

Učestalost alela sustava HLA kod ispitanika s reumatoidnim artritisom- određena molekularnim metodama

Jurić, Danijela

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:176:971006>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

DANIJELA JURIĆ

**UČESTALOST ALELA SUSTAVA HLA KOD ISPITANIKA S
REUMATOIDNIM ARTRITISOM - ODREĐENA
MOLEKULARNIM METODAMA**

Završni rad

Split, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

DANIJELA JURIĆ

**UČESTALOST ALELA SUSTAVA HLA KOD ISPITANIKA S
REUMATOIDNIM ARTRITISOM - ODREĐENA
MOLEKULARNIM METODAMA**

**FREQUENCY OF HLA SYSTEM ALLES IN SUBJECTS
WITH RHEUMATOID ARTHRITIS – DETERMINED BY
MOLECULAR METHODS**

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić, mag.biol.mol

Split, 2021. godina

Posebna zahvala mentorici doc.dr.sc. Esmi Čečuk Jeličić na savjetima, suradljivosti i stručnosti koju mi je pružila prilikom izvođenja ovoga rada, ali i tijekom cijele tri godine na pružanju potpore, poticaja i znanja koje će mi zasigurno koristiti tijekom cijeloga života.

Zahvaljujem i mag. Matei Tarabene na izdvojenom vremenu, pomoći i nesebičnim savjetima koje mi je dala prilikom izvođenja ovoga rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su cijelo vrijeme bili uz mene.

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1 Povijesni pregled sustava HLA.....	1
1.2 Općenito o sustavu HLA.....	3
1.3 HLA razred I.....	4
1.3.1 Geni HLA razreda I.....	4
1.3.2. Molekula HLA razreda I.....	4
1.4 HLA razred II.....	6
1.4.1. Geni HLA razreda II.....	6
1.4.2. Molekula HLA razreda II.....	6
1.5 Nasljeđivanje HLA.....	7
1.6 Nazivlje sustava HLA.....	8
1.7.Osobine sustava HLA.....	9
1.8 Metode određivanja antigena i gena HLA.....	11
1.8.1. Serološka metoda određivanja antigena i gena HLA.....	11
1.8.2.Molekularno određivanje antigena i gena sustava HLA.....	12
1.8.2.1. Izolacija molekule DNA iz uzroka krvi.....	12
1.8.2.2 PCR-SSO.....	15
1.8.2.3 PCR SSP.....	19
1.9. Reumatoidni artritis.....	20
1.9.1. Povijest reumatoidnog artritisa.....	20
1.9.2. Etiologija reumatoidnog artritisa.....	21
1.9.3. Dijagnosticiranje reumatoidnog artritisa.....	22
1.9.4. Liječenje reumatoidnog artritisa.....	22

2. CILJ RADA.....	23
3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. Ispitanici.....	24
3.2 Metode.....	24
3.2.1. Molekularna metoda određivanja alela HLA-DRB1.....	24
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. SAŽETAK.....	30
8. ABSTRACT.....	31
9. LITERATURA.....	32
10. ŽIVOTOPIS.....	34

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina

Znanstveno polje: Biologija

Mentor: doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić, mag.biol.mol

Učestalost alela sustava HLA kod ispitanika s reumatoidnim artritisom - određena molekularnim metodama.

Danijela Jurić, 0346008771

Sažetak:

Sustav HLA (humani leukocitni antigen) glavni je sustav tkivne podudarnosti. Ključnu ulogu u imunološkim procesima imaju molekule HLA odnosno membranski proteini koji djeluju kao antigeni i u stranom organizmu uzrokuju imunološku reakciju. Antigeni i geni sustava HLA određuju se serološkim i molekularnim metodama. Test mikrolimfocitotoksičnosti serološka je metoda koja se najčešće koristi za određivanje antigena sustava HLA razreda I i II. Molekularno određivanje HLA gena može se izvesti pomoću dvije metode, a to su metoda PCR-SSO (*engl. Polymerase chain reaction Sequence Specific Oligonucleotide*), a druga metoda je PCR-SSP (*eng. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Primer*). Prije izvođenja molekularnih metoda potrebno je izvršiti izolaciju DNA iz periferne krvi. PCR-SSO metoda zasniva se na povezivanju molekule DNA koja se amplificirala na suspenziji mikrosfera. Reumatoidni artritis kronična je, teška, autoimuna upalna bolest čija je glavna karakteristika sinovitis. Dolazi do razaranja vezivnoga tkiva i zglobnih struktura što u konačnici dovodi do bolnih i upalnih zglobova s čestim deformacijama. Cilj rada bio je odrediti učestalost alela sustava HLA kod ispitanika koji boluju od reumatoidnog artritisa na području Splitsko-dalmatinske županije. Molekularnim metodama dokazuje se povezanost zajedničkog epitopa. Molekula HLA razreda II bila je područje od interesa jer je pokazivala posebnu osjetljivost na razvoj bolesti. Molekularne metode olakšale su proučavanje te povezanosti koristeći nasljeđene sekvence od navedenih aminokiselina QKRAA, QRRAA ili RRRRAA koje se nalaze u hipervarijabilnim regijama kao ciljna mjesta.

Ključne riječi: HLA, PCR-SSO, DNA, reumatoidni artritis

Rad sadrži: 41 stranica, 18 slika, 4 tablica, 21 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

University Department for Health Studies

Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine

Scientific field: Biology

Supervisor:

Frequency of HLA system alleles in subjects with rheumatoid arthritis - determined by molecular methods.

Danijela Jurić, 0346008771

Summary:

The HLA system (human leukocyte antigen) is the major tissue matching system. A key role in immunological processes has HLA molecules and membrane proteins that act as antigens and the foreign organism causing an immune response. Antigens and genes of the HLA system are determined by serological and molecular methods. The microlymphocytotoxicity test is a serological method most commonly used to determine class I and II HLA system antigens. Molecular determination of the HLA gene can be performed using two methods, namely the PCR-SSO method (Polymerase chain reaction Sequence Specific Oligonucleotide), and the other method is PCR-SSP (Polymerase chain reaction - Sequence Specific Primer). Before performing molecular methods, it is necessary to isolate DNA from peripheral blood. The PCR-SSO method is based on the binding of a DNA molecule that has been amplified on a suspension of microspheres. Rheumatoid arthritis is a chronic, severe, autoimmune inflammatory disease whose main feature is synovitis. There is destruction of connective tissue and joint structures which ultimately leads to painful and inflammatory joints with frequent deformities. The aim of this study was to determine the frequency of HLA alleles in subjects suffering from rheumatoid arthritis in the Split-Dalmatia County. Molecular methods prove the connection of a common epitope. The HLA class II molecule was an area of interest because it showed particular susceptibility to disease development. Molecular methods have facilitated the study of these linkages using inherited sequences from the listed amino acids QKRAA, QRRAA or RRRRAA found in hypervariable regions as target sites.

Keywords: HLA, PCR-SSO, DNA, rheumatoid arthritis

Thesis contains: 41 pages, 18 figures, 4 tables, 21 references

Original in: Croatian

1.UVOD

1.1. Povijesni pregled sustava HLA

Sustav HLA (humani leukocitni antigen) glavni je sustav tkivne podudarnosti. Jean Dausset, Jon van Rood i Rose Payne prvi su donijeli neke zaključke vezane za osobitosti sustava HLA. 1958. godine objavili su radove u kojima su opisali protutijela koja su pronašli u politransfudiranih pacijenata i višerotkinja. Zahvaljujući njihovim otkrićima, otkrio se polimorfni sustav antigena na ljudskim leukocitima. Priznanje za otkriće prvoga HLA antigena pripada francuskom akademiku Jean Daussetu. Bavio se istraživanjima autoimunoloških bolesti proučavajući serume politransfudiranih pacijenata. Spoznao je da antitijela pacijenata nisu bila značajna za autoimune bolesti već su bila važan pokazatelj razlike strukture stanične membrane leukocita darivatelja i primatelja krvi.

Prvi antigen kojega je otkrio nazvao je skraćenicom MAC u čast trima osobama koje su bile dobrovoljci za njegove eksperimente i čija su imena počinjala inicijalima M, A i C. Kasnije je antigen MAC preimenovan u HLA-A2. Jean Dausset bio je predvidljiv, zaključio je da bi daljnje detaljnije proučavanje antigena leukocita moglo postati od velike važnosti u transplataciji tkiva, a pogotovo u transplantaciji koštane srži. Jon van Rood i Rose Payne također potpomogli su razumijevanju sustava HLA. Koristeći tadašnju sofisticiranu računalnu analizu u serumima koje su imali 1963. otkrili su dvije skupine antigena leukocita koje su nazvali 4a i 4b. 1964.godine Payne i suradnici otkrili su novi sustav kojega su nazvali LA. Odnos polimorfizma i genetike između različitih leukocitnih antigena koji su identificirani bilo je teško odrediti. S ciljem dokazivanja antigena HLA i uspoređivanja različitih tehnika, reagensa i rezultata između laboratorija 1964. godine osnovan je *International Hystocompatibility Workshop (IHWS)*. Prvi IHWS organizirao je profesor Bernard Amos na Sveučilištu *Duke, Durham, NC*. 1965. Jon van Rood organizirao je drugi IHWS. Treći IHWS 1967. organizirao je poznati genetičar Prof. Ruggiero Ceppellini.

