

# Hashimoto i sustav HLA (obiteljska studija)

---

**Vidak, Lara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:896544>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



zir.nsk.hr



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Lara Vidak**

**HASHIMOTO I SUSTAV HLA (OBITELJSKA STUDIJA)**

**Završni rad**

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Lara Vidak**

**HASHIMOTO I SUSTAV HLA (OBITELJSKA STUDIJA)**

**HASHIMOTO AND HLA SYSTEM (FAMILY STUDY)**

**Završni rad/Bachelor's degree**

Mentor:

**Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić**

Split, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** biomedicina i zdravstvo  
**Znanstveno polje:** kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** doc. dr. sc. Esmā Čečuk-Jeličić

### HASHIMOTO I SUSTAV HLA (OBITELJSKA STUDIJA)

Lara Vidak, 311238

#### Sažetak:

**Cilj rada:** Istražiti učestalost alela HLA sustava i haplotipskih veza kod pacijenata s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom Hashimotovog tireoiditisa kao i psorijaze.

**Materijali i metode:** Serološkom metodom mikrolimfocitotoksičnosti i molekularnom metodom PCR-SSO ispitano je devet članova obitelji ispitanice s majčine i očeve strane.

**Rezultati:** Utvrđeno je da alel HLA-B\*35, koji je odgovoran za Hashimotov tireoiditis, se prenosi s očeve strane i naslijedilo ga je troje od četvero djece. S majčine strane uočeni su aleli HLA-B\*13, -B\*17, -DRB1\*07 koji su u uskoj korelaciji sa psorijazom.

**Zaključak:** Sustav HLA ima veliku povezanost s genetski naslijednim bolestima, između ostalih i s Hashimotovim tireoiditisom i Psoriasis vulgaris. Utvrđena je prisutnost gena odgovornih za te dvije bolesti unutar obitelji. Ovaj rad pokazuje kako obiteljske studije imaju povoljne karakteristike za otkrivanje gena jer predstavljaju homogeniji i ograničeniji skup uzročnih gena i putova.

**Ključne riječi:** autoimuna bolest štitnjače; Hashimotov tireoiditis; HLA sustav; obiteljska studija

**Rad sadrži:** 52 stranice, 28 slika, 4 tablice, 18 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
University Department for Health Studies  
Medical laboratory diagnostics

**Scientific area:** biomedicine and health  
**Scientific field:** clinical medical sciences

**Supervisor:** doc. dr. sc. Esmā Čečuk-Jeličić

### HASHIMOTO AND HLA SYSTEM (FAMILY STUDY)

Lara Vidak, 311238

#### Summary:

**Objective:** To investigate the frequency of HLA system alleles and haplotype connections in patients with positive and negative family history of Hashimoto's thyroiditis as well as psoriasis.

**Materials and methods:** Nine family members from mother's and father's side of the test subject were tested using the serological method of microlymphocytotoxicity and the molecular method PCR-SSO.

**Results:** The HLA-B\*35 allele, which is responsible for Hashimoto's thyroiditis, was found to be passed on from the father's side and inherited by three out of the four children. HLA-B\*13, -B\*17, -DRB1\*07 alleles were observed on the mother's side, which are closely correlated with psoriasis.

**Conclusion:** The HLA system is highly associated with genetically inherited diseases, including Hashimoto's thyroiditis and Psoriasis vulgaris. The presence of the genes responsible for these two diseases within the family was established. This paper shows that family studies have favorable characteristics for gene discovery because they represent a more homogeneous and limited set of causative genes and pathways.

**Keywords:** autoimmune thyroid disease; family study; Hashimoto's thyroiditis; HLA system

**Thesis contains:** 52 pages, 28 figures, 4 tables, 18 references

**Original in:** Croatian

## SADRŽAJ

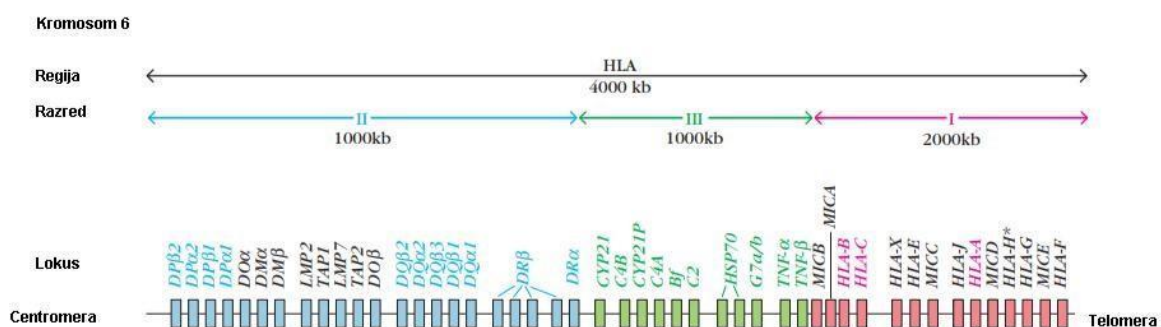
<b>1.UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. HLA SUSTAV GENA</b>	<b>1</b>
1.1.1. Antigeni HLA razreda I	1
1.1.2. Antigeni HLA razreda II	3
1.1.3. Osobitosti HLA sustava	4
1.1.4. Nomenklatura HLA sustava	5
1.1.5. Nasljeđivanje HLA gena	6
1.1.6. Dokazivanje antigena i gena	7
1.1.6.1. Serološko testiranje HLA antigena	7
1.1.6.2. Molekularno testiranje HLA gena	8
1.1.6.2.1. PCR-SSO (engl. Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotide)	8
1.1.6.2.2. PCR-SSP (engl. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Primer)	9
1.1.7. Protutijela u HLA sustavu	11
1.1.8. Značenje HLA sustava u kliničkoj praksi	12
1.1.9. HLA sustav i bolesti	13
<b>1.2. ŠTITNJAJA</b>	<b>15</b>
1.2.1. Anatomija štitnjače	15
1.2.2. Histologija štitnjače	16
1.2.3. Fiziologija štitnjače	17
1.2.4. Bolesti štitnjače	20
1.2.4.1. Hipertireoza	20
1.2.4.2. Hipotireoza	21
<b>1.3. HASHIMOTOV TIREOIDITIS (HT)</b>	<b>24</b>
1.3.1. Epidemiologija HT-a	24
1.3.2. Etiopatogeneza HT-a	24
1.3.3. Klinička slika HT-a	26
1.3.4. Dijagnoza HT-a	27
1.3.5. Liječenje HT-a	28

<b>1.4. PSORIJAZA .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5. OBITELJSKE STUDIJE.....</b>	<b>30</b>
<b>2. CILJ RADA .....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. ISPITANICI.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2. Izolacija DNA .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3. PCR-SSO (engl. <i>Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotide</i>).....</b>	<b>36</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>38</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>43</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>44</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>46</b>

# 1. UVOD

## 1.1. HLA SUSTAV GENA

Glavni kompleks tkivne snošljivosti (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC) u čovjeka naziva se HLA sustav (humani leukocitni antigeni). Humana MHC regija sadrži 252 gena, od kojih 28% ima neku ulogu u imunom sustavu. Prisutni su u svih kralježnjaka i nasljeđuju se kodominantno. Geni HLA sustava smješteni su na kratkom kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.3 i kodiraju sintezu proteina koji prezentiraju antigene imunološki kompetentnim stanicama. S obzirom na različite genske porodice, humana MHC regija dijeli se u tri razreda. Geni HLA razreda I smješteni su telomerično, razreda II centromerično, a geni HLA razreda III smješteni su između njih. O genima HLA razreda I i II ovisi sinteza antigena HLA, a razreda III sinteza komponenti komplementa (1).



Slika 1. Prikaz HLA sustava na kratkom kraku kromosoma 6. HLA razred I – crvena boja; HLA razred II – plava boja; HLA razred III – zelena boja; neklasični geni HLA razreda I i razreda II – crna boja (preuzeto s <https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A8463/datastream/PDF/view>)

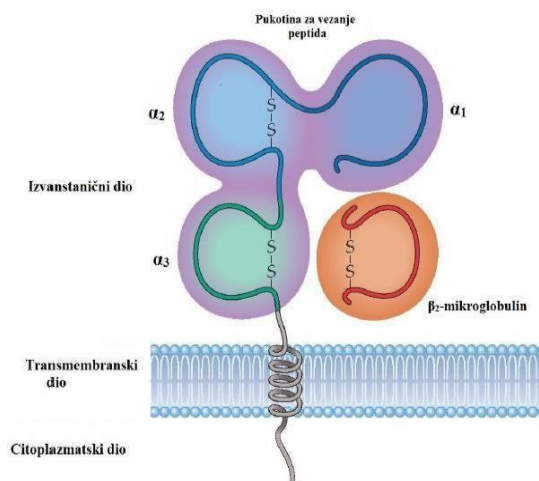
### 1.1.1. Antigeni HLA razreda I

Antigeni HLA razreda I prisutni su na stanicama koje imaju jezgru i trombocitima. Građom su glikoproteini određeni genima smještenim telomerično na kratkom kraku kromosoma 6. Klasični antigeni HLA razreda I podijeljeni su na tri



lokusa: HLA-A, HLA-B i HLA-C. Postoje i nekласični antigeni, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L i HLA-P.

Molekulu antigena HLA razreda I grade dva lanca, laki i teški. Laki lanac je  $\beta 2$  mikroglobulin koji ima ulogu učvršćivanja molekule, ne sudjeluje u prezentaciji antigena. Teški lanac građen je od 350 aminokiselina i podijeljen je u tri dijela, citoplazmatski, transmembranski i ekstracelularni s tri domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ).



Slika 2. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda I (preuzeto s <https://microbenotes.com/differences-between-mhc-class-i-and-class-ii/>)

Domena  $\alpha 3$  reagira sa staničnim receptorom citotoksičnih T limfocita (Tc). Domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  sačinjavaju sekundarnu, tzv.  $\beta$ -nabranu ploču od osam nabora. Karboksilni krajevi domena čine strukturu  $\alpha$ -uzvojnice koja oblikuje bočne strane. Na taj način stvara se utor za vezanje stranog antigena.

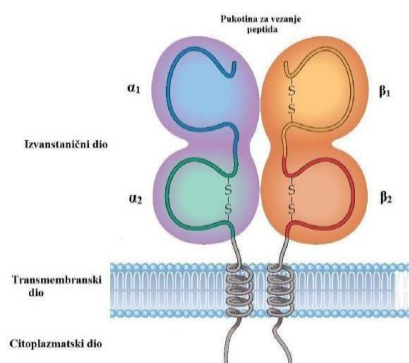
Antigeni HLA razreda I ostvaruju unutarnji put predočavanja stranog antigena. Predočuju male peptide, veličine oko devet aminokiselina. Strani antigeni razgrađuju se na peptide koji uz pomoć specifičnih prijenosnika TAP1 i TAP2 transportiraju se kroz endoplazmatski retikulum. U endoplazmatskom retikulumu odvija se sinteza HLA molekula. Peptidi i HLA molekula se vežu, prolaze kroz Golgijev kompleks i eksprimiraju na površinu stanice pomoću egzocitoze. Eksprimirane molekule prepoznaju citotoksični T limfociti pomoću antigen specifičnog receptora T. Stanični receptor T (TCR) može prepoznati antigen peptida jedino s vlastitim antigenom HLA razreda I.

Stanični receptor T (TCR) pripada superobitelji imunoglobulina. Prisutan je na citotoksičnim T limfocitima, NK i dendritičkim stanicama. Građen je od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca, a ekstracelularni dio molekule reagira s domenom  $\alpha 3$  molekula HLA razreda I (1).

### 1.1.2. Antigeni HLA razreda II

Antigeni HLA razreda II određeni su genima smještenim centromerično na kratkom kraku kromosoma 6. Podijeljeni su u više podregija: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM i HLA-DX. Svaka podregija sadrži gene kojima je kodirana sinteza  $\alpha$  i  $\beta$  lanca. U regiji se nalaze brojni pseudogeni čija je funkcija još uvijek nepoznata.

Molekulu antigena HLA razreda II grade  $\alpha$  i  $\beta$  lanac. Ekstracelularni dio molekule sadrži četiri domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$ ). Molekula je podijeljena na četiri regije. Prvu regiju sačinjavaju domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , ona je najpolimorfnija s obzirom da domene sačinjava oko 90 aminokiselina. N-terminalni krajevi domena  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  čine pukotinu strukturno sličnu pukotini antigena HLA razreda I, koja je vezno mjesto za peptid. Krajevi pukotine su otvoreni tako da se mogu vezati i peptidi koji sadrže više od 30 aminokiselina. Drugu regiju čine nepromjenjive domene  $\alpha 2$  i  $\beta 2$ , slična je imunoglobulinu. Domena  $\beta 2$  je mjesto vezanja pomoćničkih T limfocita. U trećoj regiji, transmembranskoj, nalaze se hidrofobne aminokiseline. Četvrta regija je citoplazmatska, na njoj se nalazi mjesto za fosforilaciju i odgovorna je za vezanje molekule za elemente citoskeleta (1).

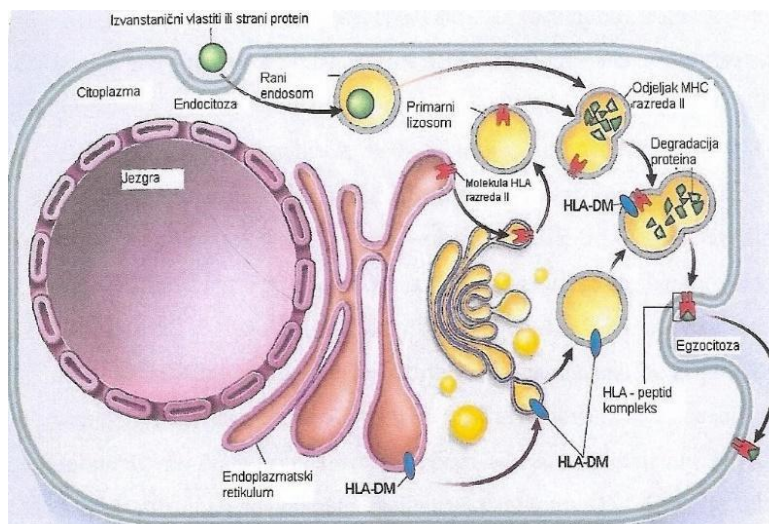


Slika 3. Shematski prikaz građe molekule HLA razreda II (preuzeto s <https://microbenotes.com/differences-between-mhc-class-i-and-class-ii/>)

Veliki značaj za sintezu molekule HLA razreda II ima nepolimorfni peptid, “invarijantni” lanac koji se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu. On određuje

mjesto vezanja peptida na antigen molekule HLA razreda II. “Invarijantni” lanac veže se umjesto endogenog peptida u antigenu HLA razreda II i tako sprječava njegovo vezanje. Kada bi se endogeni peptid vezao na antigen HLA razreda II, antigeni HLA razreda I i razreda II prezentirali bi peptide iste vrste.

