varijabilnosti koja je karakteristična. Podaci iz literature, takođe pokazuju da približno 30% obolelih od FA nema urođene anomalije tipične za ovu bolest (Alter i Kupfer 2011; Bagby i dr. 2004; Dokal i Vulliamy 2010). Sem kliničke, FA karakteristične i velika genetička heterogenost, koja se ogleda u postojanju velikog broja gena, čije mutacije dovode do razvoja bolesti (Alter i Kupfer 2011).

Od ranije je poznato da se u ćelijama obolelih od FA mogu javiti spontane hromozomske promene u vidu različitih hromozomskih prekida i drugih rearanžmana (Schroeder i dr. 1964; Schroeder 1966), kao i kod niza drugih sindroma hromozomske nestabilnosti. Međutim, pacijenti oboleli od FA se mogu izdvojiti od ostalih bolesnika sa sličnim simptomima zahvaljujući hipersenzitivnom odgovoru na DNK-unakrsno-vezujuće agense, kao što je DEB (Sasaki i Tonomura 1973). Posledica dejstva ovog mutagena je prisustvo velikog broja hromozomskih i hromatidnih prekida u kariotipu ovakvih bolesnika. Ovo svojstvo ćelija sa fenotipom FA je danas u celom svetu iskorišćeno kao diferencijalni dijagnostički test u procesu skrininga obolelih od FA (Auerbach 1993).

U ovoj studiji su, prema podacima dostupnim iz literature, prvi put prikazani rezultati analize hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om, na uzorcima pacijenata sa kliničkom slikom FA, iz Srbije. Ovom analizom je obuhvaćeno ukupno 90 pacijenata i preko 80 uzoraka klinički zdravih osoba (članova porodice i dr.). Cilj ove analize je bio da se na osnovu poznatih parametara hromozomske nestabilnosti (procenat aberantnih ćelija, broj prekida/ćeliji, broj prekida/multiaberantnoj ćeliji, indeks fragilnosti hromozoma i dr.) utvrde intervali njihovih variranja, i prvi put u Srbiji definišu referentne vrednosti hromozomske osetljivosti, kako za obolele od FA, tako i za ostale (*ne-FA*) pacijente i zdrave kontrole.

5.1.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u kulturi limfocita periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom FA

U kulturama limfocita periferne krvi kod ukupno 90 pacijenata, koji su imali simptome FA, analizirano je prisustvo kako spontanih tako i DEB-om indukovanih hromozomskih aberacija prema ve definisanim parametrima (procenat aberantnih elija, broj prekida/ eliji i dr.).

Analize hromozomskih prekida, indukovanih DEB-om u trajanju od 24h, u limfocitnim kulturama ispitivanih bolesnika, su pokazale da:

- 11,11% (10/90) pacijenata ima pove anu hromozomsku osetljivost (procenat aberantnih elija $\geq 32\%$; broj prekida/ eliji $\geq 0,48$) što odgovara elijskom fenotipu FA (*FA* grupa);
- 85,56% (77/90) pacijenata nema pove anu indukovanu hromozomsku nestabilnost (procenat aberantnih elija $\leq 6\%$; broj prekida/ eliji $\leq 0,08$) i stoga su ozna eni kao *ne-FA* grupa;
- 3,33% (3/90) pacijenata imaju hromozomsku osetljivost (procenat aberantnih elija: 12% - 22%; broj prekida/ eliji: 0,15 – 0,26) koja se nalazi na granici izme u *FA* i *ne-FA* pacijenata (grani na *FA** grupa).

U estalost FA u ispitivanoj grupi pacijenata sa klini kim znacima ove bolesti (aplasti na anemija, odnosno aplazija kostne srži i dr.), bila je niža od vrednosti publikovanih u svetu, koje se kre u u proseku od 15% do 30% (Alter 1995; Cho i dr. 1997; Esmer i dr. 2004; Korgaonkar i dr. 2010; Oostra i dr. 2012). Ovo se može objasniti injenicom da nisu svi ovakvi pacijenti upu ivani na analizu DEB testom.

Grupa pacijenata sa pozitivnim rezultatom analize DEB testom ozna ena kao *FA*, imala je vrednosti procenta aberantnih elija koje su se kretale u rasponu od 32% do 82% i bile preko 28 puta više nego u *ne-FA* grupi (tabela 30). Ovi podaci su delom objavljeni u radovima Cirkovic i dr. (2006 i 2011).

Tabela 30. Rasponi procenta DEB-om indukovanih aberantnih elija kod pacijenata sa klini kom slikom FA.

Zemlja	SV aberantnih elija (%)	
	FA pacijenti	ne-FA pacijenti
Sjedinjene Ameri ke države (Auerbach i dr. 1989b)	85,15%	5,12%
Španija (Castella i dr. 2011)	68,10%	5,83%
Srbija ³⁰	52,52%	1,82%

Sli ni rezultati su dobijeni i kada je u analizi koriš en drugi parametar hromozomske nestabilnosti: broj prekida po eliji. Rasponi vrednosti prekida/ eliji u FA i ne-FA grupi su se, tako e jasno razdvojili (tabela 31) i bili su u saglasnosti sa prethodno objavljenim sli nim studijama (Auerbach i dr. 1989b; Ilgin i dr. 1999; Kook i dr. 1998).

Tabela 31. Rasponi vrednosti broja DEB-om indukovanih prekida/ eliji kod pacijenata sa klini kom slikom FA.

Zemlja	Interval broja prekida/ eliji	
	FA pacijenti	ne-FA pacijenti
Sjedinjene Ameri ke države (Auerbach i dr. 1989b)	1,30 – 23,90	0,00 – 0,36
Koreja (Kook i dr. 1998)	0,45 – 4,25	0,00 – 0,15
Španija (Castella i dr. 2011)	0,31 – 10,00	0,00 – 0,26
Turska (Ilgin i dr. 1999) ³¹	0,20 – multipli prekidi	0,00 – 0,16
Srbija	0,48 – 4,39	0,00 – 0,08

Pore enjem rezultata u ovoj studiji sa rezultatima objavljenim u studiji Internacionalnog registra Fankonijeve anemije (IFAR³²) iz 1989. godine (tabele 30 i 31), uo eno je da su vrednosti procenta aberantnih elija i broja prekida/ eliji bile nešto niže, i to u obe grupe: FA i ne-FA. S druge strane, rezultati ove studije se u potpunosti

³⁰ Srbija – u ovoj studiji

³¹ Turska - DEB je u finalnoj koncentraciji 0,01µg/ml umesto 0,1µg/ml

³² IFAR – eng. International Fanconi's Anemia Registry

slažu sa sli nim nalazima kod pacijenata iz Koreje (Kook i dr. 1998), Turske (Ilgin i dr. 1999) (tabela 31) i Španije (Castella i dr. 2011) (tabele 30 i 31).

Rezultati analize DEB testom na limfocitima periferne krvi kod 3,33% (3/90) bolesnika, pokazali su vrednosti ispitivanih parametara hromozomske nestabilnosti ($15,67\% \pm 5,51\%$ aberantnih elija; $0,20 \pm 0,06$ prekida/ eliji) koje su bile izme u istih vrednosti dobijenih za *FA* i *ne-FA* grupu. Ovi pacijenti su svrstani u posebnu grupu tzv. grani nih *FA** pacijenata. Prema podacima iz literature oko 15% - 25% pacijenata koji boluju od *FA* ima znatno niže (od 10% - 50% aberantnih elija), ak negativne vrednosti parametara DEB-om indukovane hromozomske nestabilnosti na limfocitima periferne krvi i svrstavaju se u grupu pacijenata sa mozai nim tipom *FA* (Auerbach i Alter 1989; Castella i dr. 2011; Kwee i dr. 1983; Lo Ten Foe i dr. 1997; Soulier i dr. 2005). Zbog mogu nosti da ovi pacijenti, i pored nižih vrednosti ispitivanih parametara, ipak boluju od *FA* (Auerbach i Alter 1989; Auerbach i dr. 1989b; Castella i dr. 2011; Ilgin i dr. 1999), preporuka je da se oni podvrgnu daljem testiranju u cilju dokazivanja *FA* (Auerbach 2003; Auerbach 2009; Shimamura i dr. 2002; Soulier i dr. 2005).

Na kraju, važno je naglasiti da u grupi od 10 pacijenata sa pozitivnim odgovorom na DEB, spontana hromozomska nestabilnost nije mogla da bude iskoriš ena za dokazivanje fenotipa *FA*, zbog preklapanja ovih vrednosti u *FA*, grani noj *FA**, i *ne-FA* grupi. U analiziranom uzorku u *FA* grupi, samo 30% (3/10) pacijenata je pokazalo pove anu spontanu hromozomsku nestabilnost u odnosu na zdrave kontrole, što je u saglasnosti sa rezultatima iz literature, prema kojima ova vrednost iznosi približno 45,6% (Castella i dr. 2011).

5.1.1.1.1. Heterogenost odgovora na DEB: mozaicizam unutar *FA* grupe

U grupi od 10 *FA* pacijenata procenat DEB-om indukovanih aberantnih elija je veoma varirao, i kretao se od 32% do 82%. Ova variranja su najverovatnije posledica prisustva pacijenata sa mozai nom formom *FA* u ovoj grupi ispitanika, kod kojih su vrednosti indukovanih aberantnih elija obi no niže.

Somatski mozaicizam predstavlja pojavu reverzije mutacija u genima za *FA*, u odre enim stadijumima hematopoeze, odnosno u odre enom procentu elija, što

rezultira u pojavi dva klona elija kod ovakvih pacijenata: jednog osetljivog na dejstvo DEB-a i drugog bez odgovora na DEB zbog prisustva revertne mutacije (Gregory i dr. 2001; Gross i dr. 2002; Hoehn i dr. 2007; Lo Ten Foe i dr. 1997; Waisfisz i dr 1999a; Youssoufian 1996). Veći procenat elija neosetljivih na DEB, kod ovih pacijenata dodatno komplikuje postavljanje dijagnoze FA, uz mogućnost dobijanja lažno negativnih rezultata DEB testa. U cilju potvrde ili isključenja mozaičnog fenotipa FA, ranije je bilo neophodno ispitivanje senzitivnosti na drugim tkivima, kao i primena metoda molekularne genetike, kojom bi se sa sigurnošću utvrdila konačna dijagnoza kod ovakvih pacijenata (Shimamura i dr. 2002; Waisfisz i dr 1999a). Upravo iz ovih razloga, istraživanje grupe španskih naučnika predvođenih M. Castellom i publikovanje matematičkog modela indeksa fragilnosti hromozoma, kojim bi se lakše definisale podgrupe u okviru FA grupe, predstavljalo je veliki doprinos u smislu preciznije dijagnostike FA (Castella i dr. 2011).

Prema podacima objavljenim u radu M. Castelle i dr. (2011), FA pacijenti sa vrednostima aberantnih elija < 40% - 50% se klasifikuju kao mozaični oblici. U potencijalne mozaične forme FA se ubrajaju pacijenti sa vrednostima aberantnih elija u rasponu od 40% do 60%, dok se FA pacijenti sa vrednostima aberantnih elija > 60% smatraju kompletnim, nemozaičnim tipom FA (Castella i dr. 2011). Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, FA pacijenti sa procentom aberantnih elija < 50% i > 30% su klasifikovani kao mozaični tip FA, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima (Castella i dr. 2011).

U cilju pronalazjenja parametra hromozomske nestabilnosti, kojim bi se bolje mogao sagledati aspekt mozaičnog, ali još uvek hipersenzitivnog odgovora elija FA na DEB, u analizi dobijenih rezultata, korišćena je kombinacija dva postojeća parametra: procenat aberantnih elija i broj prekida/multiaberantnoj eliji, odnosno indeks fragilnosti hromozoma (CFI) (Castella i dr. 2011).

5.1.1.1.2. Indeks indukovane fragilnosti hromozoma

S obzirom da koriš enje pojedina nih parametara za analizu hromozomske osetljivosti, kao što su: broj prekida/ eliji, broj prekida/multiaberantnoj eliji i procenat aberantnih elija, nije dalo zadovoljavaju e rezultate u pogledu jasnog razlikovanja mozai nih od nemozai nih *FA* pacijenata, u daljoj obradi rezultata je primenjena analiza indeksa fragilnosti hromozoma (CFI) (Castella i dr. 2011). Indukovanim indeksom fragilnosti, koji je dobijen množenjem procenta aberantnih elija i brojem prekida/multiabrrantnoj eliji ili brojem prekida/ eliji, omogu eno je bolje razdvajanje ove dve podgrupe *FA* pacijenata (Castella i dr. 2011).

Analizom I-CFI vrednosti u ispitivanom uzorku dobijeni su rezultati koji su pokazali da se grupe pacijenata ozna ene kao: *FA*, grani na *FA** i *ne-FA*, mogu razlikovati i na osnovu ovog parametra, bez me usobnog preklapanja intervala variranja vrednosti, što je u skladu sa literaturnim podacima (tabela 32) (Castella i dr. 2011).

Tabela 32. Rasponi DEB-om indukovanih CFI vrednosti (I-CFI) kod pacijenata sa klini kom slikom *FA*.

Zemlja	Intervali I-CFI vrednosti	
	<i>FA</i> grupa	<i>ne-FA</i> grupa
Španija (Castella i dr. 2011)	55,00 – 1180,00	2,00 – 40,00
Srbija	73,99 – 555,96	0,00 – 8,00

U okviru *FA* grupe od ukupno 10 analiziranih pacijenata, I-CFI vrednosti su se kod šest pacijenata nalazile u intervalu od 73,99 – 138,24 što je prema radu Castelle i dr. (2011), odgovaralo istim vrednostima na enim u podgrupi mozai nih *FA* pacijenata (tabela 33).

Tabela 33. Rasponi I-CFI vrednosti kod pacijenata sa mozai nom i nemozai nom formom *FA*.

Zemlja	Intervali I-CFI vrednosti <i>FA</i> pacijenata	
	nemozai ni <i>FA</i> pacijenti	mozai ni <i>FA</i> pacijenti
Španija (Castella i dr. 2011)	181,00 – 1180,00	55,00 – 220,00
Srbija	199,68 – 555,96	73,99 – 138,24

Kod preostala četiri pacijenta I-CFI vrednosti su se kretale u rasponu od 199,68 – 555,96 koji se preklapao sa odgovarajućim vrednostima nemozai njih *FA* pacijenata, prethodno objavljenim u literaturi (tabela 33) (Castella i dr. 2011).

U ovoj studiji 60% (6/10) pacijenata iz *FA* grupe, sa procentom aberantnih elija > 30% i < 50% (0,48 – 1,50 prekida/ eliji), su na osnovu I-CFI vrednosti označeni kao mozaični, dok su preostalih 40% (4/10) pacijenata svrstani u nemozaičnu *FA* podgrupu (procenat aberantnih elija > 60%; broj prekida po eliji > 1,31). Podgrupe mozaičnih i nemozaičnih pacijenata je u ovom slučaju, bilo moguće razlikovati i na osnovu procenta aberantnih elija, bez međusobnog preklapanja. Kada se poredi uestalost mozaičnog tipa među pacijentima obolelim od *FA* (60%) u ovoj studiji, sa uestalosti u od 10% - 30% u već objavljenim radovima (Auerbach i dr. 1989a; Auerbach 2003; Castella i dr. 2011), uočava se znatno veći procenat ovakvih pacijenata u ispitivanoj grupi pacijenata iz Srbije. Uzrok ovome se najverovatnije nalazi u činjenici da nisu svi oboleli od *FA* u Srbiji, bili podvrgnuti analizi DEB testom.

U grupi pacijenata sa kliničkom slikom *FA*, 3,33% (3/90) pacijenata su pokazali variranje I-CFI vrednosti od 24,00 – 44,00 koje se delimično poklapalo sa odgovarajućim vrednostima u grupi *ne-FA* pacijenata objavljenim u radu Castelle i dr. (2011) (tabela 32). Kod ovih pacijenata označenih kao granični *FA** pacijenti, bila su neophodna dodatna testiranja za potvrdu ili isključenje dijagnoze *FA*.

Primena analize indeksa fragilnosti hromozoma omogućila je formiranje graničnih vrednosti ovog parametra pomoću kojih se mogu izdvojiti pacijenti sa mozaičnim fenotipom *FA* u odnosu na ostale *FA* pacijente, i pre sprovođenja daljih analiza na drugim tkivima, kao i primene molekularnih metoda. Nalazi koji ukazuju da se mozaični *FA* pacijenti mogu otkriti na osnovu I-CFI vrednosti na limfocitima periferne krvi pod indukcijom DEB-om, dobijaju još više značaja, s obzirom da molekularna dijagnostika ovog oboljenja može biti izuzetno složena i skupa za izvođenje.

5.1.1.1.3. Uticaj dužine trajanja indukcije DEB-om na hromozomsku nestabilnost kod pacijenata u FA i grani noj FA* grupi

Postoje brojni radovi i protokoli prema kojima se indukcija hromozomskih aberacija DEB-om u kulturama limfocita periferne krvi može vršiti u trajanju od 24h, 48h ili 72h (Auerbach i dr. 1989b; Auerbach 2003; Castella i dr. 2011; Ilgin i dr. 1999; Kook i dr. 1998). U ovoj studiji su uporeni rezultati dobijeni 24- i 48- asovnim dejstvom DEB-a, u uzorcima pacijenata FA i grani ne FA* grupe. Analiza je pokazala da se prisustvo hromozomskih aberacija, generalno uzev, poveća sa vremenom trajanja tretmana u ovim grupama. Ipak, vrednosti hromozomske nestabilnosti, indukovane 48h DEB-om u kulturama limfocita FA pacijenata, bile su niže od do sada objavljenih rezultata za isto vreme indukcije (Auerbach i dr. 1989b; Castella i dr. 2011). Ovakav slučaj može biti posledica relativno visokog procenta mozaičnih pacijenata među obolelim od FA. S obzirom na rezultate analize pri 24- asovnom dejstvu DEB-a, nije su vrednosti omogućile jasno razlikovanje između grupa, može se zaključiti da su ovi uslovi indukcije dovoljni za izazivanje specifičnog povećanja hromozomske nestabilnosti u celijama FA pacijenata.

5.1.1.2. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u kulturi fibroblasta kože

Kada analiza hromozomske osetljivosti na DEB u limfocitima periferne krvi pacijenata sa kliničkom slikom FA, pokaže da više od 50% - 70% celija nema hromozomske aberacije, neophodno je ispitati hromozomsku nestabilnost na drugom tkivu, najčešće fibroblastima kože (Auerbach 2003; Soulier i dr. 2005). U grupi od 10 pacijenata sa kliničkim znacima FA, a sa pozitivnim odgovorom limfocita na DEB, ova analiza je pokazala postojanje dve podgrupe pacijenata: nemozaični FA pacijenti sa procentom aberantnih celija > 60% i mozaični FA pacijenti sa nižim procentom aberantnih celija: od 30% do 50%. U cilju ispitivanja hromozomske nestabilnosti i potvrde, odnosno isključenja mozaika kod pacijenata sa nižim vrednostima, bilo je potrebno sprovesti analizu hromozomske nestabilnosti na fibroblastima kože (Alter i Kupfer 2011; Auerbach 2003; Gregory i dr. 2001). Potvrda ili isključenje mozaika na

fibroblastima kože je bila neophodna i kod pacijenata koji su na osnovu ove analize bili označeni kao *FA** granični pacijenti.

5.1.1.2.1. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u kulturi fibroblasta kože zdravih osoba

Citogenetičkom analizom u kulturi fibroblasta klinički zdravih osoba (kontrolna grupa) utvrđeno je interval procenta aberantnih kromosoma pri 24-satnom dejstvu DEB-a (0% - 6%), kao i raspon broja prekida/kromosoma (0,00 – 0,06). Ovakvo dobijene vrednosti su bile u saglasnosti sa podacima iz literature (Auerbach 2003) i korišćene su za poređenje sa rezultatima pacijenata u *FA* grupi, kao referentni negativni nalazi testa.

5.1.1.2.2. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u kulturi fibroblasta kože pacijenata sa mozaičnim tipom FA

Mozaičan odgovor limfocita na DEB kod određenog broja *FA* pacijenata, u smislu postojanja većeg broja kromosoma neosetljivih na dejstvo ovog agensa, zahtevao je proveru hromozomske osetljivosti na još jednom tkivu ovakvih pacijenata. Kod četiri od ukupno šest pacijenata je potvrđeno mozaični fenotip *FA*, i na fibroblastima kože (*FA* grupa: od 0,10 – 0,38 prekida/kromosoma naspram kontrolne grupe: od 0,00 – 0,06 prekida/kromosoma). Našle vrednosti kod *FA* pacijenata su bile ispod vrednosti opisanih u literaturi (0,68 – 1,10 prekida/kromosoma) (Auerbach 2003), ali veće od kontrolnih vrednosti ($p < 0,05$).

Međutim, dva *FA* pacijenta koji su u kulturama limfocita imali povećan broj hromozomskih aberacija u odgovoru na DEB, u kulturama fibroblasta kože nisu ispoljila povećanu hromozomsku osetljivost. Kod ovakvih pacijenata, kod kojih je dobijen različit odgovor na DEB testu u dva različita tkiva, tj. jedan pozitivan, a drugi negativan, neophodno je bilo uraditi neku drugu vrstu analize za dokazivanje *FA*, kao što je komet test ili protokolno citometrijska analiza zastoja kromosoma u G2 fazi.

5.1.1.2.3. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u kulturi fibroblasta kože grani nog FA* pacijenata

U grupi od tri grani na FA* pacijenta, samo kod jednog pacijenta (FA*-2) je bio dostupan uzorak biopsije kože, na kome je u daljem postupku analizirana osetljivost hromozoma na DEB. Analiza je pokazala prisustvo kako spontanaih, tako i 24h DEB-om indukovanih hromozomskih aberacija u fibroblastima ovog pacijenta. Dobijeni rezultati su bili u okvirima vrednosti karakteristi nih za FA pacijente i slagali su se sa rezultatima iz prethodnih studija (spontani broj prekida/ eliji: 0,20 – 0,36) (Auerbach 2003). Ispitivanje hromozomske nestabilnosti u fibroblastima kože ovog pacijenata se pokazalo opravdanim, s obzirom da je na ovaj na in potvr eno da se radi o mozai noj formi FA, što je i bio razlog relativno niske osetljivosti limfocita na DEB. Primena analize hromozomskih aberacija, indukovanih DEB-om, na fibroblastima kože može biti korisna u slu aju kada nije dostupna druga vrsta uzorka (limfociti), ali njeno izvo enje mora biti strogo kontrolisano, kao i kvalitet hromozoma i mitotski indeks, zbog visoko toksi nog dejstva DEB-a (Auerbach 2003).

5.1.2. ANALIZA OŠTE ENJA DNK PRIMENOM ALKALNOG KOMET TESTA

Poslednjih godina, pored ispitivanja hromozomske osetljivosti indukovane DEB-om i MMC-om, kod pacijenata sa klini kom slikom FA (Rojas i dr. 1999; Mohseni Meybodi i Mozdarani 2009), veliki zna aj se pridaje i analizi ošte enja DNK (komet test) (Singh i dr. 1988) kod ovakvih pacijenata (Mohseni Meybodi i Mozdarani 2009).

Alkalni komet test je zbog svoje osetljivosti u detekciji jednolan anih i dvolan anih prekida na molekulu DNK, nastalih bilo spontano, bilo pod uticajem odre enih spoljašnjih faktora (zra enje, mutageni) (Collins 2004), našao primenu i u ispitivanju specifi ne osetljivosti elija obolelih od FA (Djuzenova i dr. 2001; Müller 2007). Na ovaj na in, pored analize hromozomske nestabilnosti, i analiza ošte enja DNK komet testom se pokazala kao veoma informativna, dodatna metoda u postavljanju precizne dijagnoze FA (Djuzenova i dr. 2001; Mohseni-Meybodi i dr. 2009).

U cilju utvrđivanja oštećenja DNK i eventualne potvrde elijskog fenotipa FA, kod pacijenata koji su citogenetičkom analizom limfocita periferne krvi pokazali granične rezultate (FA* grupa), na istim elijama je primenjen i alkalni komet test. Kao parametar oštećenja korišten je Olive-moment repa, koji na zadovoljavaju i na in opisuje oštećenja DNK (Olive i dr. 1990; Lee i dr. 2004). Za potrebe ove analize, prvo je bilo neophodno utvrditi granice variranja OTM vrednosti kod zdravih osoba (kontrola), a zatim kod FA (DEB-pozitivnih) pacijenata, radi međusobnog poređenja.

5.1.2.1. Analiza oštećenja DNK u kulturama limfocita zdravih osoba

Kod šest klinički zdravih osoba (kontrolna grupa) urađena je analiza komet testom na uzorcima limfocita periferne krvi u cilju utvrđivanja oštećenja DNK karakterističnih za zdravu populaciju ljudi. Rezultati ove analize su pokazali da se spontano nastala oštećenja (OTM) u limfocitima kontrolne grupe kreću u rasponu od 0,94 – 1,85 (SV: $1,49 \pm 0,39$). S obzirom da je poznato da rezultati ove analize mogu da variraju od laboratorije do laboratorije, uglavnom zbog razlika u proceduri testa (Møller i dr. 2010), ali i u interpretaciji rezultata (moment repa, procenat DNK u repu i dr.) vrlo je teško uporediti podatke dobijene u ovoj studiji sa postojećim sličnim radovima. Ipak, intervali OTM vrednosti kontrolne grupe u ovoj studiji, su u saglasnosti sa rezultatima studija koje su na sličan način interpretirale rezultate oštećenja DNK limfocita zdravih osoba (SV: $1,22 \pm 0,26$ (Lee i dr. 2004) i interval: 1,12 – 1,30 (Schabath i dr. 2003)).

Kada su ove elije bile izložene dejstvu DEB-a, uočeno je povećanje (manje od jednog i po puta) oštećenja u odnosu na bazičnu. Prethodne studije, kojima je pomoću komet testa proučavano genotoksično dejstvo ovog jedinjenja u limfocitima periferne krvi i drugim elijama zdravih ljudi (Anderson i dr. 1997; Macioszek i Kononowicz 2004), pokazale su da se mutageni efekat DEB-a uglavnom zasniva na izazivanju unakrsnih veza unutar molekula DNK, jednolančanih prekida i drugih oštećenja (Wen i dr. 2011). S obzirom da su u ovim istraživanjima korišćeni različiti uslovi (koncentracija i vreme) indukcije oštećenja DEB-om, nije bilo moguće uporediti dobijene rezultate u ovoj studiji sa prethodno objavljenim podacima. Ipak, evidentno je da DEB uzrokuje oštećenja DNK, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Anderson i dr. 1997). Ovako dobijeni rezultati komet testa na limfocitima zdravih

osoba, u daljem radu su korišteni za poređenje sa rezultatima pacijenata sa kliničkom slikom FA.

5.1.2.2. Analiza oštećenja DNK u kulturama limfocita FA pacijenata

Primenom analize alkalnim komet testom ispitano je ukupno pet pacijenata koji su u prethodnim citogenetičkim analizama imali pozitivan odgovor limfocita na DEB (FA grupa). Prema I-CFI vrednostima i procentu aberantnih elija, dva od ovih pet FA pacijenata su svrstana u FA-nemozai nu podgrupu, dok su preostala tri pacijenata svrstana u FA-mozai nu podgrupu.

Kod FA pacijenata, kod kojih je otkriveno prisustvo DEB-om indukovanih hromozomskih aberacija u preko 60% analiziranih limfocita (nemozai ni FA pacijenti), OTM vrednosti su se kretale u intervalima: od 2,63 – 2,87 za spontana oštećenja; od 3,65 – 5,56 pod 24h-indukcijom DEB-om i od 2,09 – 6,97 pod 48h-indukcijom DEB-om. Međusobnim poređenjem OTM vrednosti dobijenih kod dva nemozai na FA pacijenata i u kontrolnoj grupi, utvrđeno je da se rasponi ovih vrednosti za spontana kao i za DEB-om indukovana oštećenja DNK u ove dve grupe ne preklapaju. Analize su pokazale da su oštećenja DNK u limfocitima nemozai ni FA pacijenata bila pod 24-časovnim dejstvom DEB-a čak tri puta veća nego kod klinički zdravih osoba.

Prema do sada dostupnim podacima, postoji mali broj studija koji se bavio analizom oštećenja DNK u elijama obolelih od FA primenom ove metode (Djuzenova i dr. 2001; Mohseni Meybodi i Mozdarani 2009; Mohseni-Meybodi i dr. 2009). Rezultati ove studije koji govore o povećanom prisustvu spontanih oštećenja u elijama FA pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, saglasni su sa već objavljenim podacima drugih autora (Djuzenova i dr. 2001; Mohseni-Meybodi i dr. 2009).

U analizama komet testom, objavljenim u prethodnim studijama, za indukciju i povećanje oštećenja DNK u elijama obolelih od FA, do sada je korišćeno jonizujuće zračenje i MMC (Djuzenova i dr. 2001; Mohseni Meybodi i Mozdarani 2009; Mohseni-Meybodi i dr. 2009). Koliko je poznato iz dostupne literature, DNK-unakrsno vezujuć efekat DEB-a u elijama pacijenata sa FA, do sada nije analiziran komet testom, odnosno na nivou pojedinačnih elija. U ovoj studiji su po prvi put izneti rezultati

analize DEB-om indukovanih ošte enja DNK limfocita periferne krvi pacijenata obolelih od FA. Rezultati ove analize su se poklopili sa rezultatima hromozomske analize na limfocitima i na taj na in još jednom potvrdili postojanje fenotipa FA kod ovih pacijenata.

Za tri FA pacijenta koji su na osnovu hromozomske osetljivosti limfocita na DEB svrstani u mozai nu FA podgrupu (procenat aberantnih elija: 32% - 49%), analizom ošte enja DNK utvr ene su OTM vrednosti koje su bile karakteristi ne za nemozai ne FA pacijente. Analiza komet testom se na ovaj na in pokazala kao senzitivnija od hromozomske analize, jer je kod tri pacijenta nedvosmisleno dokazala postojanje fenotipa FA.

Na osnovu podataka iz literature, komet testom do sada nisu analizirani pacijenti sa mozai nim fenotipom FA, u cilju isklju enja mozaika i potvrde fenotipa FA. U budu nosti, ova metoda bi se kao veoma senzitivna, brza i jednostavna mogla koristiti za potvrdu ili isklju enja mozaika kod svih pacijenata sa klini kom slikom FA, koji pokažu hromozomsku neosetljivost limfocita na dejstvo DEB-a u 50% do 70% svojih elija.

5.1.2.3. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita grani nih FA* pacijenata

Analiza komet testom je ura ena kod dva grani na FA* pacijenta koja su tako klasifikovana na osnovu vrednosti hromozomske nestabilnosti indukovane DEB-om u limfocitima. Kod jednog od ovih pacijenata dobijene su OTM vrednosti karakteristi ne za FA grupu pacijenata. Na ovaj na in je, kod pacijenta kod kojeg je putem DEB testa otkriveno samo 13% limfocita sa indukovanim hromozomskim aberacijama, zahvaljuju i senzitivnijem komet testu, nedvosmisleno potvr en elijski fenotip FA.

Na osnovu gore iznetih rezultata, u budu nosti bi kod svih pacijenata sa klini kim znacima FA, koji pokažu hromozomsku osetljivost na DEB u ak samo 10% - 30% svojih limfocita, pa ih na osnovu toga nije mogu e svrstati u FA ili *ne-FA* grupu, trebalo savetovati primenu komet testa u cilju potvrde ili isklju enja FA. Kod grani nih FA* pacijenata kod kojih, ak ni primena analize komet testom ne potvrdi postojanje FA,

indikovana je primena dodatnih testova, kao što je analiza elijskog ciklusa, za kona nu potvrdu ili isklju enje ovog oboljenja.

5.1.2.4. Analiza ošte enja DNK u kulturama limfocita *ne-FA* pacijenata

U analizi alkalnim komet testom ispitivan je i nivo ošte enja molekula DNK u limfocitima 10 pacijenata ija je klini ka slika ukazivala na FA, ali koji nisu pokazali hromozomsku osetljivost na DEB (*ne-FA* grupa). Kod ve ine (6/10) ovakvih pacijenata utvr ene su OTM vrednosti koje su bile u granicama vrednosti onih u kontrolnoj grupi. Kod etiri (4/10) pacijenta, me utim, dobijene su vrednosti ošte enja DNK, koje su se kretale u rasponima istih vrednosti utvr enih za *FA* pacijente.

U tuma enju rezultata analize komet testom, kod bolesnika koji su prethodno (hromozomskom analizom) dali negativan odgovor na DEB, potrebna je izvesna doza opreznosti. Naime, ovde se radi o vrlo senzitivnom testu kojim je mogu e detektovati i ošte enja koja se mogu povezati sa drugim sindromima hromozomske nestabilnosti (Nijmegenov sindrom nestabilnosti i dr.) (Smal i dr. 2010), ali i sa malignim i drugim oboljenjima (Kopjar i dr. 2006; Rajeswari i dr. 2000), koji imaju sli ne klini ke znake kao FA. Upravo je stoga neophodno sve pacijente sa pozitivnim rezultima analize komet testom, a negativnim rezultatima hromozomske osetljivosti na DEB, u budu nosti dalje pratiti uz primenu dodatnih metoda, ukoliko postoji više klini kih parametara koji upu uju na FA.

5.1.2.5. Prednosti analize komet testom u dijagnostici FA

Podaci iz literature pokazuju da komet test predstavlja relativno brz i pouzdan metod za ispitivanje senzitivnosti genoma pacijenata sa klini kom slikom FA. Njegova primena u dodatnom testiranju elijskog fenotipa FA je opravdana i mogla bi na i mesto u potvrdi mozai nog oblika ove bolesti. S obzirom na zastupljenost ovakvih i grani nih pacijenata, kao i na mogu nost negativnog odgovora limfocita na DEB u hromozomskoj analizi kod obolelih od FA, analiza ošte enja DNK bi se mogla koristiti kao dopunska metoda u skriningu ovog oboljenja (Djuzenova i dr. 2001; Shimamura i dr. 2002). S obzirom na postoje e podatke, vezane za ošte enja DNK u elijama heterozigotnih nosioca FA i mogu nosti njihovog razlikovanja u odnosu na zdrave osobe koje nisu

nosioći mutacija u genima za FA (Djuženova i dr. 2001; Mohseni-Meybodi i dr. 2009), primena komet testa u te svrhe bi bila od velikog značaja za davanje preciznog genetičkog saveta u porodicama obolelih.

5.1.3. PROTOKOLNO CITOMETRIJSKA ANALIZA ELIJSKOG CIKLUSA

Pre više od 20 godina naučnici na čelu sa B. Dutrillauxom (1982), a zatim i M. Kubbies i saradnici (1985), su otkrili da elijski ciklus limfocita periferne krvi pacijenata sa FA, sporije teče nego kod klinički zdravih ljudi. Ispitivanjem brzine proliferacije ovih elija, metodama protokolne citometrije uz korišćenje BrdU-Hoechstove tehnike, došlo se do zaključka da je G2 faza limfocita obolelih od FA značajno produžena (Kubbies i dr. 1985). U godinama koje slede, spontani zastoj elija FA u G2 fazi, koji može biti dodatno povećan dejstvom specifičnih mutagena, je iskorišćen u diferencijalno dijagnostičke svrhe (Fabio i dr. 2000; Kaiser i dr. 1982; Miglierina i dr. 1991).

Analiza elijskog ciklusa u ovoj studiji, urađena je na uzorcima pacijenata sa kliničkom slikom FA, koji su nakon analiza: DEB i komet testom, pokazali dobre rezultate (jedan test je bio pozitivan, a drugi negativan), a u cilju testiranja još jednog parametra (zastoj u G2 fazi) kojim se može potvrditi fenotip i dijagnoza FA. Pre početka analize kod ovih pacijenata sa kliničkom slikom FA, radi daljeg poređenja, prvo su dobijene vrednosti zastoja elija u G2 fazi kod već potvrđenih FA pacijenata (pozitivni na DEB i komet testu), kao i kod zdravih osoba (kontrola). Važno je napomenuti da su u ovoj studiji prikazani rezultati protokolne citometrijske analize koja je po prvi put urađena kod pacijenata pod sumnjom da boluju od FA, poreklom iz Srbije. Rezultati ove studije su prikazani u vidu procenta elija u G2 fazi elijskog ciklusa koji je pored faza rasta (G1, S, G2 i M) obuhvatio i G0 fazu.

5.1.3.1. Analiza elijskog ciklusa u kulturama limfocita periferne krvi

Protokolna citometrijska analiza je urađena prvo na limfocitima periferne krvi dve zdrave osobe i pet pacijenata iz FA grupe, a zatim i kod dva pacijenta iz granične FA* grupe i sedam pacijenata iz ne-FA grupe. Analizom je ispitan spontani zastoj

limfocita, nije je pove anje bilo specifi no indukovano primenom DEB-a i to u trajanju od 24h i 48h.

5.1.3.1.1. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa zdravih osoba

Kako bi se utvrdio procenat limfocita koji ne ispoljavaju fenotip FA, a koji se normalno nalaze u G2 fazi elijskog ciklusa, koriš ena su dva uzorka klini ki zdravih osoba. Analize su pokazale da do spontanog zastoja dolazi u 5,86% – 7,68% limfocita kontrolne grupe koji su kultivisani ukupno 72h, dok se ovaj procenat pri 24- asovnoj kultivaciji uz indukciju DEB-om kretao u rasponu od 1,56% – 4,11%, odnosno od 4,34% – 7,21% pri 48- asovnoj indukciji.

S obzirom na izvesne modifikacije metode (nije koriš ena BrdU-Hoechstova tehnika) i simplifikovanu obradu dobijenih podataka (Ormerod 2000), bilo je teško uporediti rezultate ove studije sa prethodno objavljenim sli nim radovima. Naime, u studiji brazilske grupe nau nika procenat limfocita zdravih osoba u G2 fazi se kretao u rasponu od 1,83% - 1,94% u netretiranim, dok je u 48h DEB-om tretiranim kulturama limfocita taj procenat iznosio 1,97% - 3,69% (Moreira i dr. 2008). Pri pore enju rezultata, prime uje se da su vrednosti zastoja kontrolnih uzoraka u ovoj studiji nešto više u odnosu na objavljene u radu C.F.A. Moreire i saradnika, što može biti posledica razlika u veli ini uzorka, kao i u pripremi elija za analizu. Me utim, srednja vrednost spontano nastalog zastoja kontrolne grupe ($6,77\% \pm 1,29\%$) je u okvirima istih vrednosti prethodno objavljenih ve ih studija (Fabio i dr. 2000; Xing i dr. 2007). U daljoj analizi, rezultati kontrolne grupe su služili za pore enje sa vrednostima zastoja dobijenim kod pacijenata sa klini kom slikom FA.

5.1.3.1.2. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa FA grupe

Kod pet FA pacijenata (dva iz nemozai ne i tri iz mozai ne podgrupe) koji su nakon analiza DEB i komet testom pokazali fenotip karakteristi an za FA, ura ena je analiza elijskog ciklusa iz kulture limfocita periferne krvi. Dobijeni rezultati su pokazali da vrednosti zastoja u netretiranim uzorcima FA pacijenata variraju od 11,20% – 18,48% (SV: $14,63\% \pm 2,73\%$), što je bilo oko dva puta više nego u kontrolnoj grupi. Ovi rezultati se delimi no preklapaju sa rezultatima sli nih studija (Moreira i dr. 2008) i

u skladu su sa podacima drugih radova koji govore u prilog postojanja pove anog spontanog zastoja limfocita FA u G2 fazi (Seyschab i dr. 1995).

Kada su 24- asovne kulture limfocita FA pacijenata bile izložene dejstvu DEB-a, procenat elija u G2 fazi je bio preko dva i po puta viši i nije se preklapao sa vrednostima istog parametra u kontrolnoj grupi (FA: 4,41% – 10,45% naspram kontrolne: 1,56% – 4,11%). Na ovaj na in je bilo mogu e razlikovati FA pacijente kod kojih dolazi do specifi nog nagomilavanja elija u G2 fazi, u odnosu na zdrave osobe koje imaju normalan elijski ciklus (t -test: $p < 0,05$). Pove ani zastoj limfocita ovih pacijenata uo en je i pri 48- asovnoj indukciji DEB-om, mada uz delimi no preklapanje sa kontrolnom grupom.

U prethodnim studijama za indukciju zastoja elija FA u G2 fazi naj eš e je koriš en MMC (Heinrich i dr. 1998; Schindler i Hoehn 1999; Schindler i dr. 2007), re e DEB (Moreira i dr. 2008), mefalan (Fabio i dr. 2000) i drugi agensi. Kada se dobijeni rezultati uporede sa sli nim radovima (48,29% - 62,23% (Moreira i dr. 2008)), uo avaju se nešto niže vrednosti zastoja limfocita FA pacijenata obra enih u ovoj studiji, što je najverovatnije posledica postojanja ve eg broja limfocita koji nisu senzitivni na DEB (mozaï ni FA pacijenti).

S obzirom da je proto no citometrijskom analizom elijskog ciklusa na relativno brz i jednostavan na in mogu e utvrditi elijski fenotip FA, ova metoda kao i komet test može biti iskoriš ena u dodatnoj potvrdi dijagnoze kod pacijenata sa mozaï nom formom bolesti.

5.1.3.1.3. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa grani ne FA* grupe

Uzorci limfocita dva pacijenta kod kojih je analiza DEB testom pokazala grani ne vrednosti hromozomske osetljivosti (FA* grupa), koriš eni su za analizu zastoja elijskog ciklusa u cilju potvrde ili isklju enja dijagnoze FA. Prethodno ura ena analiza komet testom kod jednog od ova dva FA* pacijenta, nije pokazala zna ajnija ošte enja DNK u limfocitima. Stoga je kod ovog pacijenta bilo nephodno uraditi analizu elijskog ciklusa, kako bi se utvrdilo da li prema procentu elija u G2 fazi može da se klasifikuje u FA ili ne-FA grupu.

Proto no citometrijska analiza u kulturama limfocita oba grani na *FA** pacijenta je pokazala da dolazi do pove anog 24h DEB-om indukovanog zastoja, koji odgovara fenotipu *FA*. Ovom analizom je potvr ena dijagnoza *FA* kod pacijenata koji su na DEB testu imali ak 78% i 87% elija sa normalnim fenotipom (nesenzitivnih na DEB). Koliko je poznato, analize ciklusa limfocita uz indukciju DEB-om, kod pacijenata sa ovako niskim vrednostima DEB testa do sada nisu ra ene, tako da su ovo prvi rezultati takve vrste. Ova metoda može biti iskoriš ena u diferencijalnoj dijagnozi pacijenata sa klini kom slikom *FA*, za koje se primenom prethodnih analiza (DEB test i komet analiza) ne može sa sigurnoš u utvrditi da pripadaju *FA* grupi pacijenata.

5.1.3.1.4. Analiza zastoja limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa *ne-FA* grupe

Analiza elijskog ciklusa ura ena je kod sedam pacijenata sa klini kim znacima *FA* koji nisu pokazali pove an broj indukovanih hromozomskih aberacija (*ne-FA* pacijenti), me u kojima je bilo i etiri pacijenta sa pove anim ošte enjima DNK u limfocitima (pozitivni na komet testu). Kod ve ine (5/7) *ne-FA* pacijenata utvr eno je da se zastoj limfocita u G2 fazi, nalazi u granicama istih vrednosti kao u kontrolnoj grupi. Samo kod dva (2/7) *ne-FA* pacijenta zastoj limfocita se kretao u rasponu vrednosti ovog parametra, karakteristi nih za *FA* pacijente. Kod jednog od ta dva pacijenta, komet analiza je pokazala i pove ana ošte enja na molekulu DNK, što je razlog više za dodatno pra enje ovog pacijenta i eventualno ponavljanje analize DEB testom.

Od ranije je poznato da pacijenti sa aplasti nom anemijom mogu imati nešto ve i zastoj limfocita u G2 fazi elijskog ciklusa, iako ne boluju od *FA* (Schindler i Hoehn 1999). Tako e se zna da ova analiza kod pacijenata sa ve razvijenim malignim oboljenjem, može dati lažno negativne rezultate, što dodatno otežava postavljanje precizne dijagnoze bolesti (Seyschab i dr. 1995). U te svrhe je neophodno sistematizovati podatke iz više analiza (DEB test, komet test, zastoj u G2 fazi) i u skladu sa klini kim znacima oboljenja tuma iti dobijene rezultate.

5.1.3.2. Analiza elijskog ciklusa u kulturama fibroblasta kože

Kod jednog *FA* pacijenta koji je na osnovu analize indeksa fragilnosti (DEB test na limfocitima) svrstan u mozai nu *FA* podgrupu, a iji limfociti nisu bili dostupni za dalje analize (komet test, analiza ciklusa), ispitivan je zastoj fibroblasta u G2 fazi, u cilju potvrde ili isklju enja mozaika. Analiza je prvo sprovedena u kulturama fibroblasta kože dve klini ki zdrave osobe (kontrolna grupa), a zatim i kod etiri *FA* pacijenta mozai ne podgrupe (uklju uju i i prethodno spomenutog) kako bi se utvrdile granice vrednosti zastoja fibroblasta u ove dve grupe.

5.1.3.2.1 Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa zdravih osoba

Proto no citometrijska analiza ciklusa u kulturi fibroblasta kože u kontrolnoj grupi pokazala je da procenat fibroblasta u G2 fazi, pri 48- asovnom dejstvu DEB-a, varira u rasponu od 2,92% - 5,99%. Na ovaj na in su odre ene granice vrednosti indukovanog zastoja fibroblasta u G2 fazi, karakteristi ne za fenotipski zdrave elije, što je bio neophodni preduslov za sprovo enje iste analize na fibroblastima *FA* pacijenata. Pošto je u ve ini prethodnih sli nih studija koje su se bavile ispitivanjem elijskog ciklusa fibroblasta, za indukciju koriš en MMC i drugi agensi (Kaiser i dr. 1982; van der Lelij i dr. 2010), nije bilo mogu e uporediti rezultate dobijene u ovoj studiji sa ve objavljenim podacima.

5.1.3.2.2. Analiza zastoja fibroblasta u G2 fazi elijskog ciklusa pacijenata sa mozai nom formom *FA*

U kulturama fibroblasta kože analiza elijskog ciklusa je kod sva etiri *FA* pacijenta sa mozai nom formom bolesti, uklju uju i i bolesnika kod kojeg je ra en samo DEB test na limfocitima, pokazala pove ani 48h DEB-om indukovani zastoj u odnosu na kontrolne uzorke. Procenat elija *FA* koji se nalazio u G2 fazi je bio u proseku oko tri puta viši nego u kontrolnoj grupi, što odgovara nalazima sli nih istraživanja u kojima je umesto DEB-a, koriš en MMC kao mutageni agens sa sli nim DNK-unakrsno vezuju im efektom (Kaiser i dr. 1982; Schindler i Hoehn 1999; van der Lelij i dr. 2010).

5.1.3.3. Značaj primene analize elijskog ciklusa u cilju potvrde fenotipa FA

Kod FA pacijenata koji su prethodno pokazali mozaičnu hromozomsku osetljivost limfocita na DEB, analizom elijskog ciklusa u kulturi fibroblasta kože, omogućena je konačna potvrda dijagnoze FA (Schindler i dr. 2007). Rezultati ove analize su od velikog značaja, za pacijente sa mozaičnim fenotipom FA, pogotovo kada uzorak limfocita ovakvih pacijenata iz određenih razloga (zbog transplantacije i dr.) nije dostupan za dalje analize (komet test). Na ovaj način su, tako ostvareni preduslovi za eventualno sprovođenje prenatalne dijagnostike u porodicama obolelih u budućnosti, u vidu analize elijskog ciklusa u kulturi amnionskih ćelija.

5.1.4. ZNAČAJ ISPITIVANJA SENZITIVNOSTI GENOMA U DIJAGNOZI FA

Primena analize DEB testom na limfocitima periferne krvi pacijenata sa kliničkim znacima FA, omogućila je skrining i izdvajanje FA pacijenata sa izuzetno povećanom hromozomskom osetljivošću (procenat aberantnih ćelija > 60%; nemozaični pacijenti), koji bi direktno bili upućivani na komplementacione i druge mutacione analize za otkrivanje uzroka, i potvrdu bolesti na molekularnom nivou. Ovom analizom je omogućena i selekcija pacijenata sa potencijalnim mozaičnim odgovorom na DEB, koji prema rezultatima ove studije mogu imati od 49% do čak samo 13% aberantnih limfocita (mozaični FA i granični FA* pacijenti). Kod ovakvih pacijenata brza i jednostavna analiza oštećenja DNK (komet test) na limfocitima omogućila je i dodatnu potvrdu fenotipa FA, pre daljih vrlo skupih i zahtevnih molekularnih analiza. Kada je kod mozaičnih FA pacijenata nakon DEB testa, jedino dostupan uzorak biopsije kože, tada se pristupa analizi elijskog ciklusa ili analizi hromozomske nestabilnosti u kulturi fibroblasta kože ovakvih pacijenata, u cilju potvrde ili isključenja mozaicizma FA. Pozitivni rezultati najmanje dve ovakve analize u slučaju mozaičnih FA pacijenata, mogu da potvrde dijagnozu FA na nivou elijskog fenotipa. Konačna potvrda dijagnoze i otkrivanje mutacija koje uzrokuju bolest mogu a je samo primenom tehnika molekularne genetike, koje se za sada ne rade u našoj zemlji, ali je mogući kontakt sa specijalizovanim laboratorijama u inostranstvu.

5.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI

5.2.1. ANALIZA HROMOZOMSKE NESTABILNOSTI PRIMENOM BLEOMICINOVOG TESTA

Kao u slučaju najvećeg broja bolesti hromozomske nestabilnosti, i kod obolelih od NSN simptomi kao što su: mikrocefalija, zastoj u rastu i razvoju, ponovljene plućne infekcije i dr, mogu predstavljati fenotipske karakteristike niza drugih oboljenja. Previše od trideset godina, kada je prvi put otkriven NSN, otkrivena je i spontana osetljivost hromozoma kod ovakvih pacijenata, koja se ogledala u prisustvu hromatidnih i hromozomskih prekida, kao i mnogobrojnih rearanžmana između hromozoma 7 i 14 (Weemaes i dr. 1981). Ovo svojstvo hromozoma u obojama obolelih od NSN se može specifično indukovati bilo zračenjem, bilo dejstvom mutagena, kao što je BLC, i kao takvo koristiti u dijagnostičke svrhe (Wegner i Stumm 1999). Brzi razvoj i progres molekularne genetike omogućio je otkrivanje i mapiranje gena (*NBN*), čije mutacije dovode do nastanka bolesti (Varon i dr. 1998). Primenom tehnika molekularne genetike, ustanovljeno je da je mutacija c.657_661del5 vrlo česta kod pacijenata slovenskog porekla, što je u mnogome olakšalo konačnu potvrdu i postavljanje dijagnoze NSN na molekularnom nivou (Concannon i Gatti 2011).

U ovoj studiji su izneti rezultati analize hromozomske osetljivosti na BLC u kulturi limfocita periferne krvi bolesnika sa kliničkom slikom NSN, poreklom iz Srbije. Koliko je poznato ovo su prvi rezultati tog tipa sa ovih prostora. Testirano je ukupno 10 pacijenata sa kliničkim znacima NSN, kao i šest uzoraka klinički zdravih osoba (kontrola). Na osnovu parametara hromozomske osetljivosti (procenat aberantnih oboja, broj prekida/ oboja i dr.) bilo je moguće razgranati intervale variranja vrednosti u grupi obolelih od NSN u odnosu na kontrolnu grupu, i na taj način po prvi put okarakterisati hromozomsku nestabilnost ovakvih bolesnika u Srbiji. Potvrdom dijagnoze na citogenetičkom nivou bila je moguća selekcija pacijenata za dalja ispitivanja i konačnu potvrdu dijagnoze molekularnim metodama.

5.2.1.1. Analiza hromozomske nestabilnosti indukovane BLC-om u kulturi limfocita periferne krvi pacijenata sa klini kom slikom NSN

Kod ukupno 10 pacijenata sa klini kim znacima NSN, analizirano je prisustvo spontanih i BLC-om indukovanih hromozomskih aberacija u kulturama limfocita periferne krvi. U ovoj studiji su prikazani rezultati analize (procenat aberantnih elija, broj prekida/ eliji i dr.) samo kod sedam pacijenata, s obzirom da kod tri pacijenta nije bilo dovoljno elija u deobi za analizu.

Analiza BLC-om indukovane hromozomske osetljivosti pokazala je da:

- 57,14% (4/7) pacijenta ima pove an broj prekida/ eliji ($>0,27$) i pove an procenat aberantnih elija (26,67%) (*NBS* grupa) u odnosu na kontrolnu grupu,
- 42,86% (3/7) pacijenta (*ne-NBS* grupa) ima vrednosti parametara analize koji se kre u u okvirima istih vrednosti u kontrolnoj grupi.

U grupi pacijenata pod sumnjom da boluju od NSN, a sa pozitivnim odgovorom limfocita na BLC, ozna enoj kao *NBS*, procenat BLC-om indukovanih aberantnih elija (uklju uju i i elije sa strukturnim rearanžmanima hromozoma: 7, 14 i dr) se kretao u rasponu od 26,67% do 40% (irkovi i dr. 2009; Jovanovic i dr. 2009). Ovakvi nalazi se poklapaju sa prethodno objavljenim rezultatima (20% - 40% aberantnih elija) drugih autora (Wegner i Stumm 1999). nalize su pokazale da su vrednosti broja prekida/ eliji (0,27 – 0,80) u grupi *NBS* pacijenata, obra enih u ovoj studiji, tako e u skladu sa literaturnim podacima (0,50 – 1,50 prekida/ eliji) (Wegner i Stumm 1999). Nešto niže zabeležene vrednosti broja prekida/ eliji u ovoj studiji, u odnosu na odgovaraju e vrednosti drugih autora, mogu biti posledica lošeg kvaliteta hromozoma i malog broja (od 20 do 50) elija za analizu.

Iako je, na osnovu analize hromozomske osetljivosti limfocita na BLC, *NBS* pacijente bilo mogu e izdvojiti u odnosu na ostale (*ne-NBS*), bilo je neophodno sprovesti molekularnu dijagnostiku ovakvih pacijenata u cilju kona ne potvrde dijagnoze NSN (Concannon i Gatti 2011). Molekularna analiza u cilju potvrde bolesti je

bila indikovana i kod tri pacijenta sa klini kom slikom NSN, iji su limfociti pokazali otpornost na dejstvo fitohemoaglutinina, karakteristi nu za elije obolelih (Digweed i Sperling 2004; Hiel i dr. 2000).

5.2.2. ANALIZA PACIJENATA SA KLINI KOM SLIKOM NSN PRIMENOM METODA MOLEKULARNE GENETIKE

5.2.2.1. Identifikacija homozigotnog prisustva c.657_661del5 mutacije kod pacijenata sa klini kom slikom NSN

U ovoj studiji su prvi put u Srbiji dobijeni rezultati molekularne analize na prisustvo/odsustvo c.657_661del5 mutacije u *NBN* genu kod pacijenata sa elijskim fenotipom NSN. Analizom je obuhva eno ukupno sedam pacijenata: etiri *NBS* pacijenta sa pozitivnim rezultatima analize BLC testom i tri pacijenta sa slabim mitotskim indeksom. Dijagnoza NSN je potvr ena kod svih ispitanika na molekularnom nivou, kroz prisustva homozigotne mutacije c.657_661del5 (Jovanovic i dr. 2009), odnosno. Zastupljenost c.657_661del5 mutacije kod obolelih od NSN iz Srbije (100% ili 7/7) se podudarala sa u estaloš u ove mutacije kod obolelih slovenskog porekla, iz drugih zemalja (Poljska, eška, Rusija, Ukrajina i dr.) (Chrzanowska i dr. 2012; Matsuura i dr. 1998; Resnick i dr. 2003; Tekin i dr. 2002; Varon i dr. 1998).

5.2.2.2. Identifikacija heterozigotnog prisustva c.657_661del5 mutacije kod lanova porodica obolelih od NSN

Molekularna analiza 13 lanova porodica obolelih od NSN, bez klini kih simptoma bolesti, potvrdila je heterozigotno prisustvo c.657_661del5 mutacije kod svih ispitanika (12 roditelja i jedan brat obolelog). Na ovaj na in je bilo omogu eno davanje preciznog geneti kog saveta u porodicama obolelih od NSN, pogotovu u pogledu mogu nosti prenatalne dijagnostike, a u cilju dobijanja zdravog potomstva. Analiza heterozigotnog prisustva ove mutacije u *NBN* genu, dobija na zna aju, s obzirom na rezultate skorijih istraživanja koji pokazuju pove an rizik upravo heterozigotnih nosilaca da obole od neke vrste kancera (kancer dojke i prostate, melanom i dr.), u

odnosu na ostatak populacije (Bogdanova i dr. 2008; Cybulski i dr. 2004; di Masi i Antoccia 2008; Steffen i dr. 2004).

Iako se radi o vrlo retkoj bolesti, s obzirom na relativno visoku zastupljenost heterozigotnih nosilaca c.657_661del5 mutacije u slovenskoj grupi naroda (1/177) (Chrzanowska i dr. 2012) i na relativno jeftinu molekularnu analizu, uvođenje skrininga kod novorođenadi u daljoj budućnosti bi bilo od velikog značaja kako za obolele, u pogledu preventive, tako i za članove njihovih porodica.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati dobijeni primenom citogenetičkih, citometrijskih i molekularnih analiza u grupi od 100 pacijenata čija je klinička slika ukazivala na FA ili NSN, omogućili su donošenje sledećih zaključaka:

6.1. FANKONIJEVA ANEMIJA

1. Analizom parametara hromozomske osetljivosti indukovane 24h DEB-om u limfocitima periferne krvi (procenat aberantnih ćelija, broj prekida/ ćeliji i I-CFI), precizno su definisane njihove vrednosti, na osnovu kojih se mogu razlikovati pacijenti oboleli od FA (aberantne ćelije 32%; broj prekida/ ćeliji 0,48; I-CFI > 73) od zdravih osoba (aberantne ćelije ≤ 8%; broj prekida/ ćeliji ≤ 0,17; I-CFI < 9).
2. Analizom istih parametara, ali spontane hromozomske osetljivosti u limfocitima nije bilo moguće izdvojiti čak 70% FA pacijenata, koji su imali pozitivan odgovor na DEB.
3. Izračunavanjem vrednosti indeksa indukovane (DEB, 24h) fragilnosti hromozoma i procenta aberantnih limfocita, definisani su precizni intervali kojima se bolesnici sa mozaičnom formom FA (aberantne ćelije: 32% – 49%; I-CFI: 73 – 139) mogu izdvojiti od obolelih sa nemozaičnim tipom FA (aberantne ćelije 64%; I-CFI: > 199).
4. Kod pacijenata koji se na osnovu pozitivnog odgovora limfocita na DEB (24h) klasifikuju kao mozaični tip FA, neophodno je uraditi dalje analize u cilju potvrde ili isključenja dijagnoze bolesti, a to su:
 - a) analiza parametara 24h DEB-om indukovane hromozomske osetljivosti u fibroblastima kože,
 - b) analiza indukovanih (DEB, 24h) oštećenja DNK u limfocitima periferne krvi primenom komet testa,

- c) analiza DEB-om 24h indukovanog zastoja u G2 fazi elijskog ciklusa u limfocitima ili 48h DEB-om indukovanog zastoja u fibroblastima kože.
5. Analizom parametara DEB-om 24h indukovane hromozomske osetljivosti u fibroblastima kože mogu e je potvrditi fenotip FA kod bolesnika sa mozai nom formom ove bolesti (FA: broj prekida/ eliji $\geq 0,10$ i aberantne elije $\geq 10\%$ u odnosu na zdrave osobe: broj prekida/ eliji $\leq 0,06$ i aberantne elije $\leq 6\%$).
 6. Analizom ošte enja DNK u limfocitima periferne krvi primenom komet testa su utvr ene OTM vrednosti obolelih od FA, nakon 24- asovne indukcije DEB-om (FA: OTM 2,72 naspram zdravih osoba: OTM 1,83), pomo u kojih se može potvrditi dijagnoza bolesti i nakon mozai nog, odnosno grani nog odgovora na DEB u hromozomskoj analizi ovih bolesnika.
 7. Analizom DEB-om 24h indukovanog zastoja u G2 fazi elijskog ciklusa dobijeni su rasponi vrednosti u limfocitima (FA: elije u G2 fazi 4,41% vs. zdrave kontrole: elije u G2 fazi 4,11%) i fibroblastima kože (FA: elije u G2 fazi 11,61% u odnosu na zdrave kontrole: elije u G2 fazi 5,99%) karakteristi ni za obolele od FA. Na osnovu ovih vrednosti može biti potvr ena dijagnoza bolesti, posebno kod pacijenata kod kojih prethodni testovi nisu bili dovoljno informativni.
 8. Nakon analize svih rezultata dobijenih primenom citogeneti kih, molekularnih i citometrijskih metoda, u uzorku od 90 pacijenta sa klini kom slikom FA, postojanje elijskog fenotipa FA je potvr eno kod 13,33% (12/90) bolesnika, koji e biti upu eni na dalje molekularne analize u cilju definitivne potvrde dijagnoze bolesti.

6.2. NIJMEGENOV SINDROM NESTABILNOSTI

Primenom citogenetičkih i molekularnih analiza u porodicama obolelih od NSN zaključeno je sledeće:

- Utvrđeni su rasponi vrednosti parametara BLC-om indukovane hromozomske osetljivosti u limfocitima periferne krvi, na osnovu kojih se oboleli od NSN mogu izdvojiti od ostalih bolesnika sa sličnim simptomima, kao i u odnosu na zdrave osobe (NSN: broj prekida/ elije $\geq 0,27$ i aberantne elije $\geq 27\%$ u odnosu na zdrave osobe: broj prekida/ eliji $\leq 0,13$ i aberantne elije $\leq 6\%$).
- Kod svih pacijenata sa kliničkom slikom NSN i pozitivnim odgovorom limfocita na BLC (*NBS* grupa), kao i kod pacijenata kod kojih sprovođenje citogenetičke analize nije moguće, indicirana je molekularna analiza c.657_661del5 mutacije u cilju konačne potvrde dijagnoze bolesti.
- Primenom modifikovane PCR metode identifikovano je homozigotno prisustvo c.657_661del5 mutacije u egzonu 6 *NBN* gena kod 100% ispitivanih pacijenata obolelih od NSN u Srbiji.
- Primenom molekularnih metoda identifikovani su i heterozigotni nosioci u porodicama obolelih od NSN, što je od neprocenjivog značaja za davanje preciznog genetičkog saveta, pre svega u vezi mogućnosti sprovođenja prenatalne dijagnostike i prevencije rađanja deteta sa ovim teškim oboljenjem.

7. LITERATURA

- Alter BP, Young NS. The bone marrow failure syndromes. In: Eds. Nathan DG, Oski FA. *Hematology of Infancy and Childhood*, 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, Inc 1993;216-316.
- Alter BP. Inherited bone marrow failure syndromes. In: Eds. Handin RI, Stossel TP, Lux SE; *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia, JB Lippincott, 1995;227-91.
- Alter BP. Diagnostic Evaluation of FA. In: Eds. Eiler ME, Frohnmayer D, Frohnmayer L, Larsen K, Olsen J. *Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management*. 3 ed. Eugene, 2008;33-46.
- Alter BP, Kupfer G. Fanconi Anemia. *Gene Reviews* 2011; URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/>.
- Ameziane N, Errami A, Leveille F, Fontaine C, de Vries Y, van Spaendonk RM, de Winter JP, Pals G, Joenje H. Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening. *Hum Mutat* 2008;29(1):159-66.
- Anderson D, Dobrzynska MM, Basaran N. Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the comet assay. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1997;17:29-43.
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* 2004;18:1958-63.
- Auerbach AD. A test for Fanconi's anemia. *Blood* 1988;72(1):366-7.
- Auerbach AD, Alter BP: Prenatal and postnatal diagnosis of aplastic anemia. In (eds): Alter BP. *Methods in Hematology: Perinatal Hematology*. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone, 1989;225.
- Auerbach AD, Koerse RE, Ghosh R, Venkatraj VS, Zhang M, Chiorazzi N. Complementation studies in Fanconi anemia. In Eds: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G. *Fanconi Anemia. Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1989a;213-25.
- Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: Relation of Clinical Symptoms to Diepoxybutane Sensitivity. *Blood* 1989b;73(2):391-6.

- Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* 1993;21:731–3.
- Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. In: Eds. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR. *Current Protocols Human Genetics*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ 2003;37:p. 8.7.1-8.7.15.
- Auerbach AD. Fanconi Anemia and its Diagnosis. *Mutat Res* 2009;668(1-2):4–10.
- Bagby GC, Lipton JM, Sloan EM, Schiffer CA. Marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004;2004(1):318-36.
- Berger R, Coniat ML, Gendron MC. Fanconi anemia: Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1993;69(1):13-6.
- Bogdanova N, Feshchenko S, Schürmann P, Waltes R, Wieland B, Hillemanns P, Rogov YI, Dammann O, Bremer M, Karstens JH, Sohn C, Varon R, Dörk T. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122(4):802-6.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-89.
- Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1994;84(5):1650-5.
- Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasi A, Estella JM, Munoz A, Ortega JJ, de Winter J, Joenje H, Schindler D, Hanenberg H, Hodgson SV, Mathew CG, Surralles J. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* 2005;105:1946–9.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998;93(3):477-86.
- Casado J, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Cantalejo A, Cela E, Cervera J, Sanchez-Calero J, Badell I, Estella J, Dasi A,

- Olive T, Jose Ortega J, Rodriguez-Villa A, Tapia M, Molines A, Madero L, Segovia JC, Neveling K, Kalb K, Schindler D, Hanenberg H, Surralles J, Bueren JA. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet* 2007;44(4):241-9.
- Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M, Ferro T, Muñoz A, Sevilla J, Madero L, Cela E, Beléndez C, de Heredia CD, Olivé T, de Toledo JS, Badell I, Estella J, Dasí Á, Rodríguez-Villa A, Gómez P, Tapia M, Molinés A, Figuera Á, Bueren JA, Surrallés J. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet* 2011;48(4):242-50.
- Chandra S, Levran O, Jurickova I, Maas C, Kapur R, Schindler D, Henry R, Milton K, Batish SD, Cancelas JA, Hanenberg H, Auerbach AD, Williams DA. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther* 2005;12:976–84.
- Chen J, Ghorai MK, Kenney G, Stubbe JA. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 2008;36(11):3781–90.
- Cho SH, Kook H, Kim GM, Yoon WS, Cho TH, Hwang TJ. A Clinical Study of Fanconi's Anemia. *Korean J Pediatr Hematol Oncol* 1997;4(1):70-7.
- Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M, Bialecka M, Gutkowska A, Goryluk-Kozakiewicz B, Michalkiewicz J, Stachowski J, Gregorek H, Lyson-Wojciechowska G, Janowicz W, Jozwiak S. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 1995;57:462-71.
- Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Baginska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2012;7(13):1-19.
- Chrzanowska KH, Janniger CK. Nijmegen Breakage Syndrome. 2012; URL: <http://emedicine.medscape.com/article/1116869-overview>.

- Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell* 2007;25:331–43.
- Cirkovic S, Guc-Scekic M, Vujic D, Ilic N, Micic D, Skoric D, Jovanovic A: Diagnosis of Fanconi's anemia by diepoxybutane analysis in children from Serbia. *Balkan J of Med Genet* 2011;14(2):65-70.
- Clarke DJ, Gimenez-Abian JF. Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays* 2000;22:351–63.
- Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26(3):249-61.
- Concannon PJ, Gatti RA. Nijmegen Breakage Syndrome. *Gene Reviews* 2011; URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1176/>.
- Cooper GM. The Eukaryotic Cell Cycle. In (eds): Cooper GM, Hausman RE. *The cell: a molecular approach* (4nd ed.). Washington, D.C: ASM Press. Chapter 16. 2007;649-88.
- Cybulski C, Gorski B, Debniak T, Gliniewicz B, Mierzejewski M, Masojc B, Jakubowska A, Matyjasik J, Zlowocka E, Sikorski A, Narod SA, Lubinski J. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 2004;64:1215–9.
- irkovi S, Gu -Š eki M, Vuji D, Mi i D. Cytogenetic Diepoxybutane sensitivity findings in Serbian children with Fanconi anemia. *Arch Biol Sci* 2006;58(4):215-19.
- Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, Gräsl S, Schindler D, D'Andrea AD, Altay C, Kayserili H, Zatterale A, Kunze J, Ebell W, Mathew CG, Joenje H, Sperling K, Digweed M. Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet* 2000;8:861–8.
- de Winter JP, Roomans MA, van der Weel L, van Berkel CGM, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. (Letter) *Nature Genet* 2000;24:15-6.

- Diamond LK, Shahidi NT. Treatment of aplastic anemia in children. *Semin Hematol* 1967;4(3): 278-88.
- Digweed M, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 2004;S.1207-17.
- di Masi A, Antoccia A. NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk. *Curr Genomics* 2008;9(4):275-81.
- Djuzenova CS, Rothfuss A, Oppitz U, Spelt G, Schindler D, Hoehn H, Flentje M. Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Lab Invest* 2001;81(2):185-92.
- Dong Z, Zhong Q, Chen PL. The Nijmegen Breakage Syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274(28):19513-6.
- Dokal I, Vulliamy T. Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 2010;95(8):1236–40.
- Drábek J, Hajdúch M, Gojová L, Weigl E, Mihál V. Frequency of 657del(5) mutation of the NBS1 gene in the Czech population by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;138(2):157-9.
- Duckworth-Rysiecki G, Cornish K, Clarke CA, Buchwald M. Identification of two complementation groups in Fanconi anaemia. *Somat Cell Mol Genet* 1985;11:35-41.
- Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M: The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet* 1982;62:327–32.
- Ellis NA, Lennon DJ, Proytcheva M, Alhadef B, Henderson EE, German J. Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high SCE phenotype of Bloom syndrome cells. *Am J Hum Genet* 1995;57:1019-27.
- Ellis NA, Ciocci S, Proytcheva M, Lennon D, Groden J, German J. The Ashkenazic Jewish Bloom syndrome mutation blmAsh is present in non-Jewish Americans of Spanish ancestry. *Am J Hum Genet* 1998;63:1685–93.

- Esmer C, Sánchez S, Ramos S, Molina B, Frias S, Carnevale A. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am J Med Genet A*. 2004;124A(1):35-9.
- Fabio T, Crescenzo N, Saracco P, Leone L, Ponzio G, Ramenghi U. Cell cycle analysis in the diagnosis of Fanconi's anemia. *Haematologica* 2000;85:431-2.
- Fanconi G. Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische* 1927;117:257-80.
- Flemming W. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. Vogel, Leipzig. 1882.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 2001;7:249.
- Gatti R. Ataxia-Tealangiectasia. *Gene Reviews* 2010; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26468/>.
- Gisselsson D. Chromosomal Instability in Cancer: Causes and Consequences. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2001; URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/ChromosomInstabilID20023.html>.
- Gordon LB, Brown WT, Collins FS. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Gene Reviews* 2011; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1121/>.
- Gregory JJ Jr., Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2532-7.
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 2002;98(2-3):126-35.
- Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, Vieten L, Verlander PC, Leurs C, Cooper RJ, Gottsche K, Haneline L, Clapp DW, Lobitz S, Williams DA, Auerbach D. Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 2002;30(5):410-20.

- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(25):14412–7.
- Hansen RS, Stoger R, Wijmenga C, Stanek AM, Canfield TK, Luo P, Matarazzo MR, D’Esposito M, Feil R, Gimelli G, Weemaes CMR, Laird CD, Gartler SM. Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication times as a major determinant. *Hum Mol Genet* 2000;9(18):2575–87.
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629–34.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821–8.
- Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, et al: DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 1998;91:275–287.
- Hiel JA, Weemaes CM, van den Heuvel LP, van Engelen BG, Gabreëls FJ, Smeets DF, van der Burgt I, Chrzanowska KH, Bernatowska E, Krajewska-Walasek M, Bialecka M, Abramczuk D, Gregorek H, Michalkiewicz J, Perek D, Midro AT, Seemanová E, Belohradsky BH, Sölder B, Barbi G, Wegner RD, Sperling K, Dixon J, Maraschio P, Marseglia GL, Green A, Taylor AM, Der Kaloustian VM, Komatsu K, Matsuura S, Conley ME, Concannon P, Gatti RA. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 2000;82:400–6.
- Higurashi M, Conen PE. In Vitro Chromosomal Radiosensitivity in Fanconi's Anemia. *Blood* 1971;38:336-42.
- Hisama FM, Tekumalla PK, Weissman SM. Overview of Chromosomal Instability and Aging Mechanisms. In: Eds. Hisama FM, Weissman SM, Martin GM. *Chromosomal Instability and Aging*, Marcel Decker Inc, New York-Basel, 2003. Chapter 2.
- Hittelman WN. Genetic instability in epithelial tissues at risk for cancer. *Ann NY Acad Sci* 2001;952:1–12.
- Hoehn H, Kalb R, Neveling K, Friedl R, Bechtold A, Herterich S, Sun Y, Gruhn B, Hanenberg H, Schindler D. Revertant Mosaicism in Fanconi Anemia: Natural

- Gene Therapy at Work. In: Eds. Schindler D, Hoehn H. Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. Monogr Hum Genet, Basel, Karger, 2007;15:149-72.
- Holmquist GP. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. Am J Hum Genet 1992;51:17-37.
- Houldsworth J, Lavin MF. Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. Nucleic Acids Res 1980;8:3709-20.
- Hu P, Ellis NA. Bloom Syndrome: Genetic, Cellular, and Molecular Features as Compared to Werner Syndrome. In: Eds. Hisama FM, Weissman SM, Martin GM. Chromosomal Instability and Aging. Marcel Decker Inc, New York-Basel, 2003; Chapter 10.
- Ilgin H, Akarsu AN, Bokesoy FI. Cytogenetic and phenotypic findings in Turkish patients with Fanconi anemia. Tr J of Medical Sciences 1999;29(2):151-4.
- ISCN 2009. An International System for Cytogenetic Nomenclature. eds: Shaffer LG, Tommerup N. S Karger, Basel 2009.
- Jaspers NG, Raams A, Silengo MC, Wijgers N, Niedernhofer LJ, Robinson AR, Gigliamari G, Hoogstraten D, Kleijer WJ, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. Am J Hum Genet 2007;80:457-66.
- Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CGM, Rooimans MA, Ebell W, van Weel M, Pronk JC, Buchwald M, Arwert F. Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. Am J Hum Genet 1997;61:940-4.
- Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG M, Rooimans MA, Morgan N, Mathew CG, Arwert F. Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. Am J Hum Genet 2000;67:759-62.
- Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. Nature Rev. Genet. 2001;2:446-57.

- Jovanovic A, Minic P, Scekcic-Guc M, Djuricic S, Cirkovic S, Weemaes C, Pasic S. Successful treatment of Hodgkin lymphoma in Nijmegen Breakage syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(1):46-52.
- Kaiser TN, Lojewski A, Dougherty C, Juergens L, Sahar E, Latt SA: Flow cytometric characterization of the response of Fanconi's anemia cells to mitomycin C treatment. *Cytometry* 1982;2:291–297.
- Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6504-8.
- Kennedy RD, D'Andrea AD: The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 2005;19:2925–40.
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanon JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.
- Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genet* 2011;43:142-6.
- Kook H, Cho D, Cho SH, Hong WP, Kim CJ, Park JY, et al. Fanconi Anemia Screening by Diepoxybutane and Mitomycin C Tests in Korean Children with Bone Marrow Failure Syndromes. *J Korean Med Sci* 1998;(6):623-8.
- Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M. Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin Exp Med* 2006;6(4):177-90.
- Korgaonkar S, Ghosh K, Jijina F, Vundinti BR. Chromosomal Breakage Study in Children Suspected With Fanconi Anemia in the Indian Population. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32:606–10
- Korenberg JR, Rykowski MC. Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell* 1988;53:391–400.
- Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJ, Friedl AA, Klein B, Verhaegh GW, Jaspers NG, Midro AT, Eckardt-Schupp F, Lohman PH, Zdzienicka MZ. Immortalization and characterization of Nijmegen breakage syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 1999;434:17–27.

- Kracker S, Bergmann Y, Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, Christine R, Wang Z, Sperling K, Digweed M, Radbruch A. Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *PNAS* 2005;102(5):1584-9.
- Kraemer KH, Ruenger TM. Genome instability DNA repair and cancer In Eds: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. New York, McGraw Hill 2008;977-86.
- Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Xeroderma Pigmentosum. *Gene Reviews* 2012; URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1397/>.
- Krenzlin H, Demuth I, Salewsky B, Wessendorf P, Weidele K, Burkle A, Digweed M. DNA Damage in Nijmegen Breakage Syndrome Cells Leads to PARP Hyperactivation and Increased Oxidative Stress. *Plos Genet* 2012;8(3):e1002557.
- Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS: Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* 1985;37:1022–1030.
- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003;101(4):1249-56.
- Kutler DI, Auerbach AD. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam Cancer* 2004;3:241-8.
- Kwee ML, Poll EH, van de Kamp JJ, de Koning H, Eriksson AW, Joenje H. Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi anaemia. *Hum Genet* 1983;64(4):384-7.
- Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:759–69.
- Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J. Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Toxicol Sci* 2004;81(1):121-32.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396,643–9.

- Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Chromosomal diagnosis of mongolism. *Arch Fr Pediatr.*1959;16:962-3.
- Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NFC, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 2004;103:2498-503.
- Levrán O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, Auerbach AD. Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13051-6.
- Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, Yan Z, Xue Y, Oostra AB, Auerbach AD, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Takata M, Meetei AR, Wang W. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J.* 2007;26:2104-14.
- Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, et al. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 1996; 14:320-3.
- Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 1997; 5(3):137-48.
- Macioszek VK, Kononowicz AK. The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: quinoline yellow (E 104) and brilliant black BN (E 151). *Cellular & Molecular Biology Letters* 2004;9:107-22.
- Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, Kondo N, Sakamoto S, Endo S, Smeets D, Solder B, Belohradsky BH, Der Kaloustian VM, Oshimura M, Isomura M, Nakamura Y, Komatsu K. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 1998;19:179-81.
- Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genet.* 2003;35:165-70.
- Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genet.* 2004;36:1219-24.

- Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 2005;37:958–63.
- Miglierina R, Le Coniat M, Berger R: A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry. *Anal Cell Pathol* 1991;3:111–18.
- Miller SA, Dykes DD, Folesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988;16 (3):1215.
- Mohseni Meybodi A, Mozdarani H. DNA damage in leukocytes from Fanconi anemia (FA) patients and heterozygotes induced by mitomycin C and ionizing radiation as assessed by the comet and comet-FISH assay. *Iran Biomed J* 2009;13(1):1-8.
- Mohseni-Meybodi A, Mozdarani H, Mozdarani S. DNA damage and repair of leukocytes from Fanconi anaemia patients, carriers and healthy individuals as measured by the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 2009;24(1):67-73.
- Moldovan GL, D'Andrea AD. How the Fanconi Anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 2009 ; 43: 223–249.
- Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1005–15.
- Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 2006;612:84–104.
- Møller P, Möller L, Godschalk RWL, Jones GDD. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis* 2010;25(2):109-11.
- Moreira CFA, Brito Júnior LC, Lemos JAR. Flow cytometry for diepoxybutane test analysis. *Genetics and Molecular Research* 2008;7(4):1353-9.
- Morgan NV, Tipping AJ, Joenje H, Mathew CG. High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene. *Am J Hum Genet.* 1999;65:1330–41.
- Morrison C, Rieder CL. Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1133–9.

- Müller W-U. Comet Assay. In: Eds. Günter Obe, Vijayalaxmi. Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007;161-72.
- Nagase T, Kikuno R, Nakayama M, Hirosawa M, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res. 2000;7:273-81.
- Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea AD. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. Nat Cell Biol 2002;4:913–20.
- Neitzel H, Trimborn M. Human Chromosomes: Structural and Functional Aspects. In: Günter Obe, Vijayalaxmi (Eds). Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007;1-20.
- Nove J, Little JB, Mayer PJ, Troilo P, Nichols WW. Hypersensitivity of cells from a new chromosomal-breakage syndrome to DNA-damaging agents. Mutat Res 1986;163:255–62.
- Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res 1969;20:462–6.
- Nurse P. Checkpoint pathways come of age. Cell 1997;91:865–7.
- Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. Radiat Res 1989;117:79–92.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. Radiat Res 1990;122:86–94.
- Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc. 2006;1(1):23-9.
- Oller AR, Rastogi P, Morgenthaler S, Thilly WG. A Statistical Model to Estimate Variance in Long Term–Low Dose Mutation Assays: Testing of the model in a human lymphoblastoid mutation assay. Mutat Res 1989;216:149–61.

- Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. *Anemia* 2012;2012:238731, doi:10.1155/2012/238731.
- Ormerod MG. Analysis of DNA – general methods. In ed: Ormerod MG. *Flow Cytometry, A Practical Approach* (third edition). Oxford University Press 2000;83-96.
- Oshima Y. Werner Syndrome. In: Eds. Hisama FM, Weissman SM, Martin GM. *Chromosomal Instability and Aging*, Marcel Decker Inc, New York-Basel, 2003; Chapter 9.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291–8.
- Pace P, Johnson M, Tan WM, Mosedale G, Sng C, Hoatlin M, de Winter J, Joenje H, Gergely F, Patel KJ. FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *EMBO J* 2002;21:3414–23.
- Park WH, Margossian S, Horwitz AA, Simons AM, D'Andrea AD, Parvin JD. Direct DNA binding activity of the Fanconi anemia D2 protein. *J Biol Chem* 2005;280:23593–8.
- Pichierri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* 2004;23:1178–87.
- Pilonetto DV, Pereira NF, Bitencourt MA, Magdalena NI, Vieira ER, Veiga LB, Cavalli IJ, Ribeiro RC, Pasquini R. FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia. *Braz J Med Biol Res* 2009;42(3):237-43.
- Pines J, Rieder CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2001;3:E3–6.
- Radivojevi D, uriši M, Lali T, Gu -Š eki M, Savi J, Mini P, Antoniadi T, Tzetis M, Kanavakis E. Spectrum of cystic fibrosis mutations in Serbia and Montenegro-strategy for prenatal diagnosis. *Genet Test* 2004; 8(3):276-280.
- Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, Khar A. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis* 2000;21(4):557–61.

- Reis A, Digweed M. NBS: Nibrin-Mutationen als Ursache für gestörte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Chromosomeninstabilität und Strahlenempfindlichkeit. In Eds: Stuhrman M, Dörk T, Karstens JH (Hrsg). Ataxia teleangiectatica, medizinischegenetik ed. 1, München, 1999;S.34-8.
- Resnick IB, Kondratenko I, Togojev O, Vasserman N, Shagina I, Evgrafov O, Tverskaya S, Cerosaletti KM, Gatti RA, Concannon P. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J Pediatr* 2002;140:355–61.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;722(1-2):225-54.
- Rommens JM, Kerem BS, Greer W, Chang P, Tsui LC, Ray P. Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. *Am J Hum Genet* 1990;46:395-6.
- Sanz MM, German J. Bloom's Syndrome. *Gene Reviews* 2010; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1398/>.
- Sasaki MS, Tonomura A. A High Susceptibility of Fanconi's Anemia to Chromosome Breakage by DNA Cross-linking Agents. *Cancer Res* 1973;33:1829-36.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749-53.
- Schabath MB, Spitz MR, Grossman HB, Zhang K, Dinney CP, Zheng PJ, Wu X. Genetic instability in bladder cancer assessed by the comet assay. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(7):540-7.
- Schindler D, Hoehn H. Flow cytometric testing for syndromes with chromosomal instability, aplastic anemia and related haematological disorders. In: Ed. Wegner R-D; *Diagnostic cytogenetics*. Berlin: Springer-Verlag, 1999;1:269-81.
- Schindler D, Sobeck A. Diagnostik von Ataxia teleangiectatica mittels Durchflußzytometrie und Zellzyklusanalyse. In: Stuhrman M, Dörk T, Karstens

- JH (Hrsg) Ataxia teleangiectatica, medizinischegenetik edition Band 1, München, 1999;S. 11-6.
- Schindler D, Friedl R, Gavvovidis I, Kalb R, Neveling K, Linka Y, Hanenberg H, Kubbies M, Hoehn H. Applications of Cell Cycle Testing in Fanconi Anemia. In eds: Schindler D, Hoehn H. Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. Monogr Hum Genet. Basel, Karger, 2007;15:110–30.
- Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A. Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. Humangenetik 1964;1:194-6.
- Schroeder TM. Cytogenetic and cytologic findings in enzymopenic panmyelopathies and pancytopenias. Familial myelopathy of Fanconi, glutathione-reductase deficiency anemia and megaloblastic B12 deficiency anemia. Humangenetik 1966;2(3):287-316.
- Schuler D, Kiss A, Fabian F. Chromosomal Peculiarities and “*inVitro*”Examinations in Fanconi's Anaemia. Humangenetik 1969;7:314-22.
- Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, et al: Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. Blood 1995;85:2233–7.
- Shahidi NT, Diamond LK. Testosterone-induced remission in aplastic anemia of both acquired and congenital types. Further observations in 24 cases. N Engl J Med 1961;264:953-67.
- Shimamura A, Montes de Oca R, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, D'Andrea AD. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. Blood 2002;100(13):4649-54.
- Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. Blood Rev 2010;24:101–22.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175:184–91.
- Smal MP, Savina NV, Kuzhir TD, Goncharova RI. Estimation of Genome Instability by the Comet Assay in the Risk Groups. In Eds: Antonina Cebulska-Wasilewska,

- Andreyan N, Osipov, Firouz Darroudi. Rapid Diagnosis in Populations at Risk from Radiation and Chemicals. IOS Press, Amsterdam, 2010;201-9.
- Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, Esperou H, Ferry C, Jubert C, Feugeas JP, Henri A, Toubert A, Socie G, Baruchel A, Sigaux F, D'Andrea AD, Gluckman E. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* 2005;105(3):1329-36.
- Steffen J, Varon R, Mosor M, Maneva G, Maurer M, Stumm M, Nowakowska D, Rubach M, Kosakowska E, Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P, Demkow T, Sadowska M, Bidzi ski M, Gawrychowski K, Sperling K. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 2004;111(1):67-71.
- Strathdee CA, Duncan AMV, Buchwald M. Evidence for at least 4 Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet* 1992a;1:196-8.
- Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 1992b;356:763-7.
- Sullivan KE, Veksler E, Lederman H, Lees-Miller SP. Cell cycle checkpoints and DNA repair in Nijmegen breakage syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;82:43-8.
- Sumner AT, Mitchell AR, Ellis PM. A FISH study of chromosome fusion in the ICF syndrome: involvement of paracentric heterochromatin but not of the centromeres themselves. *J Med Genet* 1998;35:833-5.
- Swift MR, Hirschhorn K. Fanconi's anemia. Inherited susceptibility to chromosome breakage in various tissues. *Annals of Internal Medicine*, 1966;65:496-503.
- Swift M. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature*. 1971;230:370-3.
- Swift M, Morrell D, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet* 1986;39:573-83.
- Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991;325:1831-6.

- Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen breakage syndrome. *Mutat Res* 1983;112:23–32.
- Tanic N, Tanic N, Milasin J, Vukadinovic M, Dimitrijevic B. Genomic instability and tumor-specific DNA alterations in oral leukoplakias. *European Journal of Oral Sciences* 2009;117(3):231–7.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD: S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 2002;100:2414–20.
- Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 2006;107:4223–33.
- Tekin M, Dogu F, Tacyildiz N, Akar E, Ikinogullari A, Ogur G, Yavuz G, Babacan E, Akar N. 657del5 mutation in the NBS1 gene is associated with Nijmegen breakage syndrome in a Turkish family. *Clin Genet* 2002;62:84-8.
- Thompson LH, Hinz JM, Yamada NA, Jones NJ: How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: Replication, recombination, repair, and recovery. *Environ Mol Mutagen* 2005;45:128–42.
- Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molec Cell* 2001;7:241-8.
- Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956;42:1–6.
- Uhrhammer N, Bay JO, Gatti RA. Nijmegen breakage syndrome. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2002; URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Kprones/NijmegenID10020.html>.
- van der Burgt I, Chrzanowska KH, Smeets D, Weemaes C. Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 1996;33:153–6.
- van der Lelij P, Oostra AB, Rooimans MA, Joenje H, de Winter JP. Diagnostic Overlap between Fanconi Anemia and the Cohesinopathies: Roberts Syndrome and Warsaw Breakage Syndrome. *Anemia* 2010;2010:1-7.
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA,

- Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998;93(3):467-76.
- Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genet* 2010;42:406-9.
- Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, Jabs EW, Inui K, Joenje H. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* 2005;37:468–70.
- Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, Mathew CG, Pronk JC, Joenje H. Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* 1999a;22:379-83.
- Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, Altay C, Leegwater PA, de Winter JP, Komatsu K, Evans GR, Wegner R-D, Reis A, Joenje H, Arwert F, Mathew CG, Pronk JC, Digweed M. The Fanconi anemia group E gene, FANCE, maps to chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999b;64:1400-5.
- Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, Popovic J, Lin K, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Davis JG, New MI, Auerbach AD. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics* 2001;107(4):744-54.
- Walpita D, Plug AW, Neff NF, German J, Ashley T. Bloom's syndrome protein, BLM, colocalizes with replication protein A in meiotic prophase nuclei of mammalian spermatocytes. *Proc Nat Acad Sci* 1999;96:5622-7.
- Warcoin M, Lespinasse J, Despouy G, Dubois d'Enghien C, Laugé A, Portnoi MF, Christin-Maitre S, Stoppa-Lyonnet D, Stern MH. Fertility defects revealing germline biallelic nonsense NBN mutations. *Hum Mutat* 2009;30(3):424-30.

- Watson GD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737–8.
- Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA, Taalman RD. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1981;70(4):557–64.
- Wegner R-D, Stumm M. Diagnosis of Chromosomal Instability Syndromes. In: Ed. Wegner R-D. *Diagnostic cytogenetics*. Berlin: Springer-Verlag, 1999;1:251-66.
- Wen Y, Zhang PP, An J, Yu YX, Wu MH, Sheng GY, Fu JM, Zhang XY. Diepoxybutane induces the formation of DNA-DNA rather than DNA-protein cross-links, and single-strand breaks and alkali-labile sites in human hepatocyte L02 cells. *Mutat Res* 2011;716(1-2):84-91.
- Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 1993;4:202–5.
- Wijker M, Morgan NV, Herterich S, van Berkel CG, Tipping AJ, Gross HJ, Gille JJ, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega JJ, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy AN, Abecasis M, Ebell W, Kwee ML, de Ravel T, Mathew CG. Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet* 1999;7:52–9.
- Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Houghton MF, Wallis C, Wynford-Thomas D, Faragher RG, Kipling D. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nature Genet* 2000;24:16–7.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996;272:258–62.
- Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, Pals G, Errami A, Gluckman E, Llera J, Wang W, Livingston DM, Joenje H, de Winter JP. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genet* 2007;39:159-61.

- Xing J, Spitz MR, Lu C, Zhao H, Yang H, Wang W, Stewart DJ, Wu X. Deficient G2-M and S checkpoints are associated with increased lung cancer risk: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(7):1517-22.
- Youssofian H. Natural gene therapy and the Darwinian legacy. *Nat Genet* 1996;13(3):255-6.
- Zhang X-X. Chromosome Instability. In: Eds. Gersen SL, Keagle MB. *Principles of Clinical Cytogenetics*. Totowa, NJ: Humana Press, 2004;347-61.

BIOGRAFIJA

Sanja S. Irkovi je rođena 24.01.1977. godine u Požarevcu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu u Beogradu (srednja ocena 8,57) 2002. godine, na studijskoj grupi: molekularna biologija i fiziologija, smer primenjena genetika. Diplomski rad pod nazivom: "Proband sa derivatom hromozoma 9 kao posledicom balansirane translokacije 9;20 kod roditelja", odbranila je sa ocenom 10.

Od 2003. godine, zaposlena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Pupin", gde radi na poslovima postnatalne i prenatalne dijagnostike hromozomopatija, kao i na citogenetici koja i molekularnoj dijagnostici bolesti hromozomske nestabilnosti.

U 2004., 2005. i 2008. godini dobila je stipendije Komiteta «European Human Genetics Conference» (Vienna Medical Academy, Alser Strasse 4, A-1090 Vienna, Austria), na kojima je konferencijama učestvovala sa poster prezentacijama.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu upisala je 2006. godine u oblasti Biologije, modul: Genetika. Tokom februara 2009. godine u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije se obavezavala za analizu kariotipskog ciklusa na BD citometru, dok je u Laboratoriji Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta u Beogradu, u februaru 2011. godine bila obavezavana za primenu komplementarne metode u dijagnostici Fanconijske anemije. Usmene ili poster prezentacije radova iz oblasti dijagnostike hromozomopatija i bolesti hromozomske nestabilnosti imala je na 6 domaćih i 11 stranih simpozijuma. Kao predavačica, učestvovala je na tri seminara u zemlji.

1.

a GB060090

-
-
-
-

, 28.8.2012.

C. Zupradat

2.

o

GB060090

:

/

28.8.2012.

C. Reprobil

3.

”

“

:

(Creative Commons)

1.

2.

3.

4.

5.

6.

(

).

, 28.8.2012.

Сања Ђирковић