Glavni cilj bio je analizirati genetiku do tada poznatih antigena. Istraživanje su provodili na vlastitim serumima, a nekolicina znanstvenika koristila je brži i pouzdaniji test mikrolimfocitotoksičnosti kojega su razvili Terasaki i McClelland.

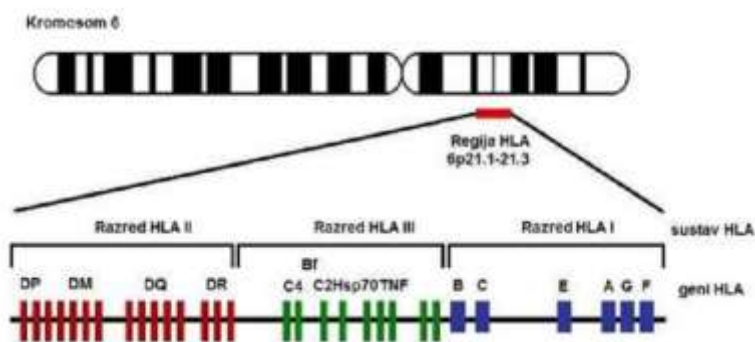
Test mikrolimfocitotoksičnosti kasnije je postao standardna tehnika serološkog tipiziranja antigena sustava HLA. Uskoro nakon trećeg IHWS-a osnovan je i Odbor za nomenklaturu HLA koji je odgovoran za usklađivanje službenih imena i antigena HLA (1). Na trećem IHWS-u 1967. godine na kojemu se proučavala povezanost antigena HLA i bolesti dokazana je povezanost sustava HLA s velikim brojem autoimunih bolesti, te malignim i infektivnim bolestima. To je i potvrdilo pretpostavke da se regiju HLA povezuje s puno više bolesti nego bilo koju drugu regiju unutar humanog genoma (2). Amiel je dokazao 1967.godine proučavajući fenotip leukocita kod Hodgkin-ove bolesti da se antigeni sustava HLA znatno češće pojavljuju kod osoba koje su oboljele od Hodgkin-ove bolesti nego što je među zdravim osobama. Povezanost nije bila jaka, relativni rizik iznosio je svega 2,8 % međutim to je bio poticaj za daljnja istraživanja i otkrivanja povezanosti HLA sustava s nekim drugim bolestima. Brewerton, Schlosstein i njihovi suradnici 1973.godine otkrili su povezanost između HLA-B27 i ankilozantnog spondilitisa s izrazito viskom relativnim rizikom za razvoj ove bolesti (1).

Napredak u razumijevanju HLA sustava doveo je do stvaranja registara pacijenata s njihovim podacima o tipizaciji HLA. Dausset, van Rood, Ceppellini i Amos zaključili su da je sustav HLA odgovoran za preživljavanje transplantiranog organa (2).

1.2. Općenito u sustavu HLA

HLA sustav glavni je sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex MHC*) u čovjeka (2). Ključnu ulogu u imunološkim procesima imaju molekule HLA odnosno membranski proteini koji djeluju kao antigeni i u stranom organizmu uzrokuju imunološku reakciju (3). Glavna uloga obrambenoga sustava je razlikovanje vlastitog od tuđeg antigena kako bi se održalo normalno funkcioniranje organizma, ali i detektiranje stranog antigena i njegovo uklanjanje. Imunološki sustav u usporedbi s nekim drugim sustavima u organizmu nije lokaliziran već djeluje strateški tamo gdje je to potrebno. Limfni organi i tkiva te cirkulirajući sastojci obrambenog sustava raspoređeni su svugdje po tijelu (4). Sustav HLA smješten je na kratkom kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.1-21.3 i obuhvaća 3.600 kilobaza DNA (1). Geni koji su smješteni unutar toga sustava imaju ulogu sinteze proteina koji u konačnici predočavaju antigene imunološki kompetentnim stanicama i na taj način pokreću imunološku reakciju (2).

Humana MHC (*Major histocompatibility complex*) regija podijeljena je u tri razreda, razred I, II, i III. Geni HLA razreda I nalaze se telomerično, geni HLA razreda II centromerično, a geni HLA razreda III između njih (2). Za sintezu HLA antigena odgovorni su geni HLA razreda I i II, a za sintezu komponenti komplementa odgovorni su geni HLA razreda III (5). Dakle, geni HLA razreda I i II su važniji jer sudjeluju u obrađivanju i predstavljanju antigena dok geni HLA razreda III nemaju ulogu u imunološkim reakcijama (**Slika 1.**). HLA geni nasljeđuju se po Mendelovim zakonima odnosno nasljeđuje se haplotip od svakog roditelja (2).



Slika 1. Shematski prikaz genske karte sustava HLA (preuzeto i prilagođeno iz 2.)

1.3. HLA razred I

1.3.1. Geni HLA razreda I

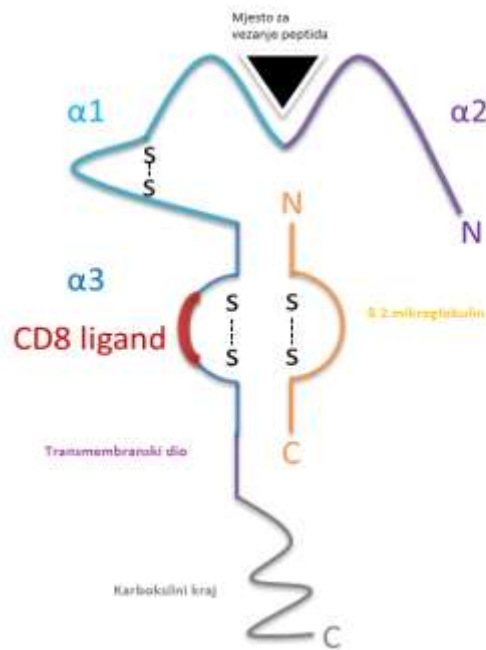
Geni HLA razreda I dijele se u klasične gene (HLA-A, -B, -C), neklasične gene (HLA-E, -F, -G) i pseudogene ili dijelove gena (12 nekodirajućih gena ili pseudogena HLA razreda I). Ova regija sadržava 18 gena koji zauzimaju gotovo 2 megabaze DNK. Klasični geni su izrazito polimorfni, ispoljavaju se na većini somatskih stanica u tijelu. Uglavnom se nalaze u limfatičnom tkivu, na svim stanicama s jezgrom i trombocitima. Nekolicina ovih antigena nalazi se na muškim i ženskim spolnim stanicama, posteljničnim i mišićnim stanicama te stanicama središnjeg živčanog sustava. Važno je naglasiti da je njihova gustoća različita u različitim tkivima (1,9). Antigeni ove klase imaju najviše polimorfnih strukturnih gena koji su zapaženi kod ljudi što omogućava različiti slijed aminokiselina u molekuli HLA. Zbog ove varijacije dolazi do generiranja različitih vrsta molekula HLA, ali i do odbacivanja organa u transplantaciji zbog nepodudarnosti istih (2).

1.3.2. Molekula HLA razreda I

Molekule HLA razreda I imaju dva polipeptidna lanca koje čvrsto drži kovalentna veza. Sadrže teški α lanac (45Kd) koji je građen od oko 350 aminokiselina i kojega određuju geni MHC i od $\beta 2$ lakog lanca kojega određuje gen na 15.kromosomu. β lanac ima oko 12 kd i naziva se još i $\beta 2$ mikroglobulin i nije uključen u predočavanju antigena već ima ulogu pričvršćavanja molekule(5). Molekula MHC razreda sastavljena je od četiri dijela: dio koji se spaja na peptide koji je ujedno i najvažniji, dio koji nalikuje imunoglobulinu, transmembranski i citoplazmatski dio (**Slika 2.**). Dio molekule na koji se vežu peptidi, tvori komplekse koje prepoznaju limfociti T. To je takozvani ekstracelularni dio koji je sastavljen od tri domene $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$. $\alpha 1$ i $\alpha 2$ tvore idealno sastavljen procjep u kojega se ugrađuje obrađeni peptid koji je sposoban vezati antigen veličine od 8-11 aminokiselina (3).

Polimorfizam odnosno različitost alelnih oblika uvjetovan je rasporedom aminokiselina u domenama $\alpha 1$, $\alpha 2$ (3). Hidrofobne aminokiseline sastavni su dio

transmembranskog dijela MHC-1 molekule dok citoplazmatski sadržava slijed bazičnih aminokiselina. Molekula HLA razreda I ima brojne uloge. One predstavljaju kratke peptide veličine od 9-11 aminokiselina virusnog ili tumorskog podrijetla (6).



Slika 2. Shematski prikaz građe HLA molekule razreda I (preuzeto i prilagođeno iz 14.)

