

# Povezanost gena HLA razreda I i II s razvojem psorijatičnog artritisa

---

**Radić, Matea**

**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:176:839572>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-02**

*Repository / Repozitorij:*



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[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

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Matea Radić**

**POVEZANOST GENA HLA RAZREDA I I II S RAZVOJEM  
PSORIJATIČNOG ARTRITISA**

**Završni rad**

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Matea Radić**

**POVEZANOST GENA HLA RAZREDA I I II S RAZVOJEM  
PSORIJATIČNOG ARTRITISA**

**ASSOCIATION OF HLA CLASS I AND II GENES WITH  
THE DEVELOPMENT OF PSORIATIC ARTHRITIS**

**Završni rad / Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Esma Čečuk-Jeličić, doc. dr. sc.**

Split, 2024.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Sveučilišni prijediplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** biomedicina i zdravstvo

**Znanstveno polje:** kliničke medicinske znanosti

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

## POVEZANOST GENA HLA RAZREDA I I II S RAZVOJEM PSORIJATIČNOG ARTRITISA

Matea Radić, 0346012888

### SAŽETAK

**Cilj:** Cilj rada je uočiti razlike u zastupljenosti alela kod pacijenata s psorijatičnim artritisom u usporedbi s kontrolnom skupinom te prikazati alele koji se pojavljuju s većom učestalošću kod ispitanika sa PsA.

**Materijali i metode:** Zbog nepostojanja definitivnih laboratorijskih testova za psorijatični artritis, tipizacija HLA pokazala se od velike koristi s obzirom na asocijaciju PsA s pojedinim alelima sustava HLA. Za određivanje alela lokusa HLA korištene su molekularne metode (PCR-SSO, PCR-SSP) u rutinskom radu na 105 pacijenata poslanih od strane reumatologa.

**Rezultati:** Usporedbom učestalosti alela lokusa HLA kod pacijenata sa PsA u odnosu na kontrolnu skupinu uočena je povećana učestalost alela HLA-A\*32 i HLA-A\*02 kod pacijenata. Aleli HLA-B\*08, HLA-B\*13 i HLA-B\*57 pokazuju statistički značajnu učestalost kod pacijenata sa PsA, dok se najučestalijim alelom pokazao alel HLA-C\*06 i predstavlja faktor rizika za psorijatični artritis. Različiti rezultati u zastupljenosti alela HLA-DRB1 lokusa mogu biti relevantni za modulaciju kliničke ekspresije.

**Zaključak:** PsA je klinički heterogena bolest. Dobiveni rezultati ukazuju na složenost sustava HLA koja nije samo temelj i glavna karika u području transplantacijske medicine već zahvaljujući najnovijim metodama molekularne biologije (PCR, NGS) i glavno polazište u određivanju genske predispozicije za niz bolesti. Još uvijek postoji potreba za daljnjim i većim genetskim studijama, unutar i izvan HLA regije, kako bi se došlo do čvršćih zaključaka u vezi psorijatičnog artritisa.

**Ključne riječi:** genska predispozicija; HLA geni; HLA tipizacija; PCR; psorijatični artritis

**Rad sadrži:** 55 stranica, 19 slika, 8 tablica

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**

**University Department for Health Studies**

**University undergraduate study of medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** biomedicine and health care

**Scientific field:** clinical medical sciences

**Supervisor:** Asst. Prof. Esma Čečuk-Jeličić, PhD

### ASSOCIATION OF HLA CLASS I AND II GENES WITH THE DEVELOPMENT OF PSORIATIC ARTHRITIS

Matea Radić, 0346012888

#### SUMMARY

**Objectives:** The aim of the work is to observe the differences in the representation of alleles in patients with psoriatic arthritis compared to the control group and to show the alleles that appear with greater frequency in subjects with PsA.

**Material and methods:** Due to the lack of definitive laboratory tests for psoriatic arthritis, HLA typing has proven to be of great use considering the association of PsA with certain alleles of the HLA system. To determine the alleles of the HLA locus, molecular methods (PCR-SSO, PCR-SSP) were used in routine work on 105 patients referred by a rheumatologist.

**Results:** By comparing the frequency of HLA locus alleles in patients with PsA compared to the control group, an increased frequency of HLA-A\*32 and HLA-A\*02 alleles was observed in patients. The HLA-B\*08, HLA-B\*13 and HLA-B\*57 alleles show a statistically significant frequency in patients with PsA, while the most frequent allele was the HLA-C\*06 allele and represents a risk factor for psoriatic arthritis. Different results in the allele representation of the HLA-DRB1 locus may be relevant for the modulation of clinical expression.

**Conclusion:** PsA is a clinically heterogeneous disease. The obtained results indicate the complexity of the HLA system, which is not only the foundation and the main link in the field of transplant medicine, but thanks to the latest methods of molecular biology (PCR, NGS) and the main starting point in determining the genetic predisposition for several diseases. There is still a need for further and larger genetic studies, within and beyond the HLA region, to reach firmer conclusions regarding psoriatic arthritis.

**Keywords:** genetic predisposition; HLA genes; HLA typing; PCR; psoriatic arthritis

**Thesis contains:** 55 pages, 19 figures, 8 tables

**Original in:** Croatian

## *Zahvale*

*Ovim putem želim izraziti svoju iskrenu zahvalnost mentorici doc. dr. sc. Esmi Čečuk-Jeličić na nesebičnoj podršci, stručnoj pomoći i strpljenju koje je pokazala tijekom pisanja ovog završnog rada. Njezina stručnost, empatija i savjeti bili su ključni u realizaciji ove teme.*

*Hvala i svim djelatnicima Laboratorija za tipizaciju tkiva, KBC Split, a posebnu zahvalu upućujem mag. biol. mol. Sonji Jaman čije su me smjernice, savjeti i susretljivost vodili kroz pisanje ovog rada.*

*Također, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Njihova prisutnost bila je moja najveća snaga tijekom cijelog obrazovnog puta.*

## **KRATICE:**

CASPAR – Kriteriji klasifikacije za psorijatični artritis (*Classification of Psoriatic Arthritis*)

