

# Povezanost sustava HLA i Crohnove bolesti (obiteljska studija)

---

**Puđa, Meri**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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:176:431908>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**

*Repository / Repozitorij:*



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



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Meri Puđa**

**POVEZANOST HLA I CROHNOVE BOLESTI (OBITELJSKA  
STUDIJA)**

**Završni rad**

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Meri Puđa**

**POVEZANOST HLA I CROHNOVE BOLESTI  
(OBITELJSKA STUDIJA)  
ASSOCIATION OF THE HLA AND CROHN'S DISEASE  
(FAMILY STUDY)**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Doc. dr. sc. Esma Čečuk Jeličić, mag.biol.mol**

Split, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Prijediplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo **Znanstveno**

**polje:** Kliničke medicinske znanosti

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

### Povezanost HLA gena s razvojem Crohnove bolesti

Meri Puđa

**Sažetak:** Sustav HLA (engl. **H**uman **L**eukocyte **A**ntigen) je glavni sustav tkivne snošljivosti kod čovjeka. Geni sustava HLA nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6 te se dijele na 3 razreda s pripadajućim lokusima. Razred I čine lokusi: HLA-A, HLA-B, HLA-Cw i dok gene razreda II čine lokusi HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Osobitosti ovog najsloženijeg genetskog sustava su izraziti polimorfizam, neravnoteža udruživanja, segregacija gena, crossing-over, populacijska specifičnost. Antigeni sustava HLA smatraju se značajnim čimbenikom u imunološkom odgovoru te obrani organizma. Najznačajniji su faktori u transplantaciji organa kao i u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica, u populacijskoj genetici te sudskoj medicini. Značaj sustava HLA očituje se u povezanosti s bolestima tj. genetskoj predispoziciji za autoimune bolesti od kojih je najveća povezanost pokazana s reumatološkim (reumatoidni artritis, psorijatični artritis, ankilozantni spondilitis), gastroenterološkim bolestima (celijakija, ulcerozni kolitis, Crohnova bolest) i endokrinološkim bolestima (diabetes mellitus, Hashimotova bolest). Cilj ovog rada bio je istražiti povezanost gena HLA s Crohnovom bolešću i time utvrditi njihovu važnost u dijagnostici i utjecaj na razvoj ove bolesti. Crohnova bolest je kronična, upalna autoimuna bolest crijeva nepoznate etiologije koja se očituje različitim skupinom simptoma. Osim genetskih faktora, smatra se da neki okolišni čimbenici utječu na razvoj bolesti zajedno sa životnim navikama i stresom. U ovom radu prikazana je obiteljska studija pacijentice s Crohnovom bolesti i članova obitelji, kojima smo molekularnom metodom PCRSSO (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides*) odredili alele razreda I i II. Rezultati ovoga istraživanja su pokazali da sestra koja boluje od Crohnove bolesti nosi haplotip HLA-C\*04, DRB\*16, DQA1\*01, DQB1\*05 koji je naslijedila od oca.

**Ključne riječi:** HLA, aleli, geni, Crohnova bolest, PCR-SSO (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides*), PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*)

**Rad sadrži:** 42 stranice, 16 slika, 1 tablica, 0 priloga, 28 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Univeristy Department for Health Studies Bachelor**  
**Study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health **Scientific field:** Clinical medical sciences

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

### Association of the HLA genes with development of Crohn's disease

Meri Puđa

**Summary:** The human leukocyte antigen (HLA) system (the major histocompatibility system [MHC] in humans) is the main system of tissue tolerance in humans. The genes controlling expression of HLA system molecules are located on chromosome 6 and are divided into 3 classes. Class I is made up of loci: HLA-A, HLA-B, HLA-Cw while class II consists of HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP loci. Main characteristics of this most complex genetic system in humans are extreme gene polymorphism, linkage disequilibrium, gene segregation, crossing-over and population specificity. HLA antigens are one of the most significant factors in solid organ transplantation as well as hematopoietic stem cell transplantation. Another major importance of HLA system is shown in clinical diagnostics – specific HLA alleles are linked to autoimmune disorders, with the greatest association shown between rheumatic (rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis), gastrointestinal (celiac disease, ulcerative colitis, Crohn's disease) and endocrine diseases (diabetes mellitus, Hashimoto's disease). The aim of this paper was to investigate the association of HLA genes with Crohn's disease and thereby determine their importance in disease diagnostics and influence on the development of this disease. Chron's disease is a chronic, inflammatory autoimmune bowel disease of unknown etiology which is manifested by a different group of symptoms. Other than genetic factors, it is believed that some environmental factors influence the development of the disease together with lifestyle habits and stress. This paper presents a family study of a patient with Crohn's disease and family members where class I and II alleles were determined with PCR-SSO (engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction-**S**equence **S**pecific **O**ligonucleotides) method. The results of this research showed that the sister suffering from Crohn's disease carries the haplotype HLA-C\*04, DRB\*16, DQA1\*01, DQB1\*05 inherited from her father.

**Keywords:** HLA system, HLA genes, Crohn's disease, PCR-SSO (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides*), PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*)

**Thesis contains:** 42 pages, 16 figures, 1 tables, 0 supplements, 28 references

**Original in:** Croatian

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Povijest sustava HLA.....	1
1.2 Glavni sustav tkivne snošljivosti, HLA .....	2
1.3. HLA razredi I i II .....	4
1.3.1. HLA razred I .....	4
1.3.2. HLA razred II .....	5
1.4. Nasljeđivanje gena HLA.....	7
1.5. Nomenklatura HLA .....	8
1.6. Povezanost s bolestima .....	9
1.7 Metode određivanja .....	10
1.7.1. Serološko određivanje.....	10
1.7.2 Molekularno određivanje.....	12
1.8. Upalne crijevne bolesti i Crohnova bolest .....	12
1.8.1 Epidemiologija bolesti.....	13
1.8.2. Utjecaj genetike .....	14
1.8.3 Okolišni čimbenici .....	14
1.8.4 Klinička slika bolesti.....	15
1.8.5 Dijagnoza bolesti .....	15
1.8.6 Terapija i lijekovi .....	17
2. CILJ RADA .....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1 Ispitanici .....	22
3.2 Materijali i metode koje su se koristile za ispitivanje gena HLA .....	22
3.3 Određivanje HLA gena molekularnim metodama .....	22
3.3.1 Izolacija DNA molekule .....	22
3.3.2 PCR metoda.....	23
4. REZULTATI .....	28
5. RASPRAVA .....	30
6. ZAKLJUČAK .....	32
7. LITERATURA.....	33
8. POPIS SLIKA .....	35
9. ŽIVOTOPIS .....	36

# 1.UVOD

## 1.1 Povijest sustava HLA

Leukocitni antigeni sustava HLA (engl. *Human leukocyte associated antigens*) obuhvaćaju skup proteina smještenih na površini stanice odgovornih za regulaciju imunološkog sustava kod čovjeka te su ujedno glavni antigeni tkivne snošljivosti u čovjeka. U otkriću samog HLA sustava veliki značaj pridonio je Jean Dausset koji je prvi otkrio antigene sustava HLA. Zaključio je da različita antitijela u pacijentovim serumima pokazuju varijacije u građi leukocitnih staničnih membrana, a do kraja u svoga istraživanja, na osnovu različitih spoznaja i istraživanja predvidio je kako će HLA antigeni imati ključnu ulogu u transplantacijskoj medicini, transplantaciji tkiva, a posebice transplantaciji krvotvornih matičnih stanica i koštane srži što se daljnjim istraživanjima kroz niz godina i potvrdilo.

Također su tu i Rose Payne i Jon van Rood koji su dokazali kako postoje dvije različite vrste HLA antigena u serumu pacijenta te su te antigene nazvali 4a i 4b antigenima. Znanstvenica R. Payne otkrila je novi sustav antigena koji je nazvala sustavom LA. Ova otkrića bila su prekretnica za daljnja istraživanja koja su rezultirala otkrivanjem niza vrsta leukocitnih antigena koja pripadaju najpolimorfnijem sustavu čovjeka, a to je sustav HLA. (1,3) Kasnije je Jon van Rood iznio ideju da se 1967. godine osnuje Eurotransplant koji je na kraju i osnovan. (3)

Tijekom obrađivanja teme o glavnom sustavu tkivne snošljivosti bilo bi neprikladno ne osvrnuti se na Svjetski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (BMDW) čiji je dio i nacionalni registar u Hrvatskoj iz 1996. godine u Zavodu za tipizaciju tkiva, Klinike za urologiju, KBC Rebro koju je predvodio u to vrijeme akademik Andrija Kaštelan i prva voditeljica doc.dr.sc. Esma Čečuk – Jeličić. (3)

## 1.2 Glavni sustav tkivne snošljivosti, HLA

HLA sustav leukocitnih antigena (engl. *Human leukocyte associated antigens*) obuhvaća skup proteina na površini stanice odgovornih za regulaciju imunološkog sustava kod čovjeka. Sustav je glavnih antigena tkivne snošljivosti. Određen je genima koji se nazivaju MHC genima (engl. *Major Histocompatibility Complex*) koji su smješteni na kratkom kraku 6. kromosoma na regiji 6p21.2-21.3.

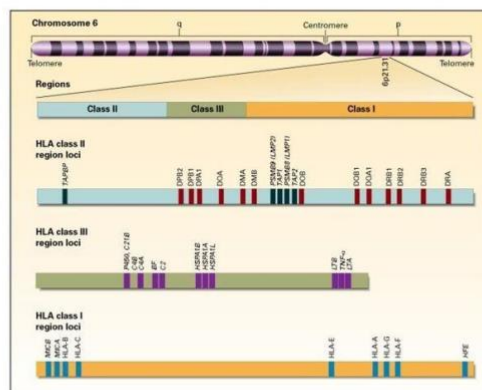
Glavne osobitosti ovog sustava su nepravilna tkivna zastupljenost, polimorfizam, crossing-over, segregacija gena, genska neuravnoteža udruživanja, križna reaktivnost, populacijska i rasna specifičnost. Polimorfizam sustava HLA odnosi se na postojanje izrazito velikog broja alela na pojedinim lokusima. Postoje dvije teorije o polimorfizmu, a to je da se moguće radi o preranom sazrijevanju za razliku od drugih vrsta genetskih sustava ili da su nastali kao sama pojava prirodne selekcije. Zbog toga sustav HLA predstavlja najpolimorfiji i najraznolikiji sustav čovjeka. Govoreći o rasnoj i populacijskoj specifičnosti, govorimo o tome da se unutar jedne rase ili populacije nalazi određena vrsta alela i haplotipova. (1) Neke od bitnijih uloga HLA sustava su te da kontrolira proizvodnju tkivnih antigena, specifičnih tkivnih protutijela, sudjeluje u imunosnoj reakciji te ima ulogu u razvitku autoimunih bolesti. (1)

Molekule sustava HLA imaju veliku ulogu u stimulaciji timusa na proizvodnju T limfocita koji tijekom sazrijevanja prolaze kroz razne procese antigen posredovane i antigen ovisne sinteze. Zbog konačnog sazrijevanja imaju važnu ulogu u posredovanju stanične imunosti. (1) Također, neki citokini mogu poticati prepisivanje gena i ekspresiju HLA molekula, a to su TNF  $\alpha$  (engl. *Tumor Necrosis Factor*), interleukini (IL-1 te IL-4) i INF  $\gamma$  (engl. *Interferon gamma*). (1)