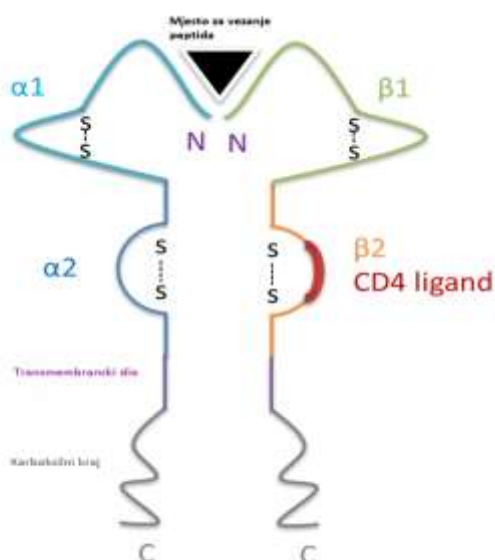
1.4. HLA razred II

1.4.1. Geni HLA razreda II

Geni HLA razreda II kodirani su kromosomima koji su smješteni telomerično na kraćem kraku 6. kromosoma. Ovi geni dijele se na niz od šest podregija (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DN i HLA-DO) od kojih svaka molekula ima dva gena, A i B koji kodiraju sintezu α i β lanca. Iznimka je podregija HLA-DR koja ima jedan lanac za (HLA-DRA1) i više gena za lanac β (1,6).

1.4.2. Molekula HLA razreda II

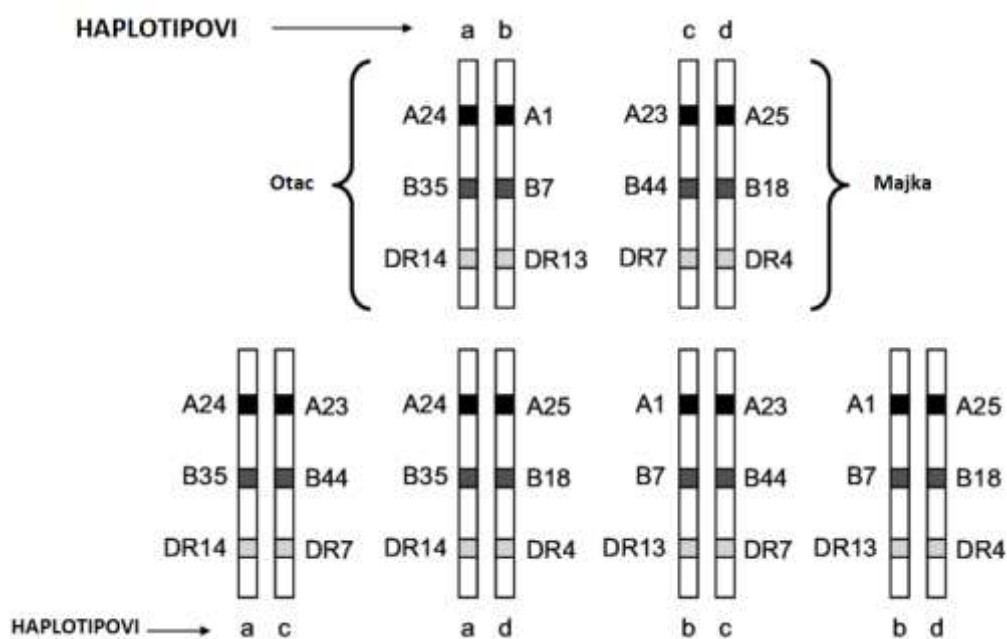
Molekule HLA razreda II sastavljene su od dva polimorfno nekovalentno vezana lanca (relativne molekulske mase oko 30 kD). Zbog većeg stupnja glikozilacije α lanac je malo veći (**Slika 3**). Njihova struktura nalikuje na strukturu molekula HLA razreda I. Molekule HLA razreda II također na sebi imaju dio koji je sposoban vezati peptide. Ekstracelularni dio građen je od četiri domene ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$), a domene $\alpha 1$ i $\beta 1$ čine dio za koji se veže antigenski peptid. Taj dio čini pukotinu za koju se vežu veći peptidi, od 10 do 30 aminokiselina pa čak i više (3).



Slika 3. Shematski prikaz građe HLA molekule razreda II (preuzeto i prilagođeno iz 15.)

1.5. Nasljeđivanje HLA

Nasljeđivanje HLA gena odvija se kodominantno po Mendelovim zakonima. Dijete nasljeđuje po jedan haplotip (odnosno pojedinu kombinaciju alelnih oblika gena HLA na jednom kromosomu) od jednog i drugog roditelja (**Slika 4.**). S obzirom na moguće kombinacije haplotipova moguća su tri ishoda. Postoji 25% šanse da dijete od roditelja naslijedi iste haplotipove i onda je ono haplotipski HLA identično roditeljima. Da dijete bude HLA haploidentično (odnosno da ima jedan isti haplotip kao i jedan od roditelja) šansa je 50%. Nadalje, 25% šanse je da djeca od roditelja naslijede potpuno različite gene odnosno da ne dijele HLA haplotipove. Ova nepodudarnost je najnepovoljnija mogućnost (2,6).



Slika 4. Prikaz HLA haplotipova u obitelji (preuzeto i prilagođeno s 16)

1.6. Nazivlje sustava HLA

1968. godine nakon održavanja trećeg Međunarodnog radnog sastanka o tkivnoj podudarnosti (*3rd International Histocompatibility Workshop-IHWS*) osnovan je Odbor za nomenklaturu antigena i gena sustava HLA. Postoji i dan danas i financira ga Svjetska zdravstvena organizacija (2). Budući da su znanstvenici iste gene nazivali različitim imenima osnivanje ovoga odbora bilo je neizostavno, a upravo to je omogućilo da nazivlje HLA sustava bude jedinstveno u svijetu. Imenovanje sustava HLA vrlo je kompleksno. Svi antigeni dokazani serološkom metodom navode se prvi oznakom lokusa HLA-A, HLA-B, HLA-C, a zatim se navodi njegov identifikacijski broj koji označuje njegovu specifičnost npr. HLA-A3 (**Slika 5.**). Taj broj navodi se prije prve dvotočke. Važno je napomenuti da se taj identifikacijski broj piše bez nule ako je jednoznamenkasti. Međutim, kod antigena koji su dokazani molekularnom metodom gdje se određuje alel i njegov gen prvo se navodi oznaka lokusa te nakon toga i njegov identifikacijski broj, ali s naglaskom da se jednoznamenkasti broj piše s nulom. Oznaka * govori da se radi o genskom testiranju npr. HLA-A*03 (5). Zatim, nakon prve dvotočke navodi set brojeva koji odgovara podtipovima nekog gena HLA dobivenih metodom visoke rezolucije. Treći i četvrti set brojeva ukazuju na eventualne mutacije koje se mogu dogoditi u kodirajućoj ili nekodirajućoj regiji (2).



Slika 5. Nomenklatura alela lokusa HLA (preuzeto i prilagođeno iz 18)

1.7. Osobine sustava HLA

Polimorfizam i poligenija, nepravilna tkivna zastupljenost, crossing-over, pravilno razdvajanje, genska neravnoteža udruživanja, križna reaktivnost te rasna i populacijska specifičnost glavna su obilježja sustava HLA.

Polimorfizam jedan je od najvažnijih karakteristika ovoga sustava jer se HLA sustav smatra najpolimorfnijim genetskim sustavom kod čovjek (**Tablica 1.**). Polimorfizam uključuje prisutnost više različitih inačica alela na lokusima (1). Polimorfizam je posljedica različitih genetskih modifikacija u kojima dolazi do genske konverzije odnosno zamjene nukleotida jednoga gena, nukleotidima drugoga gena.

Genska rekombinacija odnosno izmjena odsječaka DNA istoga lokusa kao i točkaste mutacije (promjena broja ili zamjena mjesta nukleotida) dovode do izrazitog polimorfizma. Poligenija je pojava koju karakterizira veći broj gena u haplotipu (3).

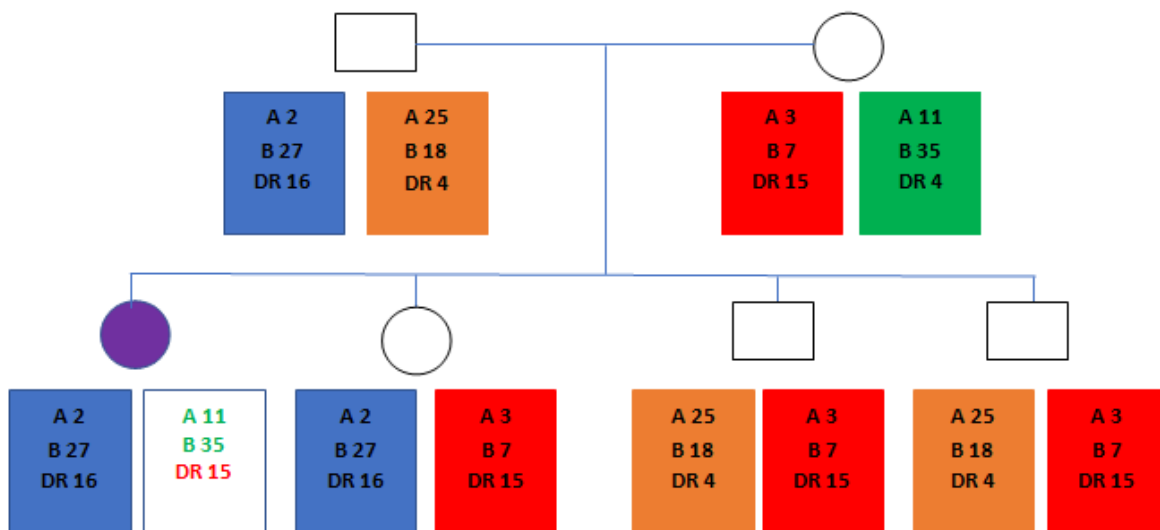
Tablica 1. Broj otkrivenih HLA alela (do ožujka 2020.godine, preuzeto iz 17)