DMARD – Lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (engl. *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*)

ER – Endoplazmatski retikulum (engl. *Endoplasmic Reticulum*)

ESSG - Europske skupine za proučavanje spondiloartropadije (engl. *The European Spondylarthropathy Study Group*)

GWAS – Cijelogenomska asocijacijska studija (engl. *Genome-Wide Association Studies*)

HLA – Sustav humanog leukocitnog antigena (engl. *Human Leukocyte Antigens*)

HSP – Proteini toplotnog šoka (engl. *Heat Shock Proteins*)

IFN – Interferon (engl. *Interferon*)

IHW – Međunarodna radionica histokompatibilnosti (engl. *International Hystocompatibility Workshops*)

IL – Interleukin (engl. *Interleucine*)

MHC – Glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *Major Hystocompatibility Complex*)

MLCT – Test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. *Microlymphocitotoxicity Test*)

NK – Prirodno-ubilačke stanice (engl. *Natural Killer*)

PCR-SSO – engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*

PCR-SSP – engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*

PsA - Psorijatični artritis (engl. *Psoriatic Arthritis*)

RA – Reumatoidni artritis (engl. *Rheumatoid Arthritis*)

SNP – jednonukleotidni polimorizam (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*)

SpA – Spondiloartritis (engl. *Spondyloarthritis*)

TCR – T stanični receptor (engl. *The T-Cell Receptor*)

TNF – Faktori nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)



# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI .....	1
1.1.1.	Povijest otkrića sustava HLA .....	1
1.1.2.	Značajke sustava HLA .....	2
1.1.3.	Osobitosti sustava HLA.....	5
1.2.	GRAĐA I FUNKCIJA MOLEKULA HLA .....	7
1.2.1.	HLA razred I.....	7
1.2.2.	HLA razred II .....	9
1.3.	NASLJEĐIVANJE HLA.....	12
1.4.	NAZIVLJE SUSTAVA HLA .....	12
1.5.	HLA SUSTAV I BOLESTI.....	15
1.6.	PSORIJATIČNI ARTRITIS .....	17
1.6.1.	Općenito .....	17
1.6.2.	Povijest .....	19
1.6.3.	Epidemiologija.....	19
1.6.4.	Etiologija .....	20
1.6.5.	Patogeneza .....	23
1.6.6.	Klinička slika .....	24
1.6.7.	Liječenje .....	28
2.	CILJ RADA .....	29
3.	MATERIJALI I METODE.....	30
3.1.	DIZAJN STUDIJE I ISPITANICI .....	30
3.2.	MATERIJALI I METODE KOJIMA SE ODREĐUJU GENI I ALELI HLA SUSTAVA.....	30
3.2.1.	Serološko određivanje .....	30
3.2.2.	Molekularne metode određivanja alela lokusa sustava HLA .....	33
3.3.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	37
4.	REZULTATI .....	38
5.	RASPRAVA .....	44
6.	ZAKLJUČAK.....	46
7.	LITERATURA .....	47

8. ŽIVOTOPIS.....	51
-------------------	----

# 1. UVOD

## 1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI

Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) uključuje gene koji služe za kodiranje proteina na stanicama koje sudjeluju u imunološkoj reakciji. Ova skupina gena prvi put je otkrivena u miševa pod nazivom H-2 te je zaključeno da su produkti ovih gena ključni u predočavanju patogenih peptida stanicama imunološkog sustava domaćina, odnosno T limfocitima. Posljedica toga je gotovo uvijek nepovoljna za patogene stanice zaražene virusom bivaju uništene, aktivirani makrofazi uništavaju bakterije u svojim unutarstaničnim vezikulama, a limfociti B su aktivirani da bi mogli proizvesti protutijela koja će odstraniti ili neutralizirati izvanstanične patogene (1).

Kod ljudi se glavni kompleks histokompatibilnosti naziva HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*). Naziv „leukocitni“ dolazi od toga što su ti antigeni prvobitno otkriveni na bijelim krvnim stanicama, iako su daljnjim proučavanjima otkriveni na gotovo svim stanicama u tijelu.

### 1.1.1. Povijest otkrića sustava HLA

MHC sustav, koji je u ljudi kasnije nazvan sustav leukocitnih antigena, HLA, otkrio je 1952. godine francuski liječnik i znanstvenik Jean Dausset koji je uočio da serum osoba koji su više puta primili transfuziju sadrže protutijela koja aglutiniraju bijele krvne stanice (2). Aloantigene na leukocitima nazvao je MAC po inicijalima donora seruma na kojima su napravljena istraživanja, a kasnije su preimenovani u HLA-A2 i smatraju se prvim otkrivenim HLA antigenima. Za svoje istraživanje Dausset je dobio Nobelovu nagradu 1980. godine. Nastavno na Daussetova istraživanja, znanstvenici Van Rood i Payne su, svaki za sebe, dokazali leukocitne aglutinine u serumu trudnica.

Sustav HLA kakvog poznajemo danas utemeljili su Jean Dausset, Jon van Rood i Rose Payne 1958. Zbog toga što je razumijevanje veze između leukocitnih antigena,