Antigeni HLA razreda II ostvaruju egzogeni put predočavanja antigena. Put predočavanja stranog antigena započinje fagocitozom. Strani antigen prodire u fagosom koji se spoji s lizosomom u fagolizosom. U fagolizosomu antigen se razgrađuje na male peptide do 30 aminokiselina. Paralelno s tim, u endoplazmatskom retikulumu počinje sinteza HLA molekule. Sintetizirana HLA molekula prenosi se u fagolizosom. U fagolizosomu se od HLA molekule odcjepljuje “invarijantni” lanac koji veže antigeni peptid. Zatim se HLA molekula i vezani antigen transportiraju na staničnu membranu antigen predočne stanice. To je mehanizam kojim se antigen prezentira pomoćničkim T limfocitima. Oni prepoznaju kompleks antigen-vlastiti HLA antigen i započinju imunološku reakciju, sekreciju interleukina, kemokina i ostalih citokina (1).



Slika 4. Vezanje peptida i HLA molekule razreda II (preuzeto s [https://cdn.ymaws.com/www.ashi-hla.org/resource/resmgr/docs/2013\\_ISS\\_PDF%27s/ISS\\_Sep\\_2013\\_Mytilineos\\_EFI\\_.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.ashi-hla.org/resource/resmgr/docs/2013_ISS_PDF%27s/ISS_Sep_2013_Mytilineos_EFI_.pdf))

### 1.1.3. Osobitosti HLA sustava

HLA sustav ima visoki stupanj raznolikosti. HLA geni smatraju se najpolimorfnijim genima u čovjeka. Za neke gene moguće je pronaći i do tisuću različitih alela po jednom lokusu. Najvažniji čimbenik polimorfnosti je prirodna

selekcija. Imunološki sustav je glavna poveznica s HLA sustavom. Sve klasične HLA molekule prikazuju antigenske determinante T limfocitima. Razlikuju se samo u domenama ovisnim o specifičnosti gena koji ih kodiraju. Polimorfizam je najprisutniji u domenama odgovornim za vezanje antigena te odnos varijabilnih regija HLA molekule i receptora na T limfocitima. Zamjena jedne molekule mijenja afinitet vezanja antigena i tako usporava ili ubrzava reakciju imunološkog sustava. Varijabilnost HLA sustava smanjuje vjerojatnost da će patogeni peptid zaobići imunološki sustav.

HLA sustav ima i obilježje kodominantnosti. Od svakog roditelja se nasljeđuje jedan haplotip koji zajedno tvore HLA genotip. Nerekombinantni aleli nemaju par na drugom kromosomu i zato se nasljeđuju skupa pravilnom segregacijom. Dijete ima 50% šanse naslijediti neki alel roditelja koji je heterozigot.

Još jedna osobitost HLA sustava je niska učestalost “crossing over”-a. To je zamjena dijelova kromatida tijekom diobe spolnih stanica. U HLA genima se rijetko pojavljuje zato što su pojedini lokusi blizu smješteni.

HLA sustav karakterizira križna reaktivnost (engl. *Cross-Reactivity*). Ona označava reakciju jednog antitijela s više različitih antigena.

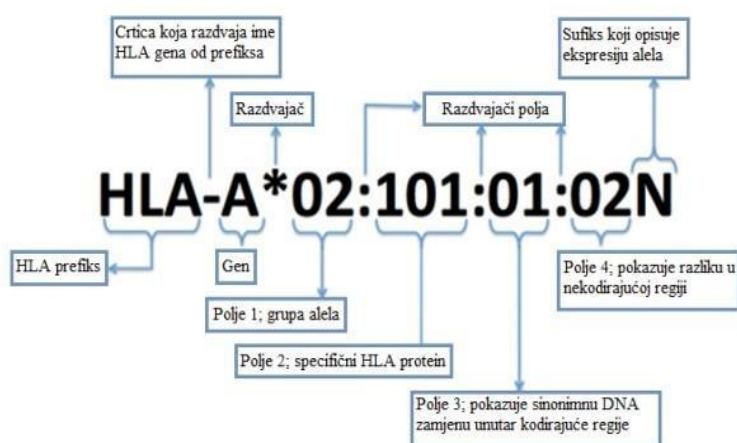
Aleli HLA sustava imaju snažnu neravnotežu udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*) što znači da susjedni aleli usko povezanih lokusa javljaju se češće u istom haplotipu od očekivanog s obzirom na njihove pojedinačne učestalosti u populaciji (2). Primjerice, aleli HLA-DQB1 i HLA-DRB1 se često nasljeđuju skupa.

Bitna karakteristika HLA sustava je nepravilna tkivna specifičnost. HLA molekule se skupljaju na limfatičkom tkivu, stanicama, tkivima i organima uključenima u imunološku reakciju. S druge strane, jako je malo HLA molekula u masnom i mišićnom tkivu te središnjem živčanom sustavu (3).

#### **1.1.4. Nomenklatura HLA sustava**

HLA sustav obuhvaća gene smještene na kraćem kraku šestog kromosoma. Dijeli se na dva razreda. Razredu I pripadaju lokusi HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L i HLA-P, a razredu II HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM i HLA-DX. Kod seroloških testiranja nakon naziva lokusa slijedi brojana oznaka specifičnog antigena kojeg kodira navedeni lokus, taj broj se piše prije dvotočke, bez nule. Kod molekularnih testiranja imenovanje je

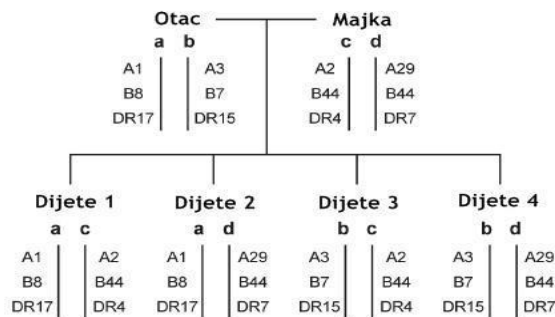
drugačije. Svaki alel ima kod od najmanje četiri seta brojeva odijeljena dvotočjem. Oznaka “\*” razdvaja identifikacijski broj alela od lokusa. Sljedeći broj nakon njega obilježava podtip gena, a posljednja dva seta brojeva ukazuju na postojanje mutacije gena. Na kraju imena može se nalaziti slovo koje označava ekspresiju alela; N označava nul alel (bez ekspresije), L označava nisku ekspresiju, S označava izlučeni alel, C označava alel izlučen unutar citoplazme, Q označava neodređenu ekspresiju i A označava nepravilnu ekspresiju (3).



Slika 5. Imenovanje HLA gena određenih molekularnom metodom (preuzeto s <http://hla.alleles.org/nomenclature>)

### 1.1.5. Nasljeđivanje HLA gena

HLA geni nasljeđuju se kodominantno prema Mendelovim pravilima (4). Svaka osoba ima dva alela za jedan lokus, po jedan naslijeđen od svakog roditelja (5). Set alela na kromosomu predstavlja haplotip, a osoba može biti homozigot ili heterozigot. Ukoliko je osoba od oba roditelja naslijedila isti alel, naziva se homozigot, ukoliko je naslijedila različite alele, naziva se heterozigot (6). HLA sustav ima nisku razinu rekombinacije koja ipak uvelike utječe na nove kombinacije gena.

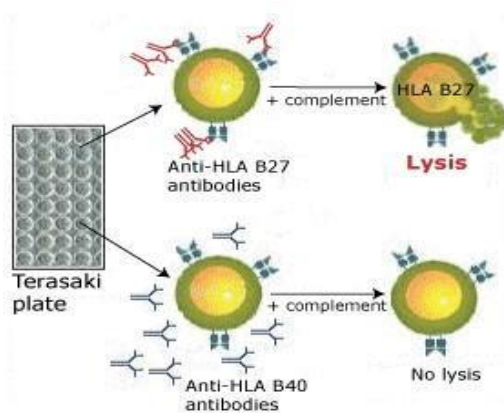


Slika 6. Shematski prikaz nasljeđivanja gena, odnosno haplotipova HLA u obitelji.  
(preuzeto i prilagođeno iz (7))

## 1.1.6. Dokazivanje antigena i gena sustava HLA

### 1.1.6.1. Serološko testiranje HLA antigena

Iz krvi uzete u epruvetu s heparinom odvoje se limfociti na gradijentu gustoće. Nakon podešavanja gustoće limfociti ispitanika dodaju se u Terasakijeve pločice u kojima su serumi poznate specifičnosti. Nakon inkubacije (seruma poznate specifičnosti i limfocita ispitanika) dodaje se kunićji komplement koji se povezuje s protutijelom tog kompleksa i oštećuje membranu stanice. Sljedeći korak je dodavanje tripanskog modrila koje prodire u stanicu. Pod mikroskopom se vidi obojenje stanice koje se očitava kao pozitivna reakcija. Kod negativne reakcije nema obojenja. Jačina reakcije označava se brojevima između jedan i osam. Broj jedan označava negativni rezultat, a osam jaki pozitivni rezultat. Ukoliko je potreban trajniji preparat, stanice se boje eozinom i fiksiraju formaldehidom, pa se očitavanje može obaviti i sljedeći dan (8).



Slika 7. Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti

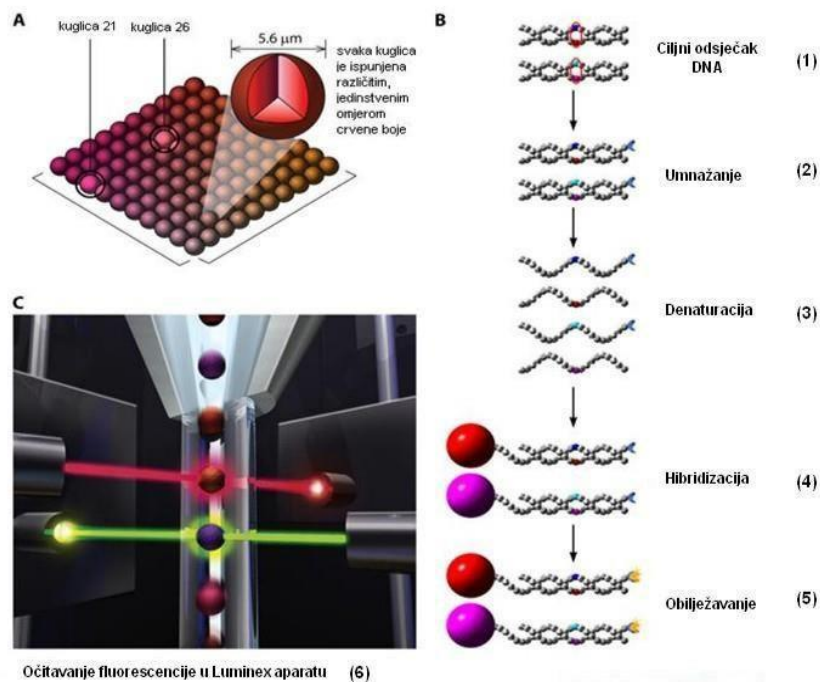
(preuzeto s [http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA\\_typing/serology.php](http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA_typing/serology.php))

### *1.1.6.2. Molekularno testiranje HLA gena*

Prvi korak molekularnog testiranja gena HLA sustava je izolacija DNA. DNA se izolira iz uzorka periferne krvi u epruveti s antikoagulansom EDTA. Nakon izolacije DNA slijedi PCR, lančana reakcija polimerazom. PCR je reakcija umnažanja dijela DNA pomoću Taq polimeraze uz prisustvo specifičnih oligonukleotidnih početnica (engl. *primer*) koje prepoznaju komplementarne dijelove DNA i vežu se za njih. Za odabir odgovarajućih početnica potrebno je poznavati nukleotidni slijed dijela sekvence ciljane DNA kojeg se želi umnožiti. Mješavina DNA, nukleotida i početnica zagrijava se na 94° kako bi se DNA denaturirala, tj. dvostruka zavojnica odmotala. Zatim se početnice vežu na komplementarne dijelove DNA, a Taq polimeraza sintetizira određeni HLA gen. Nakon 36 ciklusa od jedne molekule DNA koja služi kao kalup dobije se 2<sup>36</sup> (68 bilijuna) kopija gena. Umnoženi dijelovi DNA se separiraju na 2% agaroznom gelu te se dokumentira nalaz snimanjem gela fotografskom kamerom (8).

#### *1.1.6.2.1. PCR-SSO (engl. Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotide)*

Tehnologija Luminex temelji se na korištenju mikronskih polistirenskih mikrosfera (kuglica). Svaka mikrosfera je interno obojena jedinstvenom kombinacijom infracrvene i crvene boje. Kombinacijom intenziteta dviju boja omogućuje se identifikacija svake mikrosfere po jedinstvenom potpisu nakon što je pobuđena laserskom zrakom. Kemijska površina mikrosfere omogućuje im kemijsko presvlačenje nizom različitih meta, uključujući HLA DNA sekvence i cijele HLA antigene. Mikrosfere mogu se koristiti za ispitivanje prisutnosti HLA lokusa u uzorku. Uređaj Luminex radi na principu protočne citometrije i očitava različite intenzitete obojenja. Crveni laser pobuđiva i identificira određene mikrosfere, a zeleni laser služi za pobuđivanje i identifikaciju. Rezultati se pregledavaju na za to predviđenim softverima (9).