Aleli HLA razreda I	19.587
Aleli HLA razreda II	7.302
Aleli HLA- ukupno	26.889
non-HLA aleli	384
„povjerljivi“ aleli *	15

Segregacija gena HLA prati II.Mendelov zakon o razdvajanju alela. Ona je pravilna jer postoji 50% šanse da dijete naslijedi određeni alel HLA od roditelja heterozigota na tom lokusu HLA. Promatrajući, kroz generacije, jednak je broj pozitivnih i negativnih potomaka za praćeni gen HLA. Jedna od karakteristika sustava HLA je i nepravilna tkivna zastupljenost. Velika zastupljenost zabilježena je u limfatičnom tkivu, a slaba zastupljenost u mišićima i masnom tkivu.

Genska neravnoteža (engl. *Linkage Disequilibrium*) jedna je od značajnih pojava u kojoj se aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju u istom haplotipu češće nego što bi to bilo za očekivati na osnovu njihove genske učestalosti.

U slučaju crossing-overa (**Slika 6.**) dolazi do rekombinacije dijelova kromatida dva homologna kromosoma za vrijeme oogeneze ili spermatogeneze što rezultira novim kombinacijama gena. Ova pojava događa se u manje od 1% slučajeva (2).



Slika 6. Shematski prikaz obitelji s crossing-overom (prikaz haplotipova u obitelji)

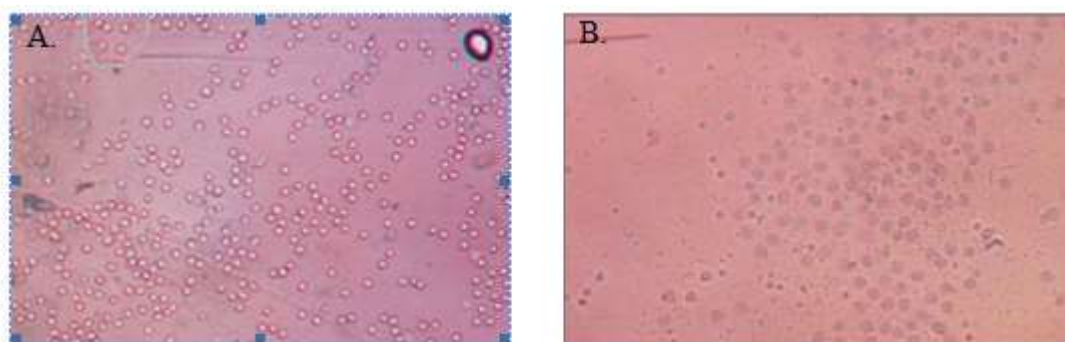
1.8. Metode određivanja antigena i gena HLA

Antigeni i geni sustava HLA određuju se serološkim i molekularnim metodama.

1.8.1. Serološka metoda određivanja antigena i gena HLA

Test mikrolimfocitotoksičnosti serološka je metoda koja se najčešće koristi za određivanje antigena sustava HLA razreda I i II. Ovo je metoda koja je ovisna o aktiviranju komplementa odnosno o specifičnoj reakciji antigen-antitijelo. Iz pacijentove krvi izoliraju se limfociti uz podešavanje gustoće.

Protutijela koja se koriste u ovoj metodi su gotova protutijela koja mogu biti monoklonska ili poliklonska. Monoklonska protutijela nastaju od aloimuniziranih višerotkinja dok poliklonska protutijela dobivaju se imunizacijom miševa. Reakcija će biti pozitivna ukoliko je antigen na leukocitima podudaran dodanome protutijelu. Da bi ova reakcija bila vidljiva potrebno je dodati antihumani globulin (kunićji komplement) koji će se potom vezati na nastali kompleks. Nadalje, kunićji komplement uzrokovat će lizu stanica te će dodatkom boje (tripansko modrilo) ona prodrijeti kroz membranu stanice. Plavo obojane stanice pod mikroskopom označavaju pozitivnu reakciju. Ukoliko nije došlo do lize stanica i prodiranja tripanskog modrila reakcija je negativna (**Slika 7.**).



Slika 7. Prikaz rezultata serološke tipizacije pod svjetlosnim mikroskopom: a) negativna reakcija b) pozitivna reakcija; fotografije su preuzete iz 19

1.8.2. Molekularno određivanje antigena i gena sustava HLA

Zbog veće mogućnosti razlučivanja koje su specifične za molekularne metode rezultati tipizacije molekularnim metodama značajno su pouzdaniji.

Molekularno određivanje HLA gena može se izvesti pomoću dvije metode, a to su metoda PCR-SSO (*engl. Polymerase chain reaction Sequence Specific Oligonucleotide*), a druga metoda je PCR-SSP (*eng. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Primer*). Prije izvođenja ovih metoda potrebno je izolirati pacijentovu DNA koju dobijemo iz uzorka pacijentove periferne krvi (2 ml) s antikoagulansom EDTA.

1.8.2.1. Izolacija molekule DNA iz uzorka krvi

Izolaciju DNA iz uzorka periferne krvi moguće je napraviti uz pomoću komercijalno dostupnih setova. Krv mora biti pripremljena uz pomoću antikoagulansa EDTA, a krv koja se koristi za izolaciju DNA može biti svježja ili smrznuta. Ove metode izolacije omogućile su odvajanje DNA od proteina i svih ostalih staničnih dijelova koji su se za nju vezali jer u protivnome bi je bilo nemoguće analizirati. Važno je naglasiti da osoba koja izolira DNA iz uzorka krvi mora biti oprezna jer je šansa za kontaminaciju uzorka u laboratoriju veća nego u prethodnim koracima prikupljanja i pohranjivanja. Komercijalni komplet koji se rutinski koristi za izolaciju molekule DNA u KBC-Split je *High Pure PCR Template Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)*. On omogućuje selektivno pročišćavanje molekule DNA pri sobnoj temperaturi upotrebom kolumni sa silikatnom membranom koja specifično veže molekule DNA i liziranjem stanica (**Slika 8.**). Stanice se liziraju tako što se uzorak krvi inkubira s odgovarajućim puferima i proteinazom K. Slijedi dodavanje alkohola etanola na lizat, DNA veže se za silikatnu membranu. Zatim se DNA ispiri s dva pufera s ciljem ispiranja od svih nečistoća. U posljednjem koraku se takva DNA eluira s membrane elucijskim puferom.



Slika 8. Komercijalni komplet za izolaciju genomske DNA - *High Pure PCR Template Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka); fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split

Na početku potrebno je obaviti nekoliko koraka. Parnu kupelj treba zagrijati na 70 °C i u njoj zagrijati Elution Buffer na istoj temperaturi te odmrznuti proteinazu K. U tubu (3,5 ml) koja se koristi za centrifugiranje dodaje se 200 µl pune krvi, 200 µl Binding Buffer-a (prepoznaje se po zelenom čepu) te 40 µl proteinaze K. Tubu je potrebno dobro izmiješati i inkubirati 10 minuta na temperaturi 70 °C. Dodavanjem proteinaze K stanične membrane leukocita se raspadaju zbog njezinog proteolitičkog djelovanja. Nakon inkubacije dodaje se 100 µl izopropanola koji omogućava taloženje i bolje prijanjanje DNA na mrežicu. Nakon miješanja tube na vortexu filter tubu koja se koristila (High Pure Filter Tube) prebaci se u tubu za sakupljanje (Collection Tube) te se odpipetira 1,5 ml u filter tubicu. Nakon toga ona se centrifuga pri brzini od 8000 x g u vremenu od 1 minute. Nakon kratkog centrifugiranja DNA zajedno s nečistoćama ostaje vezana za mrežicu kolone dok su svi ostali stanični dijelovi eluirani. Tubicu koja na sebi ima vezanu DNA prebaci se u novu filter tubu za sakupljanje (Collection tube) te se dodaje 500 µl Inhibitor Removal Buffer (u setu se prepoznaje po crnom čepu) i potom se centrifugira 1 minutu na 8000 x g kako bi se inhibitori mogli ukloniti. Filter tubice prebace se u čiste tube za sakupljanje (Collection Tube) i dva puta za redom dodaje se Wash Buffer (u setu se prepoznaje po plavom čepu) za ispiranje. Svaki put nakon dodavanja ovoga pufera, tubica se centrifugira na 1 minutu na 8000 x g i prebaci u novu tubu za sakupljanje (Collection Tube). Netom posljednjeg centrifugiranja supernatant se izbacuje, a ona se ponovno centrifugira