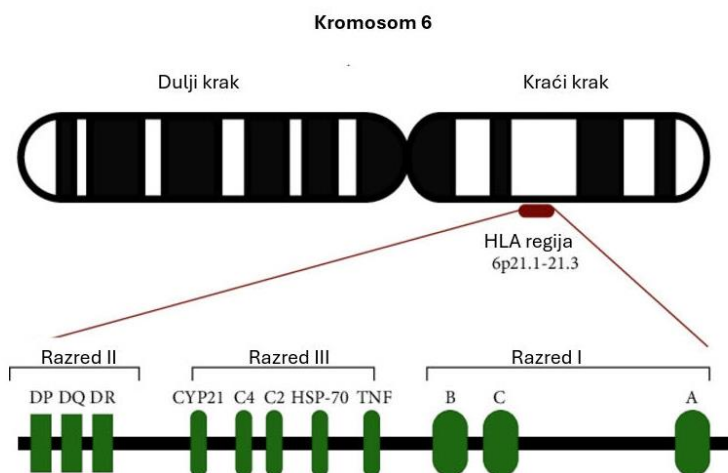
njihovog polimorfizma i nasljeđivanja, kada se oslanjalo samo na rezultate pojedinačnih laboratorija bilo izazovno, uspostavljene su međunarodne radionice (engl. *International Hystocompatibility Workshops*; IHWs) u svrhu usklađivanja metoda i nomenklature novootkrivenih antigena između laboratorija i institucija koji su se bavili ovom tematikom. Prvi radni sastanak je održan 1964. godine i za cilj je imao uspoređivanje različitih tehnika kojima se dokazuju antigeni HLA, budući da su laboratoriji koristili različite testove poput leukoaglutinacije, indirektnog antiglobulinskog testa, miješane aglutinacije, testa fiksacije komplementa i mikrocitotoksičnosti. Drugi sastanak organizirao je Jon van Rood godine 1965., a treći Ruggiero Ceppellini, talijanski genetičar godine 1967. s ciljem genetske analize poznatih antigena. Na tom sastanku, istraživači su koristili vlastite serume i tehnike, a test mikrolimfocitotoksičnosti kojeg su razvili McClelland i Terasaki postao je standardna serološka tehnika za dokazivanje antigena HLA. Nedugo nakon trećeg IHWs 1968. godine ustrojen je odbor za nomenklaturu (engl. *HLA Nomenclature Committee*) s ulogom davanja službenih imena (4).

Treći sastanak istraživao je povezanost HLA antigena s bolestima, te je dokazano da je ovaj polimorfni sustav povezan s više od 100 bolesti s autoimunom pozadinom poput: celijakije, psorijaze, reumatoidnog artritisa i drugih, s infektivnim i malignim bolestima. Dausset, Amos, Ceppellini i van Rood dokazali su važnost HLA sustava za uspješno funkcioniranje transplantiranih organa. Ovo otkriće dovelo je 12. svibnja 1969. godine do osnivanja Eurotransplanta, organizacije koja i danas djeluje u svrhu što efektivnije alokacije raspoloživih organa kompatibilnim donorima (2,3).

### **1.1.2. Značajke sustava HLA**

Sustav HLA sadrži mnoge gene uključene u imunološkoj reakciji. Primarna uloga imunološkog sustava je razlikovati vlastito tijelo od stranoga, održati integritet vlastitog organizma i pokrenuti imunološki odgovor. Geni sustava HLA sudjeluju u imunološkoj reakciji tako što kodiraju sintezu proteina odgovornih za predodžbu stranih antigena stanicama koje su imunološki kompetentne (4).

Geni sustava HLA nalaze se na kromosomu 6 i to na kraćem kraku kromosoma na odsječku 6p21.1-21.3 (Slika 1.) i čine oko 0.13% ljudskog genoma. Regija HLA grupirana je u tri razreda: I, II, III. Geni smješteni najbliže centromeri pripadaju HLA razredu II, najbliže telomeri je smještena regija HLA razreda I, a između njih regija HLA razreda III (5).



**Slika 1.** Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9162874/bin/JIR2022-9710376.001.jpg> )

Geni HLA razreda I i II su zaslužni za sintezu, preradbu i predočavanje antigena. Geni HLA razreda III, iako nisu centralni u ovom procesu, značajni su zbog brojnih gena uključenih u imunološke reakcije, poput komponenti komplementa i citokina. Geni TNF-A i TNF-B (Faktori nekroze tumora, engl. *Tumor Necrosis Factor*; TNF) kodiraju citokine TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ , poznate kao proteini „toplotnog šoka“ (engl. *Heat Shock Proteins*, HSP), koji su važni za imunološki odgovor (3).

Osim obrane od infekcije, glavna zadaća imunosnog sustava je održavanje genske i antigenske homeostaze organizma. Ta funkcija zahtjeva razlikovanje strane od vlastitih antigena. Prema vlastitim antigenima imunosni sustav pokreće reakciju tolerancije, dok strane antigene raznim mehanizmima uništava i izbacuje iz tijela (4).

Stechena imunost podrazumijeva prepoznavanje antigena i specifičan odgovor na njega te razvoj memorije limfocita T i limfocita B. T limfociti prepoznaju antigene u

obliku peptida vezanih za MHC proteine, a B limfociti koriste imunoglobulinske receptore. Pomoću receptora, limfociti B prepoznaju dijelove antigena nazvane antigenskim epitopima. Molekule HLA odgovorne su za razvoj T limfocita u timusu. T limfociti prolaze kroz proces pozitivne i negativne selekcije kako bi preživjele samo one stanice koje mogu prepoznati vlastite HLA molekule, što pomaže u sprječavanju razvoja autoimunih bolesti (5).