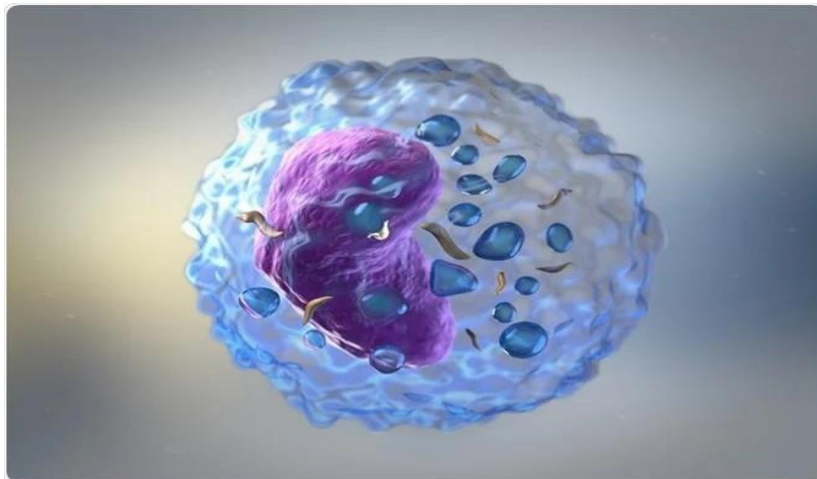
Postoje tri razreda gena HLA, a to su HLA I, HLA II te HLA III. Geni HLA razreda I su HLA-A, HLA-B i HLA-C dok su geni HLA razreda II geni lokusa HLA-DR, HLA-DQ i HLADP i upravo oni se smatraju najodgovornijima za razvoj autoimunih bolesti. Geni oba HLA razreda imaju ulogu u sintezi antigena HLA, dok geni HLA razreda III sudjeluju u sintezi komponenti komplementa. (1)



## Humani kromosom 6. s položajem gena razreda I,II i III



Slika 1. Prikaz regije HLA, preuzeto iz: <https://slideplayer.gr/slide/15081335/> (4)



Slika 2. Humani leukocitni antigen, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

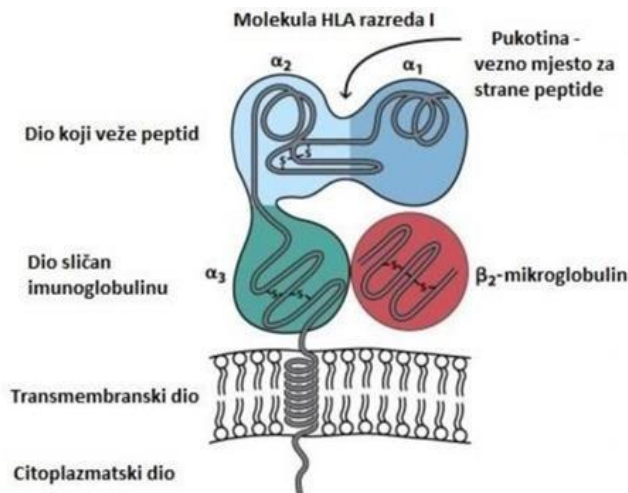
### 1.3. HLA razredi I i II

#### 1.3.1. HLA razred I

Geni HLA razreda I su skupina gena koja kodira proteine koje nalazimo na površini većine stanica u tijelu. Ova vrsta proteina igra ključnu ulogu u imunološkom sustavu identificirajući stanice kao vlastite ili strane te im pomažu u prepoznavanju i uništavanju stanica koje su zaražene virusima ili vlastite stanice koje su mutirale u tumore. Geni koji kodiraju molekule razreda I sustava HLA smješteni su telomerično na kratkom kraku kromosoma 6. Molekule HLA razreda I građene su od dva lanca: alfa ili laki lanac (kodiran HLA-A, HLA-B ili HLA-C genima) te beta-2-mikroglobulin. Laki lanac se sastoji od 350 aminokiselina i dijeli se na 3 dijela: transmembranski, citoplazmatski i izvanstanični s tri domene,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ . (1) Upravo ove domene nose raspored aminokiselina koje su dio njihove strukture i koje čine polimorfizam HLA sustava. (1) Spomenuti beta-2-mikroglobulin je tzv. teški lanac koji kodira gene koji se nalaze na 15. kromosomu. (1) Možemo ga detektirati kao slobodni beta-2mikroglobulin ili beta-2-mikroglobulin u serumu. On stabilizira molekulu i ne sudjeluje u predočavanju peptida. (1)

Najvažniji dio molekule čine domena  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  koje čine pukotinu, tj. vezno mjesto za peptide u samoj molekuli. Proteini HLA razreda I igraju vrlo bitnu ulogu u imunološkom prepoznavanju i prezentaciji antigenskih fragmenata (peptida) na površini stanica. Ovi peptidi mogu biti dijelovi vlastitih ili stranih proteina. U trenutku kada imunološki sustav prepozna prisutnost stranog peptida na površini stanice ima mogućnost pokretanja imunološkog odgovora protiv te iste stanice.

Geni HLA razreda I su izrazito polimorfni što znači da postoje mnoge varijacije ovih gena unutar ljudske populacije. Ova raznolikost omogućuje imunološkom sustavu da prepozna široki spektar potencijalnih prijetnji za organizam. Podudarnost gena između primatelja i davatelja organa ključna je za uspješnost transplantacije organa. Što je veća podudarnost između HLA gena primatelja i davatelja manja je vjerojatnost da će imunološki sustav primatelja prepoznati presađeni organ kao strano tijelo, razviti reakciju odbacivanja ili GVHD (engl. *Graft vs. Host Disease*) i odbaciti ga. (1)



**Slika 3.** Molekula HLA razreda I, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

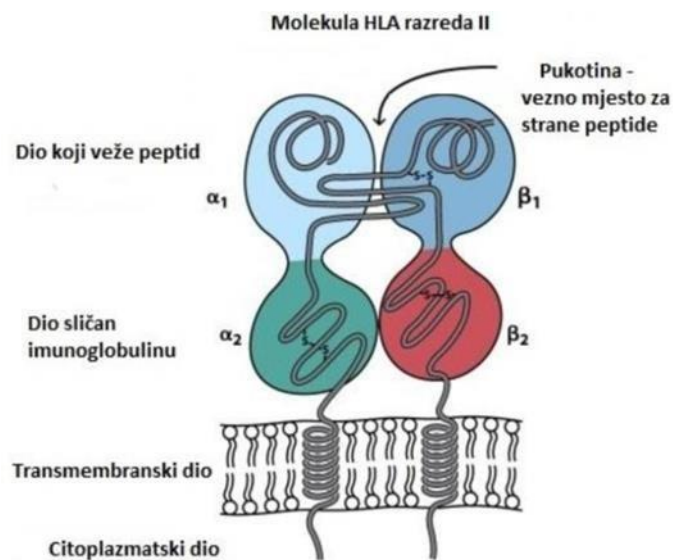
### 1.3.2. HLA razred II

Geni HLA razreda II su skupina gena koji kodiraju proteine prisutne na površini antigenpredstavljajućih stanica, poput dendritičnih stanica, makrofaga i B limfocita. Dijele se na 6 podregija, a to su: HLA-DM, HLA-DR, HLA-DO, HLA-DQ, HLA-DN i HLA-DP. (3,8)

Ovi proteini imaju ključnu ulogu u imunološkom sustavu prezentirajući antigene T limfocitima kako bi pokrenuli imunološki odgovor na strano tijelo. Smješteni su centromerno na kraćem kraku kromosoma 6 na antigen predstavljajućim stanicama. (1) Izvanstanični dio molekule HLA razreda II građen je od dva lanca: alfa lanac ili teški lanac (kodiran HLA-D genima) i beta lanac ili laki lanac (kodiran HLA-DP, HLA-DQ ili HLA-DR genima). Sastoji se od četiri domene koje su:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  i  $\beta_2$ . Domene  $\alpha_1$  i  $\beta_2$  čine najpolimorfniji dio molekule HLA koje tvore pukotinu koja ima ulogu veznog mjesta za strane peptide. Domene  $\alpha_2$  i  $\beta_2$  čine nepromjenjivi dio HLA molekule. Na  $\beta_2$  domenu vežu se pomoćnički (CD4+) T limfociti. Ovi proteini tvore kompleks koji se nalazi na površini antigen-predstavljajućih stanica i igraju bitnu ulogu u prezentaciji egzogenih antigena T limfocitima. (1,3)

Antigenske molekule koje su unesene u tijelo izvanstaničnim putevima, poput bakterija ili virusa, procesiraju se unutar antigen-predstavljajućih stanica i prezentiraju se T limfocitima uz pomoć antigena HLA razreda II. To pokreće imunološki odgovor u obliku stvaranja specifičnih antitijela i aktivacije pomoćničkih T limfocita.

Geni razreda II sustava HLA su izrazito polimorfni što znači da postoje mnoge varijacije ovih gena unutar ljudske populacije. Ova raznolikost omogućuje imunološkom sustavu da prepozna i odgovori na široki spektar potencijalnih prijetnji za organizam. Varijacije u genima HLA razreda II povezane su s povećanim rizikom od razvoja autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa, lupusa, multiple skleroze te gastrointestinalnih bolesti. Ove bolesti nastaju kada imunološki sustav pogrešno prepoznaje vlastita tkiva kao strana i napada ih. (1)

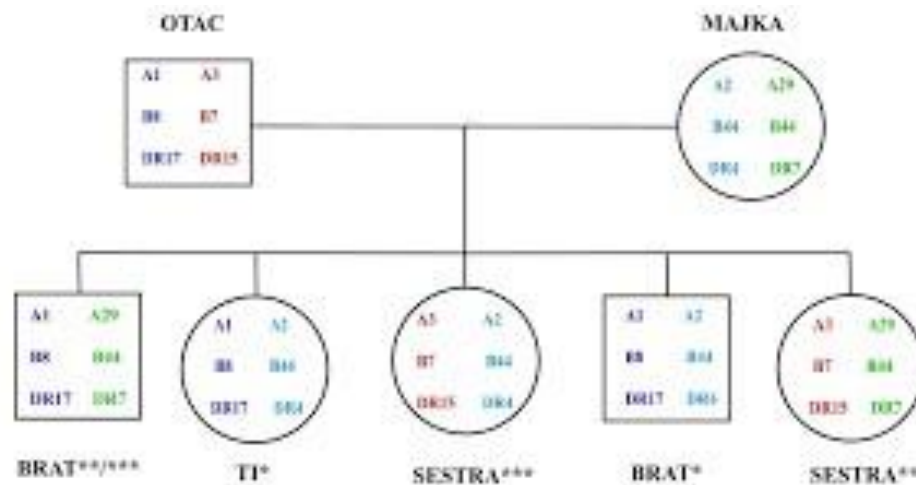


**Slika 4.** Molekula HLA razreda II, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

## 1.4. Nasljeđivanje gena HLA

Geni HLA nasljeđuju se kodominantno od oba roditelja po Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Genetska varijacija unutar HLA gena je izrazito visoka među ljudima. Ova raznolikost omogućuje imunološkom sustavu da prepozna i odgovori na širok spektar stranih tvari. (1)

Međutim, ova raznolikost također može dovesti do problema u transplantaciji organa, budući da imunološki sustav prepoznaje donirani organ ili tkivo kao strano ukoliko se antigeni sustava HLA donora razlikuju od onih u primatelja, što dovodi do odbacivanja organa. Kompatibilnost između primatelja i darivatelja određuje se podudarnošću HLA gena - što su HLA geni primatelja i donatora sličniji, to je manje vjerojatno odbacivanje organa. Tipizacija HLA sustava koristi se u izboru odgovarajućeg davatelja tkiva pri procesu presađivanja organa te pomaže u postavljanju dijagnoze bolesti. Tipizacijom tkiva se na svakom lokusu određuju dva alela, oba od roditelja. (1)

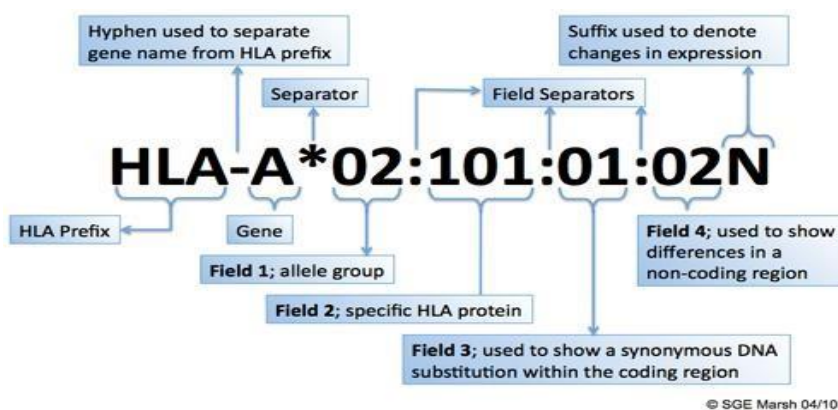


**Slika 5.** Prikaz genske karte HLA, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

## 1.5. Nomenklatura HLA

Godine 1958. otkriven je sustav HLA, a otkrivanjem sve većeg broja varijanti antigena odnosno alela lokusa ovog sustava doveo je do problema ujednačenosti u nomenklaturi antigena i gena sustava HLA među znanstvenicima koje su iste otkrivali i imenovali. Upravo iz toga razloga, 1968. godine osnovan je Odbor za nazivlje sustava HLA koji je aktivan i do sada. Njihova je odgovornost dati službena imena za gene i antigene koji se nalaze u ovom sustavu. Ovakvo je imenovanje vrlo komplicirano i zahtjevno jer naziv antigena sadrži oznaku HLA-A, HLA-B te HLA-C s identifikacijskim brojem antigena za označavanje njegove specifičnosti koji se određuju serološkom metodom. Taj broj se stavlja prije samog dvotočja i ako je taj broj jednoznamenkast navodi se bez broja 0. (1,3)

Dokazivanje antigena i alela molekularnim metodama u svrhu nomenklature je nešto složeniji proces jer pojedinačni alel ima svoj kod koji ima najmanje 4 seta brojeva razdijeljena dvotočjem. Samo ime gena sadržava i oznaku lokusa kod kojeg se stavlja znak \* koja služi za razdvajanje identifikacijskog broja alela. Nakon dvotočja se nalazi podtip samog gena koji je određen redoslijedom kojim je otkriven slijed molekule DNA. Nomenklatura se privodi kraju kad se dodaju još 2 seta brojeva koji ukazuju na mogućnost postojanja nekih drugih mutacija. Na kraju samog imena gena može se naći posebno slovo koje služi za obilježavanje ekspresije alela nekog gena. N slovo znači bez ekspresije (nul alel), L slovo alel sa slabom ekspresijom, slovo S alel koji se izlučio, C slovo alel koji ima mogućnost izlučivanja u citoplazmu, Q slovo za alel s neodređenom ekspresijom gena i A slovo s neregularnom ekspresijom. (1, 7, 9, 10)



**Slika 6.** Nomenklatura HLA, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

## 1.6. Povezanost s bolestima

Sustav humanih leukocitnih antigena se najviše povezuje s razvojem raznih bolesti nego li ijedan drugi sustav čovjeka. Najviše se povezuje s autoimunim bolestima dok i ostale bolesti nisu i ne moraju biti iznimka. HLA se s bolešću povezuje ako osoba ima i nosi ciljane gene koji su povezani s određenim tipom bolesti te tako i nosi povećan rizik od oboljenja od te iste ciljane bolesti za razliku od osoba koje nisu nositelji za taj gen i nemaju predispoziciju za oboljenje. Ta povezanost je iznimno složena, a može se objasniti na dva načina. (1)

Prvo je to da postoji neravnoteža udruživanja između alela i lokusa koja uzrokuje bolest i određenog gena HLA koji je povezan s tom bolesti. Drugo je da HLA molekule kao takve već u početku imaju ulogu u nastajanju bolesti djelovanjem četiri različita modela. Prvi razjašnjava kako HLA molekula slabo predočuje bakterijski ili virusni antigen. Drugi model kaže kako je molekula HLA smještena na površini stanice i djeluje u smislu veznog mjesta za bakterijski ili virusni uzročnik. Treći nam model govori da molekula HLA kao molekula koja bakterijskoj ili virusnoj čestici omogućuje transport u stanicu. Prema četvrtom modelu podudaranje gena sustava HLA i patogena uzrokuje neprepoznavanje stranoga patogena od strane domaćina. (1) Ovo su tipovi bolesti koji se povezuju s HLA sustavom:

**Autoimune bolesti:** Varijacije u sustavu HLA koje mogu povećati osjetljivost pacijenta na autoimune bolesti poput reumatoidnog artritisa, lupusa i multiple skleroze te nekih kroničnih bolesti crijeva koje se također ubrajaju u skupinu autoimunih bolesti. Autoimune bolesti su bolesti kod kojih dolazi do pretjerane reakcije imunološkog sustava koji zatim napada i svoje vlastite stanice i time uzrokuje pojavu određenih bolesti ovisnu koji tip stanica napada.

**Infekcije:** HLA sustav igra ključnu ulogu u određivanju individualne osjetljivosti na različite vrste infekcije. Na primjer, neke varijacije HLA sustava mogu povećati ili smanjiti rizik od infekcije virusima poput HIV-a ili nekih vrsta hepatitisa kao što je hepatitis C.

## 1.7 Metode određivanja

Antigeni sustava HLA određuju se serološkim testiranjima dok se geni HLA sustava određuju metodama molekularne biologije. Najpoznatiji serološki test za određivanje HLA antigena je test mikrolimfocitotoksičnosti dok se molekularna testiranja baziraju na lančanoj reakciji polimerazom, (engl. *Polymerase chain reaction*). U rutinskoj upotrebi za dijagnostiku autoimunih bolesti, koriste se dvije metode, a to su PCR-SSO (engl. *Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotides*) i PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primer*). Svaki od ova dva testa je različit i koristi se u mnoge svrhe koje će se tijekom rada detaljnije pojasniti. (1)

### 1.7.1. Serološko određivanje

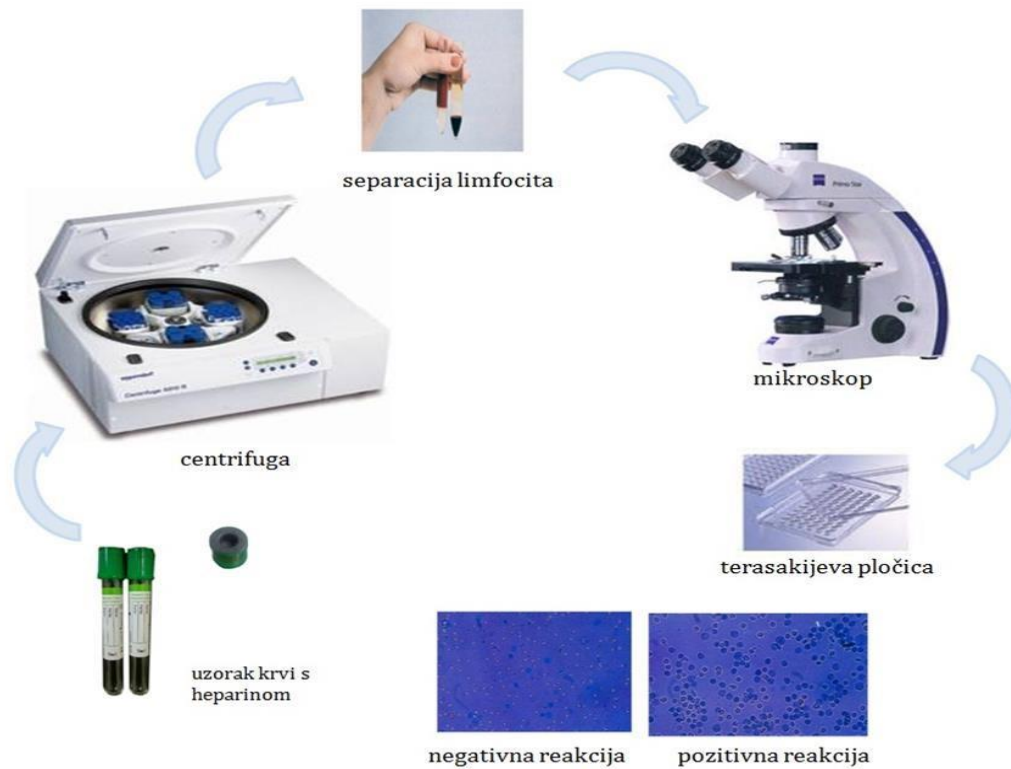
Serološki test nazivamo još testom mikrolimfocitotoksičnosti koji ima svrhu u određivanju antigena sustava HLA, odnosno molekule na površini stanice (limfocita). Temelji se na reakciji specifičnih protutijela sa antigenima koji su smješteni na limfocitima bolesnika. Serološki testovi izvode se u laboratorijima koji su prikladno opremljeni za ovakav tip analize. (1)

Postupak se temelji na izolaciji stanica prilikom čega se uzorkuje krv u epruvetu s heparinom kao antikoagulansom, a zatim se izoliraju bijele krvne stanice koje sadrže HLA antigene na svojoj površini separacijom na gradijentu gustoće i koncentracije. Koncentracija i vijabilnost dobivene suspenzije limfocita određuje se na Burker-Turk-ovim komoricama te podešava na optimalnu koncentraciju po uputama proizvođača komercijalnih pločica na kojima se nalaze serumi sa različitim specifičnostima pomoću kojih će se odrediti koji su antigeni prisutni na limfocitima pacijenta. Dobivena suspenzija limfocita iz uzorka pacijenta izlaže se navedenim serumima, te se nakon inkubacije ( 30 minuta) dodaje kunićji komplement koji će potaknuti citotoksičnu reakciju u onim jažicama na tipizacijskoj pločici u kojima je došlo do vezanja specifičnog antitijela na antigene prisutne na stanicama.

Ako se na površini stanice nalaze određeni HLA antigeni, antitijelo se veže za antigen i daje nam pozitivan ili negativan rezultat ovisno o stupnju mrtvih ili živih stanica. Za interpretaciju rezultata služimo se svjetlosnim mikroskopom i u tipizacijske listiće s poznatom specifičnošću seruma upisujemo pozitivne rezultate.



Na mjestu gdje je došlo do citotoksične reakcije antigen-antitijelo dobit ćemo pozitivan rezultat koji pod svjetlosnim mikroskopom vidimo kao plavo obojane limfocite (zbog citotoksične reakcije došlo je do pucanja membrane stanice i prodiranja boje-trypan blue). Za razliku od negativne reakcije gdje nam limfociti pod svjetlosnim mikroskopom izgledaju poput bisera. (1)



**Slika 7.** Test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT) serološka metoda određivanja gena HLA, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

### 1.7.2 Molekularno određivanje

Molekularno određivanje alela lokusa sustava HLA izvodi se metodama koje se nazivaju PCR-SSO i PCR-SSP. Za sve testove potrebno je izolirati molekulu DNA iz uzorka pune krvi korištenjem komercijalnih kitova koji sadrže sav potrebni potrošni materijal i reagense za izoliranje ukupne genomske DNA iz uzorka krvi. Komercijalni kitovi validirani za dijagnostičku uporabu jamče dobivanje DNA zadovoljavajuće čistoće i koncentracije za izvođenje daljnjih molekularnih ispitivanja. Nakon analize, rezultati se tumače kako bi se odredila genetska kompatibilnost u kontekstu transplantacijskih postupaka ili istraživanja povezanih s imunološkim odgovorom i bolestima. (1)

### 1.8. Upalne crijevne bolesti i Crohnova bolest

Upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*) je glavni naziv za kroničnu crijevnu bolest koja obuhvaća gastrointestinalni trakt iz do sada nepoznatih uzroka. U ovu skupinu bolesti možemo navesti ulcerozni kolitis te Crohnovu bolest. Crohnova bolest je kronična upalna bolest crijeva kojoj se ne poznaje uzrok i može zahvatiti cijeli gastrointestinalni trakt, od usta do anusa. (5)

Upala zahvaća sve slojeve crijevne stijenke s karakterističnom pojavom ne kazeoznih granuloma. Promjene nastale kao rezultat upale raspoređene su nepravilno. Crohnova bolest najviše pogađa osobe mlade životne dobi i traje cijeli život te se zbog toga i naziva kroničnom upalnom bolesti crijeva. Crohnova bolest je ujedno i autoimuna bolest kod koje vlastite stanice imunološkog sustava napadaju razne stanice u tijelu i time uzrokuju nastanak određenih vrsta bolesti koje napadaju razne organske sustave. Kod ove bolesti izrazito je važno uočiti simptome na vrijeme i reagirati prikladno na same simptome jer će ubuduće bolest napredovati i uzrokovati sve teže i teže posljedice kako na crijeva tako i na život samoga pacijenta.

Također, važno je održavati stadij remisije u kojem nema simptoma upale kako bi pacijent što bolje živio. Također, iznimno je važna primjena odgovarajuće terapije koja je propisana od strane gastroenterologa te ako terapija nakon nekog vremena postane ne odgovarajuća, pacijent treba promijeniti terapiju. (5)

Održavanje zdravog stila života, ne pušenje, ne konzumiranje nezdrave hrane i pića uključujući alkohol i tjelovježbu su pogotovo važni za život osobe s ovim tipom kronične upalne bolesti. Smatra se da je stres jedan od glavnih čimbenika u razvoju ovakvih tipova bolesti, stoga se preporučuje izbjegavanje stresnih situacija i pronalaženje načina kako ga se osloboditi.



**Slika 8.** Prikaz razlikovanja Crohnove bolesti s ulceroznim kolitisom, preuzeto iz: <https://rattibha.com/thread/1254860450031734784> (28)

### 1.8.1 Epidemiologija bolesti

U zadnjih par stotina godina primijetio se izraziti porast u broju oboljelih od Crohnove bolesti pogotovo u europskoj i sjeverno-američkoj populaciji gdje se primjećuje nešto veća pojavnost, na 100 000 stanovnika incidencija je 3,1-14,6 oboljelih. U Africi te Južnoj Americi ove bolesti nema, dok se u Japanu bilježi niska incidencija. Neke studije su dokazala kako je veća pojavnost kod ženskog spola i to u omjeru 1,2:1, a najviše je dijagnosticirana između 15 i 30 godina.

Što se tiče Republike Hrvatske bilježen je porast oboljelih u Splitsko-dalmatinskoj županiji i to 686 oboljeli u periodu od 2006.-2014. Od tog broja najviše su oboljeli muškarci, i to njih 72, a žena 58 oboljelih. Trenutno je prosječna godišnja pojavnost ove bolesti veća kod muškaraca nego kod žena kod osoba koje žive u ruralnim dijelovima grada, otocima te stanovništvu većeg obrazovnog statusa. Točan uzrok ove bolesti je nepoznat te neka istraživanja upućuju na genetsku predispoziciju, okolišne faktore i koji mogu uzrokovati pretjerani imunološki odgovor što uzrokuje oštećenja. (6,7)

### 1.8.2. Utjecaj genetike

Postoje istraživanja koja upućuju da bi genetika i nasljeđivanje mogli igrati vrlo važnu ulogu u nasljeđivanju ove vrste bolesti. Također, kod monozigotnih blizanaca je veća incidencija nego li kod dizigotnih blizanaca. Crohnova bolest je multifaktorska bolest i ne može se objasniti preko Mendelovih zakona nasljeđivanja. Postoji veza između Crohnove bolesti periocentrične regije 16. kromosoma koja se nazvala IBD1 lokusom. Gen NOD2 koji je kodiran na tom istom lokusu kodira za protein na monocitnim stanicama i inhibira time aktivaciju jezgrinog faktora  $\kappa$ B. Utvrđeno je kako mutacija na NOD2 genu ima utjecaj na ometanje imunološkog odgovora što vodi k prekomjernom stečenom imunom odgovoru koji uzrokuje teško oštećenje. (8)

### 1.8.3 Okolišni čimbenici

Osim genetike, okolišni čimbenici su također bitni u razvoju Crohnove bolesti te se porast incidencije povezuje s okolišem. Pušenje je najbolje istraživano i proučen faktor rizika te je prevalencija bolesti veća kod pušača. Također, ova bolest se češće javlja kod osoba koje se ne bave nikakvom tjelesnom aktivnosti te ljudi zbog većeg ekonomskog statusa.

Dokazala se povezanost ove bolesti i sa ženama koje su bile na terapiji oralnim kontraceptivima. Povećana konzumacija rafiniranih šećera, a smanjena konzumacija svježeg voća i povrća može dovesti do razvoja bolesti. Neke studije su istaknule dojenje kao čin u kojem se stječe rana imuno modulacija gastrointestinalnoga trakta. (9)

#### 1.8.4 Klinička slika bolesti

Simptomi ovise o stupnju i proširenosti same bolesti. Bolest najčešće nastupa za vrijeme 30-ih godina života s prolaznim proljevom i bolom u donjem desnom dijelu abdomena što karakterizira upalu apendiksa. Vrlo mali broj pacijenata ima tešku bolest s obilnim proljevima, gubitkom tekućine i elektrolita, gubitkom tjelesne težine. Bol je grčevita, nagla, a jačina i sama mjesto boli ovisit će o mjestu i stupnju suženja crijeva.

Osnovna karakteristika prirodnog tijeka Crohnove bolesti je opstrukcija te se u ranijim stadijima bolesti radi o intermitentnoj opstrukciji nastaloj zbog edema i spazma stijenke dok se kasnije radi o fibrostenotičkim strikturama i suženjima stijenke zbog kronične upale. Opstrukcija i fistulizacija crijeva dovodi do naseljavanja bakterijama i razvoja sindroma slijepe vijuge kod koje je jedan od glavnih simptoma proljev koji može nastajati kao posljedica smanjene apsorpcije ileuma za žučne soli ili resekcije dijela crijeva što dovodi taloženja žučnih soli koje potiču nastanku proljeva. (10)

Također, upala debelog crijeva potiče proljev zbog smanjene apsorpcije vode i elektrolita te zbog izlučivanja sluzi i gnoja. Vrućica je često prisutan simptom koji se javlja kao rezultat upale i može rasti do 38 °C. Masivno krvarenje je jako rijetka pojava. Na trajanje bolesti utječu životne navike, vrijeme otkrića bolesti kao i primjena određene terapije. Neke se maligne bolesti povezuju s ovim tipom bolesti, a to su: kolorektalni karcinom, adenokarcinom tankog crijeva, adenokarcinom anusa, Hodgkin i non-Hodgkin limfom. Povećana incidencija hematološkim malignih oboljenja može se pripisati učincima imuno modulatora i bioloških lijekova koji se mogu koristiti u liječenju. (11)

#### 1.8.5 Dijagnoza bolesti

Za postavljanje potpune dijagnoze potrebna je potpuna klinička prezentacija same bolesti te laboratorijske potvrda, uz radiološki, endoskopski i patohistološki nalaz. Evaluacija kliničke slike uz ove nalaze uključuje i osobnu i obiteljsku anamnezu, fizikalni pregled pacijenta, trajanje i intenzitet. Također se zahtijeva obratiti pažnju na simptome, gubitak tjelesne težine, slabokrvnost i hipoalbuminemiju. Izrazito je važan i pregled anogenitalne regije koje kod neke skupine bolesnika početni nalaz glasi perianalni apsces, fisura ili fistula. (12)

Što se tiče kliničkog nalaza ova se bolest može različito prezentirati. Najčešći simptomi su proljev, abdominalna bol, povišena tjelesna temperatura te gubitak tjelesne težine. ECCO (engl. *European Chron's and Colitis organisation*) su bile prve smjernice koje su se bazirale na dijagnozi i terapiji Chronove bolesti koje se i dan dana koriste. Kod novo dijagnosticiranih bolesnika kao i kod onih davno oboljelih poželjno je izračunati indeks aktivnosti Crohnove bolesti. (10)

U laboratorijskim nalazima možemo vidjeti samo medijatore kronične upale i malapsorpcije i zbog toga su nam laboratorijski nalazi izrazito nespecifični. Od svih pretraga koje se koriste to su pretrage koje uključuju kompletnu krvnu sliku (KKS), medijatore upale, jetrene enzime, biokemijske parametre i razinu vitamina D. Slabokrvnost kod oboljelih može biti rezultat sindroma malapsorpcije vitaminom B12, manjkom folne kiseline te učinkom kronične upale na koštanu srž. Kod teških oblika bolesti možemo naći hipoalbuminemiju, hipokalijemiju, hipomagnezijemiju, također, i povišenje enzima alkalne fosfataze (ALP) kod produljenog sklerozirajućeg kolangitisa, visoke koncentracije aminotransferaze kod perikolangitisa i hepatitisa. Biokemijski biljezi koji se koriste su kalprotektin i fekalni laktoferin koje dobivamo iz stolice, dok biokemijski biljezi koje dobivamo iz stolice su puno bolji i specifičniji za prikaz upalnog procesa. Oba biokemijska biljega se oslobađaju degranulacijom neutrofilnih granulocita u početku upale. (10)

Poželjno je uvijek obaviti kolonoskopiju te po mogućnosti ileoskopsku pretragu kako bi se provjerila difuzibilnost same bolesti te uzeli bioptati s raznih mjesta. Endoskopski nalaz se može razlikovati što ovisi o duljini trajanja i stupnju intenziteta bolesti u kojoj se pacijent nalazi. Ono što nije moguće dokazati endoskopskim pregledima je transmuralnost upale. Nalazom granuloma i perianalne bolesti približavamo se do postavljanja dijagnoze. Rektosigmoidoskopijom ćemo dokazati ako ga ima, edem i eritem sluznice zbog proljeva. Ova metoda je ograničena jer je rektum u većine zahvaćen. Također treba pregledati i gornji gastrointestinalni trakt jer mogu biti zahvaćeni i tanko crijevo uključujući i duodenum, želudac, ezofagus i drugi. (10)

Onim bolesnicima s kliničkom slikom akutnog abdomena trebalo bi obaviti rendgenski pregled trbušne šupljine u ležećem i stojećem položaju te CT abdomena. Ovaj tip pretraga može biti koristan jer se njima može dokazati opstrukcija, apscesi, fistule, te neke druge moguće uzroke akutnog zbivanja.

Također, treba uraditi i ultrazvučni pregled zbog mogućih komplikacija na bilijarnom i uro-poetičkom traktu. UZV može ukazati da postoji neka ginekološka patologija ako se radi o ženskom spolu.

Pretraga koja može biti od pomoći je i MR enterografija koja je ne invazivna pretraga koja bez ionizirajućeg zračenja vizualizira apscese, fistule, opstrukciju crijeva i moguće izvore krvarenja. Može se napraviti MR zdjelice. (13)

#### 1.8.6 Terapija i lijekovi

Terapija je za svakog pacijenta drugačija i tijekom postavljanja same terapije mora se pristupiti individualno za svakog pacijenta. Cilj same terapije je održavanje stanja remisije. To možemo postići na dva načina, to su „step up“ i „step down“ kod kojih se najviše koriste „step up“ terapijski pristup. Svrha ovom „step up“ terapijskom pristupu je zaobići korištenje skupih i toksičnih lijekova ako to pacijent ne zahtijeva.

U liječenju se koriste aminosalicilati, kortikosteroidi te imuno modulatori. Što se tiče terapijskog pristupa „step down“ on se zasniva na korištenju najefikasnijih lijekova te kako bi njihova primjena mogla mijenjati tijekom same bolesti i rezultirati manjom ovisnošću o steroidnim preparatima i tako smanjiti nužnost za hospitaliziranje pacijenata. (14) Također, može biti koristan i drugačiji pristup liječenju pre tipu same bolesti, je li ona predominantnog tipa tzv. upalni tip bolesti (restriktirajućem-nepenetrirajućem), strukturirajućeg oblika (fibrosteničnoopstruktivni tip) ili se radi o penetrirajućem (fistulirajućem) obliku bolesti. U liječenju same bolesti koriste se pet različitih skupina lijekova, a to su: aminosalicilati, kortikosteroidi, imuno modulatori, antibiotici i biološka terapija. (12)

#### *Aminosalicilati*

Aminosalicilati pripadaju vrsti lijekova koji imaju protuupalno djelovanje tako što inhibiraju proizvodnju upalnih medijatora, citokina i pojačanim izražajem PPA -receptora (*engl. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) epitelnih stanica debelog crijeva. Lijekovi koje možemo predstaviti kao glavne su Mesalazin i Sulfasalazin. Ova skupina lijekova djeluje lokalno ili na kožu crijeva te je važno osigurati ovim lijekovima da postignu učinak gdje trebaju.

Mogu se primijeniti u obliku kapsule s ovojnicom koja se primjenjuje oralnim putem ili u obliku klizmi i supozitorija.

Aminosalicilati se koriste godinama kao vodeći lijekovi protiv ove bolesti, no problem je što nisu djelotvorni na duge staze održavanja bolesti.(14) Ako se primijenila kirurška terapija i time postiglo stanje remisije, aminosalicilati se koriste kao terapija održavanja i to u dozi iznad 2 mg/dan. (15)



**Slika 9.** Lijek Pentasa s aktivnim lijekom Mesalazin, preuzeto iz: <https://www.indiamart.com/proddetail/500mgpentasa-mesalazin-tablets-24906628148.html> (26)

### *Kortikosteroidi*

Ovo je skupina snažnih protuupalnih lijekova koji blokiraju brojne upalne procese. Primjenjuju se oralnim putem ili putem kože. Mogu imati brojne nuspojave kao što su akne, edemi, osteoporoza koje karakterizira primjena sustavnih kortikosteroida. Ako se primjenjuju nesustavni kortikosteroidi koji za razliku od sustavnih nemaju toliko nuspojave. Sustavni kortikosteroidi primjenjuju se kod aktivne bolesti te recidiva bolesti. (16)



### *Imuno modulatori*

Tu možemo spomenuti Azatiopirin i 6-merkaptopurin koji spadaju u skupinu Tiopurina koji se koriste kod pacijenata koji su ovisni o primjeni steroida, onih koji su pak rezistentni na steroide te kod onih s produljenom bolesti tankog crijeva. Djeluju tako što smanjuju i uklanjaju steroide i održavaju remisiju bolesti. Može se koristiti i Metotreksat kod bolesnika koji se otporni na Tiopurine. (15)

### *Antibiotici*

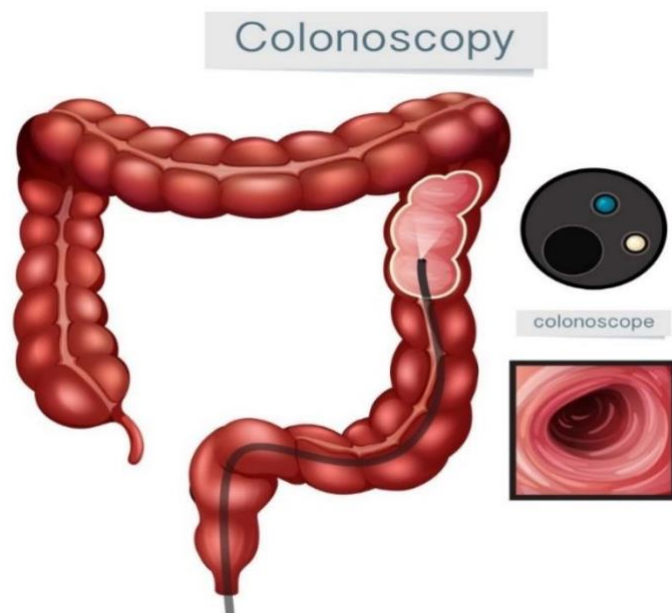
U liječenju ovog tipa bolesti od antibiotika se mogu koristiti Metronidazol i Ciprofloksacin koji se često koriste u slučaju sepse te perianalne bolesti. Terapija traje dugo, oko 6 mjeseci. (15,17)

### *Biološka terapija*

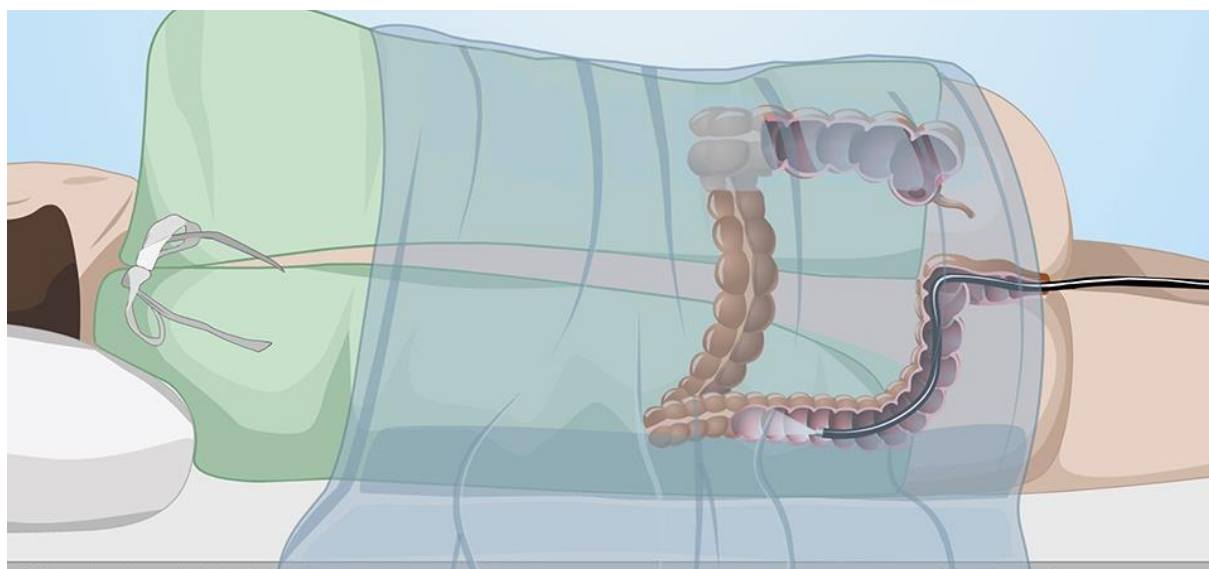
Tip biološkog lijeka usmjeren je na aktivnost nekih upalnih medijatora. Predstavnici ove skupine lijekova su TNF-alfa, Infiksimab, Adalimumab, Etanercept, Vedolizumab. (17) Najviše se koristi Infiksimab koji je zapravo kimeričko monoklonsko antitijelo koje djeluje snažno protuupalno time što uzrokuje smrt upalnih stanica. (18)

### *Kirurško liječenje*

Iako se preferira liječenje ove bolesti primjenom određene vrste lijekova, nekad je nužno provesti i kirurško liječenje. Ako bolest počne agresivno i očituje se s teškom kliničkom slikom koju je teško kontrolirati i koja jako brzo napreduje s time da uzrokuje perforacije ili opstrukcije tankog crijeva, razvijanjem intraabdominalnog apscesa, fistula, mora se liječiti kirurškim putem. Više od 70% bolesnika treba barem jedan kirurški zahvat dok će njih 45% trebati i drugu operaciju. Prva indikacija za kirurško liječenje je ako terapija lijekovima ne djeluje te se razvijaju terapijske komplikacije kao npr. ovisnost o steroidima. Druga indikacija za korištenje je ako se razviju trajne ili rekurentne opstrukcije crijeva, fistule, megakolon te perforacije kolona. Treća indikacije je ako se razviju apscesi. (15)



**Slika 10.** Kolonoskopija, preuzeto iz: <https://gihealthtampabay.com/what-is-a-colonoscopy-and-why-do-it/> (25)



**Slika 11.** Procedura izvođenja testa, preuzeto iz: <https://www.youandcolonoscopy.com/en-cln/view/m301-s03what-happens-during-and-after-a-colonoscopy-slide-show> (27)

## 2. CILJ RADA

Cilj ovoga rada je objasniti zašto je važno određivanje antigena i gena sustava HLA vezano uz genetsku predispoziciju za niz bolesti među kojima su: autoimune bolesti (reumatoidni artritis, celijakija, ulcerozni kolitis, Crohnova bolest).

Rad je dio obiteljske studije u kojoj je ispitano nasljeđivanje bolesti unutar obitelji.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 Ispitanici

Obiteljska studija podrazumijeva obitelj od 4 člana od kojih je samo jedan član obolio od Crohnove bolesti i kojemu nije pronađena nijedna poveznica ni s kojom drugom bolešću za vrijeme tipiziranja A, B i C lokusa. Tipizacija uzoraka koje smo dobili od sva 4 člana obitelji tipizirana su i obrađena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva i transplantacijsku medicinu, KBC Križine, Split, 2024. godine.

### 3.2 Materijali i metode koje su se koristile za ispitivanje gena HLA

U ovoj studiji koristile su molekularne metode određivanja alela lokusa sustava HLA PCR-SSO i PCR-SSP iz uzoraka pune krvi ispitanika.

### 3.3 Određivanje HLA gena molekularnim metodama

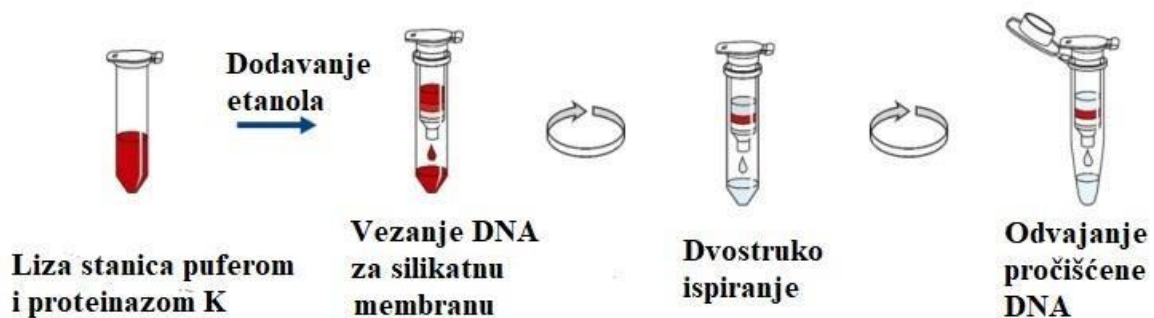
Molekularne metode za razliku od seroloških daju mogućnost veće razlučivosti kao i veću pouzdanost dobivenih rezultata . Dvije molekularne metode koje smo koristili prilikom određivanja alela lokusa sustava HLA u ovoj studiji su : PCR-SSO te PCR-SSP za koje nam je nužno da u početku izoliramo DNA molekulu pacijenta. (1)

#### 3.3.1 Izolacija DNA molekule

Ovo je prvi korak koji se mora napraviti jako pažljivo i precizno ako želimo dobiti reprezentativne i točne rezultate. Uzorak koji se koristi za izolaciju DNA je uzorak periferne venske krvi koja se uzorkuje u epruvetu s ljubičastim čepom i dodatkom antikoagulansa, K<sub>2</sub>EDTA.

Također, uzorku je potrebno dodati proteinazu K te pufer za liziranje stanica koji će se pobrinuti za razgradnju proteinskih molekula te osloboditi DNA molekulu iz jezgre.

Uzorak se inkubira po vremenu koji je napisan u protokolu nakon čega dodajemo etanol ili bilo koji oblik kiseline što treba dobro protresti na vorteksu. Iduće je premještanje uzroka u filter tubicu u kojoj se DNA veže s mnogim drugim nečistoćama za silikatnu membranu. Nakon toga se sve ispere što ponovimo dva puta. Posljednji korak je izolacija čiste DNA. (1)

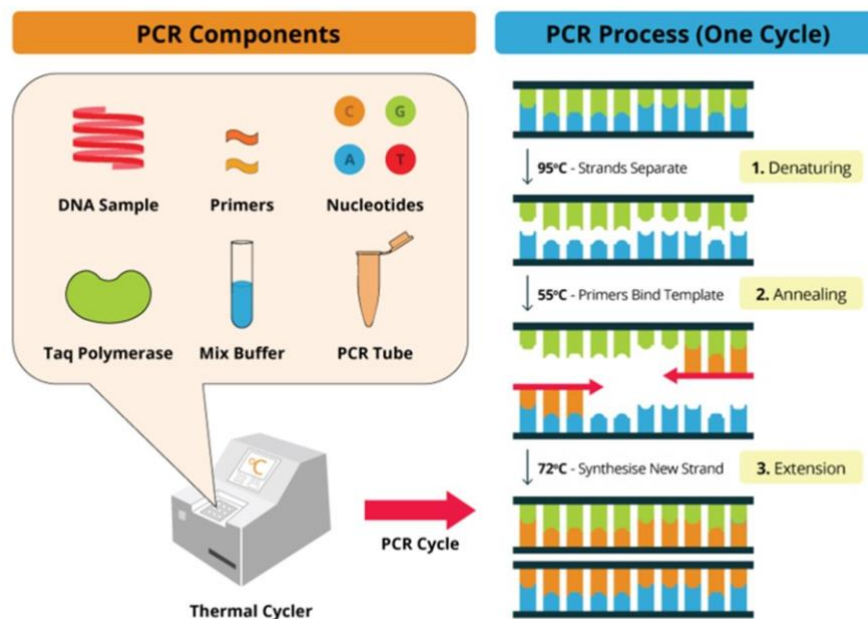


**Slika 12.** Izolacija DNA, preuzeto iz: <https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocolr9M3qnzJ> (19)

### 3.3.2 PCR metoda

Lančana reakcija polimerazom je reakcija koja omogućuje stvaranje milijuna kopija željene sekvence DNA molekule. Izvodi se u 3 koraka: denaturacija, hibridizacija i elongacija. Denaturacija je proces razmatanja dvolančane strukture na 95 Celzijevih stupnjeva. Hibridizacija je vezanje početnica s pojedinačnim lancima na 54 °C. Elongacija je proces produljenja lanca koja se odvija na 72 °C. Reakcija PCR odvija se na termocycler aparatu do 35 ciklusa koristeći odgovarajuće početnice, odgovarajuće vrste i duljine, ovisno o duljini, položaju i sekvenci gena od interesa koji želimo umnožiti u većem broju kopija.

PCR reakcija je osnovni princip svih molekularnih metoda koje se koriste u kliničkoj dijagnostici, a njezina primjena se znatno proširila u pandemiji COVID-19 budući da se metoda PCR u realnom vremenu (engl. Real Time PCR) koristila za identifikaciju infekcije tom vrstom virusa. (20)

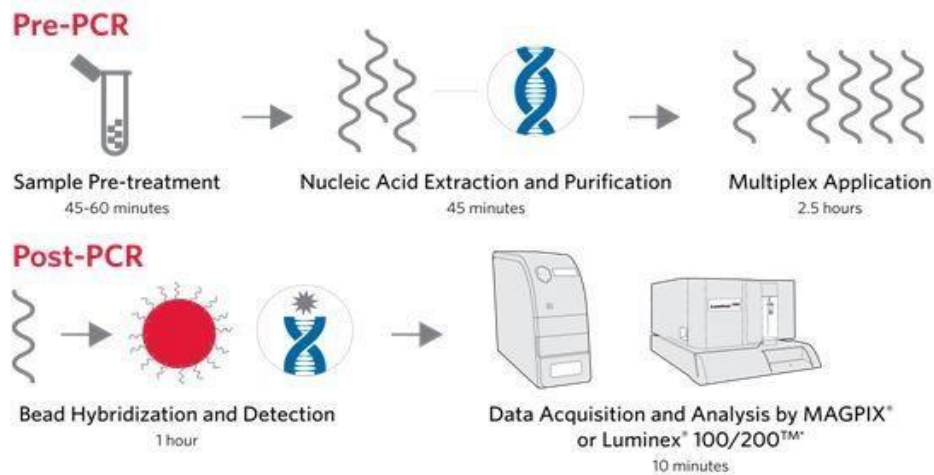


**Slika 13.** Princip lančane reakcije ovisne o polimerazi, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

### 3.3.2.1 PCR – SSO

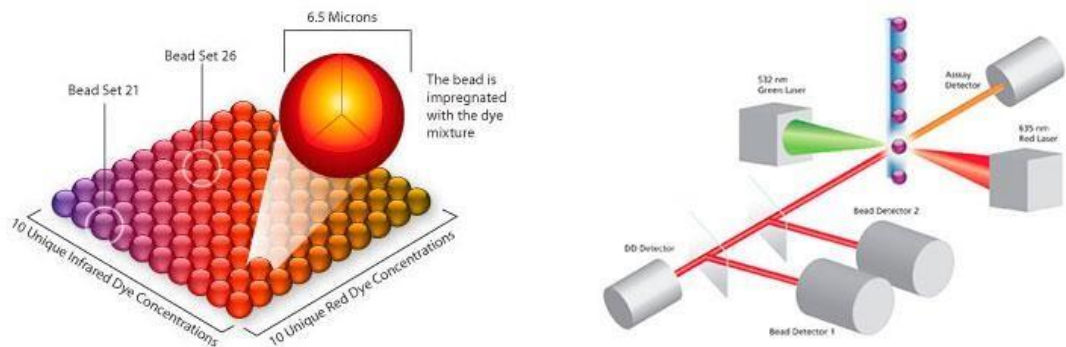
PCR – SSO je molekularna metoda koja se temelji na specifičnom vezanju između amplificiranog odsječka gena od interesa (HLA lokusa koji se ispituje) za mikrosfere na čijoj se površini nalaze fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. Takve probe čine sljedovi DNA molekule duljine 20-25 parova baza koji su specifični za pojedine alelne varijante lokusa HLA sustava koji se ispituje.

Za detekciju fluorescencije koristi se Luminex uređaj koji radi na principu protočne citometrije, što znači da mikrosfere, jedna za drugom, dolaze do dva lasera od kojih je prvi je zaslužan za klasifikaciju mikrosfere i određuje je li se proba vezala ili ne, a drugi laser određuje količinu probe koja se vezala za pojedinačnu mikrosferu. Nakon toga, rezultat se očitava i analizira pomoću odgovarajućeg softvera na računalu. (1)



**Slika 14.** Princip rada Luminex uređaja, preuzeto iz:

<https://copernicusdiagnostics.pl/index.php/oferta/diagnostyka-patogenow/metoda-luminex> (24)



**Slika 15.** PCR-SSO metoda, preuzeto iz: <https://www.dlongwood.com/en/products/lifecodes-hla-sso-kits/> (21)

Samo izvođenje PCR – SSO metode sastoji se od dva koraka: amplifikacije željenog odsječka DNA lokusa koji promatramo i hibridizacije sa mikrosferama sa fluorescentno obilježenim probama. Reakcijska smjesa za amplifikaciju sastoji se od Master Mixa, Taq polimeraze, ukupne genomske DNA izolirane iz uzorka krvi ispitanika te destilirane vode, slaže se u volumenima po uputama proizvođača te stavlja u thermocycler prethodno programiran na željeni broj ciklusa, nakon čega dobijemo veliki broj kopija željene sekvence DNA.

Kada smo proveli postupak amplifikacije, slijedi proces hibridizacije za koji nam je potrebna reakcijska smjesa koja sadrži 5  $\mu\text{L}$  PCR produkta te 15  $\mu\text{L}$  suspenzije mikrosfera. Za vrijeme hibridizacije (inkubacija na  $56^{\circ}\text{C}$  20 minuta u thermocycleru) dolazi do vezanja specifičnih oligonukleotidnih početnica koje su smještene na mikrosferama na PCR produkte dobivene amplifikacijom ukoliko se na njima nalazi sekvenca parova baza podudarna s alel specifičnim probama.

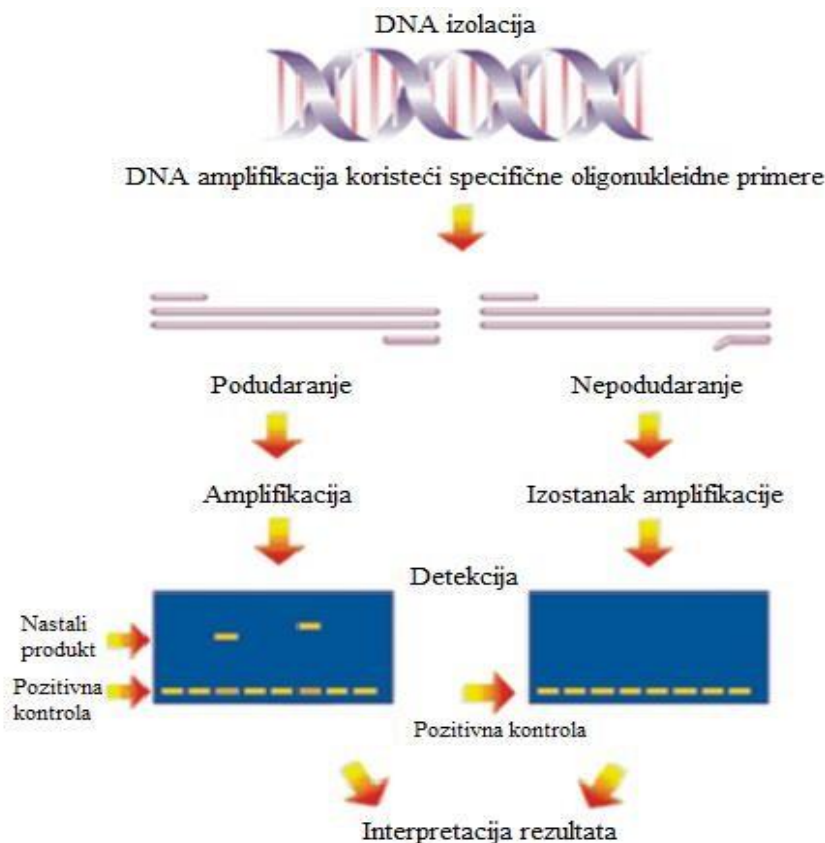
Nakon toga, dodaje se fluorescentna boja koja služi za vizualizaciju samog produkta koja se priprema tako da se doda 170  $\mu\text{L}$  dilucijske otopine i 0.75  $\mu\text{L}$  streptavidina. Boja djeluje na principu vezanja za biotin koji se nalazi na početnicama i djelomično za novonastali kompleks ako postoji. Kada smo napravili sve potrebno, rezultati, odnosno razina fluorescencije za svaku pojedinačnu probu detektiraju se pomoću Luminex aparata, te analiziraju pomoću računalnog programa. (1)

### 3.3.2.2 PCR – SSP

PCR – SSP je metoda koja se temelji na upotrebi alel specifičnih početnica za umnažanje PCR produkata. Ova metoda se koristi za određivanje alela HLA obitelji visoke rezolucije. Tijekom same reakcije bilježimo pozitivan ili negativan rezultat. Onaj rezultat koji je pozitivan znači da je došlo do amplifikacije određene sekvence molekule DNA, a ako do amplifikacije nije došlo znači da početnice nisu podudarne s ciljanom sekvencom DNA što je prikaz negativnog rezultata.

Produkti PCR reakcija vizualiziraju se pomoću gel elektroforeze na agaroznom gelu koji je vrlo pogodan za detekciju DNA molekula za razliku od poliakrilamidnog gela koji je vrlo porozan i koristi se za detekciju proteina. Elektroforeza služi za razdvajanje molekula prema veličini i naboju, stoga će se one lakše molekule gibati brže i dalje, a one koje su veće sporije i kraće. (1)





**Slika 16.** Shema PCR reakcije, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1)

Prvi korak u izradi ove metode je pravljenje reakcijske smjese koja se sastoji od Master Mixa, ukupne genomske DNA uzorka koji se analizira, reakcijskog pufera, vode i Taq polimeraze. Ovisno o lokusu koji se analizira, slaže se više PCR reakcija koje se razlikuju po korištenju različitih kombinacija alel-specifičnih parova početnica. Nakon amplifikacije, PCR produkti se izlažu s nekom od dostupnih boja npr. etidij bromidom te razdvajaju gel elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu 20-25 minuta. Po završetku elektroforeze, rezultati se vizualiziraju pomoću UV-transiluminatora, a rezultati se analiziraju pomoću računalnog programa (Helmberg SCORE) na temelju prisutnosti odnosno odsutnosti PCR produkata za svaku pojedinu reakciju – pozitivnom reakcijom se kvalificiraju one reakcije u kojima je došlo do umnažanja PCR produkta pomoću alel specifičnih početnica (1)

## 4. REZULTATI

Unutar obitelji koju čine majka, otac (roditelji) i dvoje djece, kod jedne od sestara na temelju kliničkih parametara dijagnosticirana je Crohnova bolest. Budući da je jedna od značajki sustava HLA povezanost s bolestima, na preporuku liječnika u Laboratoriju za tipizaciju tkiva zavoda za transfuzijsku medicinu KBC Split, upućeni su svi članovi obitelji kako bismo napravili tipizaciju alela sustava HLA.

Za tipizaciju tkiva alela sustava HLA uzeti su uzorci pune krvi s EDTA antikoagulansom (epruveta s ljubičastim čepom) koji su nam bili potrebni da bismo mogli odrediti alele lokusa HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1 kao i alele lokusa HLA-C molekularnom metodom. Za određivanje alela navedenih lokusa koristili smo molekularnu metodu PCR-SSO te tipizirali sve članove obitelji.

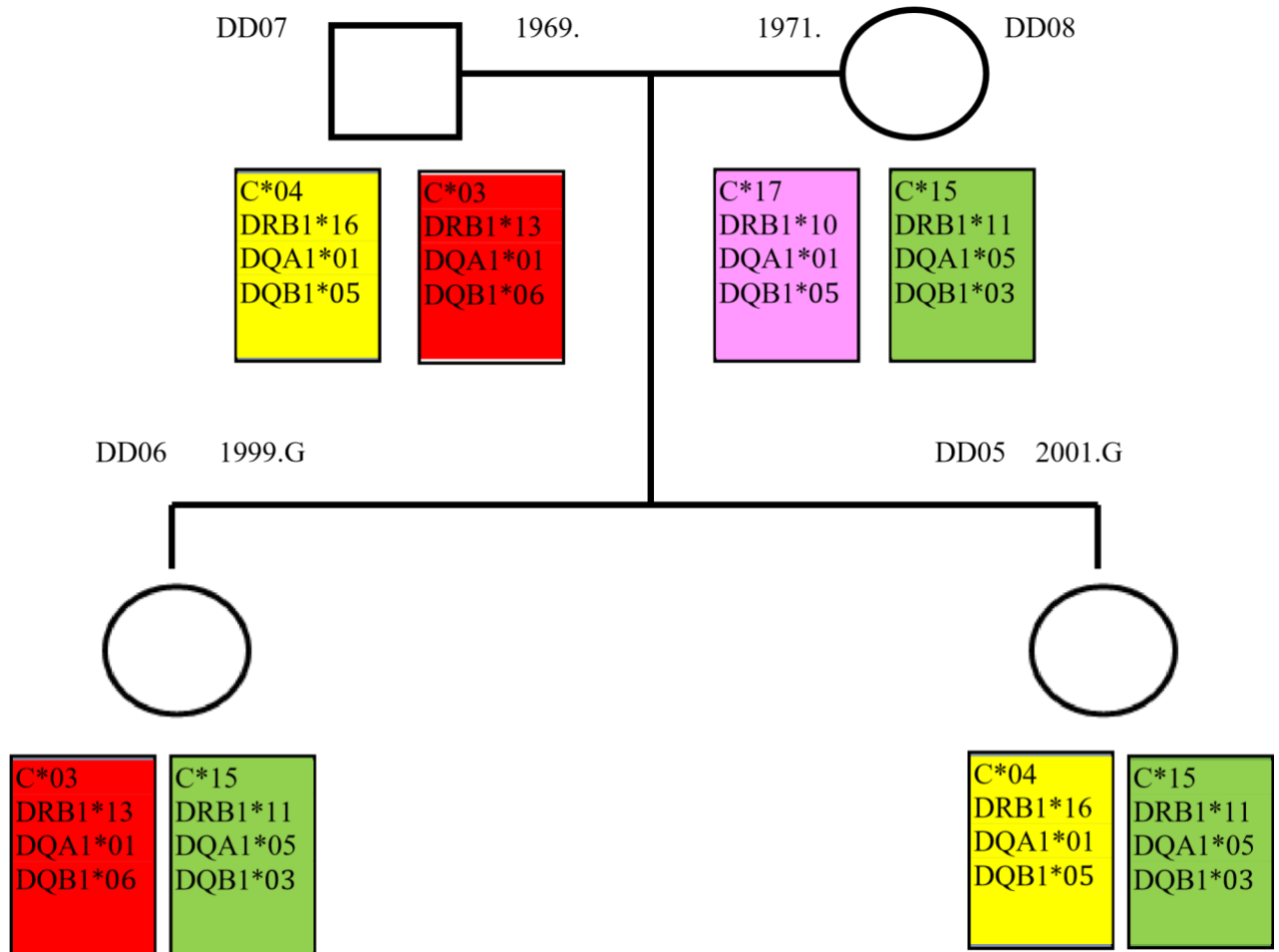
Nakon izvršene tipizacije metodom PCR-SSO odredili smo alele lokusa: HLA-DRB1, DQB1, -DQA1 kao i alele lokusa HLA-C. Po Mendelovim zakonitostima genetike poznato je da djeca od svakog roditelja dobiju po jedan haplotip (set gena na jednom kromosomu) odnosno da su polidentični sa svojim roditeljima. U našem radu zahvaljujući prisutnosti roditelja određen je genotip ove obitelji i na taj je način omogućeno praćenje nasljeđivanje bolesti.

Na temelju dobivenih rezultata svih članova obitelji zaključili smo da je pacijentica alele vezane uz Crohnovu bolest naslijedila od svoje majke. Jedna od značajki sustava HLA je da genetska predispozicija za određene bolesti, u ovom slučaju Crohnova bolest, ne mora se uvijek ispoljiti što pokazuje nalaz HLA tipizacije zdrave sestre.

Nakon izvršene tipizacije metodom PCR-SSO dobivene rezultate smo usporedili s učestalošću alela sustava HLA vezanih za Crohnovu bolest.

# OBITELJ PUĐA

Tablica 1. Rezultati HLA tipizacije pacijentice i članova obitelji



## 5. RASPRAVA

Jedna od glavnih osobitosti sustava HLA je njegova povezanost s bolestima odnosno genetska predispozicija za određene bolesti (autoimune bolesti kao što je reumatoidni artritis, celijakija), psorijaza, razne neurološke bolesti, upalne bolesti crijeva. Važno je istaknuti da postoje dvije hipoteze pojavljivanja bolesti, genetska predispozicija kao i okolišna predispozicija.

U ovom radu ispitivanja se temelje na obiteljskoj studiji te je naš zadatak bio da utvrdimo potvrđuju li navedene spoznaje povezanosti bolesti i sustava HLA i naši rezultati.

Budući da je jednoj od sestara klinički dokazana Crohnova bolest (sa svim kliničkim parametrima) mi smo našim radom htjeli utvrditi da li zaista postoji genetska predispozicija za pojavljivanje ove vrste bolesti.

Razne studije govore o jakoj povezanosti alela lokusa HLA-DRB1\*0103 i lokusa HLAB\*52 s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti. S druge strane veliki broj istraživača ističe povezanost sljedećih HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotipova s pojavom bolesti:

HLA-DRB1\*0405, -DQA1\*03, -DQB1\*040;

DRB1\*0410, -DQA1\*03, -DQB1\*0402 i DRB1\*0802-DQA1\*03-DQB1\*0402.

Analizirajući dobivene rezultate alela sustava HLA unutar naše obitelji kod sestre koja boluje od Crohnove bolesti nismo uočili alel lokusa HLA-DRB1\*0103, međutim dobiveni rezultati tipizacijom alela sustava HLA su nam ukazali na haplotip HLA C\*15, -DRB1\*11, DQA1\*05, -DQB1\*03 (što je pacijentica dobila od svoje majke).

Uspoređujući dobivene rezultate sa studijama drugih europskih zemalja, potvrdili smo na temelju studija francuskih znanstvenika da navedeni aleli koje ima i naša pacijentica govore u prilog povezanosti ovih alela s pojavljivanjem Crohnove bolesti, ali svakako ističemo da kad govorimo o poveznosti Crohnove bolesti i sustava HLA da je najjača povezanost Crohnove bolesti i alela HLA DRB1\*03. U radu smo istaknuli da je jedna od osobitosti sustava HLA izraziti polimorfizam.

Prateći literaturu vidimo da se svakodnevno otkrivaju novi aleli kao i podtipovi alela koji se povezuju s genetskom predispozicijom za autoimune i druge bolesti. Zahvaljujući metodama molekularne metode u zadnje vrijeme tipizacija sustava HLA na novoj generaciji sekvenciranja otkriva visoku rezoluciju pojedinih alela, a brojna populacijska istraživanja i obiteljske studije vezane uz bolesti otkrivaju i povezanost cijelog haplotipa s genetskom predispozicijom za određenu bolest.

Budući da znamo kolika je složenost sustava HLA kako u dijagnostici, tako i u transplantacijskoj medicini, dobiveni rezultati naše obiteljske studije upućuju da neprestano moramo istraživati ovo složeno genetsko područje.

## 6. ZAKLJUČAK

Glavni sustav tkivne snošljivosti poznatiji kao HLA sustav (Humani Leukocitni Antigeni) je jedan od najsloženijih sustava kod čovjeka. Jedna od glavnih osobina HLA sustava je uz izraziti polimorfizam i povezanost ovog sustava s bolestima.

Aleli sustava HLA određuju se metodama molekularne biologije kao što su lančana reakcija polimerazom PCR SSO i PCR SSP kao i najnovije metode sekvenciranja kako bismo mogli što bolje odrediti pojedine alele koji se povezuju s genetskom predispozicijom za pojavljivanje bolesti. Određivanje alela sustava HLA posebno ako govorimo o gastroenterološkim bolestima je važan dijagnostički parametar u medicini. Obiteljske studije nam pomažu da točno možemo pratiti Mendelsko nasljeđivanje kao i cijele haplotipske veze unutar obitelji.

Najčešća povezanost sustava HLA i Crohnove bolesti se odnosi na lokus HLA DRB1 i to na alelu HLA DRB1\*0103, ali upravo zbog izrazitog polimorfizma velikog broja istraživanja iz područja imunogenetike govorimo i o haplotipskim vezama HLA-C\*15, DRB\*11, DQA1\*05, DQB1\*03.

Osim u tipizaciji tkiva, HLA sustav gena je izrazito značajan za transplantaciju organa te krvotvornih matičnih stanica (KMS) za liječenje malignih bolesti, hematoloških bolesti te autoimunih bolesti.

Najnovije metode molekularne biologije kao što je NGS (engl. *Next Generation Sequencing*) pomoći će nam u otkrivanju novih alela sustava HLA i povezanosti s bolestima.

## 7. LITERATURA

1. Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019.
2. Thorsby E. A short history of HLA. Tissue Antigens. 10 July 2009. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x.
3. Crnić – Martinović M, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (predavanje). Rijeka, 2005.
4. <https://slideplayer.gr/slide/15081335/>
5. Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. U: Vrhovac B i sur. Interna medicina. Zagreb: Naklada LJEVAK; 2008. str. 794-804.
6. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Gastrointestinal and Liver Disease. Philadelphia:Saunders Elsevier; 2006. str. 2459-90.
7. Rošić Despalatović B, Bratanić A, Šimunić M, Jurišić Z, Žužul M, Žižić I i sur. Epidemiological trends of inflammatory bowel disease (IBD) in Split-Dalmatia County, Croatia from 2006 to 2014. Eur J Intern Med. 2017;46:e17-e19.
8. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R i sur. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001;411:603-6.
9. Addolorato G, Capristo E, Stefanini GF, Gassbarini G. Inflammatory bowel disease: A study of the association between anxiety and depression, physical morbidity, and nutritional status. Scand J Gastroenterol. 1997;32:1013
10. Vucelić B, Arroyo V, Bacon RB, Bar-Meir S, Barić I, Basta-Juzbašić A i sur. U: Vucelić B i sur. Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. str. 750-61.
11. Sharan R, Schoen RE. Cancer in inflammatory bowel disease: An evidence based analysis and guide for physicians and patients. U: Regueiro M, Barrie AM. Gastroenterology clinics of North America. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2002. str. 237-51.
12. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Gastrointestinal and Liver Disease. Philadelphia:Saunders Elsevier; 2006. str. 2459-90.

13. Carucci LR, Levine MS. Radiographic imaging of inflammatory bowel disease. Gastroenterology clinics of North America. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2002. str. 94-115.
14. Wilkins T, Jarvis K, Patel J. Diagnosis and management of Crohn's disease. Am Fam Physician. 2011;84:1365-75.
15. Vucelić B, Čuković-Čavka S. Upalne bolesti crijeva. U: Vrhovac B i sur. Interna medicina. Zagreb: Naklada LJEVAK; 2008. str. 794-804.
16. Banerjee S, Peppercorn MA. Inflammatory bowel disease: Medical therapy of specific clinical presentation. U: Regueiro M, Barrie AM. Gastroenterology clinics of North America . Philadelphia: Saunders Elsevier; 2002. str. 185-9.
17. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lemann M, Soderholm J, Colombel JF i sur. The second European evidence based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. JCC. 2010;4:28-62.
18. Bandzar S, Gupta S, Platt MO. Crohn's disease: a review of treatment options and current research. Cell Immunol. 2013;286:45-52.
19. <https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qzJ>
20. 12.Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. May-June 1992.
21. <https://www.dlongwood.com/en/products/lifecodes-hla-ss0-kits/>
22. 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.)
23. <https://slideplayer.gr/slide/15081335/>
24. <https://copernicus-diagnostics.pl/index.php/oferta/diagnostyka-patogenow/metodaluminex>
25. <https://gihealthtampabay.com/what-is-a-colonoscopy-and-why-do-it/>
26. <https://www.indiamart.com/proddetail/500mg-pentasa-mesalazin-tablets24906628148.html>
27. <https://www.youandcolonoscopy.com/en-cln/view/m301-s03-what-happens-duringand-after-a-colonoscopy-slide-show>
28. <https://rattibha.com/thread/1254860450031734784>



## 8. POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Prikaz regije HLA, preuzeto iz: <a href="https://slideplayer.gr/slide/15081335/">https://slideplayer.gr/slide/15081335/</a> (4) .....	3
<b>Slika 2.</b> Humani leukocitni antigen, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	3
<b>Slika 3.</b> Prikaz molekule HLA razreda I, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	5
<b>Slika 4.</b> Prikaz molekule HLA razreda II, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	6
<b>Slika 5.</b> Prikaz genske karte HLA, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	7
<b>Slika 6.</b> Nomenklatura HLA, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	8
<b>Slika 7.</b> Test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT) serološka metoda određivanja gena HLA, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) ....	11
<b>Slika 8.</b> Prikaz razlikovanja Chronove bolesti s ulceroznim kolitisom, preuzeto iz: <a href="https://rattibha.com/thread/1254860450031734784">https://rattibha.com/thread/1254860450031734784</a> (28) .....	13
<b>Slika 9.</b> Lijek Pentasa s aktivnim lijekom Mesalazin, preuzeto iz: <a href="https://www.indiamart.com/proddetail/500mg-pentasa-mesalazin-tablets-24906628148.html">https://www.indiamart.com/proddetail/500mg-pentasa-mesalazin-tablets-24906628148.html</a> (26) ....	18
<b>Slika 10.</b> Kolonoskopija, preuzeto iz: <a href="https://gihealthtampabay.com/what-is-a-colonoscopy-and-why-do-it/">https://gihealthtampabay.com/what-is-a-colonoscopy-and-why-do-it/</a> (25) .....	20
<b>Slika 11.</b> Procedura izvođenja testa, preuzeto iz: <a href="https://www.youandcolonoscopy.com/en-cln/view/m301-s03-what-happens-during-and-after-a-colonoscopy-slide-show">https://www.youandcolonoscopy.com/en-cln/view/m301-s03-what-happens-during-and-after-a-colonoscopy-slide-show</a> (27) .....	20
<b>Slika 12.</b> Izolacija DNA iz uzorka pune krvi, preuzeto iz: <a href="https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qzJ">https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qzJ</a> (19) .....	23
<b>Slika 13.</b> Princip lančane reakcije ovisne o polimerazi, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	24
<b>Slika 14.</b> Princip Luminex uređaja, preuzeto iz: <a href="https://copernicusdiagnostics.pl/index.php/oferta/diagnostyka-patogenow/metoda-luminex">https://copernicusdiagnostics.pl/index.php/oferta/diagnostyka-patogenow/metoda-luminex</a> (24) .....	25
<b>Slika 15.</b> Princip PCR-SSO metode, preuzeto iz: <a href="https://www.dlongwood.com/en/products/lifecodes-hla-ss0-kits/">https://www.dlongwood.com/en/products/lifecodes-hla-ss0-kits/</a> (21) .....	25
<b>Slika 16.</b> Shema PCR reakcije, preuzeto iz: Čečuk – Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta). Split, 2019. (1) .....	27

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime: Meri Puda

Adresa: Duvanjska cesta 11, 80101 Livno, Bosna i Hercegovina

### PROFIL

Išla sam u osnovnu školu „Ivan Goran Kovačić“ u Livnu koju sam završila 2017. godine i te iste godine upisala sam srednju školu. Završila sam srednju strukovnu školu "Silvije Strahimir Kranjčević" u Livnu 2021. godine. Pohađala sam smjer Farmaceutski tehničar kojeg sam završila s odličnim uspjehom (5). Nakon završene srednje škole, položila sam državnu maturu kojoj sam pristupila u Splitu. Nastavila sam obrazovanje na Sveučilištu u Splitu gdje sam upisala i završila prijediplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike 2024. godine. Tijekom sveučilišnog studija stekla sam novo znanje i vještine u radu u laboratoriju za čiji sam rad osposobljena.

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Ruj 2017 - Lip 2021:

Srednja strukovna škola "Silvije Strahimir Kranjčević", Livno, BiH

Smjer: Farmaceutski tehničar

Ruj 2021 - Srp 2024:

Prijediplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Sveučilišni Odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu