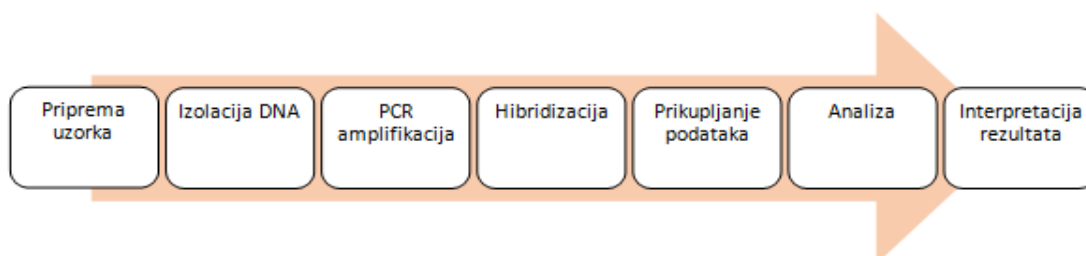
maksimalnom brzinom na 10 sekundi. Filter tuba premješta se u čiste tubu za sakupljanje (Collection Tube) i dodaje se 200 μ l prethodno zagrijanog (na 70 °) elucijskog pufera (Elution Pufer) i centrifugira 1 minutu na 8000 x g. U konačnici dobije se eluirana DNA koja je supernatant i premjesti se u čistu sterilnu 1,5 ml tubicu. Izolirana DNA pohranjuje se na +4 °C ili na -20 °C do analize (**Slika 9.**).



Slika 9. Uzorci krvi pacijenata u epruvetama s antikoagulansom EDTA; fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split

1.8.2.2 PCR-SSO (Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids)

PCR-SSO metoda zasniva se na povezivanju molekule DNA koja se amplificirala na suspenziji mikrosfera. Ovo je metoda koja ima brojne prednosti budući da visoku specifičnost i osjetljivost i za izvođenje je potrebna mala količina uzorka. Na površini imaju oligonukleotidne probe koje određuje postojanost određenog HLA lokusa u ispitivanom uzorku. Luminex uređaj funkcionira po principu protočne citometrije. Uz pomoću dva lasera on identificira svaku mikrosferu zahvaljujući različitim kombinacijama boja na mikrosferama. Laser koji određuje probu koja se vezala klasificira mikrosferu, a drugi laser ima ulogu kvantifikacije relativne količine vezanih proba (**Slika 10.**).



Slika 10. Shematski prikaz izvođenja PCR-SSO metode (Izvor: vlastita istraživanja)

Za amplifikaciju DNA koristi se uzorak izolirane DNA pacijenta. Kako bi se izolirana DNA umnožila koristi se PCR (engl. Polymerase chain reaction). Za izvođenje amplifikacije potrebno je napraviti reakcijsku smjesu uz pomoću koje će se odrediti HLA lokus od interesa.

Polu sata prije početka procesa, potrebo je pripremiti i izvaditi Lifecodes Master Mix za onaj HLA-lokus koji želimo raditi na sobnu temperaturu (22-25 °C). Sljedeći korak je izračunati reakcijski mix za broj uzoraka koji nam je potrebno s naglaskom da se napravi mješavina za jedan uzorak više (**Slika 11.**).

MASTER MIX reakcijske mješavine za jedan uzorak:

Lifecodes Master Mix	6 μ l
Sterilna voda	8,8 μ l
Taq polimeraza	0,2 μ l
DNA	5 μ l
Ukupno	20 μ l

Prvo se u Eppendorf tubicu stavlja 8,8 μ l destilirane vode. Zatim se dobro promiješana reakcijska mješavina Master Mixa (za određeni broj uzoraka) stavlja u tubicu. U označene PCR tubice se ispipetira 5 μ l DNA. U sljedećem koraku dodaje se Taq polimeraza u tubicu s Master Mixom i destiliranom vodom (**Slika 12.**). Iz prethodno pripremljene otopine ispipetira se 15 μ l te se stavi u PCR tubice u kojima se nalazi DNA te se stavi u PCR tubice. PCR tubice potrebno je dobro zatvoriti te su tada spremne za stavljanje u Veriti Thermocycler na program LYAMPF RAPID. Slijedi amplifikacija DNA (**Slika 13.**)



Slika 11. Lifecodes Master Mix; fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split



Slika 12. PCR kabinet; fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split



Slika 13. Veriti Thermocycler; fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split

Lančana reakcija polimeraze sastoji se od tri koraka. Započinje denaturacijom odnosno razdvajanjem lanaca molekule DNA na 94°C . Svaki novonastali lanac služi kao kalup za sintezu novoga, komplementarnog lanca. Slijedi hibridizacija u kojoj se temperatura snizi na približno $40\text{-}60^{\circ}\text{C}$ te se vežu oligonukleotidni primeri. U konačnici temperatura se opet povisi (72°C) jer dolazi do djelovanja Taq polimeraze koja sudjeluje u amplificiranju kratkih fragmenata DNA.

Nakon amplifikacije slijedi proces hibridizacije u kojemu dolazi do sinteze komplementarnih lanaca. Hibridizacija se izvodi kroz 20 minuta te u njoj dolazi do vezivanja PCR produkta na specifične oligonukleotidne probe (SSO probe) na mikrosferama. Mikrosfere s fluorescentnim probama potrebno je prethodno zagrijati u termo bloku 5-10 minuta na temperaturi od 56°C . Kuglice se pripreme u ultrazvučnoj kupelji od 10 sekundi. Nakon toga potrebno je u svaku jažicu Coster pločica staviti $5\ \mu\text{l}$ amplikona (PCR produkta) i $15\ \mu\text{l}$ suspenzije mikrosfera lokusa kojega tipiziramo koje na površini imaju odgovarajuće SSO probe. Coster ploča s uzorcima prekrije se folijom i stavlja u Thermocycler s prethodno programiranim protokolom za odgovarajući kit. Kako bi se produkt koji nastao mogao uočiti stavlja se $170\ \mu\text{l}$ fluorescentne boje koja se prethodno pripremila dodavanjem $170\ \mu\text{l}$ dilucijske otopine i $0,75\ \mu\text{l}$ streptavidina (engl. Streptavidin-

Phycoerytherin, SAPE). SAPE je jako osjetljiv na svjetlo stoga ga je potrebno umotati u foliju i čuvati u mraku. Coster pločica na kojoj se izvodio test prebaci se u Luminex aparat koji očitava florescenciju (**Slika 14.**).

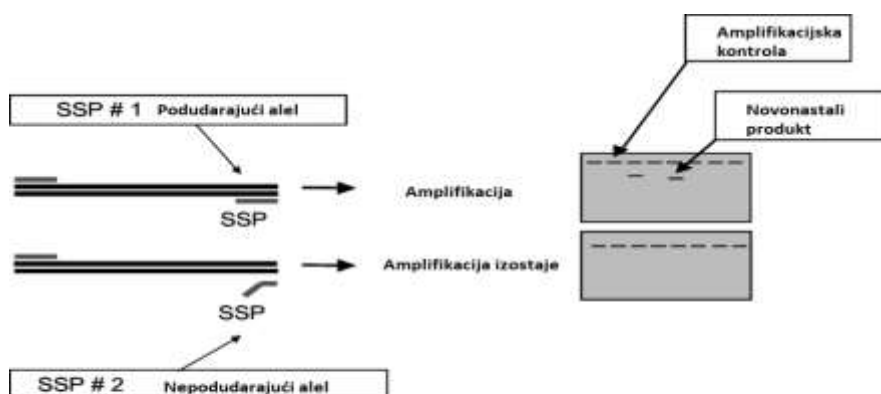


Slika 14. Luminex aparat (Fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

1.8.2.3 PCR SSP (engl. Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer)

Za izvođenje ove metode također je potrebno izolirati DNA pacijenta iz uzorka krvi s EDTA. PCR-SSP metodom omogućava rezultate visoke rezolucije. Ova metoda temelji se na reakciji oligonukleotidnih početnica karakterističnih za jedan odnosno više alela. Ukoliko početnice nisu komplementarne izostat će amplifikacija molekule DNA i rezultat koji se dobije smatra se negativnim. Ukoliko dođe do vezivanja odgovarajućih dijelova dobiva se pozitivan rezultat (**Slika 15.**). Potrebno je i izvođenje gel elektroforeze gdje će amplificirani produkti putovati tim istim gelom i zbog razlike u duljini amplificiranih sekvenci prikazivat će se različito na gelu.

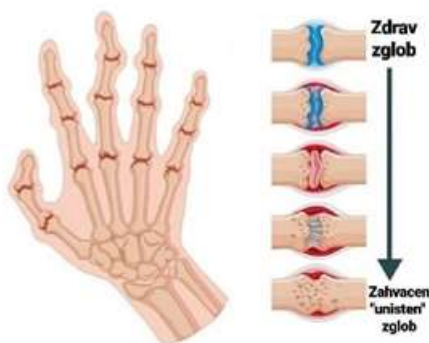
Za izvođenje ove metode radi se reakcijska mješavina (Master Mix) koja sadrži izoliranu DNA iz uzorka, Taq polimerazu i destiliranu vodu. 10 µl pripremljene mješavine ispipetira se u jažice na Olerup SSP sa dehidriranom otopinom početnicom. Kada se Olerup SSP stavi u Termocycler započinje amplifikacija DNA. Kompleks koji je nastao nakon amplificiranja stavlja se na gel elektroforezu zajedno s bojom (etidij-bromid) te se poslije 15 minuta uz pomoću UV zraka bilježi rezultat. Kako bi bili sigurni u izvođenje testa, postavlja se negativna kontrola. Rezultati se unose u program koji analizira dobivene podatke (Helmberg SCORE), a uspješna amplifikacija se prikazuje kao pruge koje svjetle na gelu.



Slika 15. Načelo izvođenja PCR-SSP metode; preuzeto i prilagođeno iz 2

1.9. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis (RA) kronična je, teška, autoimuna upalna bolest čija je glavna karakteristika sinovitis. Dolazi do razaranja vezivnoga tkiva i zglobnih struktura što u konačnici dovodi do bolnih i upalnih zglobova s čestim deformacijama (**Slika 16.**). To rezultira smanjenom funkcionalnošću zglobova i smanjenom kvalitetom života. Etiologija reumatoidnog artritisa još uvijek nije poznata međutim pretpostavlja se da genetski i pojedini okolišni čimbenici mogu utjecati na početni stadij razvoja bolesti. Genetski čimbenik nije dovoljan za nastanak RA već međusobnim djelovanjem genetskog čimbenika i jednog ili više okolišnih čimbenika dovodi do nastanka RA (7). Okolišni čimbenici su svi oni čija se povezanost s RA ne može potvrditi na temelju nekoga genetičkog markera. Znanstveno je dokazano da korištenje oralne kontracepcije može odgoditi pojavu reumatoidnog artritisa. Također, povećanom riziku izložene su žene u postporođajnom razdoblju (8). Zbog djelovanja spolnih hormona žene su sklonije oboljevanju. Pušenje duhana, neki infektivni mikroorganizmi, utjecaj industrijske prašine i prehrana samo su neki od okolišnih čimbenika koji se povezuju s RA (7).



Slika 16. Zglobne promjene kod RA (preuzeto i prilagođeno iz 21)

1.9.1. Povijest reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis najčešća je reumatska upalna bolest s prevalencijom od 0,5-1 % promatrano na globalnoj razini. Ovaj podatak zabilježen je kod nekoliko europskih i sjevernoameričkih država, ali s naglaskom da postoje iznimke (8). RA može zahvatiti sve

populacije, ali je poznato da se prevalencija i incidencija razlikuju u različitim etničkim skupinama pa čak i unutar iste zemlje. Neke studije objašnjavaju ovu varijabilnost kao rezultat različitih čimbenika, a ponajprije genetskih (7,8). Najniža prevalencija zabilježena je na ruralnom području Južne Afrike gdje studije nisu pronašle nijedan slučaj RA u studijama na 500 odnosno 2000 ispitanika (8). Niske vrijednosti prevalencije zabilježene su u jugoistočnim zemljama Azije, uključujući Japan i Kinu (0,2-0,3%) (8). Najveća zabilježena pojava RA uočena je kod autohtonih američko-indijskih populacija s prevalencijom od 5,3% u Pima Indijanaca i 6,8% u Chippewa Indijanaca (1,2).

1.9.2. Etiologija reumatoidnog artritisa

Stvarni uzroci reumatoidnog artritisa (RA) još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedna od pretpostavki koja potvrđuje nastanak ove bolesti je promjena imunološkog odgovora u pacijenata s genetskom predispozicijom uz sudjelovanje okolišnih čimbenika (8). U studijama je dokazana veća prevalencija u obitelji nego u općoj populaciji (9). Također, veća učestalost je zabilježena kod jednojajčanih blizanaca (stopa konkordancije 15-30%) i dvojajčanih blizanaca (stopa konkordancije 5%) (7,9). Stoga genetski čimbenici imaju znatan utjecaj na osjetljivost reumatoidnog artritisa (9). Antigeni HLA sustava su najpromatraniji genetski čimbenici koji predstavljaju od 30% do 50% ukupne genske predodređenosti za razvoj RA. Istraživanjima je potvrđena povezanost RA s HLA sustavom odnosno s alelima HLA-DRB1 gena. 1969. godine napravljen je prvi eksperiment u kojemu je dokazano da u miješanoj kulturi limfocita, limfociti iz periferne krvi pacijenata oboljelih od RA nisu bili pokazivali reaktivnost limfocitima zdravih pacijenata. 1976. godine ta ne je objašnjena činjenicom da pacijenti koji su oboljeli od RA imaju iste HLA gene. 1978. Stastny zaključio je u svome istraživanju da je 78 % pacijenata s RA bilo pozitivno na HLA-DRw4 u odnosu na zdravu kontrolu (7,9). 1987. godine Gregerson i sur. otkrili su povezanost RA s brojnim drugim HLA-DRB1 genima. Zaključili su da aleli HLA-DRB1 gena koji doprinose riziku nastanka RA dijele zajedničku aminokiselinsku sekvencu. Ti aleli koje HLA-DRB1 geni dijele nalaze se na pozicijama 70-74 u trećoj hipervarijabilnoj regiji DRβ1 lanca (**Tablica 2.**). Taj zaključak doveo je do nove hipoteze o zajedničkom epitopu (engl. *Shared epitope; SE*) koji se sastoji od tri sekvence aminokiselina: QKRAA, QRRAA I QRRRAA. Aleli zajedničkog epitopa su: HLA-DRB1*04:01 (QKRAA), HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:08, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*01:02, HLA-DRB1*14:02 (QRAA), HLA-DRB1*10:01 (RRRAA) (7,9).

Tablica 2. Aleli zajedničkog epitopa

Pozicija aminokiselina					
HLA-DRB1 aleli	70	71	72	73	74
*01:01	Q	R	R	A	A
*01:02	Q	R	R	A	A
*04:01	Q	K	R	A	A
*04:04	Q	R	R	A	A
*04:05	Q	R	R	A	A
*04:08	Q	R	R	A	A
*10:01	R	R	R	A	A
*14:02	Q	R	R	A	A

1.9.3. Dijagnosticiranje reumatoidnog artritisa

Uspostavljanje dijagnoze RA nije jednostavno zbog sličnosti s patofiziološkim stanjima kod sličnih bolesti (8). Što prije otkrivanje ove bolesti i početak terapije s antireumatskim lijekovima dovodi do boljih ishoda (11). Uz klinički pregled i anamnezu potrebno je napraviti određene laboratorijske i radiološke pretrage u svrhu dijagnosticiranja RA. Krvne pretrage pacijenta oboljeloga od RA uključuju reumatoidni faktor, brzinu sedimentacije eritrocita (SE) i C-reaktivni protein. Prisutnost reumatoidnoga faktora te povišene vrijednosti sedimentacije eritrocita i C-reaktivnog proteina u skladu su s dijagnozom reumatoidnog artritisa. Zlatni standard radiološke obrade uključuje radiograme šaka i stopala na kojima se prvo uočavaju promjene (8) i tipizaciju antigena i alela sustava HLA. Osim zglobova, RA može zahvatiti i organe poput pluća, kože i očiju (11).

1.9.4. Liječenje reumatoidnog artritisa

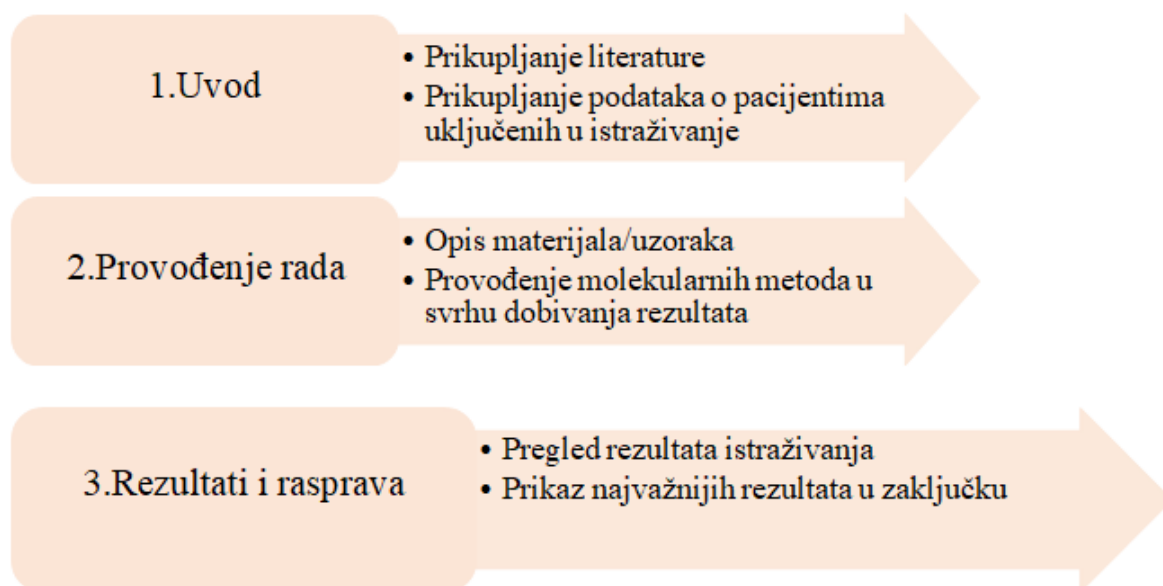
Brza dijagnoza odnosno prepoznavanje pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i pravovremeno liječenje dovode do remisije bolesti. To je važno kako bi se izbjegla trajna oštećenja zglobova i nesposobnost pacijenta (7). Laboratorijski i radiološki nalazi, otečeni zglobovi, prisutnost alela HLA-DRB1 gena zajedničkog epitopa (*04:04, *04:04) i ženski spol najbolji su dokazi za dijagnosticiranje RA. Liječenje se provodi korištenjem nestereoidnih protuupalnih lijekova, glukokortikoida, analgetika, sintetskih i bioloških lijekova koji mijenjaju tijek bolesti. Također primjenjuje se rehabilitacija, ali i fizikalne metode (11).