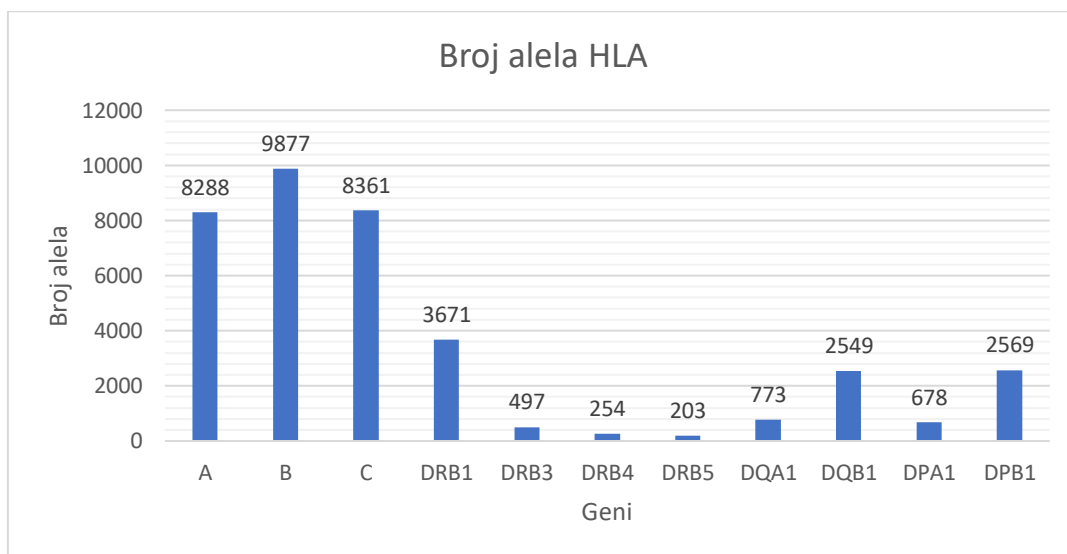
Molekule HLA sudjeluju i u predstavljanu stranih antigena limfocitima. T limfociti prepoznaju kompleks sastavljen od prerađenog stranog antigena i vlastitog HLA antigena. Limfociti T prepoznaju specifične komplekse molekula HLA i peptida putem T-staničnih receptora (engl. *The T-Cell Receptor*; TCR). CD8<sup>+</sup> limfociti T vežu se za molekule HLA razreda I i prepoznaju endogene peptide kao što su virusni ili tumorski proteini. S druge strane, CD4<sup>+</sup> limfociti T vežu se za razred II molekula HLA na antigen prezentirajućim stanicama kao što su makrofazi i dentritičke stanice, te prepoznaju egzogene peptide poput bakterijskih proteina. Većina limfocita T prepoznaje peptide, ali ne i druge molekule jer se peptidi vežu za molekule HLA (6). Među velikim brojem različitih HLA molekula, jedan limfocit T može prepoznati specifičan peptid prezentiran jednom HLA molekulom. Ta se pojava naziva spregnuto prepoznavanje (3).

Ekspresija molekula HLA na stanicama bitno je određena intenzitetom prepisivanja gena te on određuje stupanj ekspresije tih molekula. Citokini igraju ključnu ulogu u regulaciji prepisivanja gena i ekspresiji HLA molekula. U korist tomu govore limfociti T koji mogu, nakon stimulacije, putem citokina povećati broj HLA molekula na ciljanoj stanici, što je ključno za njihovo prepoznavanje. Za HLA molekule razreda I, ekspresiju najviše povećavaju interferoni (engl. *Interferon*; IFN) (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$ ) te faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*; TNF). Njihov mehanizam djelovanja uključuje aktivaciju transkripcijskih faktora koji se vežu na promotorske regije gena. Za HLA molekule razreda II, interleukini (engl. *Interleucine* ; IL) poput IL-4 i IL-1 te interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pojačavaju njihovu ekspresiju. Nasuprot tome, interferoni IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  smanjuju ekspresiju molekula HLA razreda II. Ova regulacija je važna za prilagodbu imunološkog sustava na različite patogene i za modulaciju imunološkog odgovora (4).

### 1.1.3. Osobitosti sustava HLA

Glavna obilježja sustava HLA su: polimorfizam, crossing-over, nepravilna tkivna zastupljenost, genska neravnoteža udruživanja, križna reaktivnost, rasna i populacijska specifičnost te pravilna segregacija (4).

Polimorfizam znači da postoje mnogobrojne varijante unutar istog gena nazvane alelima, kao i velik broj lokusa. Geni HLA razreda I i II predstavljaju jedan od najpolimorfnijih genskih sustava koji su istraživani u čovjeka. Sadašnja statistika pokazuje preko 38 000 otkrivenih alela. Prema IPD-IMGT/HLA bazi podataka najpolimorfniji lokus razreda I HLA je HLA-B s do sada otkrivenih 9877 različitih alela, a slijedi ga HLA-C s otkrivenih 8361 alela. Među alelima HLA razreda II, lokus HLA-DRB1 je najpolimorfniji s 3671 otkrivenih lokusa nakon kojega slijedi HLA-DPB1 s otkrivenih 2569 alela (Slika 2.).



**Slika 2.** Raspodjela alela na lokusima HLA

(Izvor: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)

Moguća objašnjenja za ovaj veliki polimorfizam su brži razvoj sustava HLA u odnosu na druge genetske sustave ili je ova raznolikost stara, odnosno rezultat selekcije koja se temelji na stvaranju HLA alela otpornih na patogene. Pozitivna prirodna selekcija favorizira alele koji poboljšavaju preživljavanje i reprodukciju, osiguravajući njihov opstanak. Novi HLA aleli nastaju kroz konverziju gena (zamjena jednog alela istog gena

drugim alelom), točkaste mutacije (zamjena jedne nukleotidne baze unutar pojedinog alela) i rekombinacije između alela, što doprinosi raznolikosti i učinkovitosti imunološkog sustava (4, 5).

HLA geni smješteni na jednom kromosomu tvore haplotip HLA. Jedna od osobitosti sustava HLA je niska učestalost crossing-over-a koja iznosi 1-2%. Događa se tijekom oogeneze ili spermatogeneze i predstavlja zamjenu dijelova kromatida. Crossing-over se događa vrlo rijetko, a poznato je da se učestalost crossing-over-a veća što su lokusi smješteni dalje (4).

Nepravilna tkivna zastupljenost znači da su molekule HLA u velikoj mjeri prisutne u limfnom tkivu i na stanicama organa koji imaju ulogu u imunološkoj reakciji dok su slabo izražene u mišićima, središnjem živčanom sustavu i masnom tkivu. HLA molekule su ključne za pokretanje imunološkog odgovora, a njihova neravnomjerna raspodjela pomaže tijelu da se fokusira na mjesta gdje je potrebna zaštita, dok na manje osjetljivim tkivima smanjuje rizik od oštećenja izazvanih imunološkim reakcijama (4).

HLA sustav također pokazuje gensku neravnotežu udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*) pri čemu se različiti aleli bliskih HLA lokusa zajedno pojavljuju češće nego očekivano. Najčešći primjer alelne povezanosti u bijeloj populaciji je HLA-A\*01:01-C\*07:01-B\*08:02-DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 haplotip, tzv. haplotip „super B8“. Jedan od mogućih razloga neravnoteže udruživanja je selektivna prednost određenih haplotipova i raspodjela pojedinih gena uslijed miješanja i migracije populacije. Neravnoteža udruživanja najveća je između alela HLA-B i HLA-C lokusa, a razlog tomu je što navedeni lokusi imaju najmanju učestalost crossing overa budući da su na kromosomu smješteni blizu jedan drugog (8).

Još jedna karakteristika HLA sustava je križna reaktivnost (engl. *Cross-Reactivity*). Imunizacijom možemo, osim protiv antigena HLA koji je pokrenuo reakciji, stvoriti imunitet i protiv drugih HLA antigena slične ili iste specifičnosti. Križna reaktivnost se uglavnom pojavljuje među HLA antigenima istog lokusa.

Sustav HLA pokazuje rasnu i populacijsku specifičnost – u populacijskim istraživanjima pokazano je da se unutar pojedinih populacija pojavljuje samo dio haplotipova i alela. Na primjer, u Hrvatskoj je od 35 različitih alela HLA-B27 uočena samo nekolicina njih (HLA-B\*27:02, - B\*27:05, -B\*27:14, -B\*27\_04) (4).

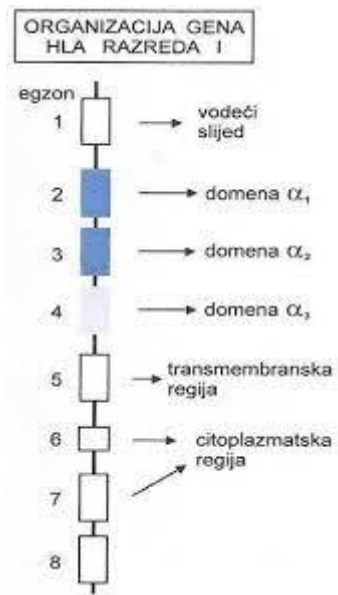


## 1.2. GRAĐA I FUNKCIJA MOLEKULA HLA

### 1.2.1. HLA razred I

Molekule HLA razreda I prisutne su na većini stanica s jezgrom i trombocitima, izuzev stanica centralnog živčanog sustava, posteljice, spermatozoida i oocita gdje ih nalazimo u vrlo malom broju. Sadrže dva polipeptidna lanca između kojih su kovalentne veze. HLA-A, -B, -C molekule kodiraju laki lanac  $\alpha$  (45kD), dok je teški lanac  $\beta$  (12 kD), poznat kao  $\beta$ 2 mikroglobulin, kodiran genima na kromosomu 15. Teški lanac sadrži 350 aminokiselina i tri dijela: transmembranski, citoplazmatski i ekstracelularni dio s tri domene ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 i  $\alpha$ 3) na koji se vežu peptidni ulomci (4).

Geni odgovorni za kodiranje teškog lanca HLA molekula razreda I imaju specifičnu strukturu gdje su različite domene proteina kodirane različitim egzonima. Na 5' kraju, vodeći egzon kodira signalni peptid koji omogućava umetanje  $\alpha$  lanca u endoplazmatski retikulum (engl. *Endoplasmic Reticulum*; ER) i koji se uklanja prije nego što molekula bude izražena na površini stanice. Zatim slijede tri izvanstanične domene ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3) kodirane egzonima 2, 3 i 4. Transmembranski dio peptida je kodiran egzonom 5, citoplazmatski kraj egzonima 6 i 7, a 3' netranslacijski kraj egzonom 8 (Slika 3.) (4).



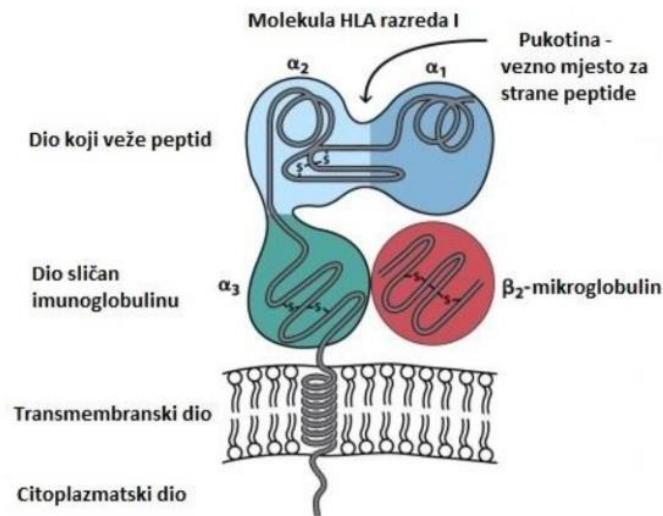
**Slika 3.** Organizacija gena HLA razreda I

(Izvor: <https://encrypted->

[tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRCW1xa26PY5p60a1EwQmQQlv1SQUWdmletoA&w=1000&h=1000&e=imp](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRCW1xa26PY5p60a1EwQmQQlv1SQUWdmletoA&w=1000&h=1000&e=imp)

Domene  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  zajedno formiraju najvažniji dio molekule, pukotinu. Na pukotinu se veže strani antigen te predstavlja najpolimorniji dio molekule. Pukotina za vezivanje peptida nalazi se na površini molekule i može vezati peptide duljine od 8 do 10 aminokiselina koji će biti predloženi limfocitima T. Dio molekule  $\alpha_3$  reagira sa staničnim receptorom za T limfocite i služi za vezanje koreceptorske molekule CD8+. Domena  $\alpha_3$  također povezuje domenu  $\alpha_2$  s dijelom  $\alpha$  lanca koji prolazi kroz staničnu membranu. Njezina struktura podsjeća na konstantnu domenu imunoglobulina, kao i struktura  $\beta_2$  mikroglobulina (Slika 4.) (4).

$\beta_2$  mikroglobulin se u serumu nalazi slobodan te se na  $\alpha$  lanac povezuje nekovalentnim vezama. Njegova uloga je učvršćivanje molekule (4).



**Slika 4.** Shematski prikaz molekule HLA razreda I

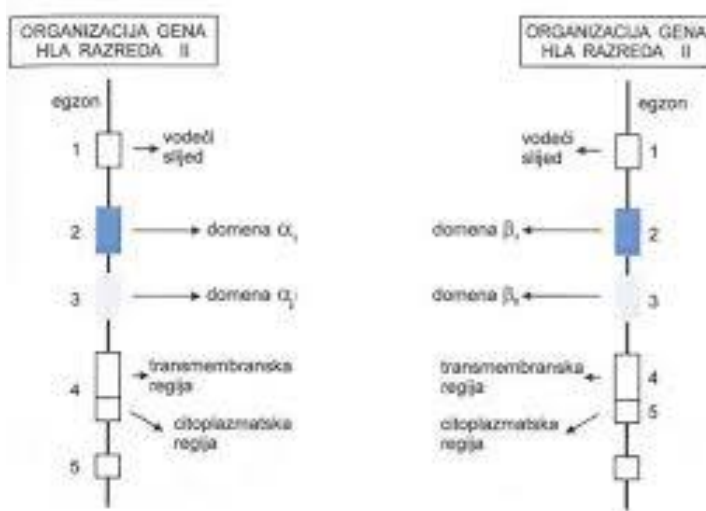
(Izvor: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT-nGUJQfuH9ZsfdjNrHiPN7CXbj0UTve31FA&s> )

### 1.2.2. HLA razred II

Regija HLA razreda II smještena je najbliže centromeri na kromosomu 6 te obuhvaća 800 kb. Organizirana je u subregije, gdje su regije HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP najznačajnije. Molekule HLA razreda II prisutne su na antigen prezentirajućim stanicama poput B limfocita, dendritičkih stanica i makrofaga. Ove stanice igraju ključnu ulogu u imunološkom sustavu jer pomažu u prepoznavanju stranih antigena i pokreću proizvodnju antitijela kako bi se tijelo borilo protiv tih antigena. HLA razreda II molekule sastoje se od dva različita polipeptidna lanca:  $\alpha$  lanca od 33 kDa i  $\beta$  lanca od 28 kDa, povezani nekovalentnim vezama. Oba lanca kodiraju HLA molekule, što nije slučaj kod HLA razreda I (4, 5).

Lakši lanac ( $\alpha$ ) kodira gen (npr. gen HLA-DRA1) koji je građen od 5 egzona, dok lanac  $\beta$  (teži lanac) kodira gen (npr. gen HLA-DRB1) građen od 6 egzona. Molekule HLA razreda II, kao i molekule razreda I, imaju citoplazmatski, ekstracelularni i transmembranski dio (5).

Egzon 1 kodira vodeći peptid dok egzoni 2 i 3 kodiraju dvije izvanstanične domene. Gen za  $\beta$  lanac sadrži 6 egzona gdje egzon 4 kodira transmembransku regiju, a egzon 5 citoplazmatsku. Gen za  $\alpha$  lanac ima 5 egzona od kojih egzon 4 kodira citoplazmatsku i transmembransku regiju (Slika 5.) (4).

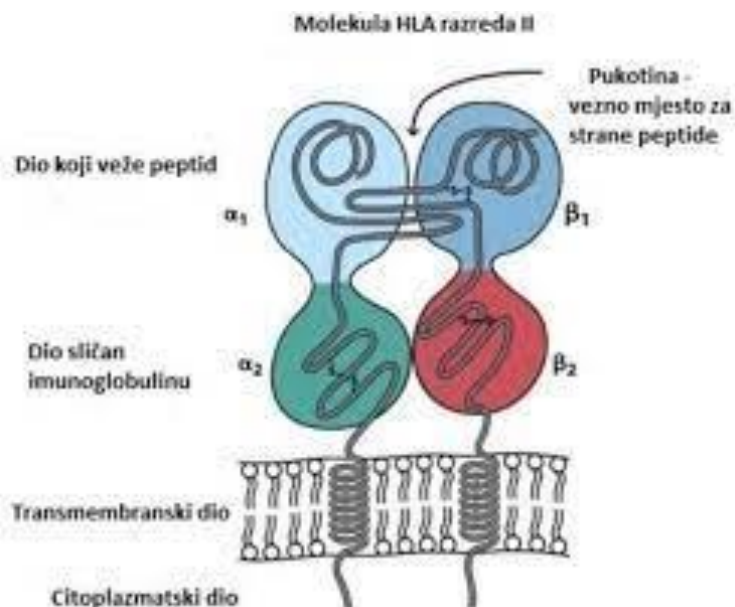


**Slika 5.** Organizacija gena HLA razreda II

(Izvor: <https://encrypted->

[tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSwXo9tloeNMccYICZNCBtl8RmGhYnqeofpqw&s](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSwXo9tloeNMccYICZNCBtl8RmGhYnqeofpqw&s))

Ekstracelularni dio sastoji se od četiri domene:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$ .  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  pripadaju imunoglobulinskoj superporodici jer imaju sličnu strukturu.  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  domene oblikuju vanjsku pukotinu za koju se vežu strani peptidi te predstavljaju najpolimorniji dio. Budući da je pukotina šire i otvorenije strukture, može primiti peptid od 10 do 30 aminokiselina. Osim navedenih dijelova, molekule HLA razreda II imaju i transmembransku regiju s hidrofobnim aminokiselinama te citoplazmatsku regiju gdje se odvija fosforilacija. Citoplazmatski dio također je odgovoran za vezanje molekula na elemente citoskeleta (Slika 6.) (5).



**Slika 6** Shematski prikaz molekule HLA razreda II

(Izvor: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSyjRDsXhzDo-qB6bJGGLfj26XybwkTpfgz0XrZCkuW1ACSm-mwF6isOSmftqTCdKJRFI&usqp=CAU> )

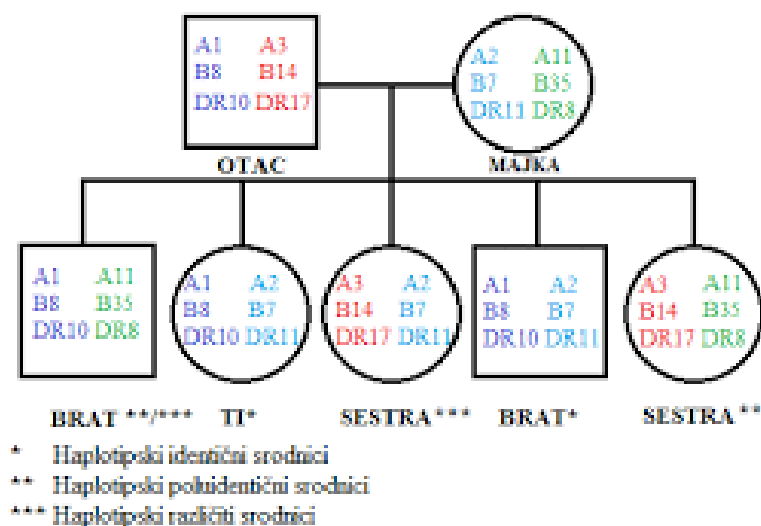
Osnovna zadaća HLA molekula razreda II je predočavanje ekstracelularnog antigena CD4<sup>+</sup> pomoćničkim T-limfocitima. Proces počinje fagocitozom stranog antigena koji se razgrađuje u fagolizosomu, dok se u ER sintetizira HLA molekula. Nakon spajanja, HLA molekula prezentira antigen peptidima na staničnoj membrani, gdje ga prepoznaju pomoćnički T limfociti, potičući imunološki odgovor lučenjem citokina (4).

Glavna razlika između HLA molekula razreda I i razreda II je u prirodi peptida. HLA molekule razreda I vežu se na endogene antigene, sintetizirane unutar stanice, koje se obrađuju u proteosomima, dok se molekule HLA razreda II vežu za egzogene antigene, a njihov put započinje fagocitozom (5).

### 1.3. NASLJEĐIVANJE HLA

Geni HLA nasljeđuju se kodominantno prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Kodominantno nasljeđivanje znači da dijete prima kombinaciju gena na jednom kromosomu od oba roditelja. Dva haplotipa tvore genotip HLA (4).

Prema Mendelovim zakonom nasljeđivanja dva potomka imaju 25% šanse da neće dijeliti haplotipove, 50% šanse da će biti haploidentični i 25% šanse da nasljeđe iste haplotipove od oba roditelja i budu haplotipski HLA identični (Slika 7.) (4).



Slika 7. Prikaz HLA haplotipova u obitelji

(Izvor: [https://encrypted-](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSiuw5qreRG614AEu8AiJq2xi4QifEHbT93_c8R3gQ2L6DJ0wOPam0OJnVNxNauSd8-pf0&usqp=CAU)

[tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSiuw5qreRG614AEu8AiJq2xi4QifEHbT93\\_c8R3gQ2L6DJ0wOPam0OJnVNxNauSd8-pf0&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSiuw5qreRG614AEu8AiJq2xi4QifEHbT93_c8R3gQ2L6DJ0wOPam0OJnVNxNauSd8-pf0&usqp=CAU))

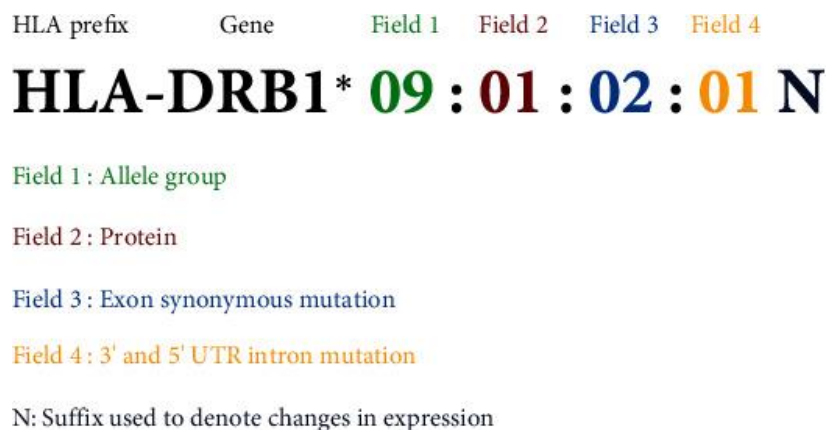
### 1.4. NAZIVLJE SUSTAVA HLA

Već u počecima istraživanja sustava HLA uočeno je da su geni koji kodiraju HLA molekule vrlo polimorfni i da postoji potreba za jedinstvenom sistematizacijom nazivlja ovog sustava (9). Zbog toga je 1968. osnovan Odbor za nazivlje HLA sustava pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *The WHO Nomenclature*

*Committee for Factors of the HLA System*). Nazivlje sustava HLA jedinstveno je u svijetu. Prije imenovanja, novootkrivene sekvence prođu analize i kontrole. Ako se potvrdi da je riječ o dosad neotkrivenoj sekvenci, ona se zajedno s imenom objavljuje u bazi podataka IPD-IMGT/HLA Database (4).

U nalazu tipizacije nazivlje se definira prema korištenim metodama. Antigeni HLA utvrđeni serološkim metodama označavaju se nazivom genskog lokusa (npr. HLA-DR) poslije čega slijedi numeriranje antigena (npr. HLA-DR1, HLA-A2, HLA-B7). Za C lokus se koristi i slovo „w“ (npr. HLA-Cw1) kako bi se razlikovao od komponenti komplementa (4, 10).

Geni dokazani molekularnom metodom imenuju se tako da nakon oznake lokusa svaki alel sadrži specifičan broj sastavljen od četiri seta znamenaka, odvojenih dvotočkom. Aleli imaju najmanje četiri broja, pri čemu prva dva označavaju specifičnost gena, a druga dva redni broj alela tog gena. Peta i šesta znamenka opisuju alelne varijacije dok sedma i osma predstavljaju varijacije u intronima (Slika 8.). Zvijezdica (\*) označava da je određivanje provedeno molekularnom metodom na razini DNA. Neki aleli sadrže sufiks kojim se opisuje ekspresija tog alela (npr. Alel bez ekspresije – N, alel s niskom ekspresijom – L) (4).



**Slika 8.** Nomenklatura HLA molekule

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9162874/bin/JIR2022-9710376.003.jpg>)

Određeni primjeri gena i njihova nomenklatura sa značenjem prikazani su u Tablici 1 pa je tako u zapisu HLA\_DRB1\*13, HLA oznaka regije, DRB1 oznaka pojedinačnog

lokusa, \* oznaka za molekularno testiranje te 13 grupa alela prema serološkoj specifičnosti (4).

**Tablica 1.** Imenovanje HLA gena i alela (4)

<b>Nomenklatura</b>	<b>Značenje</b>
<b>HLA</b>	HLA regija i prefiks za gene HLA
<b>HLA-DRB1</b>	pojedinačni HLA lokus npr. DRB1
<b>HLA-DRB1*13</b>	Grupa alela koja kodira DR13 antigen ili sekvenca homologna drugim DRB1*13 alelima
<b>HLA-DRB1*13:01</b>	Specifični alel HLA
<b>HLA-DRB1*13:01:02</b>	Alel koji se razlikuje od DRB1*13:01:01 alela po istoznačnoj mutaciji
<b>HLA-DRB1*13:01:01:02</b>	Alel koji sadrži mutaciju izvan kodirajuće regije DRB1*13:01:01:01
<b>HLA-A*24:09N</b>	„Null“ alel - alel koji nema ekspresiju
<b>HLA-A*30:14L</b>	Alel koji kodira protein sa značajno niskom ekspresijom na površini stanice
<b>HLA-A*24:02:01:02L</b>	Alel koji kodira protein sa značajno niskom ekspresijom na površini stanice, pri čemu je mutacija izvan kodirajuće regije
<b>HLA-B*44:02:01:02S</b>	Alel koji kodira protein koji je izražen samo kao topiva molekula
<b>HLA-A*32:11Q</b>	Alel čija mutacija od prije dokazano ima značajan utjecaj na ekspresiju na površini stanice, te je njegova ekspresija upitna (engl. Questionable)



## 1.5. HLA SUSTAV I BOLESTI

HLA sustav povezan je s brojnim bolestima, posebice autoimunim, ali i s kroničnom limfatičnom leukemijom, infekcijom hepatitisom C i tumorom jajnika. Nositelji gena povezanih s određenom bolešću imaju veći rizik od oboljenja, iako prisutnost gena ne znači nužno i razvoj bolesti (Tablica 2.).

Dva su glavna objašnjenja za povezanost HLA sustava i bolesti. Prvo se temelji na neravnoteži udruženja alela HLA gena s alelima gena odgovornog za bolest. Drugo objašnjenje uključuje četiri modela djelovanja HLA molekula:

- HLA molekula nedovoljno učinkovito predočuje antigen
- HLA molekula služi kao vezno mjesto za antigen
- HLA molekula omogućuje transport antigena u stanicu
- Imunološke stanice ne prepoznaju antigen kao patogen zbog sličnosti s HLA molekulom.

Temeljna je pretpostavka da mehanizam bolesti uključuje kombinacije ovih modela, ovisno o specifičnoj bolesti (11)

**Tablica 2.** Bolesti povezane s HLA sustavom (3, 5)

Populacija	Utjecaj HLA razreda I		BOLEST	Utjecaj HLA razreda II	
	Podložni	Zaštitni		Podložni	Zaštitni
Poljska			<b>TUBERKULOZA</b>	DRB1*16	DRB1*13
Irska				DRB1*07, DQA1*01:01	DQA1*03:01, DQA1*05:01
Indija				DRB1*15:01 DQB1*06:01	
Tajland				DRB1*09:01 DQB1*03:03	
Argentina	B*39	B*44	<b>HIV</b>		
Bijela rasa	B*57:01 rs2395029 C rs9264942				
Europa			<b>COVID-19</b>		DRB1*04:01
Japan				DRB1*09:01	
Rusija	A*01:01, A*02:01, A*03:01				
Bijela rasa			<b>REUMATOIDNI ARTRITIS</b>	DRB1*04:01 DRB1*04:04 DRB1*04:08	DRB1*01:03 DRB1*04:02 DRB1*11:02
Španjolska i Japan				DRB1*04:05	DRB1*11:03 DRB1*13:01
Izrael				DRB1*01:01 DRB1*01:02	DRB1*13:02 DRB1*13:04
Pima i Yakima Indijanci				DRB1*14:02	
Grčka				DRB1*10:01	
Latinska Amerika				DRB1*01:01 DRB1*04:01 DRB1*04:04 DRB1*04:05	
Bijela rasa i Latinska Amerika	C*05 C*15	C*01		<b>MULTIPLA SKLEROZA</b>	DRB1*15:01 DQB1*06:02 DRB1*13:03

				DRB1*01:08 DRB1*03:01	
Sardinija				DRB1*04 DRB1*03:01 DRB1*13:01	
			<b>SJÖGRENÖV SINDROM</b>	DQA1*05:01 DQB1*02:01 DRB1*03:01	DQA1*02:01 DQA1*03:01 DQB1*05:01
Europa i Amerika			<b>SISTEMSKI ERITEMATOZNI LUPUS</b>	DR2 DR3 DRB1*08:01 DQA1*01:02	
	B*08 B*18 B*15	A*01 A*11 A*31	<b>DIJABETES MELITUS TIP I</b>	DR3 DR4 DQB1*02:01 DQB1*03:02	DR15 DR14
	B*27:02 B*27:30 B*27:04 B*27:05	B*27:06 B*27:09	<b>ANKILOZANTNI SPONDILITIS</b>		

## 1.6. PSORIJATIČNI ARTRITIS

### 1.6.1. Općenito

Psorijatični artritis (engl. *Psoriatic Arthritis* ; PsA) kronična je upalna bolest zglobova povezana s psorijazom i pripada skupini spondiloartritisa (engl. *Spondyloarthritis*; SpA). Psorijