Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Domagoj Caban

GENSKE MUTACIJE U HEPATOCITNIM NUKLEARNIM FAKTORIMA KOD MONOGENSKOG DIJABETESA U HRVATSKOJ

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Domagoj Caban

GENSKE MUTACIJE U HEPATOCITNIM NUKLEARNIM FAKTORIMA KOD MONOGENSKOG DIJABETESA U HRVATSKOJ

DOKTORSKA DISERTACIJA

Doktorska disertacija predložena

Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije

radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz Interdisciplinarnog područja znanosti,

znanstvenih polja Temeljne medicinske znanosti i Biologija

Osijek, 2022.

Doktorska disertacija izrađena je na Odjelu za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Darka Kaštelana i prof. dr. sc. Jadranke Sertić u sklopu projekta „Uloga genskih i biokemijskih biljega u razvoju monogenskog dijabetesa“ Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorska disertacija**
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

GENSKE MUTACIJE U HEPATOCITNIM NUKLEARNIM FAKTORIMA KOD MONOGENSKOG DIJABETESA U HRVATSKOJ

Domagoj Caban

Disertacija je izrađena u: Kliničkome bolničkom centru Zagreb; Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku; Odjelu za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku

Mentor 1: prof. dr. sc. Darko Kaštelan
Mentor 2: prof. dr. sc. Jadranka Sertić

Kratak sažetak doktorske disertacije: Monogenski dijabetes (MODY) heterogena je skupina šećerne bolesti uzrokovana disfunkcijom beta-stanica gušterače. Karakteriziran je ranim nastupom bolesti, autosomno-dominantnim načinom nasljeđivanja, očuvanom endogenom produkcijom inzulina, odsutnošću protutijela na beta-stanice gušterače, odsutnošću simptoma inzulinske rezistencije uz progresivno propadanje funkcije beta-stanica što kao posljedicu ima nemogućnost optimalna povećanja inzulinske sekrecije prilikom odgovora na hiperglikemiju. U ovom radu istraživana je učestalost te vrste mutacija u genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* u bolesnika s dijagnozom šećerne bolesti primjenom metode sekvenciranja po Sangeru. U genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* identificirano je 18 različitih mutacija od kojih su tri nove koje do danas nisu objavljene. Dobiveni rezultati potvrđuju sličnu učestalost podtipova MODY-ja u Hrvatskoj kao i u drugim europskim zemljama.

Broj stranica: 103
Broj slika: 29
Broj tablica: 23
Broj literaturnih navoda: 116
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: šećerna bolest, sekvenciranje, MODY, HNF1A

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić (predsjednica)
2. prof. dr. sc. Vera Cesar (član)
3. prof. prim. dr. sc. Lea Smirčić Duvnjak (član)
4. doc. dr. sc. Maja Baretić (zamjena člana)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary area of sciences
Scientific Fields: Basic Medical Sciences and Biology

GENE MUTATIONS IN HEPATOCYTE NUCLEAR FACTORS IN MONOGENIC DIABETES IN CROATIA

Domagoj Caban

Thesis performed at: University hospital centre Zagreb, Department of Laboratory Diagnostics

Supervisors:
Menthor 1: Prof. Darko Kaštelan, PhD
Menthor 2: Prof. Jadranka Sertić, PhD

Short abstract: Monogenic diabetes (MODY) is a heterogeneous group of diabetics, caused by pancreatic β-cell dysfunction. It is characterized by early onset of the disease, autosomal dominant mode of inheritance, preserved endogenous insulin production, absence of antibodies to pancreatic β-cells, absence of symptoms of insulin resistance with progressive deterioration of β-cell function, resulting in inability to respond optimally to insulin. In this paper, the frequency and types of mutations in the *HNF1A*, *HNF4A* and *HNF1B* genes in patients diagnosed with diabetes were investigated using the Sanger sequencing method. 18 different mutations have been identified in the *HNF1A*, *HNF4A* and *HNF1B* genes, three of which are new, which have not been published to date. The obtained results confirm a similar frequency of MODY subtypes in Croatia as in other European countries.

Number of pages: 103
Number of figures: 29
Number of tables: 23
Number of references: 116
Original in: Croatian
Key words: monogenic diabetes, sequencing, MODY, HNF1A

Date of the thesis defense:

Reviewers:
1. Associate Professor Valentina Pavić, PhD (President of the review committee)
2. Professor Vera Cesar, PhD (reviewer)
3. Professor Lea Smirčić Duvnjak, MD, PhD (reviewer)
4. Assistant Professor Maja Baretić, MD, PhD (substitute reviewer)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Zahvale

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Darku Kaštelanu i prof. dr. sc. Jadranki Sertić na stručnim i znanstvenim savjetima, kritičkim razmišljanjima te nesebičnoj podršci tijekom izrade disertacije.

Zahvaljujem se na pomoći svim suradnicima Odjela za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku.

Zahvaljujem supruzi Tamari, roditeljima, sestri, nećacima i djedu na nesebičnoj podršci, razumijevanju i bezuvjetnom strpljenju, svim savjetima te riječima ohrabrenja.

Ovaj rad posvećujem svojoj Franki.

Popis kratica

ADA - Američko društvo za dijabetes (engl. *American Diabetes Association*)

ATP - adenozin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

CroDiab - Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću u Republici Hrvatskoj

DMT1 - šećerna bolest tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type 1*)

DMT2 - šećerna bolest tipa 1 (engl. *diabetes mellitus type 1*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EMQN - Europska mreža za kvalitetu molekularne dijagnostike (engl. *European Molecular Genetics Quality Network*)

GAD - protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*)

GCK - glukokinaza (engl. *glucokinase*)

GLUT 2 - transporter glukoze tipa 2 (engl. *glucose transporter 2*)

GUK - glukoza u krvi

HbA1c - glikozilirani hemoglobin

HGMD - baza podataka o mutacijama ljudskih gena (engl. *Human Gene Mutation Database*)

HNF1A - hepatocitni nuklearni faktor 1A (engl. *Hepatic Nuclear Factor 1A*)

HNF1B - hepatocitni nuklearni faktor 1B (engl. *Hepatic Nuclear Factor 1B*)

HNF4A - hepatocitni nuklearni faktor 4A (engl. *Hepatic Nuclear Factor 4A*)

hsCRP - visoko osjetljivi C-reaktivni protein (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*)

IA2 - protutijela na protein tirozin fosfatazu (engl. *islet antigen-2*)

ICA - protutijela na staničnu površinu Langeransovih otočića (engl. *islet cell antibody*)

IDA - Međunarodna dijabetička federacija (engl. *International diabetes federation*)

ITM - indeks tjelesne mase

KATP - ATP-osjetljivi kalijski kanali (engl. *ATP-sensitive potassium channels*)

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

MODY - adultni oblik šećerne bolesti mladih osoba (engl. *maturity onset diabetes of the young*)

NDM - neonatalni dijabetes (engl. *neonatal diabetes mellitus*)

NGS - sekvenciranje novih generacija (engl. *next-generation sequencing*)

OGTT - test oralne podnošljivosti glukoze (engl. *oral glucose tolerance test*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PNDM - trajni neonatalni dijabetes (engl. *permanent neonatal diabetes mellitus*)

ŠBT1 - šećerna bolest tipa 1

ŠBT2 - šećerna bolest tipa 2

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1. Klasifikacija šećerne bolesti 1
   1.2. Monogenski oblici šećerne bolesti 3
   1.3. MODY 4
   1.4. Povijesni pregled 8
   1.5. Patofiziologija 9
   1.6. Najčešći podtipovi MODY-ja 10
      1.6.1. HNF1A-MODY (MODY 3) 10
      1.6.2. GCK-MODY (MODY 2) 14
      1.6.3. HNF4A-MODY (MODY 1) 16
      1.6.4. HNF1B-MODY (MODY 5) 18
   1.7. Rijetki podtipovi MODY-ja 20
      1.7.1. NEUROD1-MODY (MODY 6) 20
      1.7.2. PDX1-MODY (MODY 4) 21
      1.7.3. KLF11-MODY (MODY 7) 21
      1.7.4. CEL-MODY (MODY 8) 21
      1.7.5. PAX4-MODY (MODY 9) 22
      1.7.6. INS-MODY (MODY 10) 22
      1.7.7. BLK-MODY (MODY 11) 22
      1.7.8. ABCC8-MODY (MODY 12) 23
      1.7.9. KCNJ11-MODY (MODY 13) 23
      1.7.10. APPL1-MODY (MODY 14) 23
   1.8. Dijagnoza i biološki biljezi za MODY 24
      1.8.1. Dijagnoza MODY-ja 24
      1.8.2. Biološki biljezi za MODY 25
         1.8.2.1. Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hsCRP) 25
         1.8.2.2. C-peptid 25
         1.8.2.3. Protutijela na beta-stanice gušterače 26

1.8.3. Važnost postavljanja ispravne dijagnoze MODY-ja i terapijski pristup 26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 28
3. MATERIJALI I METODE 29
3.1. Ispitanici 29
3.2. Materijali 30
3.2.1. Reagensi za sekvenciranje gena *HNF1A, HNF4A i HNF1B* 30
3.3. Metode 33
3.3.1. Izdvajanje DNA 33
3.3.2. Određivanje kvalitete i koncentracije DNA 33
3.3.3. Sekvenciranje kodirajuće regije gena *HNF1A, HNF4A I HNF1B* 34
3.3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 34
3.3.3.2. Provjera rezultata reakcije PCR 36
3.3.3.3. Pročišćavanje umnoženih odsječaka reakcije PCR 36
3.3.3.4. Sekvenciranje po Sangeru 37
3.3.3.5. Pročišćavanje obilježenih odsječaka reakcije sekvenciranja 39
3.3.3.6. Kapilarna elektroforeza obilježenih odsječaka 39
3.3.4. Statističke metode 41
4. REZULTATI 42
4.1. Raspodjela ispitanika prema rezultatima genetske analize 42
4.2. Mutacije u hepatocitnim nuklearnim faktorima u Hrvatskoj 43
4.3. Korelacija između genotipa i fenotipa kod bolesnika s MODY-jem 51
4.4. Statistička značajnost razlike među pojedinim skupinama 54
5. RASPRAVA 67
5.1. Raspodjela i učestalost mutacija kod ispitanika s MODY-jem u Republici Hrvatskoj . 67
5.2. Raspodjela prema spolu i dobi 68
5.3. Klinička obilježja ispitanika prema genotipu 68
5.4. Raspodjela mutacija prema genima i povezivanje fenotipa i genotipa 69
5.4.1. Mutacije u genu *HNF1A* 69
5.4.1.1. Mutacija p.Ala116Val 69
5.4.1.2. Mutacija p.Arg203Cys 70
5.4.1.3. Mutacija p.Arg203His 70

5.4.1.4. Mutacija p.Glu275Val 71
5.4.1.5. Mutacija p.Glu275del 71
5.4.1.6. Mutacija p.Ala251Thr 71
5.4.1.7. Mutacija p.Gly292Argfs*25 72
5.4.1.8. Mutacija p.Leu377fs 72
5.4.1.9. Mutacija p.Pro379Ala 72
5.4.1.10. Mutacija p.Pro379Arg 73
5.4.1.11. Mutacije p.Asn266Lys i p.Gly288Trp 73
5.4.2. Nove mutacije u genu *HNF1A* 74
5.4.2.1. Mutacija p.Ser22Arg*9 74
5.4.2.2. Mutacija c.527-6_539del, p.? 74
5.4.2.3. Mutacija c.616_617del, p.Trp206Gly*13 75
5.4.3. Mutacije u genu *HNF4A* 75
5.4.3.1. Mutacija p.Arg67Trp 75
5.4.4. Mutacije u genu *HNF1B* 76
5.4.4.1. Mutacija p.His336Asp - mutacija nepoznata značaja 76
5.4.4.2. Mutacija p.Val458Gly - mutacija nepoznata značaja 76
6. ZAKLJUČCI 78
7. LITERATURA 79
8. SAŽETAK 88
9. SUMMARY 89
10. ŽIVOTOPIS 90

1. UVOD

1.1. Klasifikacija šećerne bolesti

Šećerna bolest (lat. *Diabetes mellitus*) skupina je metaboličkih bolesti karakteriziranih hiperglikemijom koja nastaje uslijed nedostatka u sekreciji inzulina, djelovanja inzulina ili oboje. Kronična hiperglikemija povezana je s dugotrajnim oštećenjima, disfunkcijama i zatajenjem različitih organa, a posebno se to odnosi na oči, bubrege, živce, srce i krvne žile. U razvoj šećerne bolesti uključeno je nekoliko patoloških procesa, a najčešći su povezani s autoimunim razaranjem stanica gušterače koje posljedično dovodi do nedostatne sinteze inzulina te poremećaja u kojima dolazi do razvoja neosjetljvosti tkiva na inzulin. Temeljni poremećaj u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina u šećernoj bolesti nedovoljno je djelovanje inzulina na ciljana tkiva. Nedostatak djelovanja inzulina proizlazi iz neadekvatne sekrecije inzulina i/ili smanjena odgovora tkiva na inzulin. Pogoršanje kod izlučivanja inzulina i nedostaci u njegovu djelovanju često koegzistiraju kod istog pacijenta, a često je nejasno koji je poremećaj primarni uzrok hiperglikemije (1).

Prema podacima Međunarodne dijabetičke federacije (engl. *International Diabetes Federation* – IDF) procjena je da u svijetu sa šećernom bolešću živi oko 537 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina. Čak oko polovice oboljelih osoba nemaju postavljenu dijagnozu bolesti niti primaju primjereno liječenje. Godišnje od šećerne bolesti umire nešto više od 4 milijuna osoba od kojih je svaka druga osoba mlađa od 60 godina. Na globalnoj razini za troškove zdravstvene zaštite kod zbrinjavanja bolesnika sa šećernom bolešću izdvaja se oko 750 milijardi dolara. Na području Europe, dijagnozu šećerne bolesti ima oko 59 milijuna osoba starosti od 20 do 79 godina, a za troškove liječenja i skrbi oko šećerne bolesti godišnje se izdvaja oko 160 milijardi američkih dolara. Unatoč svemu, od posljedica bolesti godišnje umire otprilike oko 465 900 osoba (2).

Prema podacima Nacionalnog registra osoba sa šećernom bolešću – *CroDiab* u Republici Hrvatskoj – u 2020. prijavljeno je 310 212 bolesnika s dijagnozom šećerne bolesti, a broj se oboljelih svake godine i dalje povećava. Dosadašnja istraživanja pokazala su da u Hrvatskoj postavljenu dijagnozu šećerne bolesti ima tek 60 % oboljelih iz čega se može procijeniti da je stvaran broj oboljelih oko 500 000. Šećerna bolest treći je vodeći uzrok smrti s udjelom od 7,8 % u 2019. godini (3).

Najčešći su oblici šećerne bolesti tip 1 i tip 2, a najveći udio kod bolesnika čini šećerna bolest tipa 2 (engl. *Diabetes mellitus type 2*, DMT2) s udjelom od 90-95 % (Tablica 1). Naslijeđe kao komponenta mnogo je jače izražena kod ŠBT2. Oba navedena tipa šećerne bolesti mogu se manifestirati u bilo kojoj životnoj dobi pa je prije korištena klasifikacija prema vremenu nastanka bolesti potpuno zastarjela. Ostali specifični tipovi šećerne bolesti imaju različite uzroke nastanka. Glavna obilježja najčešćih oblika šećerne bolesti su opisana u tablici 2 (4).

Tablica 1. Etiološka klasifikacija šećerne bolesti. Prema: Američko društvo za dijabetes (engl. *American Diabetes Association,* ADA) (1).

Šećerna bolest tipa 1 (ŠBT1) (5-10 %)	nastaje zbog uništenja beta-stanica gušterače, obično dovodi do apsolutnog nedostatka inzulina uključujući latentnu autoimunu šećernu bolest u odrasloj dobi
Šećerna bolest tipa 2 (ŠBT2) (90-95 %)	nastaje zbog progresivnog gubitka odgovarajućeg lučenja beta-staničnog inzulina često u pozadini inzulinske rezistencije
Ostali specifični tipovi šećerne bolesti nastali zbog drugih uzroka	✓ nasljedni poremećaji beta-stanične funkcije ili djelovanja inzulina (MODY[1], NDM[2]) ✓ bolesti egzokrine gušterače (cistična fibroza) ✓ endokrinopatije (Cushingov sindrom, feokromocitom) ✓ uzrokovana lijekovima i kemikalijama (glukokortikoidi, tiazidni diuretici, tiroidni hormoni, diazoksid) ✓ infektivni uzroci (kongenitalna rubeola, citomegalovirus) ✓ genetski sindromi povezani sa šećernom bolešću (Downov sindrom, Turnerov sindrom)
Trudnička (gestacijska) šećerna bolest	šećerna bolest dijagnosticirana u drugome ili trećem tromjesečju trudnoće kod trudnica koje prije trudnoće nisu imale jasno izraženu šećernu bolest

[1]MODY (engl. *Maturity onset diabetes of the young*)

[2]NDM (engl. *Neonatal diabetes mellitus*)

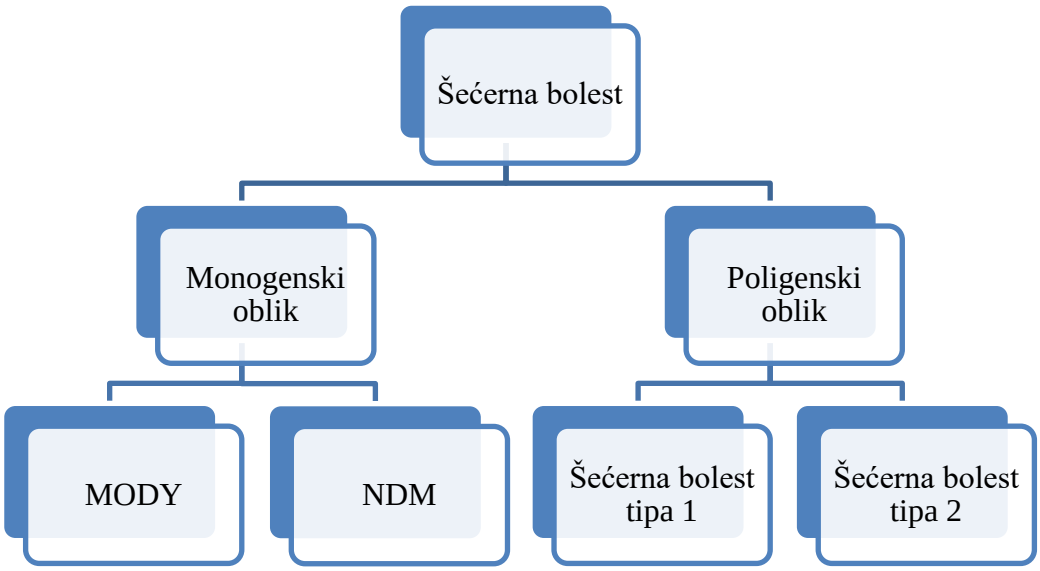
Tablica 2. Glavna obilježja najčešćih oblika šećerne bolesti (4).

	MODY	Šećerna bolest tipa 1	Šećerna bolest tipa 2
Prevalencija	2-5 %	5-10 %	90-95 %
Nasljeđivanje	monogensko, autosomno dominantno	poligensko	poligensko
Obiteljska anamneza	100 %	<15 %	>50 %
Rasa	sve rase	sve rase	sve rase; predominantna u nekih rasa (Azijati, američki Indijanci, Hispanci)
Dob pri nastupu bolesti	<25 godina	<30 godina	>30 godina
Početak	postupan	nagao	blag i postupan do nagao
Ketoza	rijetka	česta	≥1/3 bolesnika
Pretilost	rijetko	rijetko (do 25 %)	>90 %
Crna akantoza (acanthosis nigricans)	ne	ne	česta
Pokazatelji autoimunosti	ne	kod dijagnoze u 85-98 %	ne
Patofiziologija	disfunkcija beta-stanica gušterače	destrukcija beta-stanica gušterače	inzulinska rezistencija i relativna inzulinopenija

1.2. Monogenski oblici šećerne bolesti

Monogenski oblici šećerne bolesti klinički se mogu podijeliti na MODY i NDM (Slika 1). Ti izrazi mogu biti zbunjujući jer uključuju sve veći popis gena koji su odgovorni za pojavu bolesti, a u bitnom se razlikuju u smislu prezentacije, liječenja i povezanih stanja. Klinički fenotip može se izrazito razlikovati unatoč tome što se oblici te bolesti nazivaju monogenskim dijabetesom

(MODY i NDM). Najjednostavniji je klinički pristup za dijagnosticiranje novih bolesnika prikupljanje informacija o patogenezi šećerne bolesti kod bolesnika, a kasnije je prilikom svakoga kliničkog pregleda potrebno evaluirati pretpostavljenu etiologiju svakom pacijentu. To je vrlo važno s obzirom na to da se u svijetu broj pacijenata sa šećernom bolešću sve više povećava (5).



Slika 1. Vrste šećerne bolesti.

1.3. MODY

MODY je najčešći tip monogenskog dijabetesa, klinički i genetski heterogena skupina endokrinih poremećaja uzrokovanih mutacijom u jednom genu odgovornom za normalnu funkciju beta-stanica gušterače (6). Prvi su ga put u literaturi opisali Fajans i Tattersall 1975. godine kao skupinu bolesnika s obiteljskim dijabetesom karakteriziranog autosomno-dominantnim načinom nasljeđivanja i dijagnosticiranog u ranim dvadesetim godinama (7). Ta skupina poremećaja karakterizirana je monogenskim, autosomno-dominantnim nasljednim poremećajima koji su uzrokovani disfunkcijom beta-stanica gušterače. Ukupna prevalencija MODY-ja u europskoj populaciji procjenjuje se na 1 – 5:10 000 što čini 1 – 5 % svih bolesnika sa šećernom bolešću (8). Međutim, s obzirom na to da se često pogrješno dijagnosticira kao ŠBT1 ili ŠBT2, stvarna bi prevalencija trebala biti veća, ali nije provedena nijedna populacijska studija (9, 10). MODY

nastaje uslijed mutacija u različitim genima koji sudjeluju u razvoju beta-stanica gušterače ili procesu sekrecije inzulina. Do danas je poznato nekoliko podtipova MODY-ja uzrokovanih mutacijama u 14 poznatih gena (*HNF1A*, *GCK*, *HNF4A*, *HNF1B*, *PDX1*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*) koje povezuje zajednički primarni nedostatak u lučenju inzulina uzrokovan disfunkcijom beta-stanica gušterače (Tablica 3) (11). Međutim, najčešće su heterozigotne mutacije u genu za glukokinazu (*GCK*) (MODY2) i u hepatocitnim nuklearnim faktorima *HNF1A* (MODY3), *HNF4A* (MODY1) i *HNF1B* (MODY5) (9, 12).

Tablica 3. Glavna obilježja podtipova MODY-ja (13).

Podtip	Gen	Protein	Funkcija	Učestalost	Patofiziologija	Godina otkrića
HNF4A-MODY (MODY 1)	*HNF4A*	Hepatocitni nuklearni faktor 4 α	Beta-stanični transkripcijski faktor	5-10 %	Disfunkcija beta-stanica	1991.
GCK-MODY (MODY 2)	*GCK*	Glukokinaza	Enzim važan za glikolizu i detekciju razine glukoze	30-50 %	Disfunkcija beta-stanica	1993.
HNF1A-MODY (MODY 3)	*HNF1A*	Hepatocitni nuklearni faktor 1 α	Beta-stanični transkripcijski faktor	30-50 %	Disfunkcija beta-stanica	1996.
PDX1-MODY (MODY 4)	*PDX1*	Homeobox protein 1 gušterače i dvanaesnika	Beta-stanični transkripcijski faktor	<1 %	Disfunkcija beta-stanica	1997.
HNF1B-MODY (MODY5)	*HNF1B*	Hepatocitni nuklearni faktor 1 β	Beta-stanični transkripcijski faktor	5 %	Disfunkcija beta-stanica	1997.
NEUROD1-MODY (MODY 6)	*NEUROD1*	Neurogeni faktor diferencijacije 1	Beta-stanični transkripcijski faktor	<1 %	Disfunkcija beta-stanica	1999.
KLF11-MODY (MODY 7)	*KLF11*	Krueppelov faktor 1	Beta-stanični transkripcijski faktor	<1 %	Disfunkcija beta-stanica	2005.

CEL-MODY (MODY 8)	*CEL*	Karboksil ester lipaza	Egzokrina funkcija gušterače	<1 %	Smanjena endokrina i egzokrina funkcija gušterače	2006.
PAX4-MODY (MODY 9)	*PAX4*	Paired box 4	Beta-stanični transkripcijski faktor	<1 %	Disfunkcija beta-stanica	2007.
INS-MODY (MODY 10)	*INS*	Inzulin	Proizvodnja i djelovanje inzulina	<1 %	Smanjena sinteza ili nedostatak inzulina	2008.
BLK-MODY (MODY 11)	*BLK*	B limfoidna tirozin kinaza	Regulacija sekrecije inzulina	<1 %	Disfunkcija beta-stanica	2009.
ABCC8-MODY (MODY 12)	*ABCC8*	SUR podjedinica ATP ovisnog kalijevog kanala	Sudjeluje u regulaciji sekrecije inzulina	<1 %	Disfunkcija ATP ovisnog kalijevog kanala	2012.
KCNJ11-MODY (MODY 13)	*KCNJ11*	Kir6.2 podjedinica ATP ovisnog kalijevog kanala kanala beta-stanice	Sudjeluje u regulaciji sekrecije inzulina	<1 %	Disfunkcija ATP ovisnog kalijevog kanala	2012.
APPL1-MODY (MODY 14)	*APPL1*	Protein APPL1	Poremećaj u sintezi inzulina	<1 %	Autosomno Dominantno	2015.

Kako bi se poboljšala prognoza i ishod bolesti kod MODY-ja, važna je brza identifikacija oboljelih. Za potvrdu dijagnoze dostupne su specifične molekularne analize čiji rezultati omogućavaju predviđanje tijeka bolesti i odabir najprikladnijeg oblika liječenja. Međutim, oko 80 % bolesnika vodi se pod pogrješnom dijagnozom kao ŠBT1 ili ŠBT2. Trenutačni podatci pokazuju kašnjenje od približno 15 godina u vremenu od postavljanja dijagnoze šećerne bolesti do genetski potvrđene dijagnoze MODY-ja (14).

U skladu s tim, za poboljšanje dijagnostičkog značaja potreban je ciljani probir ispitanika za genetsko testiranje pogotovo ondje gdje su ograničeni financijski resursi. Za potrebe odabira kandidata za genetsko testiranje predloženi su različiti algoritmi (15). Prema trenutnim dijagnostičkim kriterijima za MODY je karakterističan rani nastup bolesti (do 25. godine života), postavljena dijagnoza šećerne bolesti kod dviju uzastopnih obiteljskih generacija, odsutnost protutijela na beta-stanice gušterače te očuvana endogena produkcija inzulina s koncentracijom C-peptida u serumu (>200 pmol/L). Opisani dijagnostički kriteriji dobro su prihvaćeni za potrebu razlikovanja MODY-ja od ŠBT1 ili ŠBT2 (16).

Učestalost različitih genetskih podtipova promjenjiva je i uvelike ovisi o kliničkom probiru (pedijatrijski ili odrasli pacijenti) te o zemljopisnom podrijetlu testiranih pacijenata (Tablica 4). U zemljama kao što su Italija i Češka gdje se provodi probir na šećernu bolest kod pedijatrijskih pacijenata slučajni nalaz blage hiperglikemije kod djece rezultira većim udjelom dijagnosticiranih pacijenata s *GCK* (MODY 2) podtipom MODY-ja. Nasuprot tomu, podtip HNF1A prevladava u zemljama kao što su Velika Britanija i Norveška gdje se pacijenti koji zadovoljavaju sve kliničke kriterije za MODY upućuju na genetsku analizu tek nakon postavljanja dijagnoze šećerne bolesti koju postavlja kliničar (17). Mutacije u genu *HNF1A* češće su kod bolesnika u europskoj bijeloj populaciji (87,5 %) u usporedbi s bolesnicima s drugim zemljopisnim podrijetlom (22,5 %) (14, 15).

Tablica 4. Prevalencija najčešćih podtipova MODY-ja u različitim državama.

Država	HNF1A-MODY	HNF4A-MODY	HNF1B-MODY	GCK-MODY	Literatura
Velika Britanija	52 %	10 %	6 %	32 %	(14)
Norveška	45 %	9 %	4 %	30 %	(18)
Danska	36 %	3 %	NA♦	10 %	(19)
Nizozemska	17 %	6 %	NA♦	15 %	(20)
Češka	12 %	5 %	NA♦	31 %	(21)
Italija	16 %	5 %	3 %	53 %	(22)

♦U navedenim istraživanjima nije analiziran gen *HNF1B*.

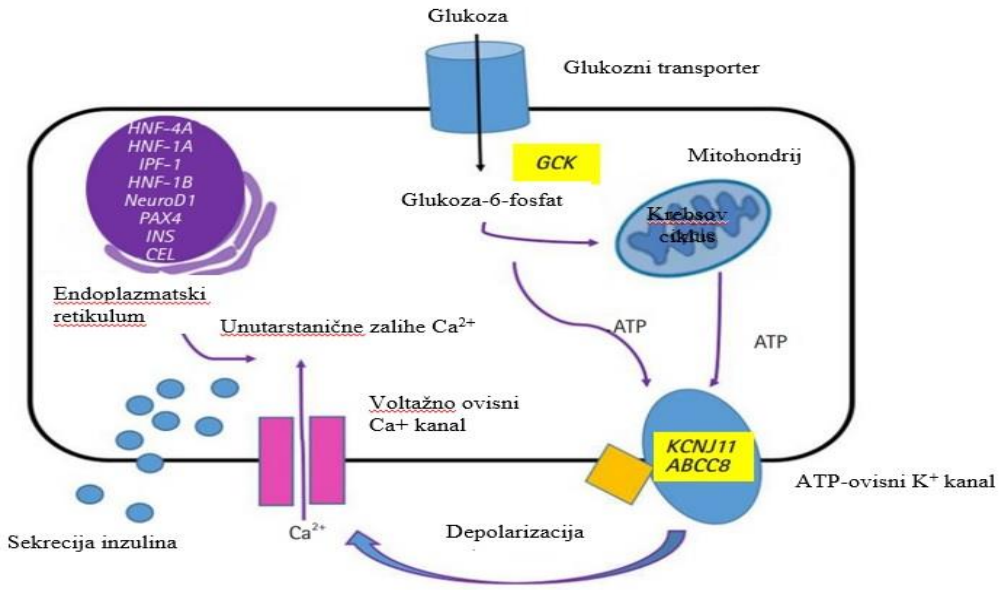
Heterozigotne mutacije u genima *GCK* i *HNF1A* čine oko 80 % svih slučajeva MODY-ja. Gen za *GCK* kodira unutarstanični enzim glukokinazu (GCK) koji djeluje kao senzor sadržaja glukoze u beta-stanicama gušterače. Mutacije u genu *GCK* odgovorne su za blagu, često asimptomatsku i neprogresivnu hiperglikemiju koja ne zahtjeva liječenje osim, ako je potrebno, za vrijeme trudnoće. S druge strane, mutacije u genima koje kodiraju transkripcijski faktori 1-alfa i 4-alfa (HNF1A i HNF4A) uzrokuju progresivno oštećenje funkcije sekrecije inzulina i hiperglikemiju koji mogu dovesti do razvoja dijabetičkih vaskularnih komplikacija. Kod takvih bolesnika šećerna bolest često se u početku dobro kontrolira pomoću sulfonilureje premda u kasnijoj fazi bolesti može biti potrebno liječenje inzulinom. MODY uzrokovan mutacijama u genu *HNF1B* mnogo je rjeđi, ali je povezan s manifestacijama izvan gušterače, a najčešća je pojava bubrežnih cista (16, 23).

1.4. Povijesni pregled

Početna istraživanja koja su provedena u različitim dijelovima svijeta upućivala su na to da se radi o blagom obliku šećerne bolesti kod mladih ljudi koji je identificiran kao predijabetes. Šećerna bolest bez simptoma prvo je zabilježena u djece i adolescenata 1958. godine, a normalna koncentracija glukoze regulirana je sulfonilurejom. U tome je razdoblju MODY klasificiran kao ŠBT2 koja se može liječiti prehranom, oralnim lijekovima ili inzulinom (24). Pojam MODY prvi je puta opisan u prikazu slučaja koji je objavio Tattersall 1974. godine. Autori su u radu prikazali obitelji s dominantno nasljednim oblikom šećerne bolesti koje su tijekom 40 godina života kao terapiju koristile sulfonilureju. Sve su obitelji imale slične kliničke simptome bolesti (25). Kasnije, 1975. godine, Tattersall i Fajans opisuju MODY kao „hiperglikemiju natašte" koja se pojavljuje kod pacijenata mlađih od 25 godina života, a koja se može liječiti bez upotrebe inzulina dulje od dvije godine od postavljanja dijagnoze (7). U sljedećem radu autori Fajans i Brown (1993.) opisuju da se kod pacijenata može razviti tolerancija na sulfonilureju te da će im za daljnje liječenje biti potrebna inzulinska terapija. S obzirom na to da se MODY prezentirao kao nasljedni oblik šećerne bolesti, sedamdesetih godina prošlog stoljeća bio je prisutan velik interes za istraživanje toga kliničkog entiteta. Tijekom 1980-ih i 1990-ih godina istraživačke su skupine iz Europe i SAD-a izvijestile o više genetskih entiteta koji su odgovorni za razvoj različitih podtipova MODY-ja (26).

1.5. Patofiziologija

MODY nastaje uslijed mutacija različitih gena koji su uključeni u razvoj beta-stanica gušterače ili proces sekrecije inzulina. Povezan je s poremećajima u sekreciji inzulina u odsutnosti inzulinske rezistencije (27, 28). U postupak sekrecije inzulina uključen je složeni niz faktora koji započinje ulaskom glukoze u stanicu pomoću transportera glukoze tipa 2 (GLUT 2) na plazma-membrani. Glikoliza započinje u citosolu pretvorbom glukoze u glukoza-6-fosfat i tijekom niza reakcija i enzima dolazi do stvaranja piruvata. U mitohondrijima piruvat u aerobnim uvjetima prelazi u acetil-CoA koji je glavni supstrat u Krebsovu ciklusu. Zatim dolazi do povećanja koncentracije ATP-a što uzrokuje zatvaranje kalijevih kanala osjetljivih na ATP (KATP) koji sprječavaju izlaz kalija što pak dovodi do depolarizacije plazma-membrane i otvaranja naponski ovisnih kalcijevih kanala uslijed čega dolazi do influksa kalcijevih iona u stanicu. Povećanjem unutarstanične koncentracije kalcija dolazi do stimulacije egzocitoze inzulinskih vezikula i sekrecije inzulina (Slika 2) (29, 30).

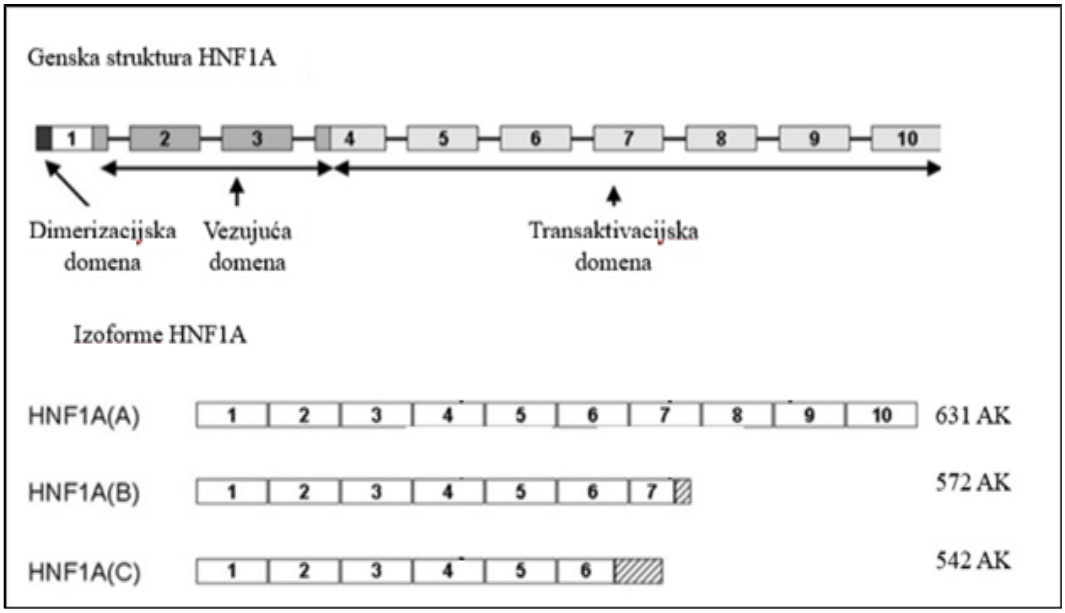


Slika 2. Shematski prikaz osnovih koraka glukozom stimulirane sekrecije inzulina te prikaz položaja gena i proteina u beta-stanici gušterače odgovornih za razvoj MODY-ja. Preuzeto i prilagođeno iz Jang, 2020 (13).

1.6. Najčešći podtipovi MODY-ja

1.6.1. HNF1A-MODY (MODY 3)

Gen *HNF1A* (hepatocitni nuklearni faktor 1A) nalazi se na kromosomu 12 (12q24.31). Sastoji se od 10 egzona te sadrži više transkripata koji nastaju alternativnim prekrajanjem, a kodiraju tri različite izoforme (Slika 3) (27, 28). Prema bazi *UniProt* izoforma A kodira najduži protein s 631 aminokiselinom za razliku od izoformi B i C koje su odgovorne za kodiranje kraćih skraćenih verzija. Izoforma B sastoji se od 572 aminokiseline. Sve tri navedene izoforme nalaze se u jetri, bubrezima, gušterači, izoliranim Langerhansovim otočićima i crijevima, međutim obrasci njihove ekspresije međusobno se razlikuju. Izoforma A nalazi se u jetri, bubrezima i fetalnoj gušterači, dok je nazastupljenija u zreloj gušterači gdje je izvjesno da igra važnu ulogu u neprekidnom održavanju funkcije beta-stanica. Dakle, ekspresija gena *HNF1A* razlikuje se u prostoru i vremenu ne samo prema vrsti tkiva već i po fazi razvoja organizma. Taj diferencijalni obrazac ekspresije može odražavati razlike u funkciji između pojedinih izoformi s obzirom na to da se smatra kako izoforma A ima najmanji transaktivacijski potencijal ili da odražava diferencijalnu aktivaciju nizvodnih efektora (29).

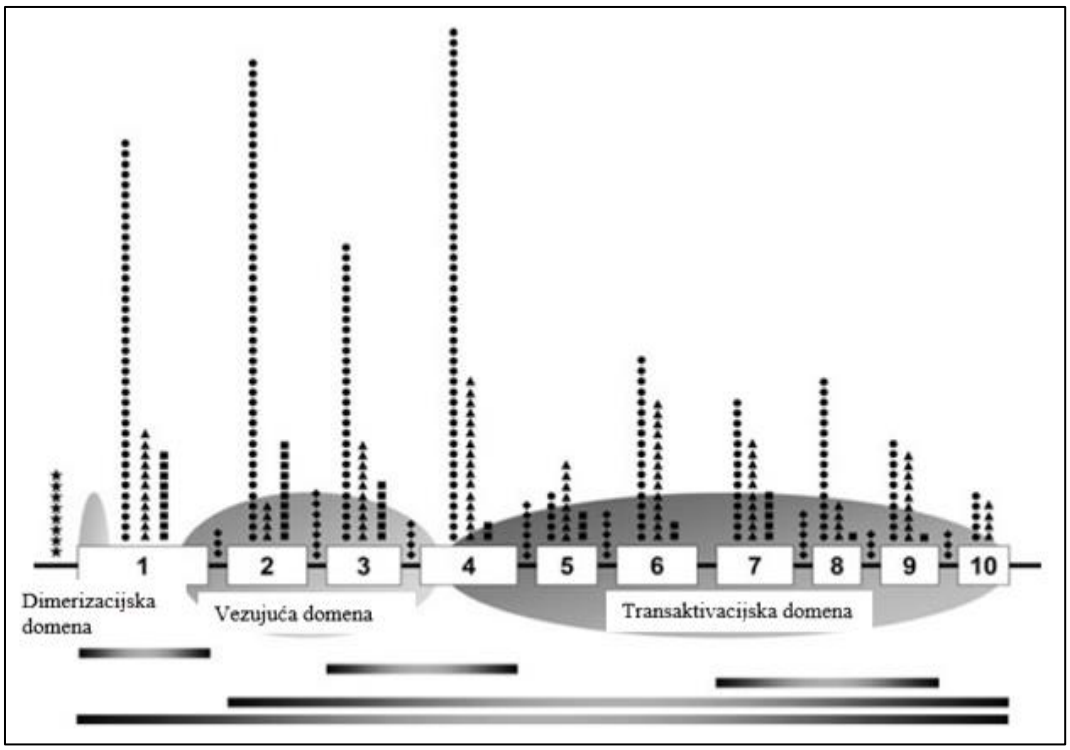


Slika 3. Prikaz gena *HNF1A*, njegovih domena i izoformi koje nastaju alternativnim prekrajanjem. Najduža je izoforma A koja se sastoji od 10 egzona, izoforma B sastoji se od 7, a izoforma C od 8 egzona. Na razini gena prikazane su tri funkcionalne domene: dimerizacijska domena (1-33 AK), vezujuća domena (100-184, 198-281) te transaktivacijska domena (282-631 AK). Preuzeto i prilagođeno iz Harries i sur., 2006 (32).

HNF1A se sastoji od triju funkcionalnih domena: dimerizacijska domena, vezujuća domena i transaktivacijska domena. Smješten je u jezgri i djeluje kao homodimer, kao dominantni oblik u jetri i gušterači te ima regulatornu ulogu u ekspresiji nekoliko gena u više tkiva tijekom embrionalnog razvoja. U jetri transkripcijski faktor *HNF1A* povezuje nekoliko gena koji su specifični za jetru (alfa i beta-lanaca albumina i fibrinogena) te ukupno oko 222 gena u hepatocitima (28). Također, *HNF1A* ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije inzulina kao i u razvoju, proliferaciji i staničnoj smrti u zrelim beta-stanicama. Za razliku od gena *GCK*, čini se da mutacije u genu *HNF1A* ne utječu na porođajnu težinu djeteta s obzirom na to da je *in utero* normalna funkcija beta-stanica što ide u prilog diferencijalnoj ekspresiji gena *HNF1A* tijekom cijeloga života (10, 30, 31).

Podtip HNF1A uzrokuju heterozigotne mutacije u genu *HNF1A*. Te su mutacije visoko penetrantne; oko 63 % bolesnika razvije MODY do 25. godine te oko 96 % do 55. godine života,

ali mogu prikazivati različito fenotipsko očitovanje s obzirom na to da su neke osobe normoglikemične, dok su druge hiperglikemične. To bi moglo ukazati da su u proces uključeni i modifikatorski geni (32, 33). U istraživanju u kojem je obuhvaćeno oko 1 200 obitelji s dijagnozom MODY-ja u genu *HNF1A* identificirano je oko 400 različitih varijanti. Pogrešne mutacije (engl. *missense*) činile su više od 50 % svih mutacija, potom mutacije pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*) oko 21 %, besmislene (engl. *nonsense*) oko 9,4 %, mutacije na mjestu prekrajanja (engl. *splice-site*), delecije i insercije oko 2,4 % te parcijalne delecije ili delecije cijelog gena oko 1,2 %. Varijante su identificirane u svim egzonima od kojih su najviše bile zastupljene u drugome i četvrtom, a najmanje u petome i desetom egzonu (Slika 4) (32).



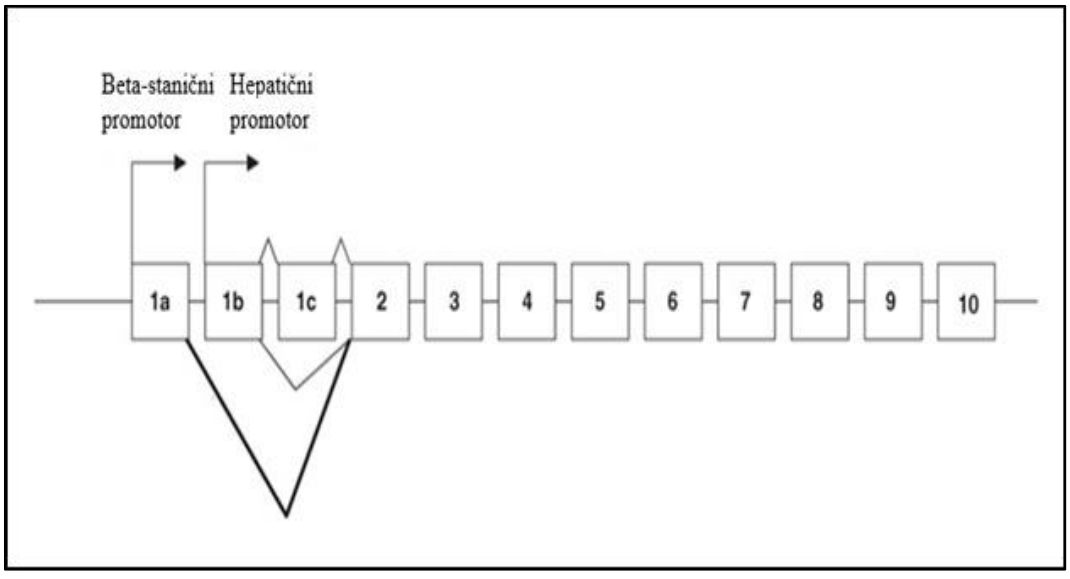
Slika 4. Raspodjela i učestalost mutacija po egzonima u genu *HNF1A* u području promotorske regije, 10 egzona te na mjestima prekrajanja. Opis simbola: ● pogrešna mutacija ► mutacija pomaka okvira čitanja ■ besmislena mutacija ♦ mutacija na mjestu prekrajanja i * mutacija u promotorskoj regiji. Četiri parcijalne i jedna delecija cijelog gena prikazane su zasjenjenim trakama. Preuzeto i prilagođeno iz Harries i sur., 2006 (32).

Kako se *HNF1A* eksprimira u nekoliko tkiva te izravno i neizravno utječe na ekspresiju više gena, mutacije u genu imaju širok raspon mogućih posljedica. U ljudi dolazi do poremećaja u lučenju inzulina što je povezano s nepotpunim glikolitičkim protokom Langerhansovih otočića i oksidativnom fosforilacijom. Kako bi se istražili temeljni procesi podtipa HNF1A, jedna je studija rabila otočiće gušterače i hepatocite *knockout* miševa te pronašla povezanost u tome da nedostatak *HNF1A* utječe na ekspresiju gena za proteine uključene u transport glukoze kao što je transporter glukoze 2 (GLUT2) i metabolizam glukoze. Također, ista je studija otkrila da su mnogi geni s funkcijama od glikolize, glukoneogeneze, derivacije aminokiselina do Krebsova ciklusa imali smanjenu ekspresiju. Kako dolazi do poremećaja metabolizma glukoze, tako dolazi i do smanjene ekspresije gena ovisnih o glukozi. Također, dokazano je da dolazi do poremećaja proliferacije beta-stanica gušterače. Međutim, važno je spomenuti da se profili ekspresije gena *HNF* međusobno razlikuju među ljudima, miševima i štakorima što je posebno izraženo za *HNF1A*, stoga se zaključci istraživanja životinjskih modela moraju pažljivo tumačiti (30).

Istraživanja su pokazala da mjesto mutacije u genu *HNF1A* utječe na dob početka bolesti pri čemu se kod mutacija u egzonima 1 – 6 bolest ranije ispoljava za razliku od mutacija u egzonima 8 – 10 (9). Razlog je tome što mutacije u egzonima 1 – 6 djeluju na izoforme A, B i C što za posljedicu ima potencijalno teži fenotip, dok mutacije u egzonima 8 – 10 djeluju samo na izoformu A koja nije dominantna forma u zreloj gušterači. Druga je studija prikazala da je navedeni odnos genotip-fenotip točan samo za pogrešne mutacije te da nije povezan s funkcionalnom domenom zahvaćena proteina (29). Međutim, druga je studija prikazala da se kod pacijenata koji imaju besmislenu mutaciju u prosjeku četiri godine ranije dijagnosticira MODY za razliku od pacijenata koji imaju pogrešne mutacije što može upućivati na potencijalno teže posljedice besmislenih mutacija. U istoj studiji također se došlo do zaključka da se kod osoba koje su imale besmislenu mutaciju u dimerizacijskoj i vezujućoj domeni bolest dijagnosticirala 10 godina ranije za razliku od osoba koje su imale besmislenu mutaciju u transaktivacijskoj domeni. To možemo objasniti zahvaćenošću jedne, dviju ili triju izoformi ili zbog važnosti određenog položaja unutar domene u odnosu na njegovu funkciju (9, 31, 33).

1.6.2. GCK-MODY (MODY 2)

Glukokinaza (heksokinaza IV) pripada obitelji heksokinaza, a nastaje kao produkt gena *GCK*. Gen *GCK* smješten je na kromosomu 7 (7q13) i eksprimiran je u gušterači i jetri. Ima važnu ulogu u izlučivanju inzulina stimuliranog glukozom u gušterači, no, s druge strane, doprinosi unosu glukoze i konverziji glikogena u jetri (34). Sastoji se od 12 egzona i dvaju alternativnih promotora pomoću kojih alternativnim prekrajanjem nastaju tri tkivno-specifične izoforme (Slika 5). Transkripcijska varijanta 1 eksprimirana je u beta-stanicama gušterače, kao i u više drugih stanica te kodira izoformu 1 (465 AK). U jetri se eksprimiraju transkripcijske varijante 2 i 3 te kodiraju izoforme 2 i 3, veliku (466 AK) i manju (464 AK) jetrenu izoformu. Transkripcijska varijanta 1 sadrži specifičan prvi egzon s 5' UTR regijom pomoću kojeg nastaje N-terminalna domena u izoformi 1. Transkripcijske varijante 2 i 3 imaju prvi egzon specifičan za jetru za razliku od transkripcijske varijante 1. Transkripcijska varijanta 3 sadrži drugi egzon koji je također specifičan za jetru, a koji je odsutan u transkripcijskoj varijanti 2 (35).



Slika 5. Shematski prikaz gena *GCK*. Alternativnim prekrajanjem nastaju tri transkripcijske varijante koje se razlikuju u prvom egzonu, dok su im egzoni 2-10 zajednički. Preuzeto i prilagođeno iz Gloyn, 2003 (36).

Glukokinaza je monomerni regulatorni enzim koji ima važnu funkciju u homeostazi glukoze. Zbog niskog afiniteta prema glukozi djeluje kao visokoosjetljivi senzor glukoze u stanicama (37). *GCK* katalizira fosforilaciju glukoze u glukoza-6-fosfat uz pomoć ATP-a. Vrhunac svoje aktivnosti dostiže za vrijeme hiperglikemije što je izravno proporcionalno koncentraciji glukoze u okolini (38). Glukokinaza je najvažniji regulatorni enzim u beta-stanicama gušterače i katalizira prvu reakciju glikolize, pretvaranje glukoze u glukoza-6-fosfat. Ima važnu ulogu u regulaciji sekrecije inzulina zbog čega se naziva senzorom za glukozu. Pomoću svojih posebnih kinetičkih osobina omogućeno joj je da u fiziološkom rasponu koncentracije glukoze može prilagođavati sekreciju inzulina prema stopi fosforilacije glukoze, a koja je direktno ovisna o koncentraciji glukoze (35, 38). S obzirom na važnu ulogu glukokinaze u metabolizmu glukoze i sekreciji inzulina, jasno je da mutacije u genu *GCK* mogu rezultirati hiper ili hipoglikemijom (38). Heterozigotne mutacije gubitka funkcije dovode do smanjene stope fosforilacije što u jetri smanjuje količinu sintetiziranog glikogena interferirajući postprandijalnu regulaciju glukoze (39). U beta-stanicama dolazi do poremećaja sekrecije inzulina što se odražava smanjenim odgovorom tih stanica na glukozu. Konačan je rezultat tih mutacija hiperglikemija (40).

Iako su vrlo rijetke, homozigotne mutacije gubitka funkcije također dovode do hiperglikemije. Te mutacije dovode do potpuna nedostatka glukokinaze što se manifestira u obliku trajnog dijabetesa koji za liječenje zahtjeva inzulin. Taj teški fenotip može biti uzrokovan i složenim heterozigotnim mutacijama gubitka funkcije, a poznat je kao trajni neonatalni dijabetes mellitus (engl. *Permanent neonatal diabetes mellitus*, PNDM). S druge strane, heterozigotne mutacije dobitka funkcije pomiču glukokinazu u aktivnu konformaciju pri nižim koncentracijama glukoze što za rezultat ima hiperinzulinemičnu hipoglikemiju (38, 41).

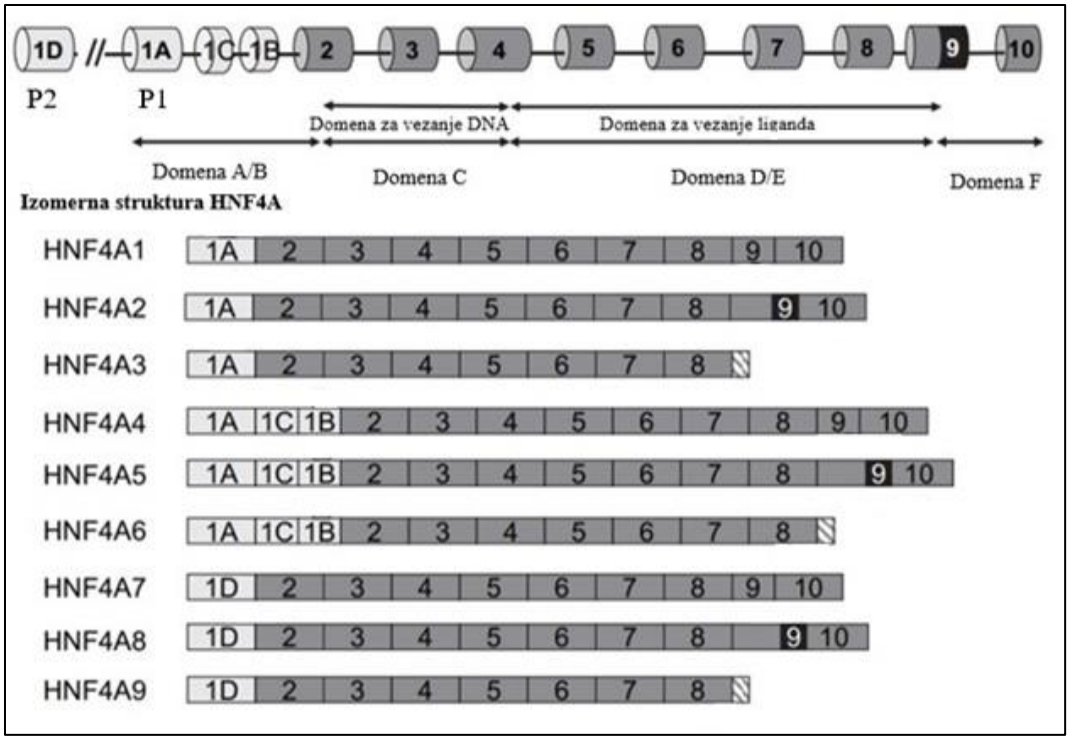
Do danas je utvrđeno više od 600 različitih mutacija raspodijeljenih pa cijelom genu *GCK* (38). Kao zanimljiv podatak treba istaknuti da je uočeno kako sve heterozigotne mutacije gubitka funkcije kao posljedicu imaju identičan fenotip zbog kompenzacijskoga djelovanja drugog alela divljeg tipa (42). Taj fenotip poznat je pod nazivom GCK-MODY (MODY 2) za koji je karakteristična asimptomatska blaga stabilna hiperglikemija koja je prisutna od rođenja. S obzirom na to da je asimptomatska i neprogresivna, često ostaje dugo neotkrivena, a dijagnosticira se slučajno tijekom rutinskih pretraga (10, 16). Kod GCK-MODY bolesnika koncentracije se glukoze kreću u rasponu od 5,5 – 8 mmol/L što odgovara vrijednostima pri kojima dolazi do stimulacije

sekrecije inzulina (41). Važno je naglasiti da bolesnici s podtipom GCK-MODY imaju dobro očuvanu homeostatsku kontrolu glukoze u krvi što je dokazano malim porastom (<3 mmol/L) koncentracije glukoze u 120. minuti testa oralne podnošljivosti glukoze (OGTT). Zbog svega navedenog te neprogresivne prirode hiperglikemije, mikro i makrovaskularne komplikacije kod tih bolesnika vrlo su rijetke (16). Kod bolesnika s podtipom GCK-MODY nije potrebno liječenje. Opći je stav da kod bolesnika sa zdravim životnim navikama terapija nije potrebna (43, 44). Primjena oralnih hipoglikemika ili inzulinske terapije nije učinkovita za smanjenje koncentracije glikiranog hemoglobina (HbA1c) jer egzogeni inzulin dovodi do smanjene endogene sekrecije inzulina, a što ne bi utjecalo na smanjenje koncentracije glukoze ili Hba1C (45).

Kod trudnica može biti potrebna inzulinska terapija kako bi se spriječile moguće posljedice na dijete (46). Ako dijete ne naslijedi heterozigotnu mutaciju s gubitkom funkcije od majke zbog povećane sekrecija inzulina i rasta stimuliranog inzulinom, bit će izloženo riziku makrosomije. U tom se slučaju preporučuje uvođenje inzulinske terapije kako bi se spriječio nastanak makrosomije i drugih mogućih komplikacija. Ukoliko dijete naslijedi mutaciju od oca, utoliko neće biti dovoljno glukoze kako bi se stimulirala odgovarajuća sekrecija inzulina koja je potrebna za normalan rast fetusa pa će se dijete roditi s manjom porođajnom težinom. Ako su majka i dijete nositelji mutacije, dijete će imati dovoljnu količinu glukoze i odgovarajuću sekreciju inzulina te će se roditi s normalnom porođajnom težinom (9, 10, 16).

1.6.3. HNF4A-MODY (MODY 1)

HNF4A je transkripcijski faktor koji je kodiran genom *HNF4A*, a smješten je na kromosomu 20 (20q13.12). *HNF4A* se sastoji od 13 egzona unutar kojih se nalaze četiri varijante za egzon 1 (1A, 1B, 1C, 1D) te dva alternativna promotora (P1 i P2) koja su međusobno udaljena oko 46 kb (47). Kombinacijom različitih promotora uz procese poliadenilacije i alternativnog prekrajanja nastaje 9 različitih izoformi proteina (HNF4A1-HNF4A9) (Slika 6). U jetri i bubrezima promotor P1 eksprimira izoforme HNF4A1-HNF4A6, dok u gušterači promotor P2 eksprimira izoforme HNF4A7-HNF4A10. Za vrijeme ranoga fetalnog razvoja u gušterači su prisutne i izoforme s promotora P1 (48).



Slika 6. Struktura gena *HNF4A* i prikaz izoformi HNF4A. U izoformama se HNF4A2, HNF4A5 i HNF4A8 u egzonu 9 nalazi dodatnih 10 aminokiselina (označeno crnom bojom). Intron 8 skraćen je kod izoformi HNF4A3, HNF4A6 i HNF4A9 (označeno bijelo s kosim crtama). Alternativni egzoni 1A, 1B, 1C i 1D označeni su bijelom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz Harries i sur., 2008 (48).

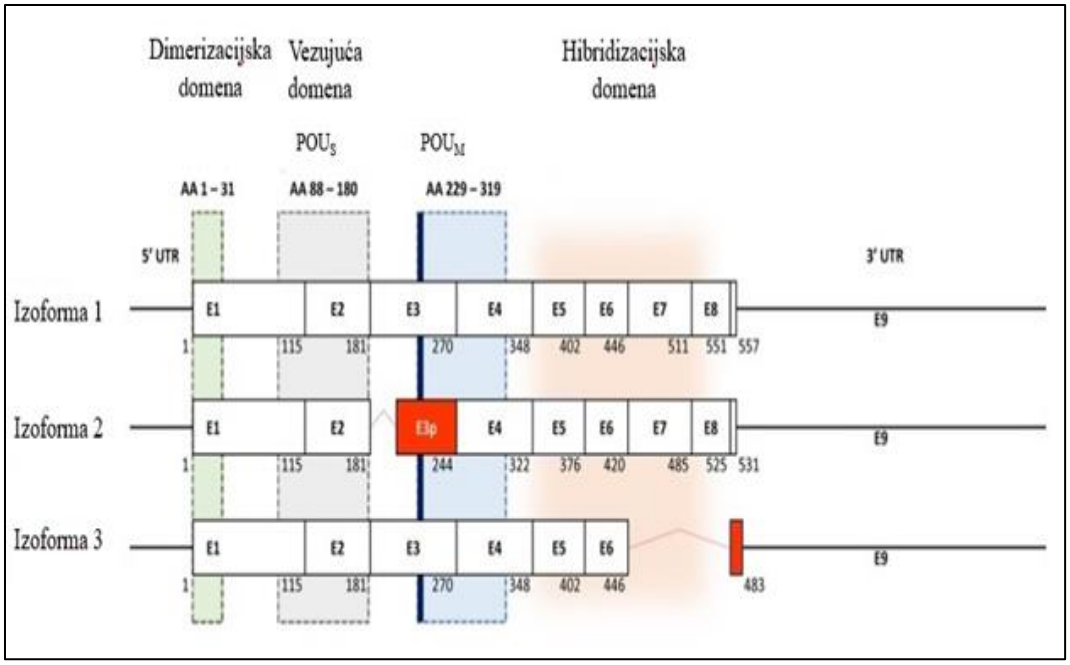
Hepatocitni nukelarni faktor 4A smješten je u jezgri te se kao homodimer veže za DNA. Pripada složenoj mreži faktora transkripcije u kojoj se nalazi i *HNF1A,* a odgovorni su za tkivno-specifičnu i vremenski ovisnu regulaciju ekspresije gena tijekom embrionalnog razvoja (49). U jetri ima važnu ulogu kod morfološke i funkcionalne diferencijacije hepatocita, skladištenja glikogena i stvaranja jetrenog epitela te sudjeluje u regulaciji ekspresije gena koji su uključeni u proces glukoneogeneze i metabolizam lipida (50, 51, 52). Također, ima važnu ulogu u razvoju gušterače, diferencijaciji i održavanju funkcije beta-stanica te sekreciji inzulina aktiviranjem gena za inzulin (INS) (48, 53).

HNF4A-MODY uzrokuju heterozigotne mutacije koje se nalaze u promotoru P2 i kodirajućoj regiji gena *HNF4A* (48). Karakterizira ga fenotip sličan podtipu HNF1A s

progresivnom disfunkcijom beta-stanica, ali mutacije u genu *HNF4A* imaju nižu penetraciju te kod bolesnika u četvrtom desetljeću života još ne nastupaju simptomi bolesti (9, 16). U genu *HNF4A* do danas je identificirano više od 100 različitih mutacija, a najčešće su, kao i u genu *HNF1A*, pogrešne mutacije (oko 58 %), mutacije pomaka okvira čitanja (oko 12 %), besmislene mutacije (oko 10 %), mutacije na mjestu prekrajanja (oko 6 %), mutacije u promotorskoj regiji (oko 6 %) te parcijalne ili delecije cijelog gena (oko 2 %). Mutacije su raspoređene po cijelom genu, ali ipak većina ih je identificirana u egzonima 7 i 8 (51). Mutacije koje se nalaze u egzonima 2 – 8, a prisutne su u svim izoformama *HNF4A*, odgovorne su za raniji nastup bolesti u usporedbi s mutacijama u ostalim egzonima (48). Za razliku od podtipa HNF1A, mutacije u genu *HNF4A* često su povezane s fetalnom makrosomijom. Kod roditelja koji su nositelji mutacije postoji rizik za razvoj makrosomije kod potomaka (oko 56 %) i hiperinzulinemične hipoglikemije (oko 10 %) (44). Kao i kod podtipa HNF1A, bolesnici s HNF4A-MODY dobro odgovaraju na terapiju niskim dozama sulfonilureje (54).

1.6.4. HNF1B-MODY (MODY 5)

HNF1B je transkripcijski faktor koji je kodiran genom *HNF1B*, a nalazi se na kromosomu 17 (17q12). Alternativnim prekrajanjem nastaju tri transkripta koji kodiraju tri izoforme proteina. Najduža je izoforma 1 koja se sastoji od 9 egzona, izoforma 2 ima skraćen egzon 3 (nedostaje unutarnja regija), a izoforma 3 nema egzone 7 i 8, dok je uslijed alternativnog prekrajanja egzon 9 drugačiji i završava na alternativnom stop-kodonu (Slika 7). Transkripcijski se faktor HNF1B, kao i HNF1A, sastoji od triju domena: dimerizacijska domena, vezujuća i transaktivacijska domena (49, 55). HNF1B se eksprimira u ranoj fazi embrionalnog razvoja u timusu, plućima, bubrezima, jetri, gušterači, žučnim kanalima, želudcu, crijevima i genitalnom traktu što je važno za preživljenje embrija (56).



Slika 7. Shematski prikaz izoformi HNF1B. Najduža je izoforma 1 koja se sastoji od 9 egzona. U transkriptu izoforme 2, skraćen je treći egzon (na 5′ kraju nedostaje regija od 78 pb). U transkriptu izoforme 3 nedostaju egzoni 7 i 8, a zbog alternativnog prekrajanja egzon 9 završava na alternativnom stop-kodonu (92 pb nakon izvornog Stop kodona). Bijelo ispunjeni pravokutnici prikazuju neizmjenjene egzone, a ispod njih su navedeni redni brojevi aminokiselina. Zeleno, sivo, plavo i narančasto obojena područja prikazuju funkcionalne domene. Preuzeto i prilagođeno iz Hojny i sur., 2020 (55).

Podtip HNF1B uzrokuju heterozigotne mutacije u genu *HNF1B*, a učestalost je tog podtipa otprilike od 1 do 5 % svih slučajeva MODY-ja. S obzirom na to da se dob prilikom postavljanja dijagnoze kreće u rasponu od rođenja do 61. godine, penetracija je vrlo varijabilna (10, 16). Do danas je utvrđeno više od 100 različitih varijanti od čega oko 34 % otpada na velike delecije, oko 31 % na pogrešne mutacije, oko 15 % na mutacije pomaka okvira čitanja, oko 11 % na besmislene mutacije te oko 8 % na mutacije na mjestu prekrajanja. *De novo* mutacije čine oko 50 % svih varijanti što znači da tijekom postavljanja dijagnoze obiteljska anamneza može izostati (56). Varijante su raspoređene po cijelom genu iako ih je najveći broj identificiran u prva četiri egzona (57). Do danas nije utvrđeno da fenotip bolesti ovisi o vrsti promjene u genu te je kod bolesnika s velikom delecijom ili promjenom jednog nukleotida fenotip sličan (58). Podtip HNF1B nastaje

zbog hipoplazije gušterače što dovodi do disfunkcije beta-stanica i smanjene sekrecije inzulina (59).

Prvotno se gen *HNF1B* povezivao samo sa šećernom bolešću, ali se vrlo brzo pokazalo da su bubrežne ciste jedan od glavnih simptoma te bolesti. S obzirom na to da bolesnici imaju istovremeno šećernu bolest i bubrežne ciste, taj se podtip MODY naziva i sindrom RCAD (engl. *Renal Cysts and Diabetes Syndrome*) (58). Uz spomenute ciste, koje su najčešće prisutne, mutacije u genu *HNF1B* mogu biti uzrok različitih strukturnih i histoloških promjena na bubrezima (hipoplazija i displazija bubrega, glomerulocistična bubrežna bolest itd.) (60).

Podtip HNF1B-MODY kod mladih se bolesnika vrlo često dijagnosticira nakon postavljanja dijagnoze bubrežne bolesti. Bolesnici često imaju negativnu obiteljsku anamnezu šećerne ili bubrežne bolesti jer se velik broj mutacija pojavljuje spontano (lat. *de novo*) i prvi se put javlja kod bolesnika (61). Bolesnici s dijagnozom HNF1B-MODY ne odgovaraju na terapiju sulfonilurejom te se za liječenje koriste inzulinskom terapijom (54).

1.7. Rijetki podtipovi MODY-ja

1.7.1. NEUROD1-MODY (MODY 6)

Neurogeni faktor diferencijacije 1 (NEUROD1) transkripcijski je faktor koji je kodiran genom *NEUROD1 (BETA2)* koji je smješten na kromosomu 2 (2q31.3). Eksprimira se u endokrinim stanicama gušterače i neurona (61). Transkripcijski faktor NEUROD1 sastoji se od dvije domene: domena bHLH (engl. *Basic helix-loop-helix*) i transaktivacijska domena (63). Podtip NEUROD1-MODY uzrokuju heterozigotne mutacije u genu *NEUROD1* koje su do danas opisane u 16 obitelji (63, 64). Većina mutacija koje su povezane s MODY-jem identificirane su u transaktivacijskoj domeni, a najčešće su to bile pogrešne mutacije i mutacije pomaka okvira čitanja (65).

1.7.2. PDX1-MODY (MODY 4)

Podtip PDX1-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *PDX1* (engl. *Panceratic duodenal homeobox gene 1, PDX1)* koji je smješten na kromosomu 13 (13q12.2). Poznat je i pod nazivom inzulinski promotor faktor 1 (IPF1) (33). PDX1 je transkripcijski faktor koji sadrži homeodomenu, odgovoran je za razvoj gušterače i djeluje na ekspresiju gena za inzulin (66). Ima glavnu ulogu u regulaciji gena koji kodiraju enzime glukagona, transporter glukoze 2 (GLUT2), inzulina i glukokinaze (GCK) (67). Heterozigotne mutacije u genu *PDX1* odgovorne su za monogenski oblik dijabetesa, dok su homozigotne mutacije odgovorne za razvoj PNDM-a (66).

1.7.3. KLF11-MODY (MODY 7)

Podtip KLF11-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *KLF11* (engl. *Kruppel Like Factor 11*) koji je smješten na kromosomu 2 (2q25.1), a eksprimira se u beta-stanicama gušterače (34). Sudjeluje u regulaciji ekspresije inzulina pri povišenoj koncentraciji glukoze vežući se za promotorske regije gena *INS* i *PDX1* (68). Do danas su opisane samo tri pogrešne mutacije koje se povezuju s MODY-jem, a odgovorne su za smanjenu sekreciju inzulina (69).

1.7.4. CEL-MODY (MODY 8)

Podtip CEL-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *CEL* (engl. *Carboxyl Ester Lipase*) koji je smješten na kromosomu 9 (9q34.13). Odgovoran je za kontrolu egzokrine i endokrine funkcije gušterače, a eksprimira se u stanicama mliječnih žlijezda i acinarnim stanicama gušterače (34). Do danas su identificirane samo tri mutacije u genu *CEL* u osam obitelji koje su povezane s MODY-jem (64). Sve objavljene mutacije bile su delecije u jedanaestom egzonu koje su odgovorne za skraćivanje proteina (mutacije pomaka okvira čitanja) (70).

1.7.5. PAX4-MODY (MODY 9)

Podtip PAX4-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *PAX4* (engl. *Paired Box 4*), a smješten je na kromosomu 7 (7q32.1) (11). Transkripcijski faktor PAX4 eksprimira se u endokrinim promotorskim stanicama za vrijeme embrionalnog razvoja, a kasnije i u beta-stanicama gušterače (71). Do danas je taj podtip opisan u samo nekoliko obitelji s različitim fenotipskim obilježjima (72).

1.7.6. INS-MODY (MODY 10)

Podtip INS-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *INS* (engl. *Insulin*) koji je smješten na kromosomu 11 (11p15.5). Gen *INS* odgovoran je za regulaciju metabolizma glukoze u organizmu (34). Mutacije u tom genu najčešće su odgovorne za razvoj PNDM-a koji se javlja unutar prvih šest mjeseci života, a vrlo rijetko kao uzrok MODY-ja u kasnijoj dobi (73). Do danas je taj podtip opisan u oko 25 obitelji s vrlo različitom kliničkom prezentacijom bolesti (64).

1.7.7. BLK-MODY (MODY 11)

Podtip BLK-MODY uzrokovan je mutacijma u genu *BLK* (engl. *B Lymphocyte Kinase)* koji je smješten na kromosomu 8 (8p23.1) (34). Gen *BLK* kodira protein receptora tirozin-kinaze i član je SRC obitelji protoonkogena koja je odgovorna za stimulaciju beta-stanica na sintezu i sekreciju inzulina. Do danas je opisana samo jedna mutacija koja se povezuje s MODY-jem (p.Ala71Thr) (74).

1.7.8. ABCC8-MODY (MODY 12)

Podtip ABCC8-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *ABCC8* (engl. *ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8)* koji je smješten na kromosomu 11 (11p15.1) i odgovoran je za sekreciju inzulina (75). Gen *ABCC8* kodira sulfonilurejni receptor (SUR1) koji je podjedinica kalijevih kanala (KATP) koji su osjetljivi na ATP, a nalaze se na membranama beta-stanica (11). Mutacije u genu *ABCC8* mogu uzrokovati kongenitalni hiperinzulinizam kao posljedicu inaktivirajućih mutacija. Te mutacije također mogu uzrokovati trajni ili prolazni neonatalni dijabetes, a kao rezultat aktivirajućih mutacija ili recesivnih mutacija gubitka funkcije (75).

1.7.9. KCNJ11-MODY (MODY 13)

Podtip KCNJ11-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *KCNJ11* (engl. *Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11)* koji je smješten na kromosomu 11 (11p15.1). Gen *KCNJ11* kodira Kir6.2 podjedinicu KATP kanala (47). Kao i kod podtipa ABCC8-MODY, mutacije u genu *KCNJ11* mogu uzrokovati kongenitalni hiperinzulinizam i neonatalni dijabetes, a vrlo rijetko i MODY (16). Do danas su opisane mutacije samo kod nekoliko obitelji s pojavom bolesti u mlađoj odrasloj dobi i to s kliničkim obilježjima kao kod šećerne bolesti tipa 2 (64).

1.7.10. APPL1-MODY (MODY 14)

Podtip APPL1-MODY uzrokovan je mutacijama u genu *APPL1* (engl. *Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting With βPH Domain And Leucine Zipper 1*) koji je smješten na kromosomu 3 (3p14.3). Gen *APPL1* uključen je u regulaciju stanične proliferacije i povezanosti između adiponektina i signalnog puta inzulina (76). Do danas su identificirane dvije različite mutacije u dvjema obiteljima, a koje su odgovorne za gubitak funkcije proteina što za posljedicu ima smanjenje sekrecije inzulina (77).

1.8. Dijagnoza i biološki biljezi za MODY

1.8.1. Dijagnoza MODY-ja

Smjernice za dijagnostiku MODY-ja ukazuju na to da je genetsko testiranje potrebno učiniti kod bolesnika kod kojih je prisutan rani nastup šećerne bolesti (do 25. godine života), postavljena dijagnoza šećerne bolesti kod dviju uzastopnih generacija, očuvana endogena sekrecija inzulina uz normalnu razinu C-peptida te odsustvo protutijela na beta-stanice gušterače (9).

Za postavljanje molekularne dijagnoze MODY-ja rabi se metoda sekvenciranja po Sangeru pomoću koje se mogu identificirati supstitucije baza, male delecije ili insercije koje se mogu nalaziti u kodirajućoj i regulatornoj regiji gena. Kao glavni nedostatak Sangerove metode jest ograničenost na malen broj gena koji su odabrani prema kliničkim obilježjima. Također, trajanje same analize razmjerno je dugotrajno pa se u praksi najčešće analiziraju samo geni *HNF1A* i *GCK*. Sangerovom metodom sekvenciranja genetska dijagnoza MODY-ja potvrdi se u oko 15 % bolesnika (17).

Razvojem tehnologije sekvenciranja novih generacija (engl. *next generation sequencing*, NGS) omogućena je istovremena analiza više gena koji su povezani s dijagnozom MODY-ja. Upotrebom danas dostupnih panela gena za MODY genetsku dijagnozu bolesti moguće je postaviti kod 25 – 30 % bolesnika uz mogućnost identifikacije mutacija u genima na koje nisu ukazivala klinička obilježja bolesnika (78).

Pravovremeno postavljanje dijagnoze MODY-ja kod djece i adolescenata omogućuje primjenu precizne medicine. Pokazalo se da primjena ciljane terapije nakon potvrde genetskog uzroka bolesti omogućava poboljšanje u kontroli glikemije, smanjenje komplikacija šećerne bolesti te ukupno smanjenje troškova liječenja. Rezultati nekoliko studija pokazuju da su genetska ispitivanja kod MODY-ja u ciljanim populacijama potpuno isplativa (79, 80, 81, 82). Razlikovanje MODY-ja od najčešćih tipova šećerne bolesti (ŠBT1 ili ŠBT2) također ima važne implikacije jer se time omogućava pravovremeno praćenje svih komplikacija i pridruženih poremećaja bolesti, a ujedno je omogućena rana identifikacija pogođenih i rizičnih članova obitelji (6).

1.8.2. Biološki biljezi za MODY

1.8.2.1. Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hsCRP)

Kako bi se poboljšala dijagnostika MODY-ja, došlo je do potrebe za uvođenjem bioloških biljega. Najbolje rezultate pokazao je visoko osjetljivi C-reaktivni protein (engl. *High-sensitivity C-reactive protein, hsCRP*). Istraživanja su pokazala da je koristan pri razlikovanju podtipa HNF1A-MODY od drugih tipova šećerne bolesti (83). Dokazano je da su mutacije gubitka funkcije u genu *HNF1A* povezane s nižim koncentracijama hsCRP-a u serumu (84). Isto je potvrđeno i u drugoj studiji koja je pokazala da su kod bolesnika s HNF1A-MODY značajno niže koncentracije hsCRP-a za razliku od bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 ili tipa 2, GCK-MODY-jem ili zdravom kontrolnom skupinom (85). S obzirom na mogućnost dobrog razlikovanja i uobičajenu upotrebu u kliničkoj praksi, hsCRP ima veliku mogućnost primjene kao biološki biljeg prilikom probira bolesnika za molekularno testiranje. Ograničenja toga biološkog biljega uključuju činjenicu da je CRP protein akutne faze i rabi se za dijagnosticiranje i praćenje infekcije i upale. Visoke koncentracije hsCRP-a mogu dovesti do zablude kod pacijenta s kliničkom sumnjom na HNF1A-MODY, a koji istodobno ima i infekciju, stoga je u tom slučaju kod pacijenata sa sumnjom na MODY nakon nekoliko tjedana potrebno ponoviti testiranje hsCRP-a (83).

1.8.2.2. C-peptid

C-peptid se zajedno s inzulinom izlučuje iz beta-stanica gušterače, a obično se rabi za mjerenje ostatne funkcije beta-stanica (83). Kao rezultat autoimune destrukcije beta-stanica kod bolesnika sa ŠBT1 koncentracije C-peptida postupno opadaju, dok je kod bolesnika s MODY-jem očuvana endogena funkcija beta-stanica. Dugotrajna evolucija ostatne funkcije beta-stanica gušterače predstavlja važno obilježje koje omogućava razlikovanje ŠBT1 od MODY-ja. Kod bolesnika sa ŠBT1 do potpunog nedostatka inzulina dolazi nakon pet godina od postavljanja dijagnoze (86). S druge strane, kod MODY-ja ne dolazi do potpune destrukcije beta-stanica

gušterače te je očuvana ostatna endokrina funkcija gušterače pa mjerljive koncentracije serumskog C-peptida izvan razdoblja „medenog mjeseca" mogu ukazivati na dijagnozu MODY-ja. Nasuprot tome, kod ŠBT2 inzulinska rezistencija povezana s pretilošću može rezultirati povišenim koncentracijama inzulina i C-peptida (87).

1.8.2.3. Protutijela na beta-stanice gušterače

ŠBT1 je karakterizirana prisutnošću protutijela na stanice gušterače uključujući protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (GAD) te protutijela na tirozin fosfatazu (IA-2). Kod 85 – 90 % bolesnika za vrijeme postavljanja dijagnoze zabilježena je prisutnost jednoga ili više protutijela na otočiće gušterače (1). Kod pacijenata sa sumnjom na MODY u dijagnostičkim se smjernicama preporuča testiranje onih koji su negativni na protutijela (9). Međutim, u istraživanju u Velikoj Britaniji autori su opisali da je kod bolesnika s MODY-jem učestalost pozitivnih protutijela GAD i IA2 manja od 1 % (83), dok su autori u Njemačkoj u pedijatrijskoj skupini ispitanika izvijestili o prisutnosti protutijela na stanice gušterače kod čak 17 % bolesnika s utvrđenim mutacijama kod MODY-ja (88). U istraživanju u Švedskoj kod 4,8 % bolesnika zabilježena je prisutnost protutijela GAD (89). Navedeni rezultati istraživanja ukazuju na to da kod pacijenata kod kojih postoje izraženi klinički simptomi koji upućuju na MODY prisutnost protutijela na stanice gušterače ne bi trebala spriječiti mogućnost genetskog testiranja (83).

1.8.3. Važnost postavljanja ispravne dijagnoze MODY-ja i terapijski pristup

Kod bolesnika s podtipom GCK-MODY kod kojih je prvotno bila postavljena dijagnoza ŠBT1 ili ŠBT2 te su nepotrebno kao terapiju primali oralne antiglikemike ili inzulin može se prekinuti s primjenom terapije uz dobru kontrolu glikemije (45). Bolesnike je potrebno upoznati sa stabilnošću hiperglikemije te niskim rizikom od mogućih vaskularnih komplikacija. S obzirom na samu dijagnozu, nije potrebno strogo praćenje bolesti kao kod drugih oblika šećerne bolesti (90). Preporučeno je učiniti probir u obitelji određivanjem koncentracije glukoze natašte i koncentracije

glikiranog hemoglobina (HbA1c). Postavljanje te dijagnoze vrlo je korisno kod žena u reproduktivnoj dobi (23).

Postavljanje točne dijagnoze kod bolesnika s podtipom HNF1A-MODY i HNF4A-MODY može omogućiti primjenu terapije sulfonilurejom umjesto korištene inzulinske terapije čak i ako je dijagnoza šećerne bolesti postavljena prije mnogo vremena (92). Međutim, unatoč postavljenoj dijagnozi MODY-ja zbog progresije bolesti potrebne su redovite kontrole tih bolesnika znajući da tijekom vremena dolazi do smanjenja u sekreciji inzulina što zahtjeva uvođenje inzulinske terapije kod otprilike 50 % bolesnika (14). U obiteljima bolesnika kod kojih je prethodno potvrđena mutacija preporučeno je obavezno učiniti molekularno-genetičku analizu gena *HNF1A* i *HNF4A* kako bi se spriječio nastanak komplikacija bolesti te kako bi se omogućilo prepoznavanje asimptomatskih hiperglikemija za vrijeme trudnoće. Kod asimptomatskih nositelja mutacije u genu *HNF1A* potrebno je redovito praćenje bolesti s naglaskom na regulaciju tjelesne mase jer je dokazano da je pretilost uzrok ranoga početka bolesti (93). Također, važno je praćenje bolesnika s utvrđenim mutacijama u genima *ABCC8* i *KCNJ11* jer je poznato da se kod bolesnika koji su imali prolazni oblik neonatalog dijabetesa tijekom života može razviti šećerna bolest (94). Nositeljima tih mutacija koji su zbog dijagnoze neonatalnog dijabetesa od rođenja liječeni inzulinskom terapijom omogućava se u odrasloj dobi učinkovit prijelaz na terapiju sulfonilurejom (95).

S obzirom na očekivane komplikacije kod bolesnika s podtipom HNF1B-MODY preporučene su redovite kontrole zbog oštećenja ostalih organa koja se pogoršavaju s vremenom s naglaskom na egzokrinu funkciju gušterače i bubrega. Kod tih bolesnika liječenje započinje terapijom sulfonilurejom ili repaglinidom što u početku omogućava dobru kontrolu glikemije, ali kasnije zbog progresije bolesti dolazi do smanjenja sekrecije inzulina i pojave bubrežne bolesti što je indikacija za uvođenje inzulinske terapije kod većine bolesnika (96).

Ispravna molekularna dijagnoza od izuzetne je važnosti za bolesnike jer može pomoći u odabiru najprikladnijeg oblika liječenja, omogućiti prognozu tijeka bolesti, ukazati na postojanje pridruženih malformacija i omogućiti genetsko savjetovanje oboljelih i članova obitelji. Također, bit će omogućena brza i pravovremena identifikacija ostalih članova obitelji što bi omogućilo bolje praćenje pojave, a zatim i tretmana bolesti (97).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja utvrditi učestalost i vrstu mutacija u genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* kod ispitanika s dijagnozom šećerne bolesti upućenih na dijagnostičku obradu u Klinički bolnički centar Zagreb te se ciljanim molekularnim ispitivanjem očekuje otkrivanje novih, dosad nezabilježenih mutacija. Drugi je cilj istražiti povezanost pojedinih mutacija i/ili gena s karakterističnim fenotipskim profilom bolesti.

Hipoteza istraživanja pretpostavlja sličnu prevalenciju mutacija u pojedinim genima koji su odgovorni za razvoj MODY-ja u Hrvatskoj i drugim europskim zemljama te vjerojatnost otkrivanja novih neopisanih mutacija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 105 ispitanika, 46 (44 %) muškaraca i 59 (56 %) žena koji su u razdoblju od veljače 2019. do kolovoza 2021. upućeni na molekularno-genetičku analizu nakon što im je postavljena klinička dijagnoza šećerne bolesti te su zadovoljili ulazne kriterije istraživanja navedene u kliničkim upitnicima. Nakon što su zadovoljeni svi ulazni kriteriji koji ukazuju na dijagnozu MODY-ja, ispitanici su upućeni na molekularno-genetičku analizu u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku. Ulazni kriteriji temeljili su se na međunarodnim smjernicama prema protokolu Centra za genomiku, Exeter, Velika Britanija (9). Svrha upitnika bila je prikupiti podatke o sljedećim parametrima: spol, dob, dob pri postavljanju dijagnoze, indeks tjelesne mase (ITM), obiteljska anamneza šećerne i bubrežnih bolesti, profil GUK-a, OGTT, HbA1c, C-peptid, inzulin, protutijela na stanice gušterače i vrstu terapije (dijeta, oralni hipoglikemici ili inzulin).

Ulazni kriteriji istraživanja obuhvatili su sljedeće kriterije:

- dob iznad 18 godina
- nastupanje bolesti prije 45. godine života
- očuvana endogena sekrecija inzulina (C-peptid ≥0,2 nmol/L)
- odsutnost protutijela na beta-stanice gušterače – negativan nalaz ICA (engl. *Islet Cell Antibody*), GAD (engl. *Glutamic Acid Decarboxylase*) i IA-2 (engl. *Islet Antigen-2*) protutijela.

Kod bolesnika kod kojih su identificirane mutacije uvršteni su u istraživanje i svi dostupni članovi obitelji u svrhu praćenja kosegregacije utvrđenih mutacija s MODY-jem. Za sudjelovanje u istraživanju svi su ispitanici potpisali informirani pristanak. Istraživanje je izvršeno prema svim etičkim normama sukladno Zakonu o zdravstvenoj zaštiti (NN 147/2020) i Zakonu o zaštiti prava pacijenata (NN 37/2008), a uz suglasnost Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb (ur. broj: 02/21-JG).

Za izdvajanje DNA korišten je uzorak periferne venske krvi uzet u spremnik s antikoagulansom K_3EDTA (Greiner Bio-One, Austrija).

Uzorci DNA ispitanika analizirani su metodom sekvenciranja po Sangeru i to sljedećim redoslijedom: *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*.

3.2. Materijali

3.2.1. Reagensi za sekvenciranje gena *HNF1A, HNF4A i HNF1B*

Kodirajuće regije gena *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* umnožene su lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) pomoću uređaja za PCR (GeneAmp 9700, Applied Biosystems, SAD). Za pripremu smjese za PCR korištena je sterilna destilirana voda i smjesa reagenasa JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix (Sigma-Aldrich, SAD) koja se sastoji od pufera, deoksinukleotida (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i Taq DNA polimeraze. Početnice koje su korištene za umnažanje svih egzona u kodirajućoj regiji gena *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje kodirajućih regija u genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* (Početnice i protokoli dobiveni ljubažnošću Ellard S, Centar za genomiku, Exeter, UK).

Gen	Egzon	Početnica (smjer 5'-3')	
HNF1A LRG_522t1	Promotor	F	GGGTGCAAGGAGTTTGGTTT
		R	GGCCCCTCTAGGCTCTCC
	1	F	TGGGCTCCATAACTGCTTTC
		R	TCCCACTGACTTCCTTTCC
	2	F	GCATGTGTGCTGTGTGTTTG
		R	AAGCCAATATCAGGAGTTCTCG
	3	F	ACTGTCAATTGCCCAAGGTC
		R	GAATGGAATGGAACCAAACTG
	4	F	TGGAGTTTGAAGTGCTGAGG
		R	GCCAAGGAAAGATGAGGTTG
	5	F	TGTAAGGAAAACCCAACCTCA
		R	AGTGGCTCTTCCAGCTCCT

	6	F	AAGTCACCGCCTGCCTCT
		R	GCCAACCTCTATCATCATCTCC
	7	F	ACAAGAGGAGCTGGAGTTGG
		R	AGACCTGGGGGAGCAGAG
	8	F	ACCAAGCAGGTAAGGTCCAG
		R	GTGACGGACAGCAACAGAAG
	9	F	GTACCCCTAGGGACAGGCAGG
		R	ACCCCCCAAGCAGGCAGTACA
	10	F	TCCCATCGCAGGCCATAGCTC
		R	CCGTCTGCAGCTGGCTCAGTT
HNF4A LRG_483t1	Promotor	F	TCCCATCGCAGGCCATAGCTC
		R	CCGTCTGCAGCTGGCTCAGTT
	1	F	GGGTGCAAGGAGTTTGGTTT
		R	GGCCCCTCTAGGCTCTCC
	2	F	TGGGCTCCATAACTGCTTTC
		R	TCCCACTGACTTCCTTTCC
	3	F	GCATGTGTGCTGTGTGTTTG
		R	AAGCCAATATCAGGAGTTCTCG
	4	F	ACTGTCAATTGCCCAAGGTC
		R	GAATGGAATGGAACCAAACTG
	5	F	TGGAGTTTGAAGTGCTGAGG
		R	GCCAAGGAAAGATGAGGTTG
	6	F	TGTAAGGAAAACCCAACCTCA
		R	AGTGGCTCTTCCAGCTCCT
	7	F	AAGTCACCGCCTGCCTCT
		R	GCCAACCTCTATCATCATCTCC
	8	F	ACAAGAGGAGCTGGAGTTGG
		R	AGACCTGGGGGAGCAGAG
	9	F	ACCAAGCAGGTAAGGTCCAG
		R	GTGACGGACAGCAACAGAAG
	10	F	GTACCCCTAGGGACAGGCAGG
		R	ACCCCCCAAGCAGGCAGTACA
	1	F	CTGGATTTGGGGTTTGCTT
		R	CGGGGGACTTCTCTGGTG
	2	F	TTTTGGCCTCATGTCTACCC
		R	GCCACCTTCCTCATATCTGC
	3	F	CATCTCCAGCTCCACATGC

HNF1B NM_000458.4		R	GAGGGTTCCTGGGTCTGTG
	4	F	ACTCCCAACCAAGACTGCTG
		R	GATCCGTGGCAAGAACCA
	5	F	CCTCGTGGCGCTTACATTC
		R	CTGGACAGCCCTCATTTTCC
	6	F	TAGTCATGCCAAGGAATCG
		R	GAGTTTGAAGGAGACCTACAG
	7	F	GGTGACTGGGACATTGAGC
		R	ACTTCCGAGAAAGTTCAGACC
	8	F	CTCACAGCCAAGCATCCAC
		R	TGTCATCCAGTCTCCAGCAA
	9	F	TTCAGGATTCAGGTCAGCAAG
		R	AGGTCACTGGGCTTTTCCA

Za postupak elektroforeze korištena je agaroza (GellyPhor LE Agarose, Euroclone, Italija) te fluorescentna boja GelRed (Olerup SSP AB, Švedska), a dobiveni su rezultati vizualizirani i analizirani pomoću uređaja za vizualizaciju i dokumentaciju gelova (G:BOX CHEMI XRQ, Syngene, Velika Britanija).

Pročišćavanje umnoženih odsječaka reakcije PCR provedeno je upotrebom kompleta reagenasa (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, Njemačka).

Postupak sekvenciranja proveden je primjenom kompleta reagenasa BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, SAD) koji sadrži smjesu pufera za reakciju sekvenciranja, DNA polimerazu, neobilježene deoksinuklotide (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) te fluorescentno obilježene dideoksinukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP).

Nakon reakcije sekvenciranja obilježeni odsječci pročišćeni su pomoću kompleta reagenasa (NucleoSEQ, Macherey-Nagel, Njemačka).

3.3. Metode

3.3.1. Izdvajanje DNA

Izdvajanje ukupne genomske DNA provedeno je automatiziranom metodom izdvajanja na uređaju QIAcube (Qiagen, Njemačka) koristeći se pritom kompletom reagenasa QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiaqen, Njemačka). QIAcube robotska je radna stanica za automatizirano izdvajanje nukleinskih kiselina. Za postupak je izdvajanja korišten uzorak pune krvi volumena 200 μL uzet u spremnik s antikoagulansom K_3EDTA.

Uređaj QIAcube (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) robotska je radna stanica namijenjena za automatizirano izdvajanje nukleinskih kiselina iz raznih primarnih uzoraka (puna krv, plazma, kultura stanica i dr.). Izdvajanje se provodi pomoću standardnih kompleta reagensa QIAgen za izdvajanje nukleinskih kiselina na kolonicama (membrane sa silika-gelom). U ovom istraživanju za izdvajanje DNA korišten je uzorak pune krvi s antikoagulansom K_3EDTA, a postupak izdvajanja učinjen je pomoću komercijalnog kompleta reagenasa QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka), prema protokolu proizvođača (98). Lizirajući pufer vrši lizu stanica pri čemu pH i ionska jakost lizata onemogućuju vezanje interferirajućih tvari na membranu kolonice. Enzimskom reakcijom pomoću proteinaze K uklanjaju se stanični proteini i druge makromolekule koje bi mogle biti inhibitori reakcije PCR. Upotrebom apsolutnog etanola, DNA se iz liziranog uzorka adsorbira na membranu kolonice QIAamp. DNA, koja se vezala na membranu, pročišćava se dvostrukim ispiranjem s puferima te eluira s membrane pomoću pufera za eluciju. Dobiveni izolat DNA pohranjuje se na temperaturi od 4 °C.

3.3.2. Određivanje kvalitete i koncentracije DNA

Koncentracija izdvojene genomske DNA određena je mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru (NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, SAD) na valnoj duljini od 260 nm. Uzorak DNA nanosi se na elektrodu uređaja u količini od 1 μL. Prije mjerenja

apsorbancije potrebno je izmjeriti apsorbanciju pufera TE (10 mM Tris, 1 mM Na EDTA, pH 9,0) koji ima ulogu referentnog uzorka, odnosno slijepe probe jer se na temelju tih vrijednosti mjere svi drugi uzorci. Također, apsorbancija je mjerena i na valnoj duljini od 280 nm. Iz omjera očitanja (260/280 nm) procijenjena je čistoća izdvojene DNA. Vrijednosti omjera između 1,8 do 2,0 pokazatelj su zadovoljavajuće kvalitete i visoke čistoće izdvojene DNA.

3.3.3. Sekvenciranje kodirajuće regije gena *HNF1A, HNF4A I HNF1B*

3.3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za umnažanje željenih odsječaka DNA korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (PCR). Reakcijska smjesa sastoji se od sterilne destilirane vode, jednog para oligonukleotidnih početnica koje su komplementarne sa slijedom DNA koji omeđuje svaki egzon, smjese JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix i genomske DNA (Tablica 6).

Reakcija PCR započinje s inicijalnom denaturacijom gdje dolazi do razdvajanja komplementarnh lanaca DNA te do aktivacije DNA polimeraze. Nakon inicijalne denaturacije slijede tri koraka koja se naizmjenično ponavljaju: denaturacija, vezanje početnica te korak produljivanja u kojem dolazi do sinteze novih lanaca. Temperatura vezanja ovisi o sastavu korištenih početnica (Tablica 7). U završnom koraku reakcije dolazi do konačne sinteze svih preostalih jednolančanih DNA. Nakon završene reakcije umnoženi je odsječak pohranjen na 4 °C.

Tablica 6. Reakcijska smjesa (25 μL).

Sastojak	Volumen (μL)	Koncentracija
Sterilna destilirana voda	10,5	
JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix	12,5	1x
Početnica F (10 μM)	0,5	0,2 μM
Početnica R (10 μM)	0,5	0,2 μM
DNA	1,0	100 ng

Tablica 7. Temperatura vezanja početnica i očekivane veličine odsječaka DNA.

Gen	Egzon	Temperatura vezanja (°C)	Veličina odsječaka (pb)
HNF1A LRG_522t1	Prm	60	550
	1	57	524
	2	58	588
	3	58	501
	4	58	540
	5	58	320
	6	60	430
	7	65	516
	8	56	513
	9	65	331
	10	65	328
HNF4A LRG_483t1	Prm/1	60	592
	2	60	380
	3	58	309
	4	60	250
	5	59	435
	6	58	333
	7	59	280
	8	59	467
	9	58	377
	10	58	434
HNF1B NM_000458.4	1	58	592
	2	57	534
	3	57	472
	4	58	415
	5	59	535
	6	52	361
	7	55	414
	8	57	631
	9	57	430

3.3.3.2. Provjera rezultata reakcije PCR

Za provjeru rezultata umnažanja lančanom reakcijom polimerazom korištena je metoda horizontalne agarozne gel-elektroforeze. Priprema agaroznog gela učinjena je otapanjem 1 g agaroze (Agaroza DNA Grade, Invitrogen, SAD) u 50 mL 1X TBE pufera (225 mM Tris, 225 mM H_3BO_3, 5 mM Na EDTA, pH 8,3) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Nakon što se agaroza potpuno otopi, agarozni se gel ohladi te se u njega dodaje fluorescentna boja GelRed (Olerup SSP AB, Švedska) koja na UV-transiluminatoru omogućava vizualizaciju DNA. Ohlađena se smjesa izlijeva u kalup za pripremanje gelova na koji je umetnut češljić za jažice te je za polimerizaciju gela potrebno pričekati oko 30 minuta. Nakon polimeriziracije gel se prenosi se u kadicu s puferom 1X TBE. Zatim se u jažice gela nanose umnoženi odsječci DNA. Elektroforeza se provodi u trajanju od 30 minuta upotrebom pufera 1X TBE uz napon od 110 V i jakost struje od 400 mA. Nakon elektroforeze odsječci se DNA vizualiziraju u uređaju za vizualizaciju i dokumentaciju gelova G:BOX CHEMI XRQ (SynGene, Velika Britanija).

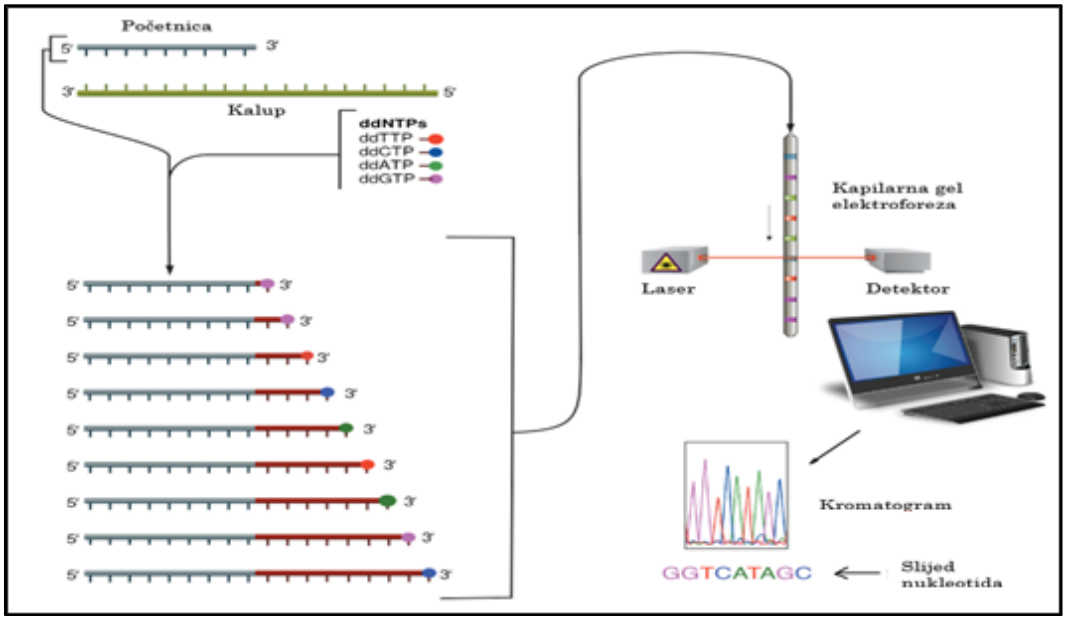
3.3.3.3. Pročišćavanje umnoženih odsječaka reakcije PCR

Nakon provjere rezultata iz umnoženih odsječaka potrebno je ukloniti suvišak nevezanih početnica i nukleotida. Pročišćavanje je učinjeno primjenom kompleta reagenasa PCR NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Njemačka) u kojemu se nalaze kolonice s filterom te reagensi za pročišćavanje, a cijeli se postupak izvodi na mikrocentrifugi (Biofuge Pico Thermo Scientific, Heraeus, Njemačka). Svi koraci provedeni su na sobnoj temperaturi centrifugiranjem pri brzini od 17 900 x g. U jedan volumen uzorka dodaju se dva volumena pufera NTI. U epruvetu volumena 2 mL umetne se kolonica NucleoSpin na koju se nanosi uzorak i centrifugira kako bi došlo do vezanja DNA za filter kolonice. Za postupak ispiranja DNA potrebno je u kolonicu dodati pufer NT3 i centrifugirati. Nakon toga potrebno je ponovno centrifugirati kolonicu kako bi se uklonili svi ostatci pufera za ispiranje nakon čega se kolonica prenese u novu epruvetu volumena 2 mL. U posljednjem koraku potrebno je u središte kolonice dodati pufer za eluciju kako bi eluirali

DNA s filtera, inkubirati jednu minutu te ponoviti centrifugiranje u trajanju od jedne minute. Nakon cijelog postupka pročišćeni se odsječak pohrani na 4 °C u epruvetu volumena 0,5 mL.

3.3.3.4. Sekvenciranje po Sangeru

Obilježavanje pročišćenih odsječaka provedeno je primjenom kompleta reagenasa AB BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, SAD) koji se sastoji od neobilježenih deoksinukleotida (dNTP), fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida (ddNTP) i polimeraze. Svaki ddNTP ima pričvršćen fluorescentni biljeg različite fluorescencije. Za vrijeme reakcije sekvenciranja dolazi do nasumična ugrađivanja dNTP i fluorescentno obilježenih ddNTP čime dolazi do sinteze novoga lanca. Vezanjem fluorescentno obilježenih ddNTP dolazi do prekida u sintezi komplementarnog lanca DNA. Nakon završetka reakcije sekvenciranja dobit ćemo sintetizirane lance različitih duljina koji su na svojem 3'-kraju obilježeni jednim fluorescentnim ddNTP-om (Slika 8). Svaki uzorak analizira se u dvjema reakcijama uz upotrebu samo jedne početnice u reakciji, F (engl. *forward*) ili R (engl. *reverse*), od para početnica koje su korištene prilikom umnažanja željenog odsječka.



Slika 8. Sekvenciranje po Sangeru (Preuzeto i prilagođeno: https://www.cleanpng.com/png-sanger-sequencing-dna-sequencing-dideoxynucleotide-1861376/). Pristupljeno: 25.02.2022.

Reakcijska smjesa korištena za reakciju sekvenciranja sastoji se od sterilne destilirane vode (ddH_2O), pročišćenog odsječka PCR, pufera, početnica (F ili R) i smjese AB BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Tablica 8). Uvjeti za izvođenje reakcije sekvenciranja na uređaju za PCR opisani su u tablici 9.

Tablica 8. Reakcijska smjesa za sekvenciranje.

Sastojak	Volumen (µL)	Koncentracija
Sterilna destilirana voda	6,2	
Pufer	1	0,5x
AB BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit	1	1x
Početnica (F ili R)	0,8	0,26 µM
Pročišćeni odsječak reakcije PCR	1	3-10 ng

Tablica 9. Uvjeti za izvođenje reakcije sekvenciranja na uređaju za PCR.

Program	Temperatura (°C)	Trajanje	Broj Ciklusa
Inicijalna denaturacija	96	2 min	1
Denaturacija	96	10 sec	25
Vezanje početnica	50	5 sec	
Elongacija	60	4 min	
Hlađenje	4	∞	-

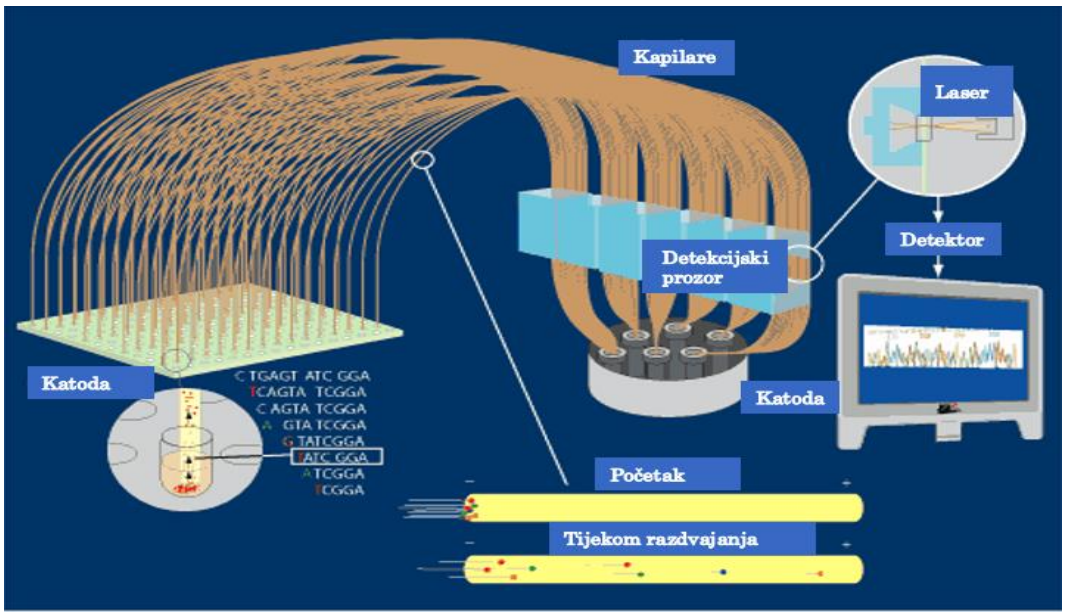
3.3.3.5. Pročišćavanje obilježenih odsječaka reakcije sekvenciranja

Postupak pročišćavanja obilježenih odsječaka reakcije sekvenciranja izvodi se primjenom kompleta reagenasa NucleoSEQ (Macherey-Nagel, Njemačka). Nakon reakcije sekvenciranja pročišćavanjem se iz uzorka uklanja suvišak nesparenih obilježenih dideoksinukleotida koji su korišteni za obilježavanje odsječaka reakcije PCR. Svi opisani koraci provode se na sobnoj temperaturi uz brzinu centrifugiranja od 750 x g. U prvom koraku potrebno je resuspendirati gel dodavanjem destilirane vode u kolonicu miješanjem pomoću vrtložne miješalice (V-1 Plus, Personal Vortex, Biosan, Latvija). S kolonice se ukloni čep te se ona umetne u kolekcijsku epruvetu (2 mL). Centrifugiranjem u trajanju od dviju minuta uklanja se suvišak vode iz gela koja se odvaja u kolekcijsku epruvetu. Potom se kolonica s hidriranim gelom prenese u čistu epruvetu (2 mL) nakon čega se uzorak reakcije sekvenciranja nanosi na sredinu gela unutar kolonice. Kolonica se ponovno centrifugira u trajanju od četiriju minuta. Dobiveni eluat s obilježenim i pročišćenim odsječcima reakcije PCR rabi se za elektroforezu na uređaju za kapilarnu elektroforezu.

3.3.3.6. Kapilarna elektroforeza obilježenih odsječaka

Nakon reakcije sekvenciranja obilježeni odsječci DNA razdvajaju se pod utjecajem električnog polja na osnovu njihove veličine i naboja primjenom metode kapilarne gel-elektroforeze koja je provedena primjenom uređaja AB Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, SAD). Pročišćene obilježene odsječke u količini od 10 µL prenosimo u bunariće pločica u koje smo prethodno dodali po 10 µL formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, SAD). Pločice se prekriju gumenom septom te se centrifugiraju i smjeste na uređaj za kapilarnu elektroforezu. Tijekom elektroforeze fluorescentno obilježeni odsječci reakcije sekvenciranja elektrokinetički se ubrizgavaju u kapilaru ispunjenu polimerom. Pod visokim naponom negativno nabijeni odsječci DNA putuju kroz polimer u kapilarama prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anodi). Neposredno prije dolaska na pozitivnu elektrodu fluorescentno obilježeni odsječci DNA, odvojeni prema veličini, prolaze kroz lasersku zraku. Laserska zraka aktivira fluorescentno obilježene nukleotide nakon čega optički uređaj za detekciju – CCD kamera (engl. *Charge* –

Coupled Device) bilježi fluorescenciju. Računalni program Data Collection Software (Applied Biosystems, SAD) pretvara fluorescentni signal u digitalne podatke (elektroferogram) što se prikazuje kao slijed nukleotida označenih različitim bojama (Slika 9). Dobiveni rezultati analizirani su primjenom računalnih programa Sequencing Analysis v2.5 (Applied Biosystems, SAD) i SeqScape v2.5 (Applied Biosystems, SAD). Ako se u jednoj reakciji pronađe promjena u slijedu DNA, potrebno ju je potvrditi i u drugoj reakciji. Patogenost svih pronađenih varijanti provjerena je u dostupnim referentnim bazama podataka za mutacije povezane s monogenskim dijabetesom: Leiden Open Variation Database (https://databases.lovd.nl) (99), The Human Gene Mutation Database (https://www.hgmd.org) (100) i ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) (101). Za procjenu patogenosti mutacija upitna značaja korišteni su bioinformatički programi PolyPhen-2 (https://genetics.bwh.harvard.edu/pph2) (102), SIFT (https://sift.bii.astar.edu.sg) (103) i Provean (https://provean.jcvi.org) (104).



Slika 9. Princip kapilarne elektroforeze (Preuzeto i prilagođeno: https://jgi.doe.gov/archived-educator-resources/sanger-sequencing-archive/how-sanger-sequencing-is-done/step-10-capillary-sequencing/). Pristupljeno: 28.02.2022.

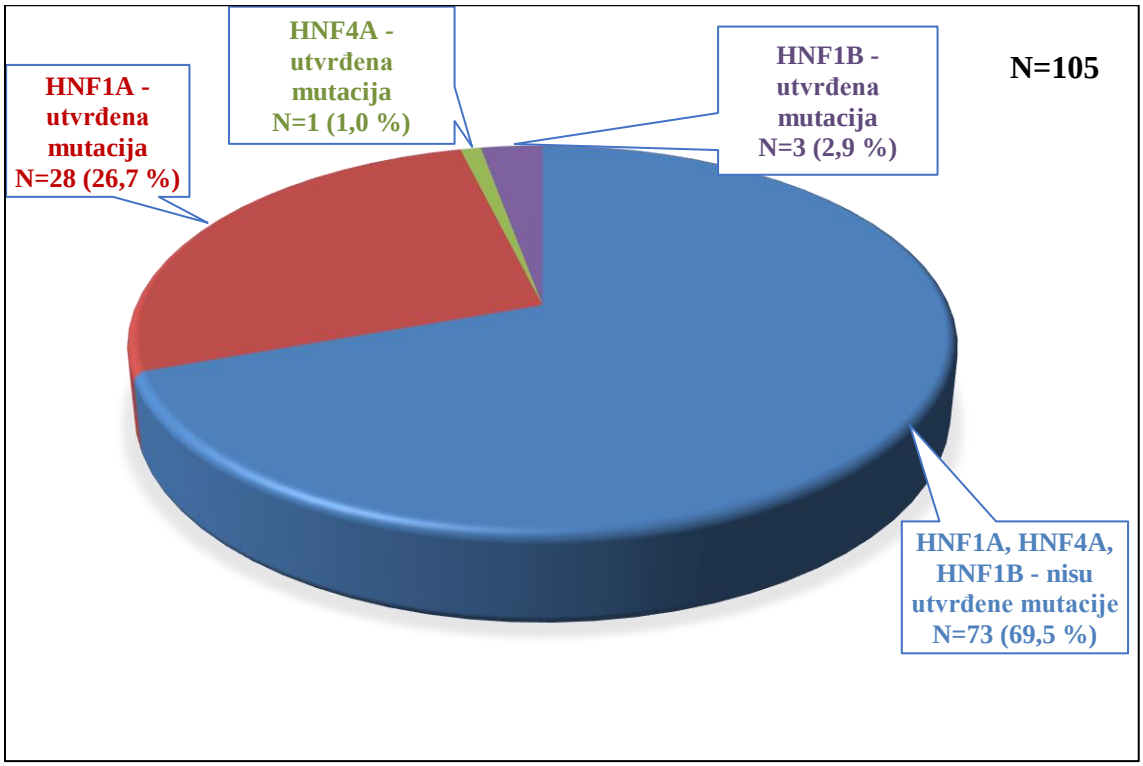
3.3.4. Statističke metode

Rezultati istraživanja prikazani su u obliku tabličnih i grafičkih prikaza. Za analizu dobivenih rezultata korištena je deskriptivna statistika s prikazima po skupinama za sve kvalitativne i kvantitativne varijable. Razlike u varijablama prema skupinama, nakon testiranja normalnosti distribucije, analizirane se primjenom t-testa. Kontinuirane numeričke varijable s normalnom distribucijom iskazane su kao srednja vrijednost i standardna devijacija, dok su varijable s neparametarskom distribucijom iskazane kao medijan i interkvartilni raspon. Kod prikaza razlika kod kategoričkih varijabli primijenjen je hi-kvadrat test. Rezultati su dodatno prikazani primjenom kutijastih dijagrama (engl. *box plot ili box-and-whisker plot*) kao jednom od metoda deskriptivne statistike. Sve dobivene *P*-vrijednosti koje su bile manje od 0,05 smatrane su kao statistički značajne. Statistička je analiza učinjena pomoću računalnog programa IBM SPSS Statistics (IBM, USA).

4. REZULTATI

4.1. Raspodjela ispitanika prema rezultatima genetske analize

U istraživanju je analizirano 105 ispitanika s dijagnozom šećerne bolesti od čega je bilo 46 muškaraca (44 %) i 59 žena (56 %). Od ukupnog broja u 28 ispitanika (26,7 %) iz 18 obitelji utvrđene su mutacije u genu *HNF1A*, kod jednog ispitanika (1,0 %) u genu *HNF4A* te kod triju ispitanika (2,9 %) iz dvije obitelji u genu *HNF1B*. Kod 73 ispitanika (69,5 %) nisu utvrđene mutacije u genima *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B* (Slika 10).



Slika 10. Raspodjela prema rezultatima genetske analize.

4.2. Mutacije u hepatocitnim nuklearnim faktorima u Hrvatskoj

U genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* identificirano je 18 različitih mutacija (Tablica 10). U genu *HNF1A* identificirano je 15 mutacija, u genu *HNF4A* jedna mutacija te dvije mutacije u genu *HNF1B* (Slika 11). Prema vrsti mutacije najveći broj mutacija bile su mutacije krivog smisla (66,7 %), delecije (27,8 %) te insercija (5,5 %). Sve su identificirane mutacije bile u heterozigotnom obliku.

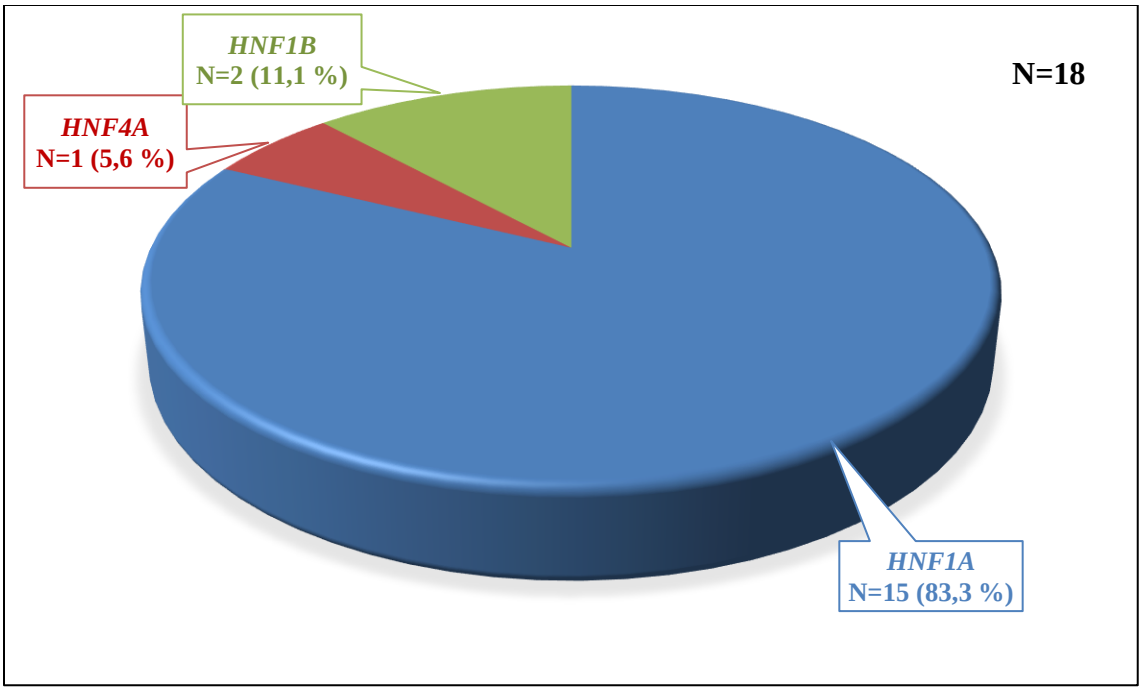
Tablica 10. Utvrđene mutacije kod ispitanika sa sumnjom na MODY u Kliničkome bolničkom centru Zagreb.

Redni broj	Gen	Egzon	Mutacija	Protein	Vrsta promjene	Literatura
1.	*HNF1A*	1	**c.66delC♦**	p.Ser22Arg*9	delecija	-
2.	*HNF1A*	2	c.347C>T	p.Ala116Val	mutacija promjene smisla	(28)
3.	*HNF1A*	3	**c.527-6_539del♦**	?	delecija	-
4.	*HNF1A*	3	c.607C>T	p.Arg203Cys	mutacija promjene smisla	(97)
5.	*HNF1A*	3	c.608G>A	p.Arg203His	mutacija promjene smisla	(105)
6.	*HNF1A*	3	**c.616_617del♦**	p.Trp206Gly*13	delecija	-
7.	*HNF1A*	4	c.824A>T	p.Glu275Val	mutacija promjene smisla	(106)
8.	*HNF1A*	4	c.824_826del	p.Glu275del	delecija	(48)
9.	*HNF1A*	4	c.751G>A	p.Ala251Thr	mutacija promjene smisla	(107)
10.	*HNF1A*	4	c.798C>G	p.Asn266Lys	mutacija promjene smisla	(108)

11.	*HNF1A*	4	c.862G>T	p.Gly288Trp	mutacija promjene smisla	(109)
12.	*HNF1A*	4	c.872dupC	p.Gly292Argfs*25	insercija	(107)
13.	*HNF1A*	6	c.1129delC	p.Leu377fs	delecija	(48)
14.	*HNF1A*	6	c.1135C>G	p.Pro379Ala	mutacija promjene smisla	(28)
15.	*HNF1A*	6	c.1136C>G	p.Pro379Arg	mutacija promjene smisla	(107)
16.	*HNF4A*	2	C.199C>T	p.Arg67Trp	mutacija promjene smisla	(107)
17.	*HNF1B*	4	c.1006C>G	p.His336Asp	mutacija promjene smisla	(107)
18.	*HNF1B*	7	c.1373T>G	p.Val458Gly	mutacija promjene smisla	(110)

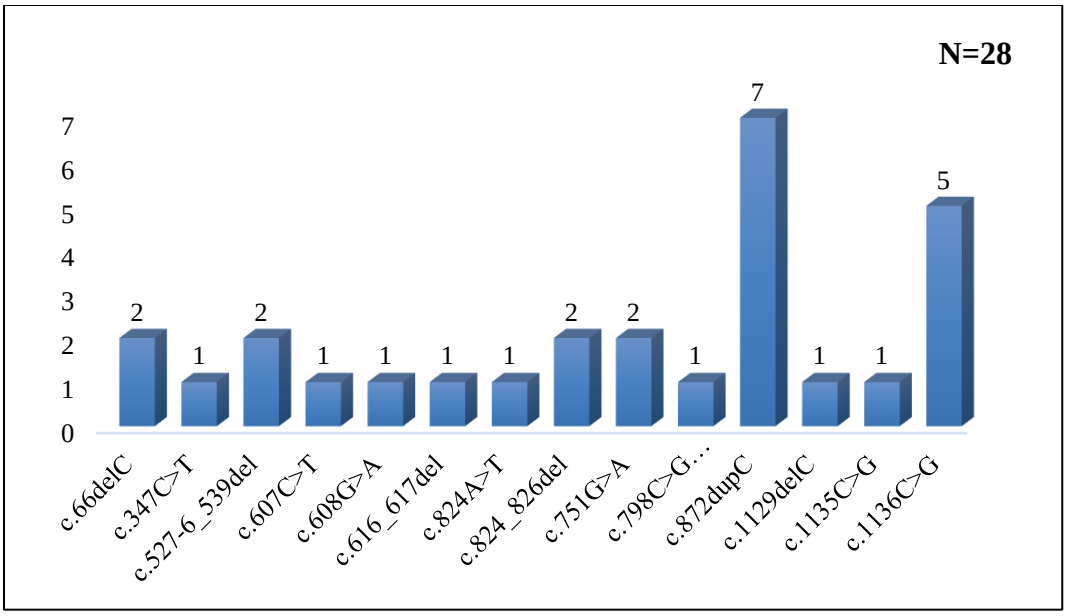
♦**novootkrivene mutacije**

*terminacijsko mjesto sinteze proteina

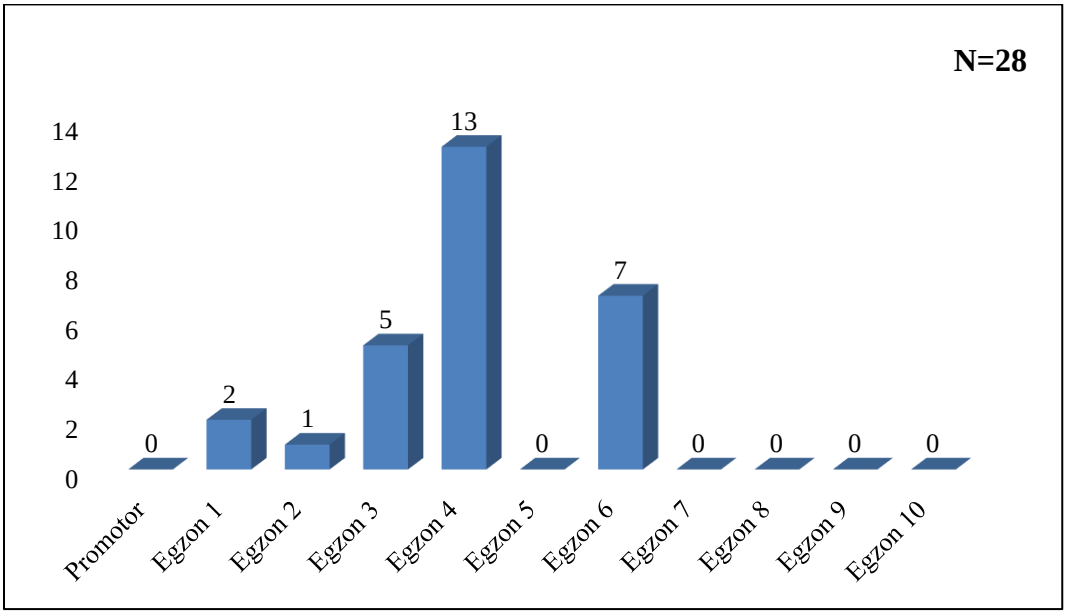


Slika 11. Raspodjela mutacija prema genima.

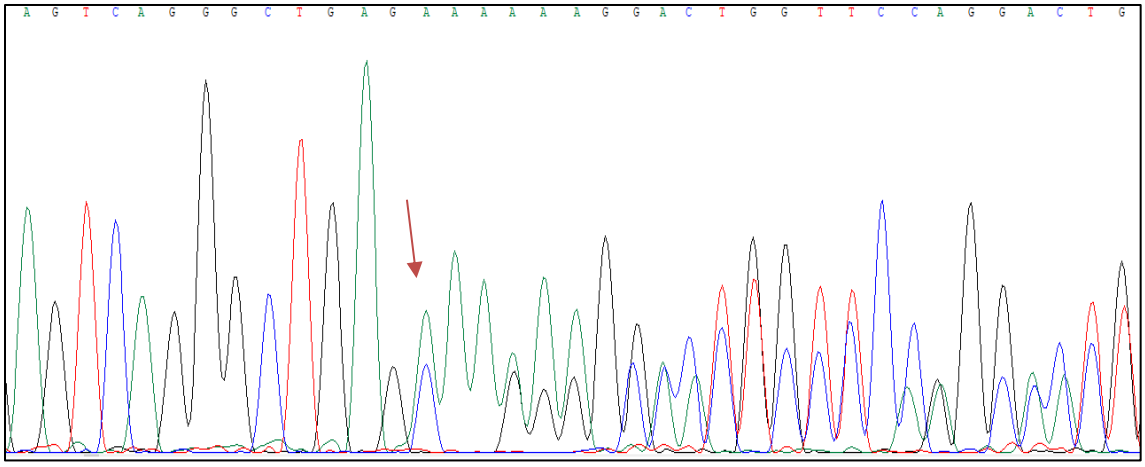
U genu *HNF1A* identificirane su mutacije kod 28 ispitanika (Slika 12). Najviše mutacija identificirano je u egzonu 4 (13), dok su ostale mutacije identificirane u egzonu 6 (7), egzonu 3 (5), egzonu 1 (2) te u egzonu 2 (1) (Slika 13). Identificirane su mutacije c.66delC, p.Ser22Arg*9 (kod dvaju ispitanika iz jedne obitelji) (Slika 14), c.347C>T, p.Ala116Val (kod jednog ispitanika), c.527-6_539del, p.? (kod dvaju ispitanika iz jedne obitelji) (Slika 15), c.607C>T, p.Arg203Cys (kod jednog ispitanika), c.608G>A, p.Arg203His (kod jednog ispitanika) (Slika 16), c.616_617del, p.Trp206Gly*13 (kod jednog ispitanika) (Slika 17), c.824A>T, p.Glu275Val (kod jednog ispitanika), c.824_826del, p.Glu275del (kod dvaju ispitanika iz jedne obitelji) (Slika 18), c.751G>A, p.Ala251Thr (kod dvaju ispitanika), c.798C>G, p.Asn266Lys i c.862G>T, p.Gly288Trp (kod jednog ispitanika), c.872dupC, p. Gly292Argfs*25 (kod sedam ispitanika iz triju obitelji) (Slika 19), c.1129delC, p.Leu377fs (kod jednog ispitanika) (Slika 20), C.1135C>G, p.Pro379Ala (kod jednog ispitanika), c.1136C>G, p.Pro379Arg (kod pet ispitanika iz dviju obitelji). Prema vrsti promjene devet ih je bilo mutacija promjene smisla, pet delecija i jedna insercija. Sve su identificirane mutacije do danas prijavljene i opisane u literaturi izuzevši tri mutacije koje se nalaze u egzonu 1, c.66delC, p.Ser22Arg*9 te egzonu 3, c.527-6_539del, p.? i c.616_617del, p.Trp206Gly*13.



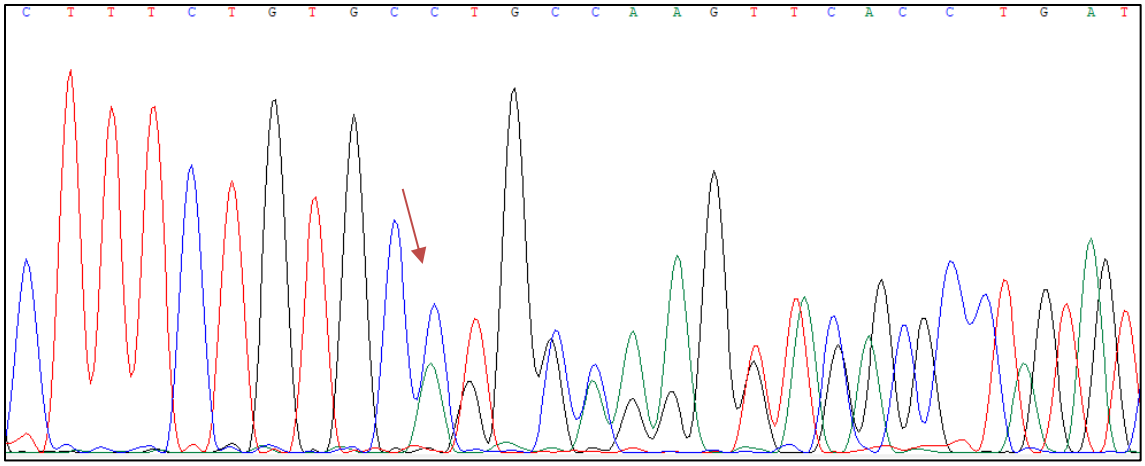
Slika 12. Broj ispitanika prema utvrđenim mutacijama u genu *HNF1A*.



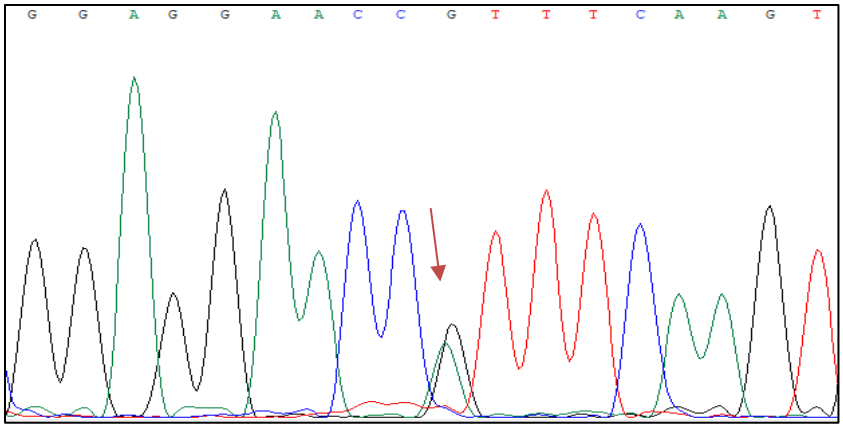
Slika 13. Raspodjela mutacija u genu *HNF1A*.



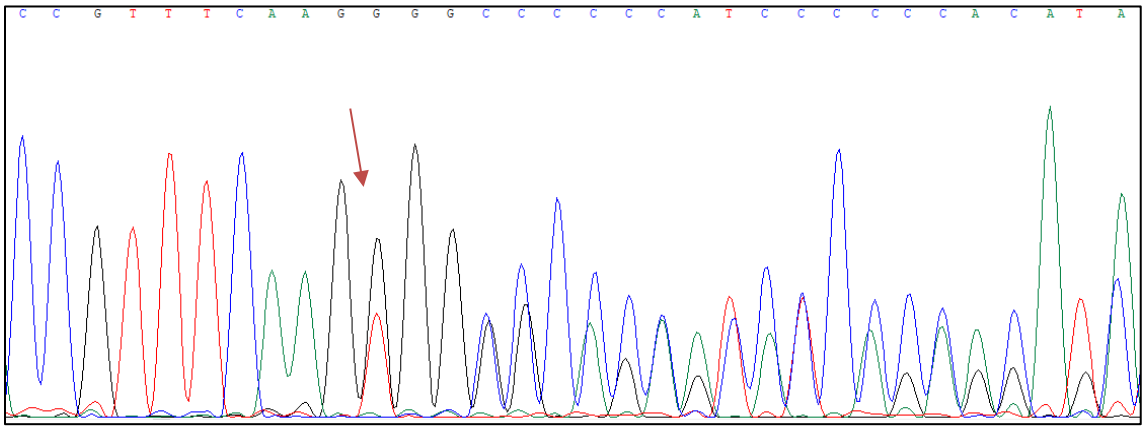
Slika 14. Delecija u heterozigotnom obliku, c.66delC, p.Ser22Arg*9 u egzonu 1, gena *HNF1A* (ispitanik ISP28).



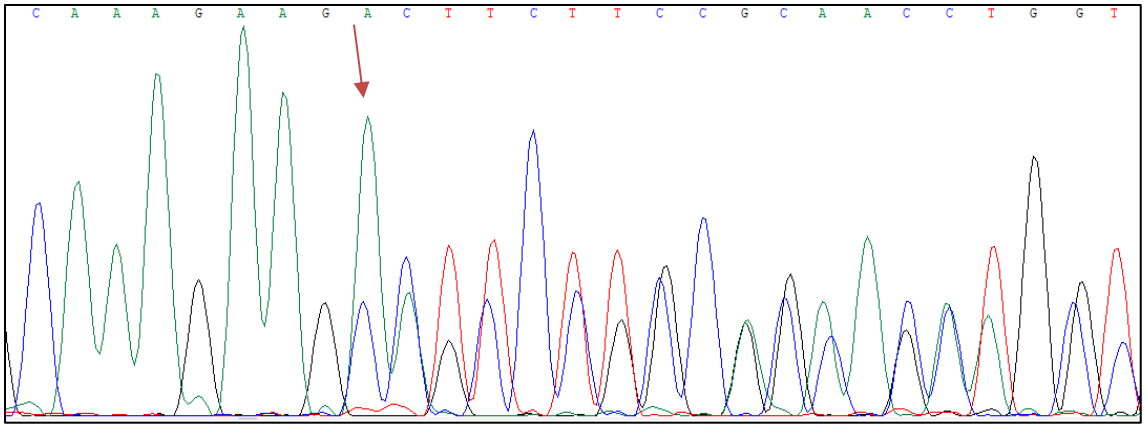
Slika 15. Delecija u heterozigotnom obliku, c.527-6_539del, p.? u egzonu 3, gena *HNF1A* (ispitanik ISP18).



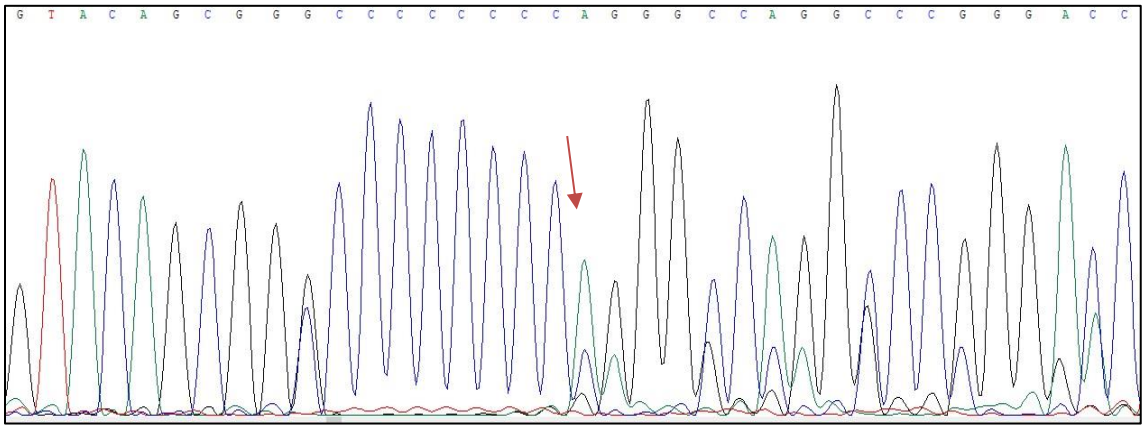
Slika 16. Mutacija promjene smisla u heterozigotnom obliku, c.608G>A, p.Arg203His u egzonu 3, gena *HNF1A* (ispitanik ISP2).



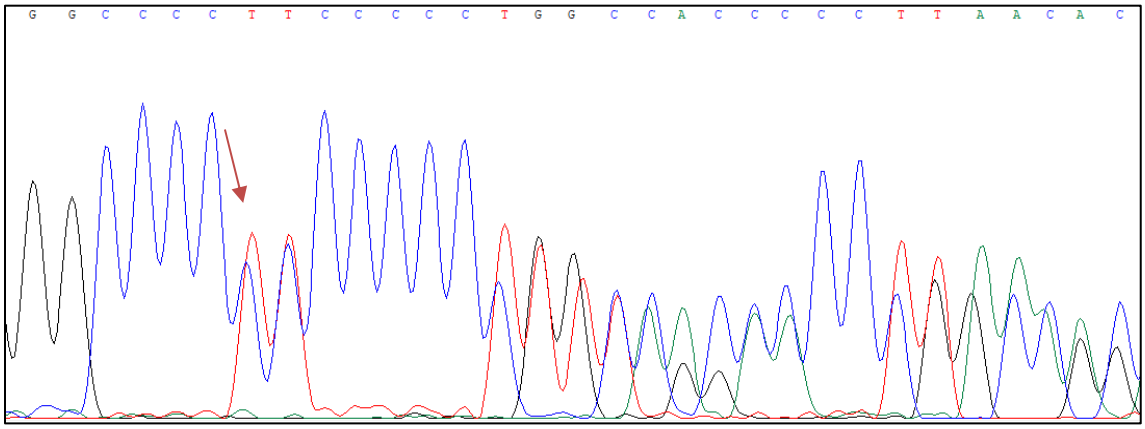
Slika 17. Delecija u heterozigotnom obliku, c.616_617del, p.Trp206Gly*13 u egzonu 3, gena *HNF1A* (ispitanik ISP17).



Slika 18. Delecija u heterozigotnom obliku, c.824_826del, p.Glu275del u egzonu 4, gena *HNF1A* (ispitanik ISP17).

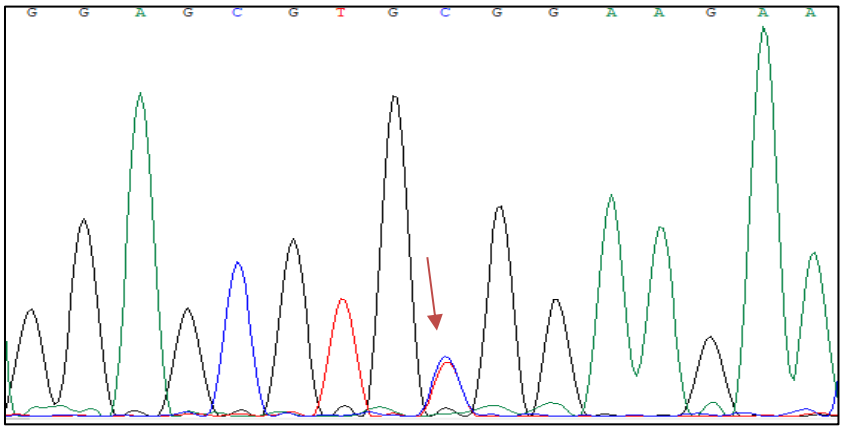


Slika 19. Insercija u heterozigotnom obliku, c.872dupC, p.Gly292Argfs*25 u egzonu 4, gen *HNF1A* (ispitanik ISP2).



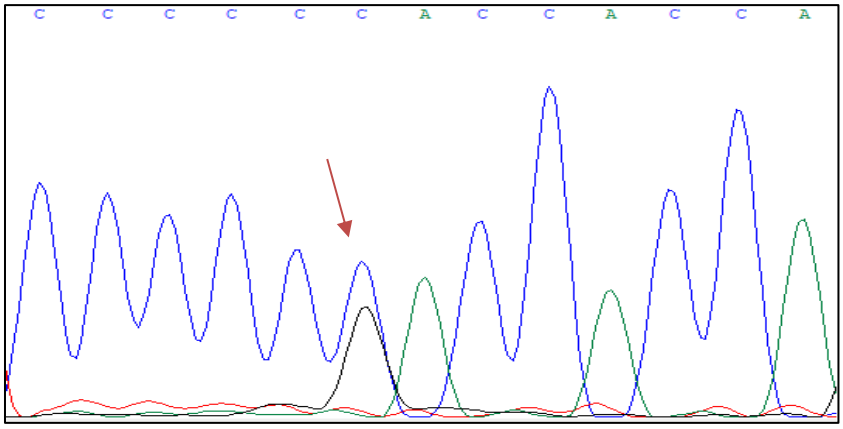
Slika 20. Delecija u heterozigotnom obliku, c.1129delC, p.Leu377fs u egzonu 6, gena *HNF1A* (ispitanik ISP24).

U genu *HNF4A* identificirana je jedna mutacija u egzonu 2, c.199C>T, p.Arg67Trp (kod jednog ispitanika) (Slika 21).

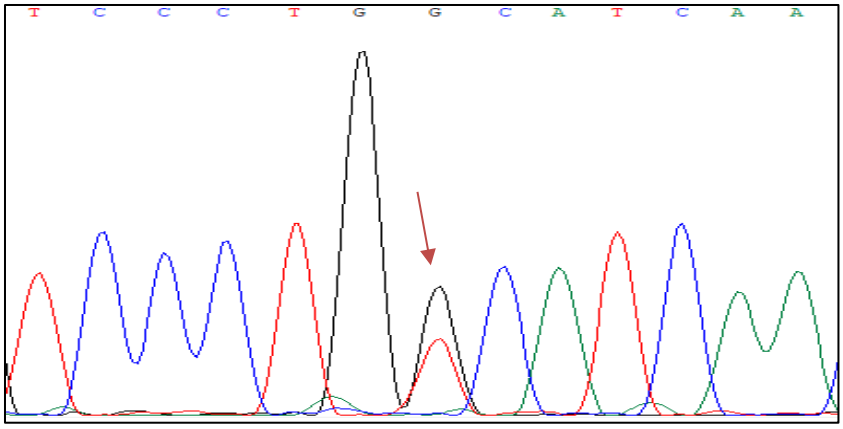


Slika 21. Mutacija promjene smisla u heterozigotnom obliku, C.199C>T, p.Arg67Trp u egzonu 2, gena *HNF4A* (ispitanik ISP29).

U genu *HNF1B* identificirane su mutacije u egzonima 4 i 7, c.1006C>G, p.His336Asp (kod dvaju ispitanika iz jedne obitelji) (Slika 22) te c.1373T>G, p.Val458Gly (kod jednog ispitanika) (Slika 23).



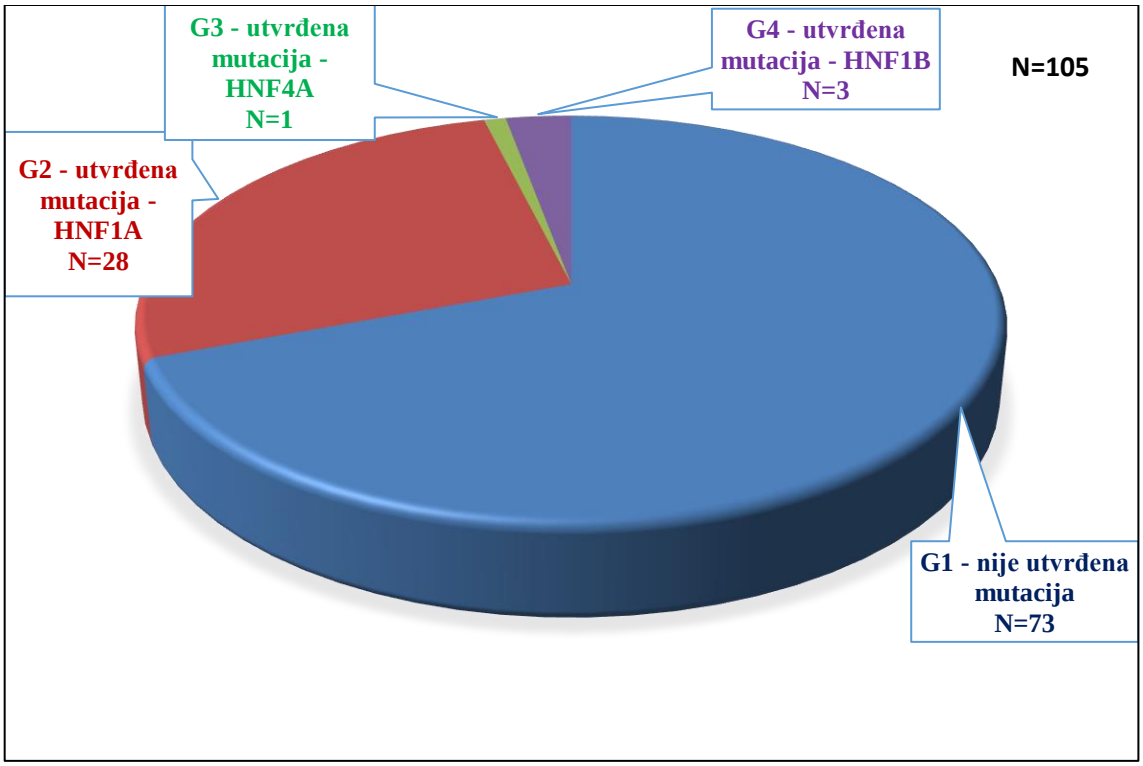
Slika 22. Mutacija promjene smisla u heterozigotnom obliku, c.1006C>G, p.His336Asp u egzonu 4, gena *HNF1B* (ispitanik ISP30)



Slika 23. Mutacija promjene smisla u heterozigotnom obliku, c.1373T>G, p.Val458Gly u egzonu 7, gena *HNF1B* (ispitanik ISP32).

4.3. Korelacija između genotipa i fenotipa kod bolesnika s MODY-jem

Nakon učinjene genetske analize ispitanici su prema genotipu raspodijeljeni u četirima skupinama: G1 – ispitanici kod kojih nije utvrđena mutacija u analiziranim genima (73 ispitanika iz 71 obitelji); G2 – ispitanici kod kojih je utvrđena mutacija u genu *HNF1A* (28 ispitanika iz 18 obitelji), G3 – ispitanici kod kojih je utvrđena mutacija u genu *HNF4A* (jedan ispitanik) i G4 – ispitanici kod kojih je utvrđena mutacija u genu *HNF1B* (3 ispitanika iz dviju obitelji) (Slika 24). Klinička obilježja ispitanika s utvrđenim mutacijama u genima *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B* prikazana su u tablici 11.



Slika 24. Raspodjela ispitanika prema genotipu u skupine (G1 – G4).

Tablica 11. Klinička obilježja ispitanika prema genotipu.

	Nije potvrđena dijagnoza MODY-ja	**Svi potvrđeni podtipovi MODY-ja**	**HNF1A-MODY**	**HNF4A-MODY**	**HNF1B-MODY**	***P*-vrijednost**
Broj ispitanika	73	32	28	1	3	-
Spol (% muškaraca)	35 (47,9 %)	11 (34,4 %)	7 (25 %)	1 (100 %)	3 (100 %)	0,222
Dob kod istraživanja (godine)	43,18±15,74	34,47±17,63	34,61±18,04	19,0±NaN	38,33±16,74	**0,014**
Dob kod nastupa dijabetesa (godine)	29,50±15,34	28,05±14,06	29,1±14,34	18,0±NaN	17,0±NaN	0,714

Trajanje dijabetesa (godine)	11,50±8,29	10,0±8,03	10,94±7,91	1,0±NaN	2,0±NaN	0,507
ITM ($kg/m^{2)}$	23,57±2,31	22,66±1,16	22,64±1,22	22,2±NaN	23,15±0,35	0,059
Glukoza natašte (mmol/L)	6,05±1,83	6,77±2,09	6,96±2,17	5,1±NaN	5,6±0,0	0,111
Inzulin (pmol/L)	46,35±24,35	29,30±18,72	26,13±15,78	74,0±NaN	40,2±25,17	**0,002**
HbA1c (%)	7,54±2,51	7,18±1,88	7,09±1,63	5,1±NaN	9,2±3,96	0,520
C-peptid (mmol/L)	0,80±1,63	0,49±0,23	0,47±0,2	0,19±NaN	0,88±0,11	0,355
Obiteljska anamneza	54	30	27	1	2	-
Terapija						-
DA	48 (65,8 %)	21 (65,6 %)	19 (67,9 %)	1 (100 %)	2 (66,7 %)	-
Oralni hipoglikemici	24 (50 %)	12 (57,1 %)	12 (63,1 %)	0	0	-
Inzulinska Terapija	21 (43,8 %)	8 (38,1 %)	6 (31,6 %)	1 (100 %)	2 (100 %)	-
Dijeta	3 (6,2 %)	1 (4,8 %)	1 (5,3 %)	0	0	-
NE	25 (34,2 %)	11 (34,4 %)	9 (32,1 %)	0	1 (33,3 %)	-

NaN – vrijednost koja nije definirana zbog ograničenog broja uzorka

Napomena: U tablici 11 su kontinuirane numeričke varijable s normalnom distribucijom izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, dok su varijable s neparametarskom distribucijom izražene kao medijan ± interkvartilni raspon. Vrijednosti kategoričkih varijabli izražene su kao postotci. Razlike u varijablama prema skupinama analizirane se primjenom t-testa, odnosno hi-kvadrat testa. Sve dobivene p-vrijednosti koje su bile <0,05 smatrane su kao statistički značajne (prikazano podebljano).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je dob kod istraživanja različito obilježje između ispitanika kod kojih nije utvrđena mutacija i ispitanika kod kojih je potvrđen neki od podtipova MODY-ja (*P*=0,014). Također, ispitanici s potvrđenom dijagnozom MODY-ja imaju niže koncentracije inzulina (*P*=0,002).

4.4. Statistička značajnost razlike među pojedinim skupinama

Statistička analiza pomoću hi-kvadrat testa učinjena je kako bi se prikazale značajnosti razlike među pojedinim skupinama ispitanika prema spolu (Tablica 12), dok je za prikaz značajnosti razlike prema dobi (Tablica 13) te ostalim korištenim parametrima (ITM, glukoza natašte, HbA1c, inzulin, C-peptid) (Tablice 14-23) korišten t-test. Kod svih vrijednosti $P<0,05$ smatra se da postoji statistički značajna razlika.

Analizom skupina ispitanika prema spolu utvrđene su očekivane statistički značajne razlike između skupina G1 i G2 i skupina G2 i G4 (Tablica 12). Također, analizom su utvrđene statistički značajne razlike po dobi između skupina G1 i G2 (Tablica 13).

Kod parametara ITM-a, glukoze, HbA1c (Tablice 14 – 16) utvrđene razlike nisu bile značajne, dok su kod vrijednosti inzulina između skupina G1 i G2 te vrijednosti C-peptida između skupina G2 i G4 utvrđene statistički značajne razlike (Tablice 17 – 18).

Razlike u vrijednostima između analiziranih parametara između skupine G1 u odnosu na skupine G2, G3, G4 prikazane su pomoću kutijastih dijagrama (Slike 27-31).

Tablica 12. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema spolu učinjene pomoću hi-kvadrat testa (G1 – ispitanici kod kojih nije utvrđena mutacija u analiziranim genima; G2 – ispitanici kod kojih je utvrđena mutacija u genu *HNF1A*; G3 – ispitanici kod kojih je utvrđena mutacija u genu *HNF4A*; G4 – ispitanici kod kojih je utvrđena mutacija u genu *HNF1B*).

Varijabla	**N=105**	**Zavisna varijabla skupina**	**Zavisna varijabla**	***P*-vrijednost**
Spol	73	G1	**G2**	**0,042**
			G3	0,294
			G4	0,073
	28	G2	**G1**	**0,042**
			G3	0,099
			G4	**0,008**
	1	G 3	G1	0,294
			G2	0,099
			G4	-
	3	G4	G1	0,073
			G2	**0,008**
			G3	-

Utvrđene su statistički značajne razlike za spol između skupina G1 i G2 te između skupina G2 i G4 ($P<0,05$).

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 13. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema dobi učinjene pomoću t-testa.

Varijabla	N=105	Zavisna varijabla skupina	Zavisna varijabla	*P*-vrijednost
Dob	73	G1	**G2**	**0,021**
			G3	-
			G4	0,603
	28	G2	**G1**	**0,021**
			G3	-
			G4	0,735
	1	G3	G1	-
			G2	-
			G4	-
	3	G4	G1	0,603
			G2	0,735
			G3	-

Utvrđene su statistički značajne razlike za dob između skupina G1 i G2 (P<0,05).

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 14. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema parametru ITM učinjene pomoću t-testa.

Varijabla	N=105	Zavisna varijabla skupina	Zavisna varijabla	*P*-vrijednost
ITM	73	G1	G2	0,068
			G3	-
			G4	0,798
	28	G2	G1	0,068
			G3	-
			G4	0,570
	1	G3	G1	-
			G2	-
			G4	-
	3	G4	G1	0,798
			G2	0,570
			G3	-

Nisu utvrđene statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 15. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema vrijednosti glukoze učinjene pomoću t-testa.

Varijabla	N=105	Zavisna varijabla skupina	Zavisna varijabla	*P*-vrijednost
Glukoza (natašte)	73	G1	G2	0,058
			G3	-
			G4	0,731
	28	G2	G1	0,058
			G3	-
			G4	0,396
	1	G3	G1	-
			G2	-
			G4	-
	3	G4	G1	0,731
			G2	0,396
			G3	-

Nisu utvrđene statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 16. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema vrijednosti HbA1c učinjene pomoću t-testa.

Varijabla	N=105	Zavisna varijabla skupina	Zavisna varijabla	*P*-vrijednost
HbA1c	73	G1	G2	0,437
			G3	-
			G4	0,364
	28	G2	G1	0,437
			G3	-
			G4	0,130
	1	G3	G1	-
			G2	-
			G4	-
	3	G4	G1	0,364
			G2	0,130
			G3	-

Nisu utvrđene statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 17. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema vrijednosti inzulina učinjene pomoću t-testa.

Varijabla	N=105	Zavisna varijabla skupina	Zavisna varijabla	*P*-vrijednost
Inzulin	73	G1	**G2**	**0,001**
			G3	-
			G4	0,726
	28	G2	**G1**	**0,001**
			G3	-
			G4	0,258
	1	G3	G1	-
			G2	-
			G4	-
	3	G4	G1	0,726
			G2	0,258
			G3	-

Utvrđene su statistički značajne razlike za vrijednost inzulina između skupina G1 i G2 ($P<0,05$).

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 18. Prikaz usporedbe ispitivanih skupina prema vrijednosti C-peptida učinjene pomoću t-testa.

Varijabla	N=105	Zavisna varijabla skupina	Zavisna varijabla	*P*-vrijednost
C-peptid	73	G1	G2	0,353
			G3	-
			G4	0,949
	28	G2	G1	0,353
			G3	-
			G4	**0,010**
	1	G3	G1	-
			G2	-
			G4	-
	3	G4	G1	0,949
			G2	**0,010**
			G3	-

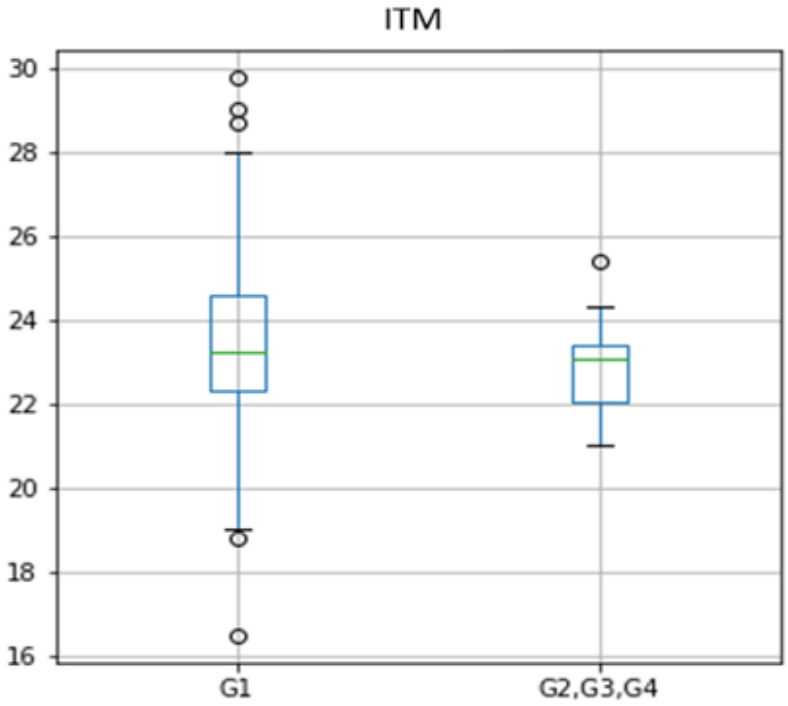
Utvrđene su statistički značajne razlike za vrijednost inzulina između skupina G2 i G4 (P<0,05).

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

Tablica 19. Statističke varijable za ITM prema skupinama ispitanika - deskriptivni parametri.

Varijabla	Skupina	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti - donja granica	95 % interval pouzdanosti - gornja granica	Min	Max
ITM	G1	70	23,6	2,313	0,276	23,031	24,114	16,5	29,76
ITM	G2	23	22,6	1,225	0,255	22,14	23,14	21	25,4
ITM	G3	1	22,2	-	-	-	-	22,2	22,2
ITM	G4	2	23,2	0,354	0,25	22,66	23,64	22,9	23,4

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

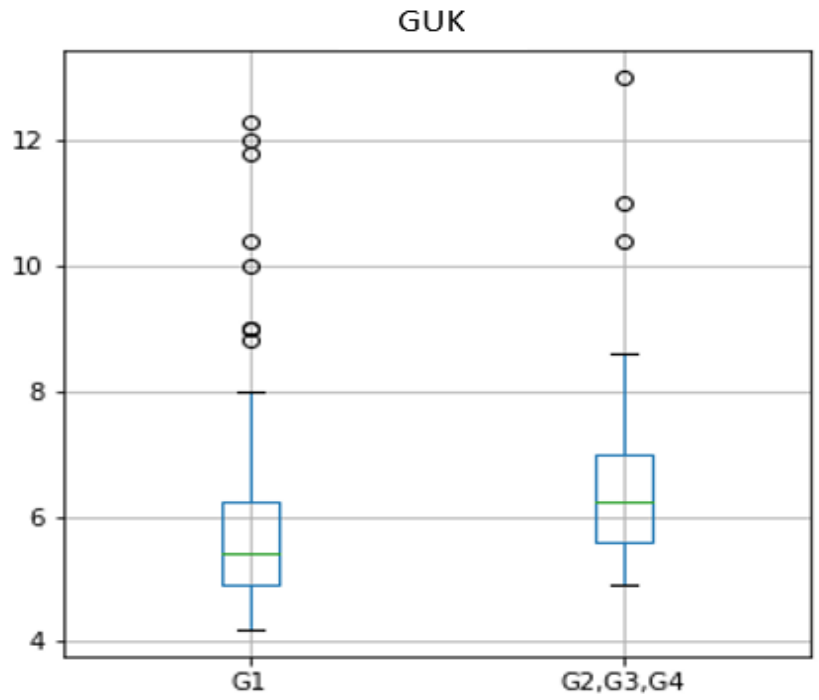


Slika 25. Razlike u vrijednosti ITM-a između skupine G1 u odnosu na skupine G2, G3, G4. Razlike su prikazane kutijastim dijagramom gdje svaki pravokutnik prikazuje vrijednost od donjega do gornjeg kvartila. Linija u pravokutniku označava medijan. Vanjske linije pravokutnika označavaju raspon od najniže do najviše vrijednosti unutar 1,5 interkvartilnog raspona. Sve točke izvan pravokutnika vrijednosti su koje se bitno razlikuju od većine skupova podataka.

Tablica 20. Statističke varijable za glukozu prema skupinama ispitanika - deskriptivni parametri.

Varijabla	Skupina	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti - donja granica	95 % interval pouzdanosti - gornja granica	Min	Max
GUK	G1	70	6	1,826	0,218	5,621	6,476	4,2	12,3
GUK	G2	21	7	2,175	0,475	6,032	7,892	4,9	13
GUK	G3	1	5,1	-	-	-	-	5,1	5,1
GUK	G4	2	5,6	-	-	-	-	5,6	5,6

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

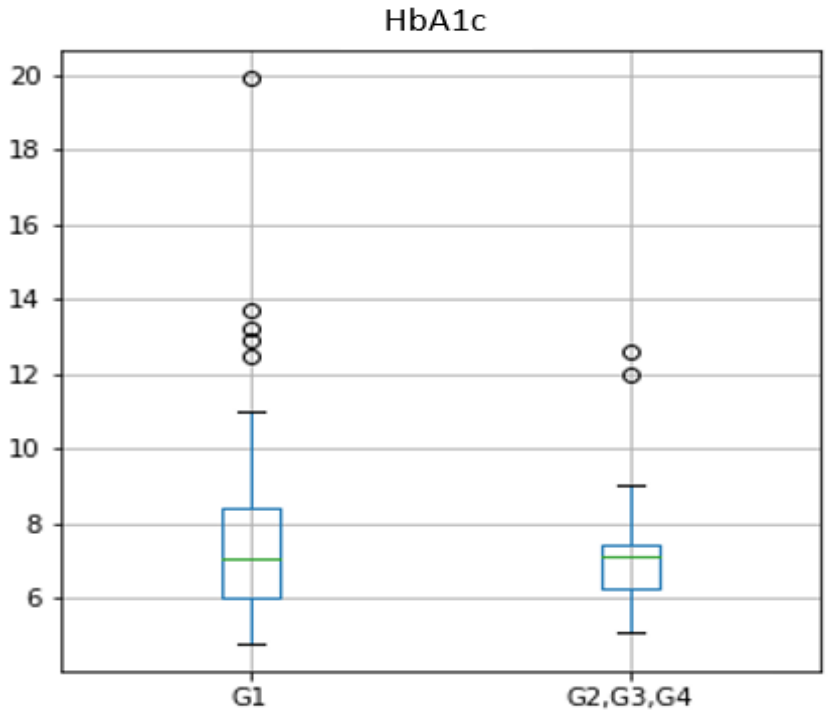


Slika 26. Razlike u vrijednostima GUK-a između skupine G1 u odnosu na skupine G2, G3, G4. Razlike su prikazane kutijastim dijagramom gdje svaki pravokutnik prikazuje vrijednost od donjega do gornjeg kvartila. Linija u pravokutniku označava medijan. Vanjske linije pravokutnika označavaju raspon od najniže do najviše vrijednosti unutar 1,5 interkvartilnog raspona. Sve točke izvan pravokutnika vrijednosti su koje se bitno razlikuju od većine skupova podataka.

Tablica 21. Statističke varijable za HbA1c prema skupinama ispitanika - deskriptivni parametri.

Varijabla	Skupina	N	Srednja Vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti - donja granica	95 % interval pouzdanosti - gornja granica	Min	Max
HbA1c	G1	69	7,5	2,505	0,302	6,95	8,132	4,8	19,9
HbA1c	G2	21	7,1	1,632	0,356	6,388	7,784	5,1	12,6
HbA1c	G3	1	5,1	-	-	-	-	5,1	5,1
HbA1c	G4	2	9,2	3,96	2,8	3,712	14,688	6,4	12

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

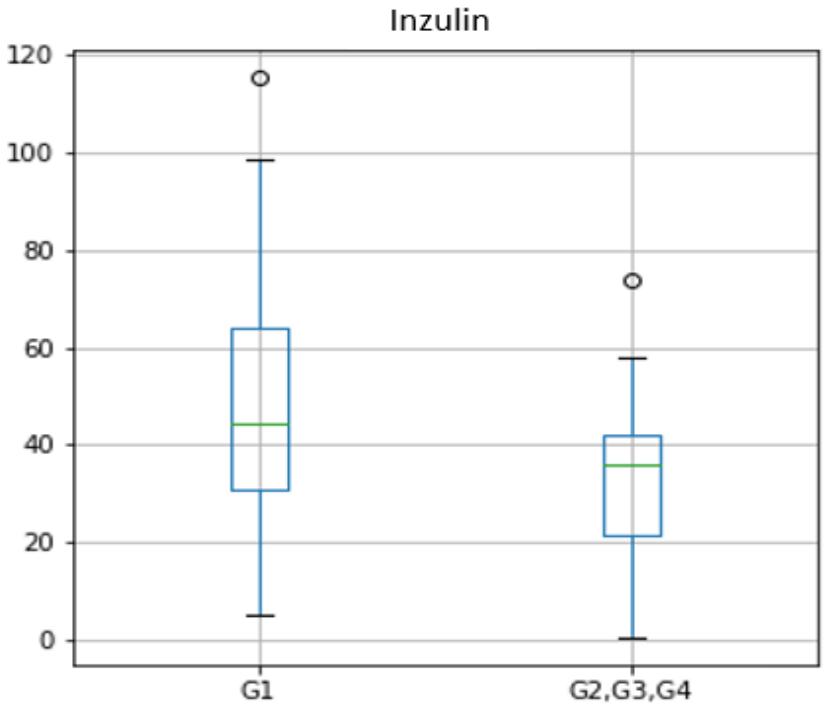


Slika 27. Razlike u vrijednostima HbA1c između skupine G1 u odnosu na skupine G2, G3, G4. Razlike su prikazane kutijastim dijagramom gdje svaki pravokutnik prikazuje vrijednost od donjega do gornjeg kvartila. Linija u pravokutniku označava medijan. Vanjske linije pravokutnika označavaju raspon od najniže do najviše vrijednosti unutar 1,5 interkvartilnog raspona. Sve točke izvan pravokutnika vrijednosti su koje se bitno razlikuju od većine skupova podataka.

Tablica 22. Statističke varijable za inzulin prema skupinama ispitanika - deskriptivni parametri.

Varijabla	Skupina	N	Srednja vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti - donja granica	95 % interval pouzdanosti - gornja granica	Min	Max
Inzulin	G1	70	46,3	24,346	2,91	40,645	52,052	5,1	115,2
Inzulin	G2	21	26,1	15,784	3,444	19,378	32,88	0,71	56
Inzulin	G3	1	74	-	-	-	-	74	74
Inzulin	G4	2	40,2	25,173	17,8	5,313	75,087	22,4	58

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka

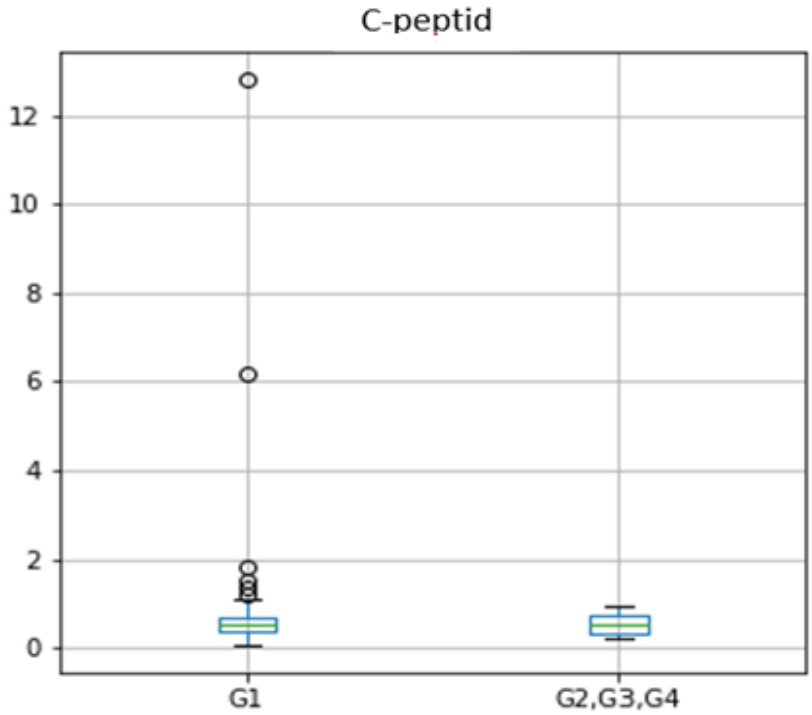


Slika 28. Razlike u vrijednostima inzulina između skupine G1 u odnosu na skupine G2, G3, G4. Razlike su prikazane kutijastim dijagramom gdje svaki pravokutnik prikazuje vrijednost od donjega do gornjeg kvartila. Linija u pravokutniku označava medijan. Vanjske linije pravokutnika označavaju raspon od najniže do najviše vrijednosti unutar 1,5 interkvartilnog raspona. Sve točke izvan pravokutnika vrijednosti su koje se bitno razlikuju od većine skupova podataka.

Tablica 23. Statističke varijable za C-peptid prema skupinama ispitanika - deskriptivni parametri.

Varijabla	Skupina	N	Srednja Vrijednost	Standardna devijacija (SD)	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti - donja granica	95 % interval pouzdanosti - gornja granica	Min	Max
C-peptid	G1	70	0,8	1,633	0,195	0,418	1,183	0,07	12,8
C-peptid	G2	21	0,5	0,2	0,044	0,38	0,551	0,24	0,89
C-peptid	G3	1	0,2	-	-	-	-	0,19	0,19
C-peptid	G4	2	0,9	0,106	0,075	0,728	1,022	0,8	0,95

- vrijednost nije izražena zbog ograničenog broja uzorka



Slika 29. Razlike u vrijednosti C-peptida između skupine G1 u odnosu na skupine G2, G3, G4.Razlike su prikazane kutijastim dijagramom gdje svaki pravokutnik prikazuje vrijednost od donjega do gornjeg kvartila. Linija u pravokutniku označava medijan. Vanjske linije pravokutnika označavaju raspon od najniže do najviše vrijednosti unutar 1,5 interkvartilnog raspona. Sve točke izvan pravokutnika vrijednosti su koje se bitno razlikuju od većine skupova podataka.

5. RASPRAVA

5.1. Raspodjela i učestalost mutacija kod ispitanika s MODY-jem u Republici Hrvatskoj

U ovom istraživanju sudjelovalo je 105 ispitanika kojima je prethodno postavljena klinička dijagnoza šećerne bolesti te su bili zadovoljeni svi ulazni kriteriji istraživanja koji ukazuju na dijagnozu MODY-ja. Klinička dijagnoza MODY-ja potvrđena je molekularno-genetičkom analizom kod 32 ispitanika (30,5 %). Identificirano je 18 različitih mutacija u trima analiziranim genima (*HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*). U genu *HNF1A* identificirano je 15 mutacija (83,3 %), u genu *HNF4A* jedna mutacija (5,6 %) te dvije mutacije u genu *HNF1B* (11,1 %). Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je prevalencija pojedinih podtipova MODY-ja slična rezultatima istraživanja kao i u nekim drugim europskim zemljama. U Velikoj Britaniji identificirano je 52 % mutacija u genu *HNF1A*, 32 % mutacija u genu *GCK*, 10 % mutacija u genu *HNF4A* i 6 % mutacija u genu *HNF1B*; u Norveškoj 45 % mutacija u genu *HNF1A*, 30 % mutacija u genu *GCK*, 9 % mutacija u genu *HNF4A* i 4 % mutacija u genu *HNF1B* (14, 20). Za razliku od navedenih zemalja u Italiji su najzastupljenije mutacije u genu *GCK* (53 %), 16 % mutacija u genu *HNF1A*, 5 % mutacija u genu *HNF4A* i 3 % mutacija u genu *HNF1B*; u Španjolskoj 80 % mutacija u genu *GCK*, 8 % mutacija u genu *HNF1A*, 0 % u genu *HNF4A* i 1 % u genu *HNF1B* (22, 112). Prema navedenim podatcima može se zaključiti da prevalencija pojedinih podtipova MODY-ja ovisi o ispitivanoj populaciji. Također, taj otklon može biti razlog različitim strategijama kod probira šećerne bolesti jer u zemljama kod kojih se rjeđe provode rutinske kontrolne analize glukoze u krvi pokazalo se da se češće identificira podtip HNF1A-MODY za razliku od zemalja gdje se provodi sustavni probir na šećernu bolest pa je zastupljeniji podtip GCK-MODY (14, 113).

Sve identificirane mutacije u genu *HNF1A* nalaze se u egzonima 1 – 6 koji su smješteni u području koje obuhvaća sve tri izoforme gena ((*HNF1A* (A), *HNF1A* (B) i *HNF1A* (C)). Slična raspodjela mutacija unutar gena *HNF1A* prikazana je i u drugim istraživanjima (28).

5.2. Raspodjela prema spolu i dobi

Statističkom analizom ispitanika prema skupinama dobiveni su rezultati koji ukazuju na postojanje razlike u zastupljenosti bolesti prema spolu između ispitanika kod kojih nije utvrđena mutacija (G1) i ispitanika s potvrđenim podtipom HNF1A-MODY (G2). Rezultati ukazuju da je podtip HNF1A-MODY češće zastupljen u ženskoj populaciji (P=0,042) (109). Uspoređujući ispitanike kod kojih nije potvrđena mutacija (G1) sa svim ostalim skupinama s potvrđenom dijagnozom MODY-ja (G2-G4), nisu utvrđene značajne razlike što možemo pripisati relativno ograničenom broju ispitanika.

Kod ispitanika kojima nije utvrđena mutacija (G1) i ispitanika s potvrđenim podtipom HNF1A-MODY (G2) također je utvrđeno kako postoji razlika u dobi kod nastupa šećerne bolesti (P=0,021) što i jest očekivano s obzirom na to da je dob kod nastupanja bolesti jedan od prvih kliničkih obilježja kojim se koristi prilikom postavljanja dijagnoze MODY-ja (14).

5.3. Klinička obilježja ispitanika prema genotipu

Kod ispitanika kojima nije utvrđena mutacija (G1) i ispitanika s potvrđenim podtipom HNF1A-MODY (G2) utvrđena je niža vrijednost inzulina (p=0,001) što je također očekivano i usporedivo s rezultatima drugih istraživanja (114). Kod ostalih kliničkih obilježja korištenih u ovom istraživanju nisu uočene značajnije razlike što isto možemo pripisati relativno ograničenom broju ispitanika.

5.4. Raspodjela mutacija prema genima i povezivanje fenotipa i genotipa

5.4.1. Mutacije u genu *HNF1A*

U ovoj skupini ispitanika u genu *HNF1A* identificirano je 15 različitih mutacija kod 18 obitelji. Najviše mutacija identificirano je u egzonima 4 (13) i 6 (7), dok su ostale mutacije raspoređene u egzonu 3 (6), egzonu 1 (2) te u egzonu 2 (1). Prema vrsti promjene devet (60,0 %) ih je bilo mutacija promjene smisla, pet (33,3 %) delecija i jedna (6,7 %) insercija. Prema položaju u funkcionalnim domenama većina je mutacija smještena u dimerizacijskoj i vezujućoj domeni (66,7 %), dok su ostale smještene u transaktivacijskoj domeni (33,3 %). Ta raspodjela mutacija odgovara rezultatima prethodnih istraživanja koji pokazuju da je većina identificiranih mutacija smještena u dimerizacijskoj i vezujućoj domeni (51). U toj skupini najzastupljenija mutacija u genu *HNF1A* jest c.872dupC, p.Gly292Argfs*25 (24,1 %) koja je ujedno i najčešće prijavljena mutacija inače pronađena kod više od 234 obitelji diljem svijeta. Za usporedbu, oko 65 % mutacija potvrđeno je u pojedinačnim obiteljima, a ako izuzmemo mutaciju c.872dupC, sljedeća najzastupljenija mutacija ima učestalost oko 2 % (51). Sve su identificirane mutacije do danas prijavljene i opisane u literaturi osim triju mutacija koje se nalaze u egzonu 1, c.66delC, p.Ser22Arg*9 te egzonu 3, c.527-6_539del, p.? i c.616_617del, p.Trp206Gly*13. Kod jednog su ispitanika identificirane dvije mutacije, c.798C>G, p.Asn266Lys i c.862G>T, p.Gly288Trp, koje su prema dostupnim podatcima klasificirane kao mutacije upitna značenja. Mutacije su analizirane bioinformatičkim alatima za procjenu patogenosti te su klasificirane kao patogene.

5.4.1.1. Mutacija p.Ala116Val

Mutacija promjene smisla c.347C>T, p.Ala116Val u heterozigotnom statusu identificirana je kod jedne ispitanice. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 2. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database* i *The Human Gene Mutation Database* te je klasificirana kao patogena. Prema dostupnim podatcima obiteljska je anamneza negativna.

Dijagnoza šećerne bolesti postavljena je u dobi od 44 godine, a dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 47 godina. Ispitanica je na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.2. Mutacija p.Arg203Cys

Mutacija promjene smisla c.607C>T, p.Arg203Cys u heterozigotnom je statusu identificirana kod jedne ispitanice. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 3. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database, The Human Gene Mutation Database i ClinVar* te je klasificirana kao patogena. Ima važnu ulogu za stabilnost i funkciju proteina, a supstitucija arginina cisteinom na poziciji 203 smanjuje afinitet proteina za DNA čime se destabilizira protein (23). Obiteljska anamneza prisutna je i u prvoj i drugoj generaciji. Dijagnoza je šećerne bolesti postavljena u dobi od 30 godina, a dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 35 godina. Ispitanica je na inzulinskoj terapiji.

5.4.1.3. Mutacija p.Arg203His

Mutacija promjene smisla c.608G>A, p.Arg203His u heterozigotnom je statusu identificirana kod jednog ispitanika. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 3. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database* i *The Human Gene Mutation Database,* dok je u bazi *ClinVar* klasificirana kao vjerojatno patogena. Funkcionalnim je testovima utvrđeno da je kod prisustva te mutacije karakterističan rani nastup bolesti (89) što je karakteristično i kod ovog ispitnika. Dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 25 godina. Obiteljska je anamneza prisutna i u prvoj i drugoj generaciji. Ispitanik je na terapiji oralnim hipoglikemicima i dijeti.

5.4.1.4. Mutacija p.Glu275Val

Mutacija promjene smisla c.824A>T, p.Glu275Val u heterozigotnom je statusu identificirana kod jedne ispitanice. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 4. Mutacija je prijavljena u bazi *Leiden Open Variation Database* kao vjerojatno patogena, dok je u bazi *ClinVar* klasificirana kao patogena. Dijagnoza je šećerne bolesti postavljena u dobi od 42 godine, a dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 59 godina. Obiteljska anamneza prisutna je u prvoj i drugoj generaciji. Ispitanica je na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.5. Mutacija p.Glu275del

Mutacija c.824_826del, p.Glu275del u heterozigotnom je statusu identificirana u jednoj obitelji kod dvaju srodnih članova (majke i kćeri). Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 4. Mutacija je prijavljena u bazi *Leiden Open Variation Database* te je klasificirana kao patogena. Dijagnoza HNF1A-MODY kod majke je postavljena u dobi od 46 godina. Obiteljska anamneza nije poznata kod ostalih članova obitelji. Majka je na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.6. Mutacija p.Ala251Thr

Mutacija c.751G>A, p.Ala251Thr u heterozigotnom statusu identificirana je kod dvaju ispitanika koji nisu u srodstvu. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 4. Mutacija je prijavljena u bazi *The Human Gene Mutation Database* te je klasificirana kao patogena. Kod ispitanice dijagnoza HNF1A-MODY postavljena je u dobi od 61 godine, dok je kod drugog ispitanika potvrđena u dobi od 18 godina. Obiteljska anamneza prisutna je u prvoj i drugoj generaciji kod obaju ispitanika. Oboje su na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.7. Mutacija p.Gly292Argfs*25

Mutacija c.872dupC, p.Gly292Argfs*25 u heterozigotnom statusu identificirana je kod sedam ispitanika iz triju različitih obitelji. Smještena je u transaktivacijskoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 4. Mutacija je prijavljena u bazi *Leiden Open Variation Database* te je klasificirana kao patogena. Uzrokuje pomak okvira čitanja što dovodi do gubitka funkcije proteina. Kao što je već navedeno, ovo je najučestalija mutacija u genu *HNF1A* koja je potvrđena kod otprilike 20 % obitelji s HNF1A-MODY (113). U jednoj obitelji potvrđena je kod majke i sina. Kod majke je dijagnoza postavljena u dobi od 64 godine, dok je kod sina potvrđena u dobi od 31 godine. Obiteljska anamneza prisutna je u dvjema generacijama. Oboje su na terapiji oralnim hipoglikemicima. U drugoj obitelji mutacija je potvrđena kod bake, majke i dvoje djece. Kod bake je dijagnoza HNF1A-MODY postavljena u dobi od 70 godina, dok je kod majke potvrđena u dobi od 42 godine (dijagnoza šećerne bolesti postavljena u dobi od 15 godina). Baka i majka na inzulinskoj su terapiji.

5.4.1.8. Mutacija p.Leu377fs

Mutacija c.1129delC, p.Leu377fs u heterozigotnom statusu identificirana je kod jedne ispitanice. Smještena je u transaktivacijskoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 6. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database*, *The Human Gene Mutation Database* i *ClinVar* te je klasificirana kao patogena. Dijagnoza šećerne bolesti postavljena je u dobi od 14 godina, a dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 32 godine. Obiteljska je anamneza prisutna u drugoj generaciji. Ispitanica je na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.9. Mutacija p.Pro379Ala

Mutacija c.1135C>G, p.Pro379Ala u heterozigotnom statusu identificirana je kod jedne ispitanice. Smještena je u transaktivacijskoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 6. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database*, *The Human Gene Mutation Database* i

ClinVar te je klasificirana kao patogena. Dijagnoza šećerne bolesti postavljena je u dobi od 23 godina, a dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 42 godine. Obiteljska anamneza prisutna je u prvoj i drugoj generaciji. Ispitanica je na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.10. Mutacija p.Pro379Arg

Mutacija c.1136C>G, p.Pro379Arg u heterozigotnom statusu identificirana je kod pet ispitanika iz dviju obitelji. Smještena je u transaktivacijskoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 6. Mutacija je prijavljena u bazi *The Human Gene Mutation Database* te je klasificirana kao patogena. U jednoj obitelji potvrđena je kod majke i kćeri. Obiteljska je anamneza prisutna u prvoj i drugoj generaciji. Obje su ispitanice na terapiji oralnim hipoglikemicima. U drugoj je obitelji mutacija potvrđena kod majke, sina i kćeri. Obiteljska je anamneza prisutna u prvoj generaciji. Majka je na terapiji oralnim hipoglikemicima.

5.4.1.11. Mutacije p.Asn266Lys i p.Gly288Trp

Mutacije c.798C>G, p.Asn266Lys i c.862G>T, p.Gly288Trp u heterozigotnom statusu identificirane su kod istog ispitanika. Mutacija p.Asn266Lys smještena je u vezujućoj domeni, dok je p.Gly288Trp smještena u transaktivacijskoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 4. Obje mutacije prijavljene su u bazi *The Human Gene Mutation Database* te su klasificirane kao patogene, dok su u bazi *ClinVar* klasificirane kao mutacije upitna značenja. Mutacije su provjerene bioinformatičkim alatima za provjeru patogenosti te su klasificirane kao patogene. Dijagnoza šećerne bolesti postavljena je u dobi od 15 godina, a dijagnoza HNF1A-MODY potvrđena je u dobi od 20 godina. Obiteljska anamneza nije poznata. Ispitanik je na inzulinskoj terapiji.

5.4.2. Nove mutacije u genu *HNF1A*

Uz mutacije koje su do danas opisane u ovom su istraživanju utvrđene i tri nove mutacije koje do danas nisu prijavljene. Prema vrsti promjene radi se o delecijama jednoga ili više nukleotida. Budući da bioinformatičke alate za procjenu patogenosti možemo rabiti samo za procjenu patogenosti kod zamjene pojedinih aminokiselina u proteinu, nije bilo moguće učiniti procjenu patogenosti za te mutacije. U pravilu, prisutnost mikrodelecija u konzerviranim regijama egzona gotovo se uvijek smatraju patogenima. Za sve nove mutacije učinjeno je ponavljanje analize (tehnički duplikat) kako bi se potvrdilo postojanje mutacije te kako bi se odbacila sumnja na slučajni nalaz. Također, tamo gdje je bilo moguće, provedena je i studija segregacije u obitelji. Uz navedeno, procjenu patogenosti novootkrivenih mutacija potrebno je provjeriti primjenom funkcijskih testova.

5.4.2.1. Mutacija p.Ser22Arg*9

Mutacija c.66delC, p.Ser22Arg*9 u heterozigotnom statusu identificirana je kod dvaju ispitanika (kćeri i majke) iz iste obitelji. Smještena je u dimerizacijskoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 1. Obiteljska je anamneza prisutna u prvoj i drugoj generaciji. Obje su ispitanice na inzulinskoj terapiji. S obzirom na prikazani fenotip bolesti te potvrdom prisustva mutacije kod dvaju članova obitelji, možemo pretpostaviti da ta delecija ima patogeni učinak.

5.4.2.2. Mutacija c.527-6_539del, p.?

Mutacija c.527-6_539del, p.? u heterozigotnom statusu identificirana je kod dvaju ispitanika (kćeri i majke) iz iste obitelji. Prema vrsti promjene to je mutacija koja utječe na mjesto prekrajanja (engl. *splice site*). Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A*, a nalazi se na prijelazu iz introna 2 u egzon 3. Obiteljska je anamneza prisutna u prvoj i drugoj generaciji. Obje su ispitanice na terapiji oralnim hipoglikemicima. S obzirom na prikazani fenotip bolesti te potvrdom prisustva

mutacije kod dvaju članova obitelji, možemo pretpostaviti da ta delecija ima patogeni učinak. Također, mutacije koje pogađaju mjesto prekrajanja često su patogene.

5.4.2.3. Mutacija c.616_617del, p.Trp206Gly*13

Mutacija c.616_617del, p.Trp206Gly*13 u heterozigotnom statusu identificirana je kod jednog ispitanika. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF1A* u egzonu 3. Obiteljska anamneza prisutna je u prvoj i drugoj generaciji. Ispitanica je na terapiji oralnim hipoglikemicima. S obzirom na prikazani fenotip bolesti, možemo pretpostaviti da ta delecija ima patogeni učinak. Potvrdu patogenosti, kao u prethodnim dvama slučajevima, dobili bismo provedbom studije segregacije u obitelji.

5.4.3. Mutacije u genu *HNF4A*

5.4.3.1. Mutacija p.Arg67Trp

Mutacija C.199C>T, p.Arg67Trp u heterozigotnom statusu identificirana je kod jednog ispitanika. Smještena je u vezujućoj domeni gena *HNF4A* u egzonu 2. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database* i *The Human Gene Mutation Database* te je klasificirana kao patogena. Dijagnoza HNF4A-MODY potvrđena je u dobi od 19 godina. Obiteljska anamneza prisutna je u drugoj generaciji. Ispitanica je na inzulinskoj terapiji.

5.4.4. Mutacije u genu *HNF1B*

5.4.4.1. Mutacija p.His336Asp - mutacija nepoznata značaja

Mutacija c.1006C>G, p.His336Asp u heterozigotnom statusu identificirana je kod dvaju ispitanika (otac i sin) iz jedne obitelji. Smještena je u hibridizacijskoj domeni gena *HNF1B* u egzonu 4. Mutacija je prijavljena u bazama *Leiden Open Variation Database* i *ClinVar* te je klasificirana kao mutacija nepoznata značaja. S obzirom na prikazani fenotip bolesti te potvrdom prisustva mutacije kod dvaju članova obitelji, možemo pretpostaviti da ta mutacija ima patogeni učinak. Obiteljska je anamneza prisutna je u prvoj i drugoj generaciji. Oba ispitanika na inzulinskoj su terapiji.

Navedena se mutacija smatra patogenom jer utječe na zamjenu visoko konzerviranoga aminokiselinskog ostatka i smještena je u vrlo važnoj funkcionalnoj domeni gena *HNF1B* (115, 116).

5.4.4.2. Mutacija p.Val458Gly - mutacija nepoznata značaja

Mutacija c.1373T>G, p.Val458Gly u heterozigotnom statusu identificirana je kod jednog ispitanika. Smještena je u hibridizacijskoj domeni gena *HNF1B* u egzonu 7. Mutacija je prijavljena u bazi ClinVar te je klasificirana kao mutacija nepoznata značaja. S obzirom na prikazani fenotip ispitanika, možemo pretpostaviti da ta mutacija ima patogeni učinak. Obiteljska je anamneza prisutna u prvoj i drugoj generaciji. Ispitanik je na inzulinskoj terapiji. Procjena patogenosti učinjena je pomoću bioinformatičkih alata (PolyPhen-2, SIFT i Provean) te je dobiven rezultat da je mutacija patogena. Navedena mutacija do danas nije opisana u dostupnoj literaturi.

Ovo će istraživanje omogućiti primjenu translacijske medicine u dijagnostici i liječenju bolesnika s MODY-jem u Republici Hrvatskoj te uspostavu racionalnoga dijagnostičkog algoritma koji se danas rabi u probiru pacijenata sa sumnjom na MODY u kliničkoj praksi. Ispravna molekularna dijagnoza od izuzetne je važnosti za bolesnike s MODY-jem jer može pomoći u

odabiru najprikladnijeg oblika liječenja, omogućiti prognozu tijeka bolesti, ukazati na postojanje pridruženih malformacija te omogućiti genetičko savjetovanje oboljelih i članova obitelji uz racionalizaciju troškova liječenja u zdravstvu.

Nedostatak ovog istraživanja relativno je ograničen uzorak pacijenata sa sumnjom na MODY na temelju kojeg bi se mogli dati podatci o stvarnoj prevalenciji ove bolesti u hrvatskoj populaciji. Ovo istraživanje ukazuje na potrebu uvođenja metode višestrukog umnažanja vezanih sondi (engl. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*, MLPA) s obzirom na mogućnost velikih delecija unutar analiziranih gena posebno kod gena *HNF1B* (56). Također, patogenost novootkrivenih mutacija potrebno je provjeriti primjenom funkcijskih testova.

6. ZAKLJUČCI

1. Ovim istraživanjem pokazan je smjer prevalencije MODY-ja podtipova HNF1A-MODY, HNF4A-MODY i HNF1B-MODY u Hrvatskoj koja je slična kao i u ostalim europskim zemljama.

2. Klinička dijagnoza MODY-ja potvrđena je molekularno-genetičkom analizom kod 32 ispitanika (30,5 %).

3. Velik udio potvrđenih dijagnoza MODY-ja ukazuje da je u probiru pacijenata sa sumnjom na MODY korišten racionalni dijagnostički algoritam.

4. U genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* identificirano je 18 različitih mutacija. U genu *HNF1A* identificirano je petnaest 15 mutacija (83,3 %), u genu *HNF4A* jedna mutacija (5,6 %) te dvije mutacije u genu *HNF1B* (11,1 %)

5. Identificirane su tri nove neopisane mutacije u genu *HNF1A* (c.66delC, c.527-6_539del, c.616_617del).

6. Ovo će istraživanje omogućiti primjenu translacijske medicine u dijagnostici i liječenju bolesnika s MODY-jem u Republici Hrvatskoj te primjenu racionalnoga dijagnostičkog algoritma.

7. Pravovremena potvrda genetskog uzroka bolesti omogućava primjenu ciljane terapije što za rezultat ima poboljšanje u kontroli glikemije, smanjenje komplikacija šećerne bolesti te racionalizaciju troškova liječenja u zdravstvu.

8. Ispravna molekularna dijagnoza od izuzetne je važnosti za bolesnike s MODY-jem jer može pomoći u odabiru najprikladnijeg oblika liječenja, omogućiti prognozu tijeka bolesti, ukazati na postojanje pridruženih malformacija i omogućiti genetičko savjetovanje oboljelih i članova obitelji.

7. LITERATURA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1(Suppl 1):S64-S71.
2. Međunarodna dijabetička federacija – IDB. Izvor: https://diabetesatlas.org/en/. Pristupljeno: 21.08.2021.
3. Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću – CroDiab. Izvor: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/crodiab-registar/. Pristupljeno: 21.08.2021.
4. Aganović I, Metelko Ž. Šećerna bolest. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. Interna medicina. Zagreb: *Naklada Ljevak*. 2008;1244-1264.
5. Vigersky RA, Fish L, Hogan P, et al. The clinical endocrinology workforce: current status and future projections of supply and demand. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3112-3121.
6. Sanyoura M, Philipson LH, Naylor R. Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options. *Curr Diab Rep*. 2018 Jun 22;18(8):58.
7. Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes*. 1975 Jan;24(1):44-53.
8. Kavvoura FK, Owen KR. Maturity onset diabetes of the young: clinical characteristics, diagnosis and management. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2012;10(2):234-242.
9. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT; European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) MODY group. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia*. 2008 Apr;51(4):546-553.
10. Anık A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(3-4):251-263.
11. Firdous P, Nissar K, Ali S, et al. Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:253.
12. Baldacchino I, Pace NP, Vassallo J. Screening for monogenic diabetes in primary care. *Prim Care Diabetes*. 2020;14(1):1-11.
13. Jang KM. Maturity-onset diabetes of the young: update and perspectives on diagnosis and treatment. *Yeungnam Univ J Med*. 2020;37(1):13-21.
14. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010;53(12):2504-2508.

15. Bellanné-Chantelot C, Lévy DJ, Carette C, et al. Clinical characteristics and diagnostic criteria of maturity-onset diabetes of the young (MODY) due to molecular anomalies of the HNF1A gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(8):E1346-E1351.

16. Urakami T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:1047-1056.

17. Colclough K, Saint-Martin C, Timsit J, Ellard S, Bellanné-Chantelot C. Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(9).

18. Søvika, O., Irgens, H. U., Molnes, J., Sagena, J. V., Bjørkhaug, L., Ræder, H., Molveng, A., & Njølstad, P. R. Monogenic diabetes mellitus in Norway. *Norsk Epidemiologi*. 2013;23(1).

19. Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O, Hansen T. Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4607-4614.

20. Weinreich SS, Bosma A, Henneman L, et al. A decade of molecular genetic testing for MODY: a retrospective study of utilization in The Netherlands. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(1):29-33.

21. Pruhova S, Ek J, Lebl J, et al. Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia*. 2003;46(2):291-295.

22. Delvecchio M, Ludovico O, Menzaghi C, et al. Low prevalence of HNF1A mutations after molecular screening of multiple MODY genes in 58 Italian families recruited in the pediatric or adult diabetes clinic from a single Italian hospital. *Diabetes Care*. 2014;37(12):e258-e260.

23. McDonald TJ, Ellard S. Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. *Ann Clin Biochem*. 2013;50(Pt 5):403-415.

24. Fajans, S.S. & Conn, J.W. 1962. Use of tolbutamide in treatment of young people with mild diabetes mellitus-progress report. *Diabetes*, 11:123.

25. Tattersall RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med*. 1974;43(170):339-357.

26. Fajans SS, Brown MB. Administration of sulfonylureas can increase glucose-induced insulin secretion for decades in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care*. 1993;16(9):1254-1261.

27. Chambers C, Fouts A, Dong F, et al. Characteristics of maturity onset diabetes of the young in a large diabetes center. *Pediatr Diabetes*. 2016;17(5):360-367.

28. Naylor R, Philipson LH. Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(4):422-426.

29. Naylor RN, Greeley SA, Bell GI, Philipson LH. Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*. 2011;2(3):158-169.

30. Heuvel-Borsboom H, de Valk HW, Losekoot M, Westerink J. Maturity onset diabetes of the young: Seek and you will find. *Neth J Med*. 2016;74(5):193-200.

31. Bellanné-Chantelot C, Carette C, Riveline JP, et al. The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes*. 2008;57(2):503-508.

32. Harries LW, Ellard S, Stride A, Morgan NG, Hattersley AT. Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(14):2216-2224.

33. Harries LW, Brown JE, Gloyn AL. Species-specific differences in the expression of the HNF1A, HNF1B and HNF4A genes. *PLoS One*. 2009;4(11):e7855.

34. Kanwal, A., Fazal, S., Ismail, M. & Naureen, N. 2011. A narrative insight to maturity-onset diabetes of the young. Clinical Reviews and Opinions, 3(1):6-13.

35. Iynedjian PB. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(1):27-42.

36. Gloyn AL. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat*. 2003;22(5):353-362.

37. Baldini SF, Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, et al. Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(2):942-948.

38. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*. 2009;30(11):1512-1526.

39. Velho G, Petersen KF, Perseghin G, et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest*. 1996;98(8):1755-1761.

40. Byrne MM, Sturis J, Clément K, et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest*. 1994;93(3):1120-1130.

41. Liu S, Ammirati MJ, Song X, et al. Insights into mechanism of glucokinase activation: observation of multiple distinct protein conformations. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13598-13610.

42. Misra S, Owen KR. Genetics of Monogenic Diabetes: Present Clinical Challenges. *Curr Diab Rep*. 2018;18(12):141.

43. Gardner DS, Tai ES. Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012;5:101-108.

44. Lachance CH. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. *Can J Diabetes*. 2016;40(5):368-375.

45. Stride A, Shields B, Gill-Carey O, et al. Cross-sectional and longitudinal studies suggest pharmacological treatment used in patients with glucokinase mutations does not alter glycaemia. *Diabetologia*. 2014;57(1):54-56.

46. Kim SH. Maturity-Onset Diabetes of the Young: What Do Clinicians Need to Know?. *Diabetes Metab J*. 2015;39(6):468-477.

47. Thomas H, Jaschkowitz K, Bulman M, et al. A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet*. 2001;10(19):2089-2097.

48. Harries LW, Locke JM, Shields B, et al. The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development. *Diabetes*. 2008;57(6):1745-1752.

49. Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. *J Hepatol*. 2018;68(5):1033-1048.

50. Chandra V, Huang P, Potluri N, Wu D, Kim Y, Rastinejad F. Multidomain integration in the structure of the HNF-4α nuclear receptor complex. *Nature*. 2013;495(7441):394-398.

51. Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan SE, Ellard S. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*. 2013;34(5):669-685.

52. Parviz F, Matullo C, Garrison WD, et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet*. 2003;34(3):292-296.

53. Eeckhoute J, Moerman E, Bouckenooghe T, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology*. 2003;144(5):1686-1694.

54. Misra S, Hassanali N, Bennett AJ, et al. Response to Comment on Misra et al. Homozygous Hypomorphic *HNF1A* Alleles Are a Novel Cause of Young-Onset Diabetes and Result in Sulfonylurea-Sensitive Diabetes. Diabetes Care 2020;43:909-912. *Diabetes Care*. 2020;43(10):e155-e156.

55. Hojny J, Bartu M, Krkavcova E, et al. Identification of novel HNF1B mRNA splicing variants and their qualitative and semi-quantitative profile in selected healthy and tumour tissues. *Sci Rep*. 2020;10(1):6958.

56. Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J Med Genet*. 2006;43(1):84-90.

57. Alvelos MI, Rodrigues M, Lobo L, et al. A novel mutation of the HNF1B gene associated with hypoplastic glomerulocystic kidney disease and neonatal renal failure: a case report and mutation update. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(7):e469.

58. Clissold RL, Hamilton AJ, Hattersley AT, Ellard S, Bingham C. HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(2):102-112.

59. El-Khairi R, Vallier L. The role of hepatocyte nuclear factor 1β in disease and development. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18 Suppl 1:23-32.

60. Lim SH, Kim JH, Han KH, et al. Genotype and Phenotype Analyses in Pediatric Patients with *HNF1B* Mutations. *J Clin Med*. 2020;9(7):2320.

61. Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, et al. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med*. 2004;140(7):510-517.

62. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*. 1999;23(3):323-328.

63. Horikawa Y, Enya M. Genetic Dissection and Clinical Features of MODY6 (NEUROD1-MODY). *Curr Diab Rep*. 2019;19(3):12.

64. Aarthy R, Aston-Mourney K, Mikocka-Walus A, et al. Clinical features, complications and treatment of rarer forms of maturity-onset diabetes of the young (MODY) - A review. *J Diabetes Complications*. 2021;35(1):107640.

65. Abreu GM, Tarantino RM, Cabello PH, et al. The first case of NEUROD1-MODY reported in Latin America. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(12):e989.

66. Stoffers DA, Thomas MK, Habener JF. Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Trends Endocrinol Metab*. 1997;8(4):145-151.

67. Kim SK, Selleri L, Lee JS, et al. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in Ipf1-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet*. 2002;30(4):430-435.

68. Schwitzgebel VM. Many faces of monogenic diabetes. *J Diabetes Investig*. 2014;5(2):121-133.

69. Ushijima K, Narumi S, Ogata T, et al. KLF11 variant in a family clinically diagnosed with early childhood-onset type 1B diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2019;20(6):712-719.

70. Torsvik J, Johansson S, Johansen A, et al. Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes. *Hum Genet*. 2010;127(1):55-64.

71. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*. 2005;146(3):1025-1034.

72. Chapla A, Mruthyunjaya MD, Asha HS, et al. Maturity onset diabetes of the young in India - a distinctive mutation pattern identified through targeted next-generation sequencing. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(4):533-542.

73. Meur G, Simon A, Harun N, et al. Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention. *Diabetes*. 2010;59(3):653-661.

74. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, et al. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14460-14465.

75. Kapoor RR, Flanagan SE, James C, Shield J, Ellard S, Hussain K. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Arch Dis Child*. 2009;94(6):450-457.

76. Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, et al. The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell*. 2008;133(3):486-497.

77. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, et al. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet*. 2015;97(1):177-185.

78. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, et al. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia*. 2013;56(9):1958-1963.

79. Greeley SA, John PM, Winn AN, et al. The cost-effectiveness of personalized genetic medicine: the case of genetic testing in neonatal diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(3):622-627.

80. Naylor RN, John PM, Winn AN, et al. Cost-effectiveness of MODY genetic testing: translating genomic advances into practical health applications. Diabetes Care. 2014;37(1):202-209.

81. Nguyen HV, Finkelstein EA, Mital S, Gardner DS. Incremental cost-effectiveness of algorithm-driven genetic testing versus no testing for Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) in Singapore. J Med Genet. 2017;54(11):747-753.

82. Schnyder S, Mullis PE, Ellard S, Hattersley AT, Flück CE. Genetic testing for glucokinase mutations in clinically selected patients with MODY: a worthwhile investment. Swiss Med Wkly. 2005;135(23-24):352-356.

83. Mughal, S.A., Thanabalasingham, G. & Owen, K.R. Biomarkers currently used for the diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Management*, 2013;3(1):71.

84. McDonald TJ, Shields BM, Lawry J, et al. High-sensitivity CRP discriminates HNF1A-MODY from other subtypes of diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1860-1862.

85. Owen KR, Thanabalasingham G, James TJ, et al. Assessment of high-sensitivity C-reactive protein levels as diagnostic discriminator of maturity-onset diabetes of the young due to HNF1A mutations. *Diabetes Care*. 2010;33(9):1919-1924.

86. Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001 [published correction appears in Diabetes.2004;53(7):1934]. *Diabetes*. 2004;53(1):250-264.

87. Tfayli H, Bacha F, Gungor N, Arslanian S. Phenotypic type 2 diabetes in obese youth: insulin sensitivity and secretion in islet cell antibody-negative versus-positive patients. *Diabetes*. 2009;58(3):738-744.

88. Schober E, Rami B, Grabert M, et al. Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicentre database. *Diabet Med*. 2009;26(5):466-473.

89. Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, et al. High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia*. 1999;42(9):1131-1137.

90. Chakera AJ, Steele AM, Gloyn AL, et al. Recognition and Management of Individuals With Hyperglycemia Because of a Heterozygous Glucokinase Mutation. *Diabetes Care*. 2015;38(7):1383-1392.

91. Nataša Rojnić Putarek. MODY. *Paediatr Croat*. 2019;63(Supl 1):48-54.

92. Raile K, Schober E, Konrad K, et al. Treatment of young patients with HNF1A mutations (HNF1A-MODY). *Diabet Med*. 2015;32(4):526-530.

93. Gussinyer M, Clemente M, Cebrián R, Yeste D, Albisu M, Carrascosa A. Glucose intolerance and diabetes are observed in the long-term follow-up of nonpancreatectomized patients with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy due to mutations in the ABCC8 gene. *Diabetes Care*. 2008;31(6):1257-1259.

94. Flanagan SE, Patch AM, Mackay DJ, et al. Mutations in ATP-sensitive K+ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood [published correction appears in Diabetes. 2008 Feb;57(2):523]. *Diabetes*. 2007;56(7):1930-1937.

95. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes [published correction appears in N Engl J Med. 2004 Sep 30;351(14):1470]. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1838-1849.

96. Poitou C, Francois H, Bellanne-Chantelot C, et al. Maturity onset diabetes of the young: clinical characteristics and outcome after kidney and pancreas transplantation in MODY3 and RCAD patients: a single center experience. *Transpl Int*. 2012;25(5):564-572.

97. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(5):1265-1272.

98. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook - EN – QIAGEN.

Izvor: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en. Pristupljeno: 07.02.2022.

99. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*. 2011;32(5):557-563.
100. Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21(6):577-581.
101. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D862-D868.
102. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-249.
103. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081.
104. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;31(16):2745-2747.
105. Ellard S, Colclough K. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat*. 2006;27(9):854-869.
106. Zmysłowska A, Jakiel P, Gadzalska K, et al. Next- generation sequencing is an effective method for diagnosing patients with different forms of monogenic diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109154.
107. Komazec J, Zdravkovic V, Sajic S, et al. The importance of combined NGS and MLPA genetic tests for differential diagnosis of maturity onset diabetes of the young. *Endokrynol Pol*. 2019;70(1):28-36.
108. Zubkova N.A., Gioeva O.A., Tikhonovich Yu.V., Petrov V.M., Vasilyev E.V., Timofeev A.V., Tiulpakov A.N. Clinical and molecular genetic characteristics of MODY1—3 cases in the Russian Federation as shown by NGS. *Problems of Endocrinology*. 2017;63(6):369-378.
109. Pavić T, Juszczak A, Pape Medvidović E, et al. Maturity onset diabetes of the young due to *HNF1A* variants in Croatia. *Biochem Med (Zagreb)*. 2018;28(2):020703.
110. Bente B. Johansson, Aishwarya Pavithram, Haichen Zhang, Kristin A. Maloney, Monika Ringdal, Alba Kaci, Jorn V. Sagen, Jeffrey Kleinberger, Linda Jeng, Pål Rasmus Njølstad, Toni I. Pollin, Janne Molnes; 1638-P: Functional Characterization of HNF1B Variants Can Enhance Diabetes Precision Medicine. *Diabetes*. 2020;69 (Supplement_1):1638–P.

111. Tripathy D, Carlsson AL, Lehto M, Isomaa B, Tuomi T, Groop L. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic subgroups: studies in the prediabetic and diabetic state. *Diabetologia*. 2000;43(12):1476-1483.

112. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, et al. Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(4):538-546.

113. Thanabalasingham G, Owen KR. Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). *BMJ*. 2011;343:d6044.

114. Peixoto-Barbosa R, Reis AF, Giuffrida FMA. Update on clinical screening of maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetol Metab Syndr*. 2020;12:50.

115. Karges B, Bergmann C, Scholl K, et al. Digenic inheritance of hepatocyte nuclear factor-1alpha and -1beta with maturity-onset diabetes of the young, polycystic thyroid, and urogenital malformations. *Diabetes Care*. 2007;30(6):1613-1614.

116. Weber S, Moriniere V, Knüppel T, et al. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(10):2864-2870.

8. SAŽETAK

Monogenski dijabetes (MODY) heterogena je skupina šećerne bolesti uzrokovana disfunkcijom beta-stanica gušterače. Karakteriziran je ranim nastupom bolesti, autosomno-dominantnim načinom nasljeđivanja, očuvanom endogenom sekrecijom inzulina, odsutnošću protutijela na beta-stanice gušterače, odsutnošću simptoma inzulinske rezistencije uz progresivno propadanje funkcije beta-stanica što kao posljedicu ima nemogućnost optimalna povećanja inzulinske sekrecije prilikom odgovora na hiperglikemiju. U ovom radu istraživana je učestalost te vrste mutacija u genima *HNF1A, HNF4A* i *HNF1B* u bolesnika s dijagnozom šećerne bolesti primjenom metode sekvenciranja po Sangeru. U istraživanju je sudjelovalo 105 ispitanika s dijagnozom šećerne bolesti od čega je bilo 46 muškaraca (44 %) i 59 žena (56 %). Klinička dijagnoza MODY-ja potvrđena je molekularno-genetičkom analizom kod 32 ispitanika (30,5 %). Identificirano je 18 različitih mutacija u trima analiziranim genima (*HNF1A, HNF4A* i *HNF1B*). U genu *HNF1A* identificirano je 15 mutacija (83,3 %), u genu *HNF4A* jedna mutacija (5,6 %) te dvije mutacije u genu *HNF1B* (11,1 %) od čega su tri nove neopisane mutacije u genu *HNF1A*. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je prevalencija pojedinih podtipova MODY-ja slična rezultatima istraživanja kao i u nekim drugim europskim zemljama. Ispravna molekularna dijagnoza od izuzetne je važnosti za bolesnike jer može pomoći u odabiru najprikladnijeg oblika liječenja, može omogućiti prognozu tijeka bolesti, ukazati na postojanje pridruženih malformacija te omogućiti genetičko savjetovanje i testiranje oboljelih i članova obitelji.

9. SUMMARY

Monogenic diabetes (MODY) is a heterogeneous group of diabetics caused by pancreatic β-cell dysfunction. It is characterized by early onset of the disease, autosomal dominant mode of inheritance, preserved endogenous insulin production, absence of antibodies to pancreatic β-cells, absence of symptoms of insulin resistance with progressive deterioration of β-cell function, resulting in inability to respond optimally to insulin. In this paper, the frequency and types of mutations in the *HNF1A*, *HNF4A* and *HNF1B* genes in patients diagnosed with diabetes were investigated using the Sanger sequencing method. The study involved 105 subjects diagnosed with diabetes, of which 46 were men (44 %) and 59 women (56 %). The clinical diagnosis of MODY was confirmed by molecular genetic analysis in 32 subjects (30.5 %). 18 different mutations in the three analyzed genes (*HNF1A*, *HNF4A* and *HNF1B*) were identified. Fifteen mutations (83.3 %) were identified in the *HNF1A* gene, one mutation (5.6 %) in the *HNF4A* gene and two mutations in the *HNF1B* gene (11.1 %), of which three new undescribed mutations in the *HNF1A* gene. From the obtained results we can conclude that the ratio of individual MODY subtypes is similar to the research results as in some other European countries. Proper molecular diagnosis is extremely important for patients because it can help choose the most appropriate form of treatment, predict the course of the disease, warn of the presence of associated malformations and provide genetic counseling and testing of patients and family members.

10. ŽIVOTOPIS

Domagoj Caban rođen je 18. srpnja 1983. godine u Slavonskom Brodu. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja u Medicinskoj školi u Slavonskom Brodu 2001. godine upisao je preddiplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu gdje je stekao zvanje prvostupnika medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Nadalje, 2013. godine upisao je diplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Rijeci gdje je 2015. godine stekao zvanje magistra medicinsko-laboratorijske dijagnostike kao prva generacija polaznika tog studija.

Od 2005. godine zaposlen je u Kliničkome bolničkom centru Zagreb, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku. Od 2011. godine obnaša funkciju glavnog inženjera Odjela za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku.

Od 2007. godine sudjeluje kao asistent u nastavi na dodiplomskim stručnim studijima Zdravstvenog veleučilišta na Katedri za informatiku u zdravstvu i to na kolegijima Medicinska informatika, Računalska obrada laboratorijskih podataka te Upravljanje informacijskim sustavom i sustavom kliničkih podataka, a 2016. godine izabran je u nastavno zvanje predavač. Od 2018. godine nositelj je kolegija Medicinska informatika na preddiplomskom studiju Medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Od 2019. godine sudjeluje u nastavi kao predavač na Katedri za biologiju i fiziku na kolegijima Biologija, Molekularna biologija te Osnove molekularne biologije.

Od osnivanja Hrvatske komore zdravstvenih radnika (2010.-2017.) aktivno je sudjelovao u radu spomenute organizacije obnašajući funkciju predsjednika Povjerenstva za staleška pitanja, Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost te člana Vijeća SR MLD-a. U razdoblju od 2012. do 2014. godine obnašao je i funkciju člana Vijeća HKZR-a. Kao član organizacijskoga i znanstvenog odbora sudjelovao je u organizaciji kongresa i tečajeva Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost. Trenutno u radu Komore sudjeluje kao provoditelj stručnog nadzora. Kao član radne grupe sudjelovao je u izradi kompetencija medicinsko-laboratorijske djelatnosti.

Član je Društva za kliničku genetiku Hrvatske (DKGH), Hrvatskog društva za humanu genetiku (HDHG), Hrvatske udruge laboratorijske medicine (HULM) i Hrvatskog društva za medicinsku informatiku (HDMI).

Izvorni znanstveni radovi:

Merkler A, Sertić J, Bazina Martinović A, Križ T, Miličić I, Šimić M, **Caban D**, Ljubić H, Markeljević J, Šimičević L, Kaštelan S, Pećin I, Reiner Ž. Haptoglobin genotype 2-2 associated with atherosclerosis in patients with ischemic stroke. Gene. 2020; 752:1-6.

Rako, Ivana; Jakic-Razumovic, Jasminka; **Caban, Domagoj;** Sertic, Jadranka; Katalinic, Darko; Golem Hilda; Plestina, Stjepko. Uloga mutacije gena KRAS u kolorektalnom karcinomu – prediktivni čimbenik odgovora na liječenje inhibitorima EGFR-a. // Liječnički vjesnik: glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora. 133 (2011); 403-407.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:

Špehar Uroić, Anita; Merkler, Ana; Krnić, Nevena; Miličić, Iva; Rojnić Putarek, Nataša; **Caban**, **Domagoj**; Sertić, Jadranka. The first report on MODY testing in children in Croatia // Pediatric diabetes. Virtual: ISPAD, 2021.146-146.

Merkler, Ana; Špehar Uroić, Anita; Krnić, Nevena; Ljubić, Hana; **Caban**, **Domagoj**; Acman Barišić, Ana; Kaštelan, Darko; Sertić, Jadranka. GCK mutations in Croatian MODY patients // Gothenburg, Švedska, 2019. Abstracts from the 52nd European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: Posters. Eur J Hum Genet 27, 1250-1250.

Caban, **Domagoj**; Merkler, Ana; Ljubić, Hana; Špehar Uroić, Anita; Krnić, Nevena; Čavlović Naglić, Maja; Smirčić-Duvnjak, Lea; Kaštelan, Darko; Sertić, Jadranka Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (HNF1A), 4 Alpha (HNF4A) and 1 Beta (HNF1B) in Maturity-Onset Diabetes of the Young in Croatia // Gothenburg, Švedska, 2019. Abstracts from the 52nd European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: Posters. Eur J Hum Genet 27, 1262-1262.

Sertić, Jadranka; Kaštelan, Darko; Smirčić Duvnjak, Lea; Dušek, Tina; Bulum, Tomislav; Baretić, Maja; Merkler, Ana; **Caban**, **Domagoj**; Špehar Uroić, Anita; Ljubić, Hana; Telarević, Srđana. Genski i biokemijski biljezi monogenskog dijabetesa // Zagreb, Hrvatska, 2018.

Sertić, Jadranka; Merkler, Ana; Ljubić, Hana; **Caban**, **Domagoj**; Acman Barišić, Ana; Škaro, Senka; Petrović, Karolina Molekularna laboratorijska dijagnostika cistične fibroze od 1991.-2018. u Kliničkom bolničkom centru Zagreb //Paediatria Croatica Zagreb, 2018. 169-170.

Merkler, Ana; Dušek, Tina; Kaštelan, Darko; Ljubić, Hana; **Caban**, **Domagoj**; Acman Barišić, Ana; Škaro, Senka; Petrović, Karolina; Sertić, Jadranka. Molekularna dijagnostika sindroma

MEN1 i MEN2 u Kliničkom bolničkom centru Zagreb // Biochemia Medica - Knjiga sažetaka. Zagreb: Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, 2018. 137-138.

Ljubić, Hana; Merkler, Ana; **Caban**, **Domagoj**; Acman Barišić, Ana; Škaro, Senka; Petrović, Karolina; Sertić, Jadranka. Molekularna ekstenzijska analiza mikrodelecija kromosoma Y u neplodnih muških ispitanika u Kliničkom bolničkom centru Zagreb // Biochemia Medica - Knjiga sažetaka. Zagreb: Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, 2018. 135-136.

Caban, **Domagoj**; Mekler, Ana; Ljubić, Hana; Acman Barišić, Ana; Špehar Uroić, Anita; Rojnić Putarek, Nataša; Sertić, Jadranka. Molekularna dijagnostika monogenskog dijabetesa u Hrvatskoj - preliminarni rezultati // Biochemia Medica - Knjiga sažetaka. Zagreb: Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, 2018. 129-130.

Merkler, Ana; Richter, Darko; Kelecic, Jadranka; Ljubic, Hana; **Caban**, **Domagoj**; Sertic, Jadranka. Genetic basis of primary immunodeficiencies in Croatian patients European Journal of Human Genetics 2013;21: Suppl. 2. European Human Genetics Conference 2013, European Society of Human Genetics, Pariz, 08.-11.06.2013. 237-237.

Caban, **Domagoj**; Merkler, Ana; Ljubić, Hana; Jakić-Razumović, Jasminka; Pleština, Stjepko; Sertić, Jadranka. The role of determining the status of KRAS gene in colorectal cancer. European Journal of Human Genetics 2013; 21: Suppl. 2. European Human Genetics Conference 2013, European Society of Human Genetics, Pariz, 08.-11.06.2013. 532-532.

Katalinic, Darko; Plestina, Stjepko; Rako, Ivana; **Caban**, **Domagoj**; Sertic, Jadranka; Jakic-Razumovic, Jasminka. Mutation Pattern of KRAS and BRAF Oncogenes and Their Comparison with Clinicopathological Features in Patients with Colorectal Cancer //European Journal of Cancer / Harry Bartelink (ur.). Stockholm: Elsevier, 2011. 403-403.