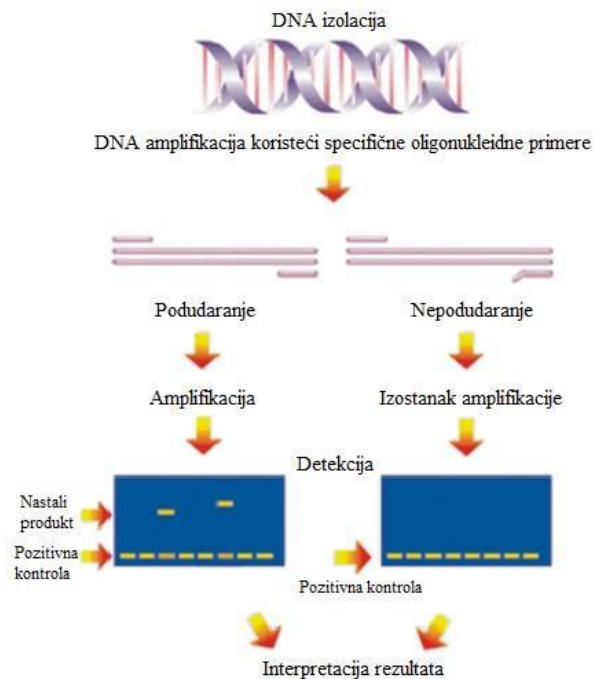
Slika 8. Shematski prikaz PCR-SSO metode korištenjem uređaja Luminex. A) prikaz mikrosfera (kuglica); B) prikaz postupaka PCR-SSO metode; C) prikaz očitavanja u uređaju Luminex (preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Suspension-bead-array-A-Microspheres-56-m-in-diameter-are-filled-with-different\\_fig8\\_26888549](https://www.researchgate.net/figure/Suspension-bead-array-A-Microspheres-56-m-in-diameter-are-filled-with-different_fig8_26888549))

#### 1.1.6.2.2. PCR-SSP (engl. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Primer)

PCR-SSP metoda služi za određivanje HLA gena visoke rezolucije (četiri znamenke). Temelj metode su lančana reakcija polimeraze i specifične početnice za određeni alel ili skupinu alela. Da bi došlo do umnožavanja, specifične početnice moraju odgovarati slijedu nukleotida ispitivane DNA ili će rezultat biti negativan.

Elektroforezom na agaroznom gelu u boji provjerava se umnožavanje fragmenata. Rezultate reakcije dokumentira se fotografijom u tamnoj komori. Reakcija se karakterizira kao negativna ili pozitivna ovisno o veličini produkata PCR-a. Rezultati se pregledavaju u za to predviđenim programima (9).





Slika 9. PCR-SSP metoda

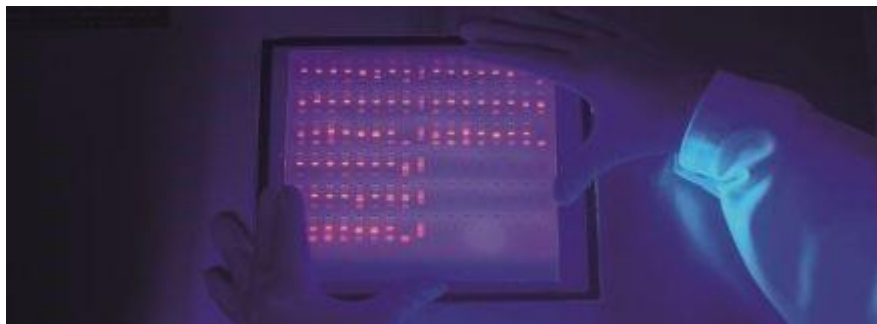
(preuzeto s: <http://www.topdiag.com/top/0.27.tipizare-hla-ssp.html?sLang=en>)

Poslije izolacije DNA iz uzorka pune krvi pravi se reakcijska smjesa. Reakcijska smjesa sadrži Master Mix s Taq polimerazom, destiliranu vodu i uzorak DNA. Smjesa se pipetira u jažice pločice u kojima je dehidrirana otopina početnica. Pločica se stavlja u termoblok za amplifikaciju DNA.



Slika 10. Fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split

Umnoženi fragmenti razdvajaju se gel elektroforezom skupa s bojom (etidnim bromidom) i vizualiziraju se pod UV svjetlom. Pozitivna kontrola je bitna za određivanje nastalih produkata, a negativna kontrola za procjenu kvalitete izvedenog testa. Rezultati se pregledavaju u za to predviđenom programu (9).



Slika 11. Vizualizacija rezultata PCR-SSP analize (preuzeto s: <http://www.allenex.com/sv/transplantation/olerup-ssp>)

### 1.1.7. Protutijela u HLA sustavu

Protutijela anti-HLA su alopotutijela koja se stvaraju nakon kontakta imunoloških stanica sa stranim HLA antigenom. Uzrok senzibilizacije su trudnoće, transfuzije krvi te transplatacije tkiva i organa. Najčešće pripadaju IgG imunoglobulinima te aktiviraju komplement. Prisustvo IgM imunoglobulina može biti znak početne senzibilizacije, ali najčešće se radi o auto-protutijelima koja nemaju značajno kliničko značenje u transplataciji tkiva i organa.

Donor-specifična protutijela uzrok su odbacivanja presatka. Zbog toga se sve bolesnike koji čekaju transplataciju svaka četiri mjeseca testira na prisustvo limfocitotoksičnih protutijela i određuje se panel reaktivnih protutijela (% PRA). Prisustvo protutijela dokazuje se testom mikrolimfocitotoksičnosti ovisnim o komplementu (engl. *Complement Dependent Cytotoxicity*, CDC) s i bez dodatka ditiotreitola (DTT). DTT reducira IgM protutijela u uzorku seruma bolesnika koja nemaju kliničko značenje. Osim testa citotoksičnosti ovisne o komplementu, za dokazivanje prisustva anti-HLA protutijela koriste se i osjetljivije metode, ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), protočna citometrija i Luminex tehnologija kojom se dokazuje prisustvo samo IgG protutijela (1).

### 1.1.8. Značenje HLA sustava u kliničkoj praksi

Antigeni sustava HLA imaju veliko kliničko značenje u transplataciji tkiva i organa, transfuzijskoj medicini, forenzičkoj medicini, dijagnostici mnogih autoimunih bolesti, genetičkim istraživanjima, istraživanjima migracija stanovništva i dokazivanju ili osporavanju očinstva.

Bolesnik kojem se transplatira organ ne smije imati protutijela protiv antigena sustava HLA kojeg nosi davatelj organa. Prije transplatacije obavezno se izvodi križna reakcija testom mikrolimfocitotoksičnosti tehnikom CDC s i bez DTT-a zato što pri prisustvu anti-HLA protutijela dolazi do hiperakutnog odbacivanja presatka čim se uspostavi cirkulacija. Negativna križna reakcija znači da u serumu bolesnika nisu prisutna anti-HLA protutijela i organ se može transplantirati, a pozitivna križna reakcija je kontraindikacija za transplataciju.

Budući da se HLA antigeni nalaze na leukocitima i trombocitima, sustav HLA ima značajno mjesto u transfuzijskoj medicini. Transfuzije trombocita koriste se u liječenju bolesnika s trombocitopenijom, a transfuzije granulocita u liječenju bolesnika s granulocitopenijom koji su životno ugroženi teškom infekcijom. Trombocitopenija može biti posljedica jakog krvarenja, primjene kemoterapije ili hematoloških bolesti. Koncentrati trombocita dobivaju se od zdravih davatelja krvi selektivnim centrifugiranjem pune krvi ili procesom trombaferenze. Procesom trombaferenze dobiva se terapijska doza trombocita od jednog davatelja koja je ekvivalentna "pool"-u koncentrata trombocita koji se dobije od četiri do šest davatelja. Trombociti na sebi nose trombocitne antigene i antigene HLA razreda I. Anti-HLA aloprotutijela se stvaraju kao posljedica senzibilizacije prethodnim transfuzijama ili trudnoćom. Ta protutijela mogu reagirati s antigenima na trombocitima i dovesti do razvoja refrakternosti, nedostatka porasta broja trombocita nakon transfuzije trombocita. Leukociti su snažan senzibilizirajući čimbenik, zbog toga se u liječenju bolesnika koriste metode odstranjivanja leukocita iz koncentrata trombocita i dobivaju se filtrirani trombociti. Ukoliko su već stvorena protutijela, preporuka je davati HLA podudarne trombocite. Koncentrati granulocita se dobivaju postupkom afereze nakon što se davatelj tretira faktorom rasta kolonija granulocita (G-CSF, engl. *Colony Stimulating Factor*) (1). Potrebno je prethodno ispitati serum bolesnika na prisustvo anti-HLA protutijela te ako su prisutna, bolesniku je potrebno davati transfuzije granulocita

dobrovoljnih darivatelja krvi kojima su određeni HLA antigeni razreda I, aleli HLA sustava i paziti da darivatelji ne sadrže antigene ili alele na koje se bolesnik senzibilizirao. Pravilo vrijedi i za pacijente na listi čekanja za transplantaciju solidnih organa i tkiva.

### **1.1.9. HLA sustav i bolesti**

HLA sustav povezuje se s najviše bolesti od svih genetskih sustava. Uglavnom je povezan s autoimunim bolestima, ali i s ostalim bolestima kao što su kronična limfatična leukemija, tumor jajnika i kronična infekcija hepatitisom C (10). Osoba koja nosi gen povezan s određenom bolešću ima veću šansu za oboljenje od osobe koja nije nosioc tog gena. Međutim, prisutnost gena ne mora uvijek uzrokovati bolest.

Postoje dva objašnjenja povezanosti HLA sustava i bolesti. Prvo objašnjenje temelji se na neravnotežom udruživanju alela lokusa odgovornog za nastanak bolesti i HLA gena povezanog s bolesti. Drugo objašnjenje obuhvaća četiri modela djelovanja HLA molekula odgovornih za nastanak bolesti. Prvi model predlaže da HLA molekula nedovoljno jako predočuje virusni ili bakterijski antigen, a drugi da HLA molekula na površini stanice služi kao vezno mjesto za virusni ili bakterijski antigen. Treći model navodi da HLA molekula omogućuje transport virusnoj ili bakterijskoj čestici u stanicu. U četvrtom modelu imunološke stanice ne prepoznaju strani antigen kao patogen zbog molekularne podudarnosti HLA molekule i patogena. Pretpostavlja se da mehanizam nastanka bolesti uključuje sva četiri modela u različitim mjerama ovisno o bolesti.

Tablica 1. Bolesti povezane s HLA sustavom (preuzeto iz Gough i Simmonds, 2007)

Utjecaj HLA razreda II		AUTOIMUNA BOLEST	Utjecaj HLA razreda I	
Podložni	Zaštitni		Podložni	Zaštitni
		<b>Ankilozantni spondilitis</b>	B*27:02 B*27:30 B*27:04 B*27:05	B*27:06 B*27:09
DR3 DRB1*08	DR7	<b>Gravesova bolest</b>	C*07 B*08	C*16 C*03 B*44
DR4 DR3	DR7	<b>Hashimotov tiroiditis</b>		
DR3		<b>Mijastenija gravis</b>		
DR3		<b>Addisonova bolest</b>		
Zajednički epitopi DRB1*01:01 DRB1*01:02 DRB1*04:01 DRB1*04:04 DRB1*04:05 DRB1*04:08 DRB1*10:01 DRB1*14:02	DRB1*01:03 DRB1*07:01 DRB1*12:01 DRB1*13:01 DRB1*15:01	<b>Reumatoidni artritis</b>		
DQ2 DQ8		<b>Celijakija</b>		
DR15	DR14	<b>Multipla skleroza</b>	C*05 C*15	C*01
DR3 DR4 DQB1 pozicija β57	DR15 DR14	<b>Šećerna bolest tipa 1 (DMT1)</b>	B*39 B*18 A*24	A*01 A*11 A*31
DR3 DR8 DR15		<b>Sistemska lupus eritematodes</b>		

## 1.2. ŠTITNJAČA

### 1.2.1. Anatomija štitnjače

Štitnjača (lat. *glandula thyroidea*) najveća je žlijezda s unutrašnjim izlučivanjem. U odraslih ljudi ima prosječnu masu između 15 i 20 grama te prosječni volumen između 15 i 30 cm<sup>3</sup>. Nalazi se s prednje strane vrata, paralelno s donjim dijelom grkljana i gornjim dijelom dušnika. Grade je desni i lijevi režanj (lat. *lobus dexter* i *lobus sinister*) povezani uskim i tankim dijelom, istmusom (lat. *isthmus glandulae thyroideae*). To daje štitnjači karakteristični oblik leptira ili slova H. U 50% slučajeva u štitnjači se nalazi i treći režanj, piramidalni (lat. *lobus pyramidalis*). On se nalazi između jednog od režnjeva ili istmusa i jezične kosti (11).



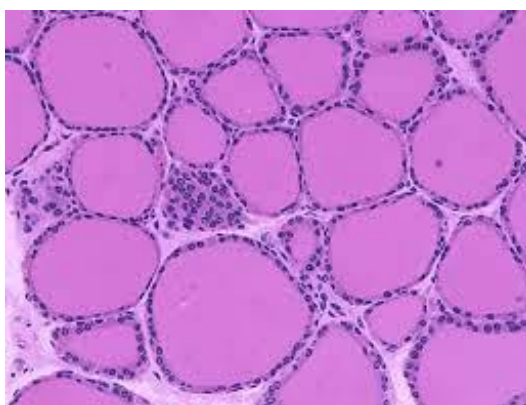
Slika 12. Štitnjača (preuzeto s <https://www.touchendocrinology.com/thyroid>)

Štitnjača ima dvije ovojnice. Vanjska ovojnica (lat. *capsula fibrosa*) dio je srednjeg lista vezivne ovojnice vrata. Obavija štitnjaču s lateralnih strana i s prednje strane, deblja je od unutarnje ovojnice. Čvrsto je vezana uz dušnik i grkljan, a s okolnim je tvorbama vezana slabije. Posljedično, štitnjača prati kretanje dušnika i grkljana, a pokretna je u odnosu na ostale tvorbe. Unutarnja ovojnica omeđuje štitnjaču sa svih strana, čvrsto prijanja uz nju i tanja je od vanjske. Građena je od vezivnog tkiva. Iz vezivnog tkiva pružaju se tračci duboko unutar tkiva štitnjače i dijele je na manje režnjice (lat. *lobuli glandulae thyroideae*). Između vanjske i unutarnje ovojnice smještene su dvije donje i dvije gornje doštitne žlijezde, štitaste arterije i vene koje također ulaze u tkivo štitnjače (11).

Štitnjača je jako dobro prokrvljena. Minutni volumen krvi koji proteče kroz štitnjaču pet je puta veći od njene mase. Krvlju je opremaju dvije parne arterije, gornja i donja štitasta arterija (lat. *a. thyroidea superior* i *a. thyroidea inferior*), a u 10% slučajeva može biti prisutna najdonja štitasta arterija (lat. *a. thyroidea ima*) kao peta krvna žila. Krv iz štitnjače odvede srednje i gornje štitaste vene (lat. *v. thyroideae mediae* i *v. thyroideae superiores*) koje se slijevaju u unutarnju jugularnu venu (lat. *v. jugularis interna*), i donja štitasta vena (lat. *v. thyroideae inferior*) koja se slijeva u lijevu branhiocefaličnu venu (lat. *v. brachiocephalica sin*) (11).

### 1.2.2. Histologija štitnjače

Osnova građevna jedinica tkiva štitnjače je folikul. Folikul je okrugla zatvorena struktura različitih veličina, promjera između 100 i 300  $\mu\text{m}$ . Obavijen je mrežom krvnih i limfnih kapilara. Ispunjen je koloidom, a obložen folikularnim epitelnim stanicama koje izlučuju tireoglobulin u folikul. Tireoglobulin je glavna sastavnica koloida. Folikularne stanice su niske cilindrične, kubične ili pločaste. Aktivnost štitnjače uvjetuje izgled folikularnog epitela. Ukoliko je štitnjača aktivna, folikuli će biti izgrađeni od folikularnih cilindričnih stanica, a kod smanjene aktivnosti štitnjače prevladat će folikularne pločaste ili kubične stanice. U štitnjači se također nalaze parafolikularne ili C stanice uključene u folikularni epitel ili intersticij. One su nešto svjetlije i veće od folikularnih stanica i izlučuju kalcitonin. Kalcitonin je hormon koji pomaže u regulaciji koncentracije kalcija u krvi (11).



Slika 13. Mikroskopski prikaz tkiva štitnjače, hematoksilin-eozin bojanje (preuzeto s [http://medcell.org/histology/endocrine\\_systems\\_lab/thyroid.php](http://medcell.org/histology/endocrine_systems_lab/thyroid.php))

### 1.2.3. Fiziologija štitnjače

Najvažnija funkcija štitnjače je izlučivanje hormona tiroksina ( $T_4$ ) i trijodtironina ( $T_3$ ). Oba su hormona pohranjena u koloidu, vezana na tireoglobulin. Tireoglobulin je glikoprotein relativne molekularne mase od 330 kDa na kojem se odvija proces stvaranja hormona štitnjače. U jednoj molekuli tireoglobulina nalazi se otprilike 70 aminokiselina tirozina koje povezivanjem s oksidiranim jodom sačinjavaju hormone štitnjače.

Proces sinteze hormona štitnjače započinje sintezom tireoglobulina u folikularnim stanicama i izlučivanjem unutar lumena folikula. Stvaranje tireoglobulina započinje u hrapavom endoplazmatskom retikulumu, potom se u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom kompleksu nadodaju ugljikohidrati, u konačnici se iz sekretornih mjehurića tireoglobulin luči u lumen folikula. Drugi stupanj u sintezi hormona štitnjače je prenošenje jodida iz krvi u unutrašnjost folikularne stanice. Prijenos se odvija uz pomoć sunosača jodida i natrija koji prenosi jedan jodidni ion i dva iona natrija kroz bazalnu membranu do unutrašnjosti stanice. Pošto je u krvi manja koncentracija joda nego unutar folikularnih stanica, energija za prenošenje jodida u stanicu protiv koncentracijskog gradijenta potječe iz natrij-kalij ATPazne crpke uz pomoć koje se natrij izbacuje iz stanice. Tako se postiže niža koncentracija natrija u stanici koja omogućuje olakšani prijenos natrija i jodida u stanicu. Jodidi se iz folikularnih stanica preko apikalne membrane prenose u folikul uz pomoć ionskog nosača koji se zove pendrin. Na apikalnoj membrani je peroksidaza, enzim koji s vodikovim peroksidom poboljšava oksidaciju jodida. Oksidirani jodid se zatim može povezati s tirozinom na tireoglobulinu. Na dodirnom mjestu koloida i apikalne membrane folikularne stanice događa se organifikacija tireoglobulina, odnosno vezanje oksidiranog jodida na tirozinske ostatke na tireoglobulinu. Jodiranje tirozinskih ostataka je ubrzano posredstvom peroksidaze i traje par sekundi ili minuta. Jodiranjem tirozina stvaraju se molekule monojodtirozina i dijodtirozina koje se ubrzo počnu međusobno vezati. Spajanjem dviju molekula dijodtirozina nastaje molekula  $T_4$ , dok spajanjem molekule monojodtirozina i dijodtirozina nastaje molekula  $T_3$ . Sintetizirani hormoni se pohranjuju u folikulima na tireoglobulinu. Pohranjene zalihe hormona su dovoljne za normalnu opskrbu tijela hormonima naredna dva do tri mjeseca.



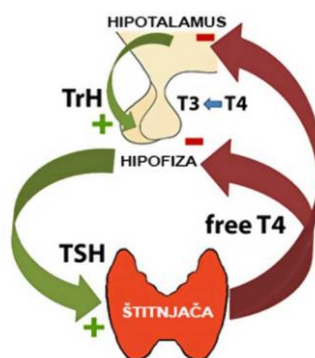
Hormoni štitnjače se otpuštaju s molekule tireoglobulina kad se tireotropin (engl. *thyroid stimulating hormone*, TSH) veže za specifične receptore koji se nalaze na bazalnoj membrani stanice. TSH je hormon iz adenohipofize koji stimulira lučenje hormona iz štitnjače. Folikularne stanice unose dijelove koloida u stanicu na podražaj TSH-om. Pinocitozni mjehurići se u staničnoj citoplazmi stapaju s lizosomima. Djelovanjem enzima proteaza koje su sastavni dio lizosoma, s molekule tireoglobulina se u citoplazmu oslobađaju T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, monojodtirozin i dijodtirozin. Slobodni hormoni T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub> prolaze staničnu membranu i otpuštaju se u kapilare. Monojodtirozin i dijodtirozin se ne otpuste u krv nego se uz pomoć enzima dejodaze s njihovih molekula ukloni jod. Dejodirani tirozin i uklonjeni jod se mogu ponovno koristiti u folikularnim stanicama u ponovnom ciklusu sinteze hormona štitnjače.

T<sub>3</sub> čini otprilike 7%, a T<sub>4</sub> 93% hormona štitnjače otpuštenih u krv. Ali je djelovanje T<sub>3</sub> četiri puta brže i jače od T<sub>4</sub>. Uz to, pola molekula T<sub>4</sub> se dejodira u krvi te nastaju novosintetizirane molekule T<sub>3</sub>, dakle više hormona T<sub>3</sub> dospije u ciljna tkiva. Hormoni štitnjače su hidrofobne molekule, pa se u plazmi uglavnom vežu na proteinske nosače i tako se prenose do ciljnih mjesta. Udio slobodnih hormona štitnjače je jako mali, 0.3% za T<sub>3</sub> i 0.03% za T<sub>4</sub>. Globulin koji veže tiroksin (engl. *thyroxin binding globulin*, TBG) je glavni proteinski nosač na kojeg se vezuje većina hormona štitnjače. U manjoj mjeri se vežu i na transtiretin (TTR, prealbumin koji vezuje tiroksin) i albumin. Učinak hormona T<sub>4</sub> je sporiji od T<sub>3</sub> zato što se hormoni izrazito polako otpuštaju s nosača u ciljne stanice. Poluvrijeme života u krvi T<sub>3</sub> je jedan dan, a T<sub>4</sub> sedam dana. Ulaskom u ciljne stanice, hormoni se vezuju za unutarstanične proteine, T<sub>4</sub> jače od T<sub>3</sub>. Tako se hormoni spremaju u željenim stanicama i sporo otpuštaju u narednom razdoblju. U ciljnim stanicama također se događa dejodiranje većine molekula T<sub>4</sub>, tako da se skoro sav T<sub>4</sub> pretvara u T<sub>3</sub>.

Hormoni štitnjače stimuliraju transkripciju raznih gena u jezgri skoro svih stanica u organizmu, a novosintetizirani proteini imaju mnogobrojne utjecaje na organizam čime se povećava stanični metabolizam u cijelom organizmu. Pretjerano izlučivanje hormona štitnjače može pojačati bazalni metabolizam između 60% i 100%. Hormoni štitnjače imaju poboljšani utjecaj na metabolizam ugljikohidrata ubrzanjem apsorpcije glukoze te povećanjem glukoneogeneze i glikolize. Prekomjerno izlučivanje hormona štitnjače također uzrokuje smanjenu koncentraciju fosfolipida, triglicerida i

kolesterola u plazmi, ali povećanu koncentraciju slobodnih masnih kiselina. Potiču razvitak mozga u fetalnom periodu i početnim godinama života te rast djece. Povećana koncentracija hormona štitnjače utječe na smanjenje tjelesne težine, ali i povećanje apetita i pojačano lučenje probavnih sokova. Hormoni štitnjače pojačavaju prokrvljenost skoro svih tkiva u organizmu, minutni srčani volumen i srčanu kontraktilnost. Djeluju na živčani sustav tako što prekomjerno lučenje hormona ponekad uzrokuje nervozu i anksioznost, a premalo lučenje hormona usporava mentalne funkcije.

Izlučivanje hormona štitnjače kontrolirano je lučenjem TSH iz adenohipofize uz pomoć mehanizma povratne sprege. TSH povećava izlučivanje hormona  $T_4$  i  $T_3$  tako što poboljšava proteolizu tireoglobulina unutar folikularnih stanica, pospješuje prenošenje jodida iz krvi, pojačava organifikaciju tireoglobulina i povećava broj, volumen i sekretornu djelatnost folikularnih stanica. Ako je koncentracija  $T_4$  i  $T_3$  povećana u tjelesnim tekućinama, smanjuje se lučenje TSH iz adenohipofize, čime se smanjuje i izlučivanje  $T_4$  i  $T_3$  iz štitnjače. To je mehanizam kojim je omogućeno održavanje adekvatne koncentracije hormona štitnjače unutar tjelesnih tekućina nužne za metaboličku aktivnost u organizmu. TSH je pod utjecajem tireoliberina (TRH, hormon koji oslobađa tireotropin) kojeg izlučuje hipotalamus. TRH se prenosi do hipofize hipotalamično-hipofiznim krvnim žilama. Tamo se veže na membranu hipofiznih stanica za specijalne TRH hipofizne receptore, što dovodi do izlučivanja TSH iz hipofiznih stanica. Ako dođe do prekida veze između adenohipofize i hipotalamusa, izlučivanje TSH će se značajno smanjiti, ali neće prestati (11).



Slika 14. Regulacija izlučivanja hormona štitnjače  
(preuzeto s <https://odaberizdravlje.hr/stitnjaca/>)

#### 1.2.4. Bolesti štitnjače

Održavanje adekvatne koncentracije hormona štitnjače nužno je za ispravno funkcioniranje cijelog tijela. Ako štitnjača izlučuje previše ili premalo hormona, doći će do patološkog stanja, hipertireoze ili hipotireoze.

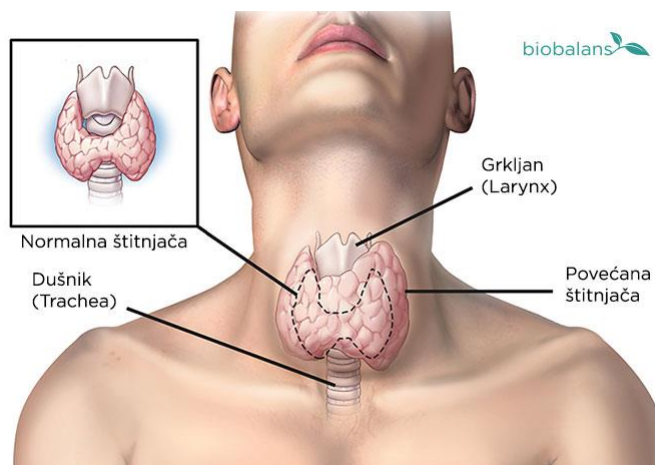
##### 1.2.4.1. Hipertireoza

Hipertireoza označava povećanje sinteze i izlučivanja hormona štitnjače. Usljed povećanog izlučivanja hormona dolazi do patofizioloških promjena u raznim organskim sustavima. Te promjene uzrokuju niz simptoma bolesti: nervozu, palpitacije, pojačano znojenje, nepodnošenje topline, dispneju u naporu, osjećaj slabosti, umor, tople i vlažne dlanove, tremor ruku, tahikardiju, povećan apetit, smanjenje tjelesne težine i učestalije stolice.

Gravesova ili Basedowljeva bolest najčešći je uzrok hipertireoze. U zemljama s dovoljnim unosom joda prevladava Gravesova bolest. To je autoimuna bolest koju uzrokuje kombinacija okolišnih i genetskih čimbenika. Glavno obilježje Gravesove bolesti je sinteza stimulirajućih protutijela za TSH receptore (engl. *thyroid stimulating antibodies*, TSA<sub>t</sub>). Antitijela se vezuju na iste receptora na površini bazalne membrane folikularnih stanica kao i TSH te stimuliraju folikularne stanice da dodatno izlučuju hormone štitnjače, što rezultira hipertireozom.

Hipertireoza se također pojavljuje i u Hashimotovom tireoiditisu. Inače je praćen hipotireozom, ali se u početku bolesti nekada pojavljuje privremena hipertireoza koja uglavnom s vremenom prijeđe u hipotireozu.

Hipertireoza se također razvija zbog multinodalne toksične guše ili toksičnog adenoma. U zemljama s jodnom insuficijencijom 50% slučajeva hipertireoze uzrokuje jedna od dviju navedenih bolesti. Toksični adenom je dobroćudni tumor štitnjače koji stvara i izlučuje prevelike količine hormona neovisno o lučenju TSH. U multinodalnoj toksičnoj guši čvorovi štitnjače postanu autonomni i izlučuju hormone štitnjače bez obzira na izlučivanje TSH. Obje bolesti uzrokuju hipertireozu u osoba starije dobi (11).



Slika 15. Povećanje štitnjače

(preuzeto s <https://biobalans.hr/2020/01/05/upoznajmo-stitnjacu/>)

#### 1.2.4.2. Hipotireoza

Hipotireozu obilježava smanjena sinteza i izlučivanje hormona štitnjače. Budući da su patofiziološki procesi u hipertireozu suprotni procesima u hipotireozu, također se i simptomi bolesti većinom razlikuju. Najčešći simptomi hipotireoze su slabost, usporen govor, promuklost, poremećaj pamćenja, dispneja, suha, hrapava, hladna i blijeda koža, osjetljivost na hladnoću, edem lica i periferni edemi, lomljivost kose, gubitak dlaka, konstipacija i porast tjelesne težine.

Kliničku manifestnu hipotireozu definira povišena koncentracija TSH i snižena koncentracija  $T_4$  (fT<sub>4</sub>). Smatra se da je supklinička hipotireoza predstadij manifestne hipotireoze. To je stanje u kojem je koncentracija TSH povišena, ali koncentracija  $T_4$  (fT<sub>4</sub>) unutar referentnih intervala. Iz supkliničke u manifestnu hipotireozu prijeđe između 5% i 20% slučajeva u jednoj godini.

Ovisno o uzroku, hipotireoza može biti primarna, sekundarna i tercijarna. Primarna hipotireoza uzrokovana je bolešću štitnjače ili poremećajem funkcije štitnjače. Sekundarna je uzrokovana manjkom poticanja zdrave štitnjače zbog poremećaja u hipotalamusu ili hipofizi, rijetko se pojavljuje. Tercijarna je posljedica mutacije gena za receptore za hormone  $T_3$  i  $T_4$ , izrazito je rijetka (11).

Uzrok hipotireoze može biti i neadekvatan unos joda jer onemogućava sintezu hormona  $T_3$  i  $T_4$ . U najozbiljnije posljedice neadekvatnog unosa joda ubrajaju se gušavost i razvoj kretinizma kojeg obilježava mentalna retardacija i zaostatak u tjelesnom rastu. Početkom 20. stoljeća su se u brojnim državama počeli provoditi javno-

zdravstveni projekti jodiranja soli. Do danas su ti projekti uvedeni u većini država. Ti projekti predstavljaju najsigurniji i najjeftiniji način sprječavanja razvoja bolesti uzrokovanih manjkom joda te tjelesnih i kognitivnih oštećenja. U 20. stoljeću su u ponekim dijelovima Hrvatske predstavljali problem endemski kretinizam i endemska gušavost. 1953. godine provođenjem zakona o obaveznom jodiranju soli s 10 mg KJ/kg soli te provođenjem novog zakona 1996. godine o povećanom jodiranju soli s 25 mg KJ/kg soli, u Hrvatskoj je 2003. godine ostvarena jodna suficijencija.

**NN 84/1996 (9.10.1996.), Naputak o jodiranju kuhinjske soli**

**MINISTARSTVO ZDRAVSTVA**

Na temelju članka 50. stavka 1. točke 6. Zakona o zdravstvenoj ispravnosti i zdravstvenom nadzoru nad namirnicama i predmetima opće uporabe ("Narodne novine" br. 60/92, 26/93, 29/94 i 55/96) ministar zdravstva donosi

**NAPUTAK**

**O JODIRANJU KUHINJSKE SOLI**

**Članak 1.**

Ovim Naputkom određuje se količina kalijevog jodida u kuhinjskoj soli kao uvjet zdravstvene ispravnosti ove namirnice.

**Članak 2.**

Zdravstveno ispravna je kuhinjska sol koja je jodirana sa 25 mg kalij-jodida (KJ) na jedan kilogram soli ili odgovarajućom količinom natrij-jodida (NaJ) ili natrij-jodata (NaJo3) ili kalij-jodata (KJo3), tako da u jednom kilogramu (računajući i prirodni jod) ne sadrži manje od 20 mg ni više od 30 mg kalij jodida (što odgovara količini od 15-23 mg joda po kilogramu soli).

**Članak 3.**

Ovaj Naputak stupa na snagu danom objave u "Narodnim novinama".

Klasa: 540-01/96-01/0120

Urbroj: 534-02-30-96-001

Zagreb, 2. listopada 1996.

Ministar

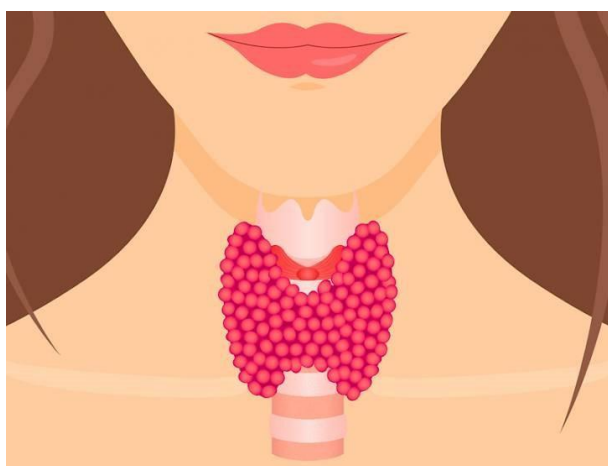
**prof. dr. sc. Andrija Hebrang, v. r.**

Slika 16. Naputak o jodiranju soli iz 1996. Godine

(preuzeto s [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/1996\\_10\\_84\\_1503.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/1996_10_84_1503.html))

Hashimotov tireoiditis je najučestaliji uzrok hipotireoze u zemljama s adekvatnim unosom joda. Bolesnici s Hashimotovim tireoiditisom početno uglavnom imaju supkliničku hipotireozu ili su eutireoidni. Autoimuna upala uništava tkivo štitnjače i ono postepeno propada te u konačnici fibrozira. To uzrokuje smanjenje ili potpuni prestanak izlučivanja hormona štitnjače, odnosno razvija se hipotireoza.

Također učestao uzrok hipotireoze je upotreba radioaktivnog joda za liječenje hipertireoze, tj. Gravesove bolesti. Ubrzo poslije liječenja pacijenti razviju supkliničku hipotireozu te se stanje s vremenom pogorša i prijeđe u manifestnu hipotireozu. Pojavljivanje hipotireoze pet godina od završetka liječenja iznosi između 7% i 50%, a dugoročno oko 80% pacijenata koji imaju Gravesovu bolest koji su liječeni radioaktivnim jodom stekne hipotireozu. Manje često hipotireoza nastaje kao posljedica upotrebe radioaktivnog joda za liječenje multinodalne toksične guše ili toksičnog adenoma. Hipotireozu može uzrokovati i vanjsko zračenje malignih bolesti vrata ili kirurško liječenje štitnjače. Još jedan uzrok hipotireoze zbog preopterećenja jodom je primjena lijekova koji sadržavaju jod, primjerice amiodaron. Oni trenutno smanjuju aktivnost štitnjače i sintezu hormona štitnjače. Slično djelovanje ima i litij kojeg se koristi za liječenje ponekih psihijatrijskih bolesti (11).



Slika 17. Ilustracija štitnjače

(preuzeto s <https://www.hopeforwomenmag.com/hope-for-women-magazine/2021/7/22>)

### 1.3. HASHIMOTOV TIREOIDITIS (HT)

Hashimotov tireoiditis (HT) najčešća je autoimuna bolest štitnjače. Ima značajnu genetsku podlogu te je uzorkovana kombinacijom okolišnih čimbenika i genetske predispozicije. Osnovno obilježje HT-a je infiltracija limfocita u tkivo štitnjače i uništavanje tkiva, što dovede do hipotireoze. Prvi je put opisan kao zasebno patološko stanje u prošlom stoljeću. 1912. godine japanski kirurg dr. Hakaru Hashimoto opisao je bolest u četiri pacijenta s atrofijom tkiva štitnjače i s kroničnom limfocitičkom upalom štitnjače te je nazvao limfomatozna struma (11).

#### 1.3.1. Epidemiologija HT-a

Najčešće od svih autoimunih bolesti povezanih s nekim organom su autoimune bolesti štitnjače. Prevalencija autoimunih bolesti štitnjače u procjeni iznosi između 5% i 10%. Hashimotov tireoiditis uvrštava se u najraširenije endokrinološke poremećaje i najčešće autoimune bolesti. Smatra se najvećim uzrokom hipotireoze u zemljama s adekvatnim unosom joda. Rizični faktor za razvoj HT-a su godine, iako se može pojaviti i u djetinjstvu. Bolest se do deset puta rjeđe razvija u muškaraca nego u žena (12).

Tablica 2. Procijenjena godišnja incidencija Hashimotovog tireoiditisa (podatci preuzeti s (12))

	Godišnja incidencija HT-a
Žene	350/100 000
Muškarci	80/100 000

Bolesnici s HT-om često imaju i druge autoimune bolesti, ponajviše vitiligo, reumatoidni artritis i kronični autoimuni gastritis. Nerijetko se razviju i šećerna bolest tipa 1, reumatska polimialgija, celijakija, Sjogrenov sindrom, sustavni eritemski lupus, multipla skleroza i sarkoidoza.

#### 1.3.2. Etiopatogeneza HT-a

Glavno obilježje HT-a je infiltracija T i B limfocita u štitnjaču. Unatoč višebrojnim provedenim istraživanjima, konkretan mehanizam autoimunog procesa još nije u potpunosti objašnjen. Pretpostavljeni mehanizmi uključuju oštećenje i smanjenje

broja regulatornih limfocita T (engl. *T regulatory cells*, Tregs) i pojačanu aktivnost folikularnih pomoćničkih limfocita T (engl. *follicular helper T cells*, Tfh). Time se omogućuje B limfocitima stvaranje protutijela protiv vlastitih antigena štitnjače. Limfociti T sudjeluju u ostvarivanju kliničke slike i razaranjem folikularnih stanica izravnim citotoksičnim djelovanjem. Također, limfociti T neizravno utječu na vitalnost i funkciju folikularnih stanica proizvodnjom citokina koji promijene integritet te imunu i metaboličku funkciju folikularnih stanica.

Važno obilježje HT-a je prisutnost antitijela protiv glavnih antigena štitnjače, štitne peroksidaze (TPO) i tireoglobulina (Tg). Iako su štitna peroksidaza i tireoglobulin različiti antigeni, antitijela protiv štitne peroksidaze (TPOAt) i antitijela protiv tireoglobulina (TgAt) imaju razna zajedničkih obilježja. TPOAt i TgAt većinom su imunoglobulini G razreda (IgG) visokog afiniteta za vlastite antigene. TgAt se pronalaze u 80%, a TPOAt u 90% pacijenata s HT-om. Oba antitijela su ključni klinički markeri kod postavljanja dijagnoze HT-a, ali TPOAt smatraju se najboljim prediktorima autoimunog poremećaja štitnjače. Iako antitijela štitnjače ukazuju na razaranje tkiva štitnjače, TgAt i TPOAt ne smatraju se uzročnim čimbenicima bolesti i najvjerojatnije nisu ključni u patogenezi HT-a. Međutim, TPOAt fiksiraju komplement i tako narušavaju folikularne stanice mehanizmom stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima. Ipak, ukupno oštećenje uzrokovano TPOAt-ima je beznačajno u usporedbi na cjelokupno oštećenje uzrokovano limfocitima T lučenjem citokina ili izravnim citotoksičnim djelovanjem (11).

HT je u otprilike 75% slučajeva uvjetovan genetskim, a 25% okolišnim čimbenicima. Otkriveno je mnogo okolišnih čimbenika koji doprinose razvoju HT-a. Najčvršći dokazi povezanosti s HT-om temelje se na povećanom unosu joda preko soli. Provedeno je nekoliko longitudinalnih i presječnih istraživanja koje pokazuju da je jodiranje soli značajno povećalo učestalost autoimunosti štitnjače i HT-a. Trajno ili prolazno oštećenje štitnjače, što uključuje i HT, može biti uzrokovano i citokinima, poput interferona  $\alpha$  koji su u sve češćoj primjeni u terapiji karcinoma različitih vrsta. Neka istraživanja predlažu da razvoju HT-a pridonosi i neadekvatan unos selena, kao i manjak vitamina D, ali ove povezanosti nisu do kraja istražene. Osim toga, razvoju HT-a doprinose virusne infekcije, poput hepatitis C virusa, humanog herpes virusa 6 (HHV-6) ili Epstein-Barr virusa te bakterijske infekcije uzrokovane bakterijom *Yersinia*



*enterocolitice*. Međutim, ove povezanosti nisu potpuno potvrđene i potrebno ih je još dodatno istražiti.

Iako je otprilike 75% slučajeva uzrokovano genetskim čimbenicima i broj studija koje istražuju pozadinu ove bolesti su u konstantnom rastu, genetski čimbenici koji utječu na razvoj HT-a slabo su istraženi. Nedavno objavljeno istraživanje tvrdi da dosad poznati genetski čimbenici uvjetuju samo 5.5% predispozicije za razvitak HT-a. Analiza gena HLA regije bila je u centru istraživanja brojnih provedenih kandidatnih istraživanja povezanosti. HLA regija najbolje je istražena regija u genomu s brojnim genima za regulaciju raznih imunoloških funkcija koji mogu uzrokovati različite autoimune bolesti (11).

### **1.3.3. Klinička slika HT-a**

Pacijenti najčešće dolaze liječniku zbog tvrdo-elastične guše gumene konzistencije. U štitnjači je često naglašen i piramidalni režanj. Povećanje štitnjače nerijetko se otkrije na sistematskom pregledu, i većinom je bezbolno, a pacijenti u nekim slučajevima navode popunjenost ždrijela ili blagi pritisak u vratu. Ponekad štitnjača može biti i bolna. U početku pacijenti nekad imaju kliničke znakove hipotireoze, kod njih je štitnjača atrofična, mala i fibrozno promjenjiva. Međutim, većina pacijenata u početku bolesti ima supkliničku hipotireozu ili je eutireoidna. S vremenom autoimuna upala uništava tkivo štitnjače, što može uzrokovati atrofiju štitnjače te dovesti do razvoja hipotireoze. Od pacijenata s HT-om sa supkliničkom hipotireozom, godišnje se u 4% slučajeva razvije manifestna hipotireoza. Suprotno tome, neki pacijenti u početku razvijaju hipertireozu koju uzrokuje stvaranje stimulirajućih antitijela protiv TSH receptora. Ovo prolazno stanje zove se hashitoksikoza ili tireotoksikoza i s vremenom se razvije hipotireoza ili uspostavi uredna funkcija štitnjače.

Budući da većina pacijenata s HT-om s vremenom zadobije supkliničku ili manifestnu hipotireozu, simptomi HT-a su nalik simptomima hipotireoze. Najčešći simptomi HT-a su slabost, porast tjelesne težine, suha i hrapava koža, a najrjeđi simptom je usporen govor (13). U presječnom istraživanju provedenom na 290 pacijenata s HT-om otkrivena je poveznica TgAt i niza simptoma, otečenosti očnih kapaka, lomljivosti kose, edema lica i promuklosti.

Tablica 3. Najčešći simptomi Hashimotovog tireoiditisa (podatci preuzeti s (13))

Najčešći simptomi Hashimotovog tireoiditisa
slabost
suha i hrapava koža
porast tjelesne težine
osjetljivost na hladnoću
lomljivost kose
dispneja
blijeda koža
konstipacija
poremećaj pamćenja
otеченост očnih kapaka
promuklost
gubitak dlaka
periferni edemi
edem lica
usporen govor

#### 1.3.4. Dijagnoza HT-a

Postoji sumnja na HT ako se na kliničkom pregledu pronađe čvorasta ili glatka guša gumene, čvrsto-elastične konzistencije. Budući da većina pacijenta ima supkliničku hipotireozu, za postaviti dijagnozu treba se odrediti koncentracije TSH i T<sub>4</sub> (fT<sub>4</sub>) u serumu. U početku razvoja HT-a TSH je uglavnom blago povišen, a fT<sub>4</sub> u referentnim intervalima ili lagano snižen. Napretkom bolesti koncentracija TSH se povisuje, a fT<sub>4</sub> snižava, pa je potrebno redovno kontrolirati koncentracije tih hormona i s obzirom na laboratorijske nalaze prilagoditi terapiju. Za potvrditi dijagnozu potrebno je odrediti antitijela štitnjače (TgAt i TPOAt). Oni su pozitivni u većine bolesnika i njihova koncentracija je povezana s limfocitnom infiltracijom štitnjače te se zato koriste kao ključni dijagnostički markeri.

Ultrazvučni pregled štitnjače također je pouzdana neinvazivna metoda dijagnoze HT-a. Ovisno o napretku bolesti, štitnjača može biti smanjena, normalne veličine ili povećana. Tkivo štitnjače može biti nehomogeno i nerijetko hipohogeno zbog limfocitičke infiltracije, mogu se pojaviti hiperehogeni tračci zbog fibroze. U početnoj fazi bolesti moguće je da antitijela štitnjače (TgAt i TPOAt) budu negativna, tada je karakteristična ultrazvučna slika štitnjače dokaz bolesti.

### 1.3.5. Liječenje HT-a

Određeni dio pacijenata bez obzira na prisutnu upalu štitnjače imaju normalnu funkciju žlijezde i malu gušu, bez simptoma bolesti. To eutireodino stanje ponekad traje godinama i nije ga potrebno liječiti, samo je potrebna redovna kontrola koncentracija TSH i  $fT_4$  u serumu. Ako dođe do hipotireoze, potrebno je započeti liječenje zamjenskom hormonskom terapijom. Postoje brojni pripravci hormona štitnjače, danas se u liječenju upotrebljava levotiroksin ( $LT_4$ ), sintetska inačica hormona  $T_4$ . Terapijska se doza individualno prilagođava ovisno o kliničkoj slici pacijenta i koncentracijama TSH i  $fT_4$  u serumu. Cilj zamjenske terapije je ostvarivanje eutireoidnog stanja i kompletne kliničke remisije. Kod supkliničke hipotireoze odluka o terapiji i liječenju određuje prema kliničkoj slici i dobi pacijenta te koncentracijama TSH i TPOAt. Pacijenti s tireotoksikozom ne liječe se jer je hipertireoza prolazno stanje i funkcija štitnjače samostalno se normalizira, ili prijeđe u hipotireozu koju se liječi na prethodno opisan način (11).

## 1.4. PSORIJAZA

Psorijaza (lat. *psoriasis vulgaris*) najčešći je oblik psorijaze. To je kronična, nezarazna, imunološki posredovana upalna bolest kože koja se manifestira kao uzdignuće ili plakovi kože koji ne sadrže gnoj. Plakovi mogu biti crvene ili ružičaste boje, prekriveni bijelim ili srebrenastim ljuskama različite veličine i debljine. Najčešće pojavljuju se na laktovima, koljenima i tjemenu. Rijetko je opasno po život, ali pacijentima uzrokuje znatan psihološki stres. Pojavljuje se neovisno o životnoj dobi, ali najčešće se javlja prije 25. godine života. Mogu je uzrokovati infekcije, stres i lijekovi, ali veliku ulogu ima i genetika. Kada oba roditelja imaju psorijazu šanse da je dobiju djeca su 50%. Psorijaza se javlja s upalnim infiltratom leukocita pretežno u dermis i uključuje stanični imunološki odgovor. Imunološki čimbenici potiču keratinocite na brže dijeljenje što dovodi do poremećenog sazrijevanja keratinocita. Još nije identificiran auto-antigen na koji je usmjeren imunološki odgovor. Nasljeđivanje psorijaze je poligeno, a HLA sustav nedvojbeno je jedan od važnijih, ako ne i najvažniji genetski čimbenik u razvoju psorijaze. Studije poveznosti su utvrdile da je najuže povezan s psorijazom gen HLA-Cw6 i vjerojatno čini 35-50% nasljednog rizika. Otprilike 87% bolesnika sa psorijazom nosi ovaj gen. Brojnim istraživanjima dokazana je najveća povezanost ove bolesti s HLA antigenima HLA-B\*13, HLA-B\*17, HLA-C\*06:02 i HLA-DRB1\*07. Osim HLA gena, non-HLA geni koji su pokazali povezanost sa psorijazom su funkcionalni polimorfizmi u genima za čimbenike koji kontroliraju upalu kao što je TNF $\alpha$  (engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*). Većina dijagnoza postavlja se na temelju prezentacije kože, ali genetska istraživanja korisna su pomoć u dijagnozi, posebice za HLA-C\*06:02 (14).



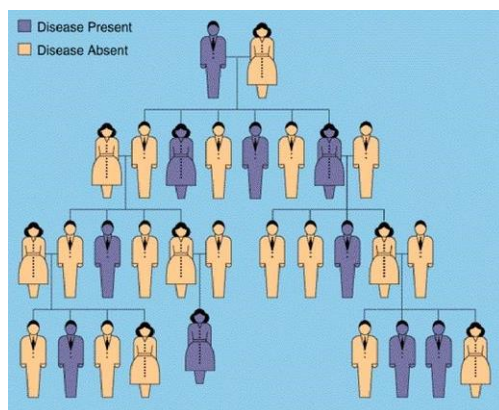
Slika 18. Psorijaza (preuzeto s <https://lupilu.hr/psorijaza-kod-djece>)

## 1.5. OBITELJSKE STUDIJE

Genetske studije izvode se na skupini povezanih pojedinaca, to jest obitelji. Mendelove rane studije na grašku o obrascima nasljeđivanja svojstava s roditelja na potomstvo ukazale su na osnovne mehanizme nasljeđivanja, uključujući temeljne zakone segregacije gena s roditelja na potomstvo i neravnotežu udruživanja gena koji su usko smješteni na kromosomu. Raspodjela osobina unutar obitelji pokazala je matematičke omjere segregacije kod potomaka poznatih tipova razmnožavanja. Ovi očekivani omjeri segregacije korišteni su kao važan alat u proučavanju i otkrivanju ljudskih bolesti, pružajući dokaze za mnoštvo poremećaja jednog gena. Genetske studije uspješno su korištene za identifikaciju gena koji utječu na širok raspon svojstava od biomedicinske važnosti, uključujući niz urođenih grešaka metabolizma i drugih genetskih bolesti (npr. cistična fibroza, Duchenneova mišićna distrofija, Huntingtonova bolest) (15).

Obiteljske studije imaju nekoliko povoljnih karakteristika za otkrivanje gena. Ovakve studije predstavljaju homogeniji i ograničeniji skup uzročnih gena i putova, za razliku od studija nesrodnih pojedinaca, što povećava statističku snagu za otkrivanje gena. Ovaj je pristup omogućio otkriće novih lokusa i putova. U nedavnom primjeru, utvrđivanje obitelji s ranom bolešću koronarnih arterija i očitom mendelskom segregacijom dovelo je do identifikacije nove povezane mutacije u LRP6 (protein 6 povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće) (16). Još jedna povoljna značajka obiteljskih studija je mogućnost kontrole. Analiza fenotipova među članovima obitelji donekle je kontrolirana i zbog genetske pozadine i izloženosti okolišu. Budući da članovi obitelji dijele predvidljivi udio svojih gena koji su identični po podrijetlu, pozadinska genetska varijacija se do neke mjere može kontrolirati. U ekstremnom slučaju, monozigotni blizanci imaju jaku kontrolu genotipa, prepuštajući varijacije osobina epigenetskim fenomenima, interakcijama ili modifikatorima okoline. Slično tome, uži članovi obitelji također imaju tendenciju homogenije izloženosti okolišu, žive na sličnim geografskim lokacijama sa sličnim socioekonomskim statusom, a možda čak i sličnim zdravstvenim navikama kao što su prehrana, pušenje, konzumacija alkohola i tjelesna aktivnost. S tehničke strane, obiteljski podaci omogućuju dublju razinu kontrole kvalitete genotipizacije nego što je to moguće u studijama nesrodnih pojedinaca (15).

S druge strane, obiteljske studije imaju i nedostatke. Teže je i stoga skuplje identificirati, regrutirati i upisati cijele obitelji nego proučavati pojedince koji nisu u srodstvu. Ako netko želi proučavati ekstremlne distribucije, kao što je hipertenzija naspram hipotenzije, studija slučaja definitivno će biti jednostavnija i jeftinija te može biti učinkovitija, pri čemu su svi ostali čimbenici jednaki (npr. dobro podudaranje, homogenost izloženosti okoliša i kontrola pozadinske genetske varijacije) (15).



Slika 19. Prikaz nasljeđivanja bolesti (preuzeto s

[https://www.ianthropology.org/psychology\\_genetic\\_test.html](https://www.ianthropology.org/psychology_genetic_test.html))

## **2. CILJ RADA**

Cilj rada je ukazati na važnost određivanja antigena i gena HLA sustava. Određivanje se provodi kod transplantacije krvotvornih matičnih stanica i solidnih organa te kod dijagnostike autoimunih bolesti. U ovom radu nastoji se ukazati na osobitosti sustava HLA vezane uz bolesti.

U ovom radu je prikazana učestalost alela sustava HLA i haplotipskih veza kod pacijenata s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom Hashimotovog tireoiditisa kao i psorijaze.

Također je cilj rada ukazati na važnost različitosti te prednosti i nedostatke serološke naspram molekularne metode na primjeru autoimunih bolesti.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. ISPITANICI**

Ovaj rad predstavlja obiteljsku studiju u kojoj su promatrane tri generacije obitelji sa sumnjom na Hashimotov tireoiditis i Psoriasis vulgaris. Svim ispitanicima je napravljena HLA tipizacija kako bi se utvrdila genetska predispozicija za navedene bolesti.

### **3.2. METODE**

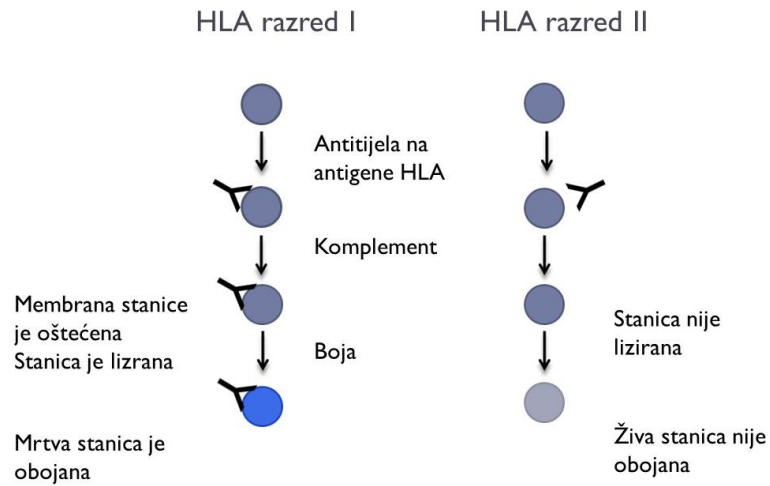
Svim ispitanicima su određeni aleli razreda I i razreda II sustava HLA. Korištene su serološka i molekularna metoda. Serološka metoda (test mikrolimfocitotoksičnosti) koristila se kod određivanja antigena lokusa HLA-B. Alele lokusa HLA-DRB1\* svim članovima obitelji određeni su molekularnom metodom PCR –SSO (Luminex metoda). Da bi se potvrdili rezultati dobiveni serološkom metodom određujući antigene lokusa HLA-B također su svim članovima obitelji aleli lokusa HLA-B potvrđeni PCR-SSO metodom (Luminex metoda).

#### **3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti**

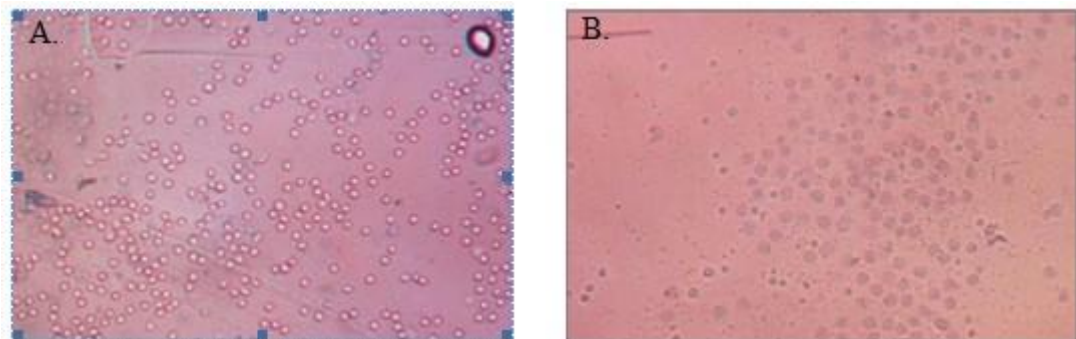
Za izvođenje testa potreban je uzorak periferne krvi u epruveti s antikoagulansom heparinom. Test započinje separacijom limfocita na gradijentu gustoće i određivanjem koncentracije limfocita. Koncentracija limfocita određuje se pomoću Burk-Turkove komorice na koju se dodaje 5 $\mu$ L tripanskog modrila i 5 $\mu$ L suspenzije limfocita. Mikroskopski se broje stanice u svakom kvadratiću, za tipizaciju antigena HLA sustava potrebno je u kvadratiću uočiti 5 do 6 obojanih ili 10 do 12 neobojanih stanica. Nakon podešavanje gustoće, uzorak se nanosi na Terasakijeve pločice pomoću Hamilton mikrolitarske šprice u kojima se nalaze serumi poznate specifičnosti. Nakon trideset minuta inkubacije u jažice se dodaje kunićji komplement i ponovno inkubira još sat vremena. Kunićji komplement se veže na protutijela kompleksa (serum poznate specifičnosti i limfociti ispitanika) i oštećuje membranu stanice. Na kraju se uklanja višak kunićjeg komplementa protresanjem i stanice se bojaju tripanskim modrilom.



Tripansko modriilo prodire u mrtve stanice što označava pozitivnu reakciju te se rezultati dobiveni mikroskopiranjem upisuju u tipizacijski listić.



Slika 20. Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti (preuzeto iz Crnić-Martinović M, skripta Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka)



Slika 21. Rezultat serološke tipizacije prikazan pod svjetlosnim mikroskopom (test mikrolimfocitotoksičnosti): A. negativna reakcija, B. pozitivna reakcija (snimljeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Name: PA III / IZ  
 Vorname: HORVAT IVAN  
 Geb.-Datum: 15.07.1957  
 Ergebnis / Result: HLA-A: 2, 23(9) HLA-B: 27, 44(12) HLA-Cw: 2 HLA-Bw: 4  
 Unterschrift / Signature:   
 inno-train DIAGNOSTIK GMBH  
 HLA-Ready Plate ABC 72  
 IVD CE 0123 LOT H972037 2018-08  
 Kaninchenkomplement Charge: H9KL027  
 Datum / Date: 15.07.2018

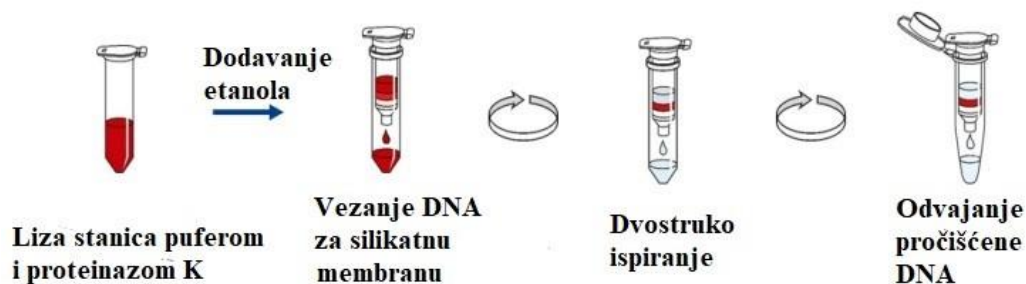
Pos.	Anti-HLA	möglich positive	Charge Lot No.	Reaktion Reaction	Pos.	Anti-HLA	möglich positive	Charge Lot No.	Reaktion Reaction
1A	pos. Control			3	2A	B 62*		9625	
1B	neg. Control				2B	B 63	B57	0733	
2C	A 1		0587		2C	B 15(62+63+75+76+77)+57+46		0461	
2D	A 1+26		0703		2D	B 38		0743	
2E	A 2		0521	3	2E	B 39		0744	
2F	A 2+69		0485	3	2F	B 16(28+39)		0735	
2G	A 3		0760		2G	B 57*		0748	
2H	A 3*		0769		2H	B 17(37+58)		0611	
2I	A 23		0578	3	2I	B 18		0660	
2J	A 24+2403*		0767		2J	B 18		0903	
2K	A 24+2403*	anti A2403	0600H	3	2K	B 49+52*		0491	
2L	A 25		0546		2L	B 21(49+50)+41	B44, B45	0583	4
2M	A 26		0542		2M	B 55		0715	
2N	A 28+56*		0688		2N	B 56		0358	
2O	A 10(25+26+34+66)		0686		2O	B 22(54+55+56)		0741	
2P	A 11*		0714		2P	B 27		0706	3
2Q	A 11		0780H		2Q	B 27*		0742	3
2R	A 23(54+69)*	A2	0407		2R	B 35+39+40+45+50+53+62+70*		0729H	
2S	A 23(54+69)		0675		2S	B 35+53+51*	B52	0641	
2T	A 29		0518		2T	B 35+53+5(51+52)*		0399	
2U	A 30+31+33+1+3+11+29*		0779H		2U	B 53+5(51+52)+49		0308	
2V	A 31	A30	0429		2V	B 37+35+53+5(51+52)+18+79*	B48	0779H	
2W	A 32	A25	0650		2W	B 60	B48	0481	
2X	A 33		0639		2X	B 40(60+61)+47+13		0480	
2Y	A 74+29+39+51+32+33+19+23		0437H		2Y	B 40(60+61)+48+81		0343	
2Z	B 51*		0694		2Z	B 41+41*		0730	
3C	B 5(51+52)	B49	0605		3C	B 70+15+21(48+50)+56	B35	0708H	
3D	B 7	B73	0998		3D	Cw 1		0641	
3E	B 7+42+48+56		0680		3E	Cw 2		0463	3
3F	B 8		0671		3F	Cw 3		0790	
3G	B 8+48+59+41		0691		3G	Cw 4		0650	
3H	B 44		0543	3	3H	Cw 5	Cw15	0770	
3I	B 45+76*		0752		3I	Cw 6+4*		0751	
3J	B 12(64+65)		0339	3	3J	Cw 7+17		0463	
3K	B 13		0303		3K	Bw 4*		0475	3
3L	B 14(64+65)		0540		3L	Bw 6		0735	

inno-train Diagnostik GmbH · Niederhöchstädt Straße 63 · 61276 Kronberg · Tel. 00 49 (0) 61 73 / 60 79 30 · Fax 00 49 (0) 61 73 / 60 79 30  
 E-mail: info@inno-train.de · www.inno-train.de

Slika 22. Analiza testa mikrolomfocitotoksičnosti (serološka metoda) (snimljeno u laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

### 3.2.2. Izolacija DNA

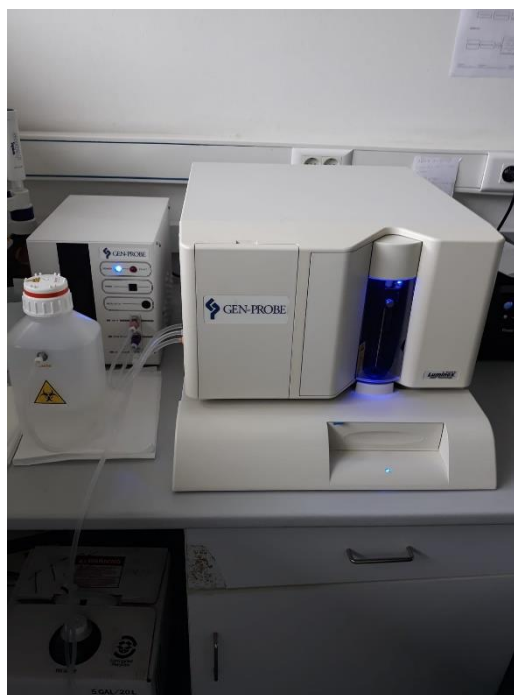
Iz uzorka pune krvi u epruvetu s antikoagulansom EDTA izolira se DNA. Za izolaciju DNA koristi se komercijalni kit tvrtke Roche Diagnostics (High Pure PCR Template Preparation Kit). Prvo se u tubicu dodaje 200µl uzorka pune krvi, 200µl Binding Buffera za lizu stanica i 40µl proteinaze K za razgradnju proteinskih molekula čime se DNA molekula oslobađa iz stanične jezgre. Nakon inkubacije u uzorak se dodaje 100µl izopropanola te se vorteksira. Zatim se uzorak premješta u filter tubu s tubom za sakupljanje gdje se centrifugiranjem DNA s nečistoćama veže za silikatnu membranu. Nakon niza dodavanja 500µl Inhibitor Removal Buffera i 500µl Wash Buffera s centrifugiranjem DNA se pročisti od nečistoća. Izolirana DNA se eluira dodavanjem 200µl zagrijanog Elution Buffera i centrifugiranjem te se pohranjuje u sterilnoj tubici volumena 1.5 mL na temperaturi od +4°C ili -20°C.



Slika 23. Izolacija DNA iz uzorka pune krvi (preuzeto i prilagođeno iz <https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qnzJ>)

### 3.2.3. PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotide*)

Uzorak za PCR-SSO je prethodno izolirana DNA. Izolirana DNA je umnožena PCR metodom (engl. *Polymerase chain reaction*). Napravljena je reakcijska smjesa od 0,6 $\mu$ l Master MIX-a odnosno reakcijskog pufera koji sadrži oligonukleotidne početnice, 0,2 $\mu$ l Taq polimeraze i 8,8 $\mu$ l destilirane vode. Pripremljenoj reakcijskoj smjesi se dodaje 5 $\mu$ l izolirane DNA i stavlja u Thermocycler gdje se DNA amplificira. Taq polimeraza u procesu amplifikacije prepoznaje komplementarne dijelove DNA na koje se vežu oligonukleotidne početnice. Proces se ponavlja 30 puta čime se dobiva velika brojka kopija DNA. Nakon amplifikacije DNA slijedi proces hibridizacije. Za hibridizaciju je napravljena smjesa s 5 $\mu$ l PCR produkta i 15 $\mu$ l suspenzije mikrosfera. U hibridizaciji dolazi do vezanja PCR produkta sa specifičnim oligonukleotidnim probama na mikrosferama. Za vizualizaciju nastalog kompleksa dodaje se 170 $\mu$ l fluorescentne boje za obilježavanje koja je pripremljena miješanjem 170 $\mu$ l dilucijske otopine i 0.75 $\mu$ l streptavidina. Fluorescentna boja dijelom se veže na biotin na početnicama, a dijelom na nastali kompleks ako je došlo do njegovog stvaranja. Nakon hibridizacije Cluster pločica na kojoj se test izvodio stavlja se u Luminex aparat i očitava rezultat.



Slika 24. Uređaj Luminex  
(fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)



Slika 25. Analiza rezultata Luminex metodom (snimljeno u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

## 4. REZULTATI

Autoimune bolesti štitnjače česte su bolesti koje nastaju kao posljedica učinka brojnih gena i faktora okoliša. Populacijska istraživanja kao i obiteljske studije su pokazala da glavni sustav tkivne podudarnosti (HLA sustav) ima važnu ulogu u etiopatogenezi ove bolesti.

Ispitanici u ovom radu bili su članovi obitelji Vidak i obitelji Gudelj. Budući da je jednom članu obitelji dokazan Hashimotov tireoiditis, s obzirom na jednu od osobitosti i složenosti HLA sustava te poznatu povezanost HLA sustava i bolesti, želja je bila kod ispitanice utvrditi od koga je naslijedila alele vezane uz ovu bolest (s očeve ili majčine strane).

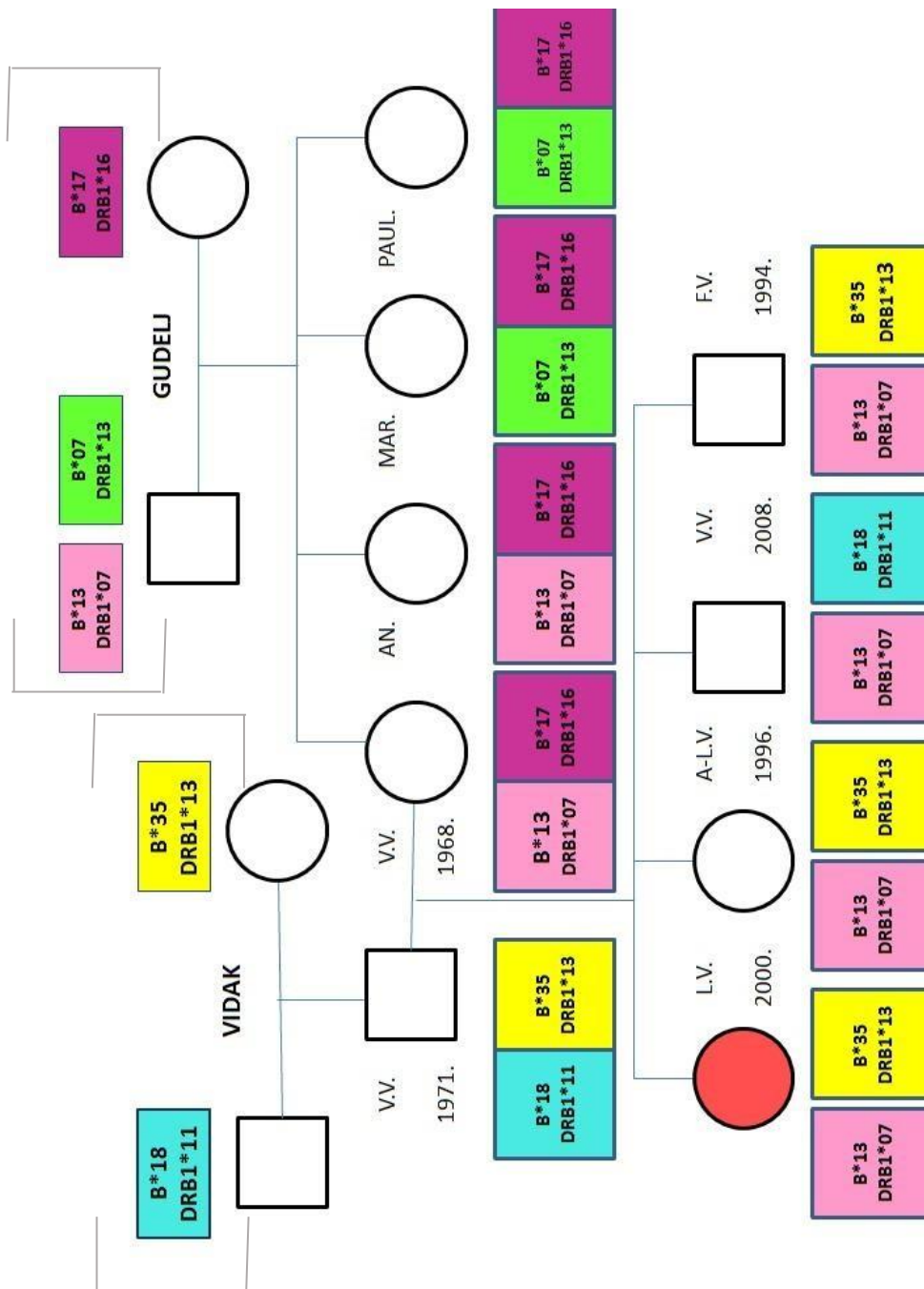
Članove obitelji činili su roditelji ispitanice, dvojica braće i sestra kao i sestre s majčine strane. Svim ispitanicima su određeni aleli razreda I i razreda II HLA sustava serološkom i molekularnom metodom.

Nakon analize članova obitelji Vidak i Gudelj serološkom metodom i Luminex metodom dobiveni su sljedeći rezultati HLA tipizacije.

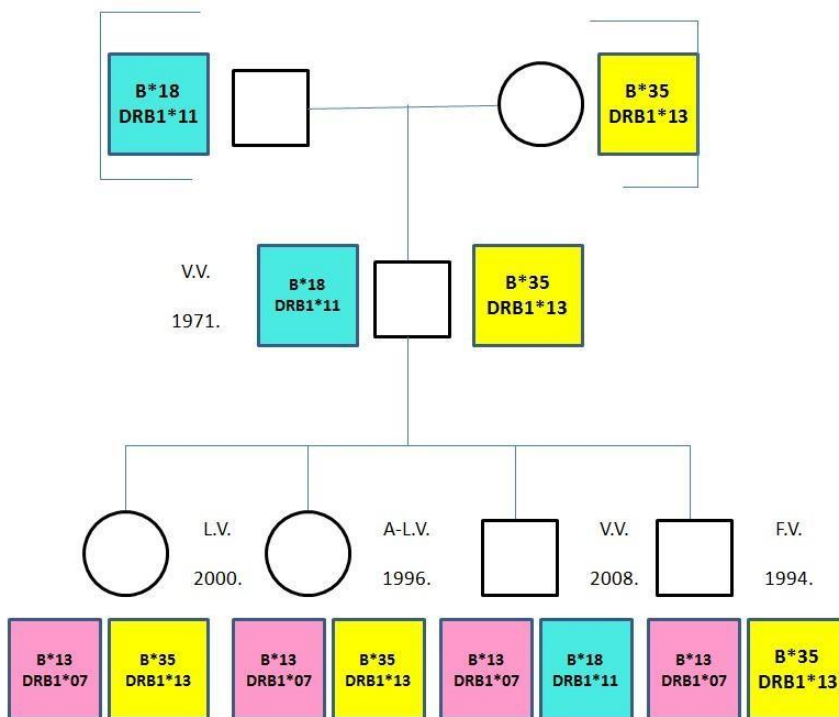
Tablica 4. Prikaz rezultata dobivenih serološkom i molekularnom metodom

IME ISPITANIKA	LOKUS B*	LOKUS DRB1*
V.V. (otac)	*18. *35	*11. *13
V.V. (maika)	*13. *17	*07. *16
A.G-S.	*13. *17	*07. *16
M.Z.	*07. *17	*13. *16
P.G.	*07. *17	*13. *16
F.V.	*13. *35	*07. *13
A-L.V.	*13. *35	*07. *13
V.V. (brat)	*13. *18	*07. *11
L.V.	*13. *35	*07. *13

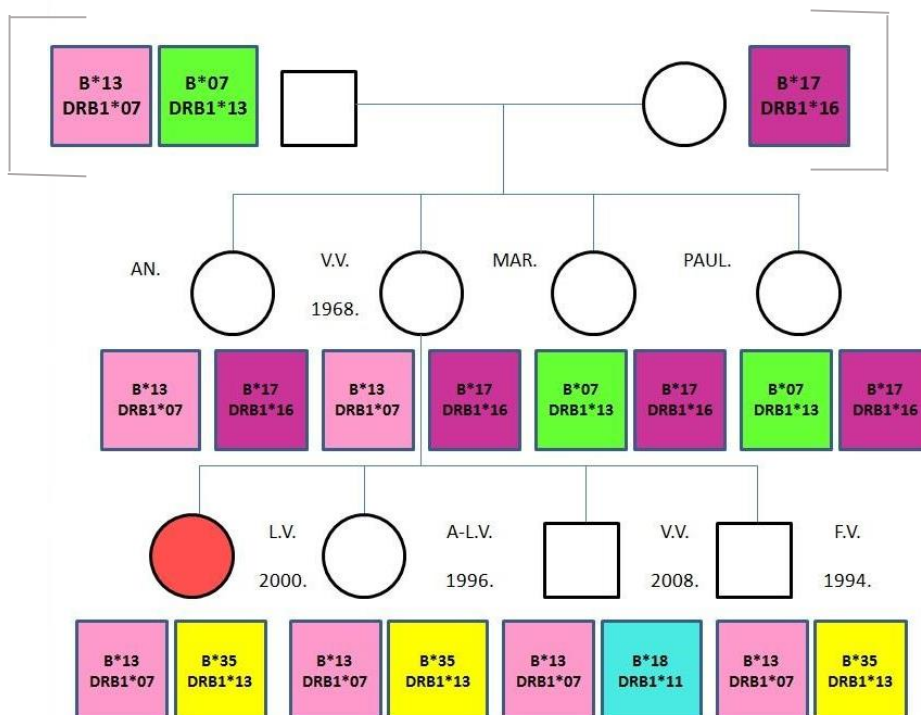
Zahvaljujući tipizacijama roditelja bilo je moguće pratiti nasljeđivanje dviju generacija, točno odrediti haplotipove u obitelji, a dedukcijom su određeni i aleli HLA-B\* i DRB1\* kod baka i djedova (pravilna segregacija).



Slika 26. Obiteljsko stablo Vidak-Gudelj



Slika 27. Obiteljsko stablo Vidak



Slika 28. Obiteljsko stablo Gudelj

Iz prikazanih slika na temelju dobivenih rezultata koji su određeni serološkom i molekularnom metodom, kod obitelji Vidak i Gudelj se vidi da se alel HLA-B\*35 prenosi s očeve strane, odnosno određen je kod ispitanika obitelji Vidak. Alele HLA – B\*35 imalo je troje od četvero djece.

Iz shematskog prikaza obitelji Gudelj uočeni su aleli HLA-B\*13, -B\*17, -DRB1\*07 koji su u uskoj korelaciji sa psorijazom. HLA tipizacija i članova obitelji s majčine strane otvara novu priču, odnosno ukazuje na mogućnost od oboljenje psorijazom.

U kontaktu s članovima obitelji, utvrđeno je da jedna od majčinih sestara ima i kliničku sliku psorijaze. Gore dobiveni nalazi potvrđuju jednu od glavnih osobitosti HLA sustava, a to je povezanost HLA sustava i bolesti.



## 5. RASPRAVA

Populacijska i obiteljska istraživanja pokazala su da glavni sustav tkivne podudarnosti (sustav HLA) ima važnu ulogu u etiopatogenezi bolesti. U ovom radu prikazana je povezanost dosadašnjih spoznaja o asocijaciji gena HLA sustava i određenih bolesti.

Ideja i cilj ovog rada bio je otkriti od koga potječe genetska predispozicija alela sustava HLA za bolest Hashimotov tireoiditis od kojeg je ispitanica bolovala. Stoga su u radu tipizirani svi članovi uže obitelji, koje su činili roditelji i njihova djeca (ispitanica, braća i sestra).

Nakon tipizacije članova obitelji serološkom metodom (test mikrolimfocitotoksičnosti), a potom i molekularnom metodom PCR-SSO (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide*) utvrđeno je da je ispitanica alel HLA-B\*35, koji se povezuje s Hashimotovim tireoiditisom, naslijedila s očeve strane.

U nekim od studija povezanosti sustava HLA i HT-a otkrivena je jaka povezanost između HT-a i DR4 (DRB1\*04, -DQB1\*03, -DQA1\*03). Zaštitni učinci također su otkriveni za DR13 (DRB1\*13, -DQB1\*06, -DQA1\*01) (17).

Vrlo značajan rezultat u ovom radu, zahvaljujući tipizaciji alela HLA majke bio je otkrivanje alela HLA-B\*13, -B\*17 i -DRB1\*07 koji se povezuju s genetskom predispozicijom za Psoriasis vulgaris (PV). U kontaktu i razgovoru s majkom potvrđena je klinička slika PV-a u obitelji što je potaknulo ideju o proširenju obitelji, tj. tipizaciji članova obitelji majčine strane, gdje su se nakon HLA tipizacije sestara s majčine strane također otkrili aleli vezani za PV. Samim tim je potvrđena vrlo važnu osobitost sustava HLA, a to je njegova povezanost s bolestima.

Dedukcijom, zahvaljujući genotipizaciji uže obitelji, bilo je moguće odrediti haplotipove djedova i baka te na taj način pratiti pravilnu segregaciju.

## 6. ZAKLJUČAK

- Određivanje antigena i alela sustava HLA izvodi se serološkim metodama (test mikrolimfocitotoksičnosti) i molekularnim metodama (PCR-SSP, PCR-SSO).
- Kod autoimunih bolesti terapija se određuje ovisno o tome je li bolest genetski uvjetovana. Za potvrdu kliničke slike bolesti pomaže HLA tipizacija kod pacijenata koji boluju od endokrinoloških bolesti (Hashimotov tireoiditis) i prisutnost alela HLA-B\*35. Kod pacijenata kojima je dokazana klinička slika psorijaze, podloga bolesti se pronalazi u genetskoj predispoziciji u slučaju prisutnosti alela HLA-B13, -B37, -B57(17), -Cw6.
- Obiteljske studije imaju nekoliko povoljnih karakteristika za otkrivanje gena.
- Raspodjela osobina unutar obitelji pokazala je matematičke omjere segregacije kod potomaka poznatih tipova razmnožavanja. Ovi očekivani omjeri segregacije korišteni su kao važan alat u proučavanju i otkrivanju ljudskih bolesti, pružajući dokaze za mnoštvo poremećaja jednog gena.
- Budući da članovi obitelji dijele predvidljivi udio svojih gena koji su identični po podrijetlu, pozadinska genetska varijacija se do neke mjere može kontrolirati.

## 7. LITERATURA

1. Crnić-Martinović M. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (predavanje). Rijeka, 2005.
2. Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transplant Immunology*, 2005;14:175-182.
3. Čečuk – Jeličić E, Jaman S. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (in press)
4. Trobonjača Z, Živčić-Ćosić S, Lisjak J. *Imunobiologija presađivanja bubrega* 2010;46:424-433.
5. Barlow AD. *Kidney transplantation. Surgery* 2017; 35:378-384.
6. Alelign T, Ahmed MM, Bobosha K, Tadesse Y, Howe R, Petros B. Review Article Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies. *Journal of Immunology Research*, 2018;1-18.
7. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing and clinical implications. *Yonsei Medical Journal* 2007; 48: 11-23.
8. Tinckam J. Basic Histocompatibility Testing Methods in: A. Chandraker et al. *Core Concepts in Renal Transplantation*. Springer Science+Business Media, 2012.
9. Nowak J, Mika-Witowska R, Graczyk-Pol E. Genetic Methods of HLA Typing. In: Michal Witt, Tomasz Szczepanski, Malgorzata Dawidowska. *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies*. Springer Science+Business Media; 2012. 325-339.
10. Kanevskiy L, Erokhina S, Kobyzeva P, Streltsova M, Sapozhnikov A, Kovalenko E. Dimorphism of HLA-E and Its Disease Association. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(21):5496.
11. Brčić L. Hashimotov tireoditis: otkrivanje genetskih varijanti uključenih u razvoj bolesti. Split, 2018.
12. McGrogan A, Seaman HE, Wright JW, de Vries CS. The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Nov;69(5):687-96.

13. Barić A, Brčić L, Gračan S, Škrabić V, Brekalo M, Šimunac M, Lovrić VT, Anić I, Barbalić M, Zemunik T, Punda A, Boraska Perica V. Thyroglobulin Antibodies are Associated with Symptom Burden in Patients with Hashimoto's Thyroiditis: A Cross-Sectional Study. *Immunol Invest*. 2019 Feb;48(2):198-209.
14. De Freire Cassia F, Fernandes Cardoso J, Cristovao Porto L, Ramos-e-Silva M, Carneiro S. Association of HLA Alleles and HLA Haplotypes with Psoriasis, Psoriatic Arthritis and Disease Severity in a Miscegenated Population. 2021 May 10. DOI: 10.2147/PTT.S258050.
15. Borecki IB, Province MA. Genetic and Genomic Discovery Using Family Studies. *Circulation* 2008;118:1057–1063.
16. Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, Mani A, Mani MA, Nelson-Williams C, Carew KS, Mane S, Najmabadi H, Wu D, Lifton RP. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 2007; 315:1278-1282.
17. Grubić Z, Žunec R, Čečuk – Jeličić E, Kehrin – Brkljačić V, Kaštelan A: Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. 2000 February 27. DOI: 10.1046/j.1365-2370.2000.00193.x.

## **8. ŽIVOTOPIS**

### **Osobni podaci**

Ime i prezime: Lara Vidak

Datum rođenja: 21. svibnja 2000.

Mjesto rođenja: Imotski, Hrvatska

### **Obrazovanje**

2007. – 2015. Osnovna škola Zmijavci, Zmijavci

2015. – 2019. Prirodoslovno-matematička gimnazija dr. Mate Ujevića, Imotski

2019. – 2022. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split

Smjer: Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### **Strani jezici**

Engleski jezik