2. CILJ RADA

Cilj rada bio je odrediti učestalost alela sustava HLA kod ispitanika koji boluju od reumatoidnog artritisa na području Splitsko-dalmatinske županije. Povezanost reumatoidnog artritisa i gena sustava HLA potvrđena je molekularnim metodama.

Također, cilj je bio pokazati raspodjelu odnosno učestalost pojedinih alela DRB1 lokusa te odrediti najučestaliji podložni gen koji se pojavljuje kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa. U istraživanje bilo je uključeno 155 pacijenata koji su bolovali od reumatoidnog artritisa čiji su uzorci obrađeni u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split (**Slika 17.**).

Osim učestalosti i povezanosti alela sustava HLA i RA, pokazala se raspodjela bolesti po spolu i po dobnim skupinama. Budući da je HLA-DRB1 gen koji se povezuje direktno s RA, ali i najučestaliji među Hrvatima napravljena je usporedba alela HLA-DRB1 gena u našoj populaciji i pacijenata drugih nacionalnosti.



Slika 17. Shematski prikaz završnog rada

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovom retrospektivnom istraživanju obuhvaćeno je 155 ispitanika s područja Splitsko-dalmatinske županije. Ispitivanu skupinu činilo je 118 žena te 37 muškaraca. U ispitivanoj skupini proučavala se učestalost pojedinih alela lokusa HLA-DRB1 sustava HLA kod oboljelih od reumatoidnog artritisa. Svi ispitanici pacijenti su kojima je tipizacija tkiva napravljena iz rutinskog rada u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split u razdoblju od 2019-2021 godine.

3.2. Metode

3.2.1. Molekularna metoda određivanja alela HLA-DRB1

Metoda koja se koristila za potrebe ovog rada je PCR-SSP (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer*). Temelji se na umnažanju sekvenci DNA koristeći se početnicama koje su specifične za jedan ili za više alela. Da bi rezultat bio validan i da bi se mogla točno odrediti DNA sekvenca od interesa nukleotidni slijed mora se umnožiti i do nekoliko milijuna kopija. Metoda se odvija po točno određenom protokulu koristeći reakcijsku mješavinu sastavljenu od prethodno izolirane molekule DNA, Taq polimeraze i destilirane vode. Rezultat se bilježi uz pomoće elektroforeznoga gela gdje se zbog različitih duljina amplificiranih dijelova isti različito redaju. Da bi se rezultat mogao očitovati potrebno je dodati bojilo etidij-bromid. Komplementarnost se očituje pozitivnom reakcijom.

4. REZULTATI

U ovo istraživanje bilo je uključeno 138 pacijenata koji su bolovali od reumatoidnog artritisa. Od ukupno 138 pacijenata iz rutinskoga rada 104 su bile žene (75,36%), a muškaraca je bilo 34 (24,63%). Porast oboljelih uočava se u dobi od 50-59 godine (20,1% oboljelih). Najveći broj oboljelih (26,8%) uočen je u dobi od 60-69 godina. Žene su češće oboljevale od reumatoidnog artritisa naspram muškaraca. (**Tablica 3.**)

Tablica 3. Demografska obilježja pacijenata sa RA u Splitsko-dalmatinskoj županiji po spolu i po dobnim skupinama (n=broj pacijenata)

	n	(%)
Spol		
Muškarci	34	24.63
Žene	104	75.36
Ukupno	138	
Dob		
18-29	5	3.7
30-39	9	6.5
40-49	13	9.5
50-59	28	20.1
60-69	37	26.8
70-79	27	19.6
80	19	13.8

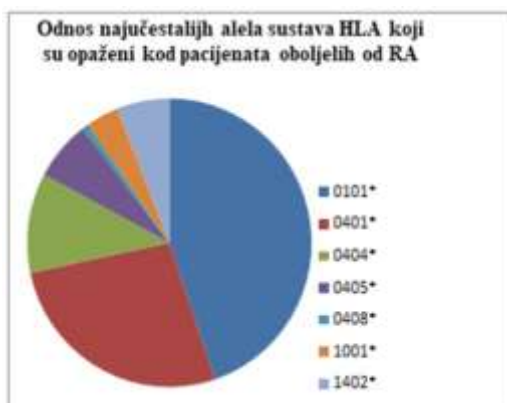
Ovim istraživanjem potvrđena je povezanost RA s alelima sustava HLA točnije s alelima DRB1 lokusa *0401, *0404, *0405*, *0408. Također je uočena povezanost i drugih alela DRB1 lokusa kao što su: *0101, *1001 i *1402. Najučestaliji podložni alel bio je *0101 kojega je imalo 13,66% pacijenata te je on povezan s destruktivnijim oblikom bolesti. Očekivano, kao najučestaliji među alelima DRB1*04 u hrvatskoj populaciji alel *0401 prisutan je kod 11,15% pacijenata dok su ostali alel DRB1*04 prisutni u idućim postotcima: alel *0402 prisutan je kod 6,11% pacijenata, alel *0403 kod 5,75% pacijenata dok je alel *0404 zabilježen kod 4,6% pacijenata (**Tablica 4.**). Ukoliko usporedimo dobivene podatke s onima iz Hrvatskog registra dobrovoljnih darivatelja matičnih stanica (HRDDKMS) uočavamo da su dobiveni rezultati jednaki onima hrvatske populacije.

Tablica 4. Prikaz svih alela koji su uočeni kod ispitanika te postotak njihove zastupljenosti (n-broj alela)

Alel	n	AF	% AF
0101*	38	0.136691	13.66906
0102*	1	0.003597	0.359712
0103*	2	0.007194	0.719424
0104*	1	0.003597	0.359712
0301*	34	0.122302	12.23022
0305*	1	0.003597	0.359712
0401*	31	0.111511	11.15108
0402*	17	0.061151	6.115108
0403*	16	0.057554	5.755396
0404*	13	0.046763	4.676259
0405*	4	0.014388	1.438849
0408*	1	0.003597	0.359712
0432*	1	0.003597	0.359712
04161*	2	0.007194	0.719424
0701*	8	0.028777	2.877698
0801*	5	0.017986	1.798561
0802*	1	0.003597	0.359712
0804*	1	0.003597	0.359712
0816*	1	0.003597	0.359712
0901*	1	0.003597	0.359712
1001*	3	0.010791	1.079137
1101*	17	0.061151	6.115108
1104*	8	0.028777	2.877698
1112*	1	0.003597	0.359712
11135*	1	0.003597	0.359712
1201*	4	0.014388	1.438849
1301*	16	0.057554	5.755396
1305*	2	0.007194	0.719424
1302*	8	0.028777	2.877698
1303*	3	0.010791	1.079137
1401*	5	0.017986	1.798561
1501*	12	0.043165	4.316547
1502*	3	0.010791	1.079137
1503*	1	0.003597	0.359712
1506*	1	0.003597	0.359712
1507*	1	0.003597	0.359712
1601*	12	0.043165	4.316547
1625*	1	0.003597	0.359712
Br. pacijenata	139		
Br. alela	278		

*AF-allele frequencies (učestalost alela)

U ovom radu pratila se raspodjela alela HLA-DRB1 zajedničkog epitopa povezanog s RA koji su ujedno i jedni od najučestalijih u hrvatskoj populaciji (**Slika 18.**). Uočeno je sedam poddtipova HLA-DRB1 gena zajedničkog epitopa povezanog s pojavom RA kod ispitanika s područja Splitsko-dalmatinske županije od kojih je najučestaliji alel DRB1*0101, a zatim DRB1*04:01, DRB1*04:02, DRB1*04:03, DRB1 *04:04 te DRB1*04:05.



Slika 18. Shematski prikaz učestalosti HLA-DRB1 alela u pacijenata oboljelih od RA

5. RASPRAVA

Budući da postoji genetska povezanost reumatoidnog artritisa i HLA-DRB1 gena, posljednjih godina javlja se značajan interes za razumijevanje te povezanosti. Genetski faktori omogućavaju predviđanje razvoja reumatoidnog artritisa ili pak mogu služiti u potvrdi dijagnoze. Genetski faktori imaju veću prednost u odnosu na neke druge prediktore budući da se oni ne mijenjaju tijekom cijeloga života (12).

Molekularnim metodama dokazuje se povezanost zajedničkog epitopa. Molekula HLA razreda II bila je područje od interesa jer je pokazivala posebnu osjetljivost na razvoj bolesti (12). Molekularne metode olakšale su proučavanje te povezanosti koristeći nasljeđene sekvence od navedenih aminokiselina QKRAA, QRRAA ili RRRRAA koje se nalaze u hipervarijabilnim regijama kao ciljna mjesta (6.). Svakako je važno naglasiti da alel HLA-DRB1 nije jedini koji je povezan s genetskom predispozicijom za razvoj reumatskih bolesti već je ona dokazana i kod pacijenata koji imaju alelom HLA-B27.

Reumatoidni artritis pokazuje povezanost s određenim alelima na lokusu HLA-DRB1, od kojih je najistaknutiji alel HLA-DRB1*04 (13). Važno je naglasiti da su podtipovi alela lokusa HLA-DRB1*04 u prvom redu *0402, *0403, *0404 te *0405 podjednako prisutni u hrvatskoj populaciji dok je najučestaliji *0401 (12). Pojava homozigotnosti nekog od gore navedenih podtipova alela lokusa HLA-DRB1*04 može ukazivati na teži oblik bolesti.

Rezultati brojnih istraživanja pokazuju čvrstu povezanost alela HLA-DRB1*0401 i *0404 s reumatoidnim artritismom. Uspoređujući dobivene rezultate sa rezultatima u svijetu uočeno je da je predisponirajući alel kod sjevernoameričkih Indijanaca *1402. Aleli koji se najčešće opažaju u populacijama mediteranskih zemalja su *0101 i *1001. To potvrđuje podatak da oboljela populacija južne Francuske ima DRB1*0101 kao jedan od najučestalijih predisponirajućih alela. U hrvatskoj populaciji koja se također ubraja u krug mediteranskih zemalja alel *0101 genetski je prediktor povezanosti HLA sustava i RA. Španjolska populacija bilježi *0405 kao učestali alel (13).

6. ZAKLJUČAK

1. Otkriće sustava HLA zasigurno je pridonijelo raznim područjima medicine kao što je populacijska genetika, važnost prilikom transplantacija, ali i dijagnosticiranja brojnih autoimunih bolesti odnosno povezanost s bolestima
2. Reumatoidni artritis autoimuna je bolest čiji mehanizam nastanka još uvijek u potpunosti nije razjašnjen. Jedan od ključnih čimbenika nastanka bolesti je prisustvo nekoga od alela lokusa HLA-DRB1 koji je važan u samom mehanizmu nastanka bolesti, a može uključivati i okolišne čimbenike.
3. Aleli lokusa HLA-DRB1*04 u prvom redu podtipovi *0401, -*0402, -*0403,*0404 te*0405 se povezuju s razvojem RA. Genetska predispozicija za razvoj bolesti ne znači nužno da će do razvoja bolesti i doći te ju je potrebno dokazati klinički.
4. Tipiziranje alela lokusa HLA-DRB1 molekularnom metodom omogućava što točniju i precizniju dijagnostiku bolesti.

7. SAŽETAK

HLA sustav je sustav leukocitnih antigena koji se nalaze na kraćem kraku 6. kromosoma. Molekule HLA sustava kodirane su genima razreda I, II i III. Sustav HLA ima važnost u imunološkim reakcijama gdje sudjeluje u reakcijama prepoznavanja stranog antigena i pokretanju imunološke reakcije kako bi se taj isti antigen uklonio, ali i održalo normalno funkcioniranje organizma bez narušene homeostaze. Ovaj sustav gena zbog izrazitog polimorfizma povezuje se s brojnim autoimunim bolestima, među koje spada i reumatoidni artritis.

Cilj ovoga rada bio je odrediti alele lokusa HLA-DRB1 sustava HLA kod ispitanika oboljelih od reumatoidnog artritisa te definirati koji se od tih alela najčešće pojavljuje kod pacijenata s uspostavljenom dijagnozom. .

U istraživanje bilo je uključeno 138 pacijenata čija je analiza polimorfizma alela HLA-DRB1 napravljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, Zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split. Za određivanje alela lokusa HLA-DRB1 korištena je molekularna metoda PCR-SSO.

Rezultati su pokazali da kod 30,6% pacijenata uočen neki od predisponirajućih alela lokusa HLA-DRB1*04 vezanih uz RA. Ovi rezultati su u skladu s prethodno objavljivanim rezultatima i literaturnim podacima te potvrđuju povezanost pojedinih HLA-DRB1 alela s pojavom reumatoidnog artritisa u hrvatskoj populaciji.

8. ABSTRACT

The HLA gene system is a system of leukocyte antigens located on the shorter arm of chromosome 6. HLA molecules are encoded by class I, II, and III genes. The HLA system is important in the immune reactions where it participates in the recognition of a foreign antigen and initiates an immune reaction in order to remove that same antigen, but also to maintain the normal functions of the organism without disrupting the homeostasis. This gene system, due to its pronounced polymorphism, is associated with a number of autoimmune diseases one of which is rheumatoid arthritis that will be further discussed later on.

The aim of this study was to determine the alleles of the HLA-DRB1 locus that correlate with the occurrence of the rheumatoid arthritis and to determine the key subtypes linked to it.

The study included 138 patients whose analysis of HLA-DRB1 allele polymorphism was performed in the Tissue Typing Laboratory, Department of Transfusion Medicine, Clinical Hospital Center Split. The PCR-SSO molecular method was used to type the HLA-DRB1 locus allele.

The results showed that some of the predisposing alleles of the RA-related HLA-DRB1 * 04 locus were observed in 30.6% of patients. These results are in accordance with previously published results and literature data and confirm the association of certain HLA-DRB1 alleles with the occurrence of rheumatoid arthritis in the Croatian population.

9. LITERATURA

1. Thorsby E; A short history of HLA. *Tissue Antigens* 2009 Aug; 74(2):101-16.
2. Čečuk- Jeličić E, Jaman S, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti, skripta za studente Odsjeka medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Kolegij- Laboratorijska imunologija s imunokemijom, 2019/2020
3. Andreis I, Batinić D., Čulo F., Grčević., Marušić M., Taradi M., Višnjic D., *Imunologija*, Zagreb, Medicinska naklada, 2010.; str. 98.-113.
4. Lukač J; *Imunologija, Skripta iz predmeta imunologija za studente Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*
5. Crnić-Martinović M., *Skripta Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka*
6. Tumer G; Simpson B; Roberts TK. *Genetics, Human Major Histocompatibility Complex (MHC)*, StatPearls Publishing LLC., 2020 Sep 2.
7. Marinović I., *Doktorska disertacija; Populacijsko istraživanje sustava HLA kod oboljelih od reumatoidnog artritisa s područja sinjske krajine, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, 2016.*
8. Alan J Silman, Jacqueline E Pearson, *Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis*, *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S265-72
9. Bax M, van Heemst J, Huizinga TWJ , Toes REM. *Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned?* *Immunogenetics* 2011 Aug; 63(8):459-66.
10. Viatte S , Plant D, Raychaudhuri S. *Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol* 2013 Mar;9(3):141-53.

11. Amy Wasserman. Rheumatoid Arthritis: Common Questions About Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 2018 Apr 1;97(7):455-462.
12. Laktašić-Žerjavić, N., Soldo-Jureša, D., Babić-Naglić, Đ., Čurković, B., Potočki, K., Žunec, R., & Ivanišević, G. (2005). Raspodjela HLA-DRB1 gena u hrvatskih bolesnika s artritismom. *Reumatizam*, 52(1), 12-16.
13. Grubic, Z., Stingl, K., & Zunec, R. (2012). Heterogeneity of HLA-DRB1* 04 alleles and haplotypes in the Croatian population. *Tissue antigens*, 80(3), 219-223.
14. <https://clinicalgate.com/antigen-presenting-molecules/>
15. https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-MHC-class-II-molecule_fig2_301362122
16. https://www.researchgate.net/figure/Inheritance-of-HLA-haplotypes-HLA-genes-are-inherited-en-block-from-each-parent_fig4_268208616
17. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>
18. Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., & Trowsdale, J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue antigens*, 75(4), 291.
19. Žunec, Grubić, Balen, 2011. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa. *Medix*, 17:92
20. https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-SSP-HLA-alleles-are-amplified-by-PCR-using-SSPs-The-PCR-products-are-then_fig1_268208616
21. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-za-pacijente/bolesti-kostiju-zglobova-i-misica/bolesti-zglobova-i-vezivnog-tkiva/reumatoidni-artritis>

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Danijela Jurić

Datum rođenja: 17.07.1998.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

E-mail adresa: danijelaj12gmail.com

Obrazovanje

2005.-2013. Osnovna škola kraljice Jelene, Solin

2013.-2017. IV. Gimnazija Marko Marulić, Split

2018.-2021. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija,
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Strani jezici

Engleski jezik-napredna razina

Njemački jezik-osnovna razina

Priznanja

Stipendija grada Solina na temelju uspjeha za akademsku godinu 2019./2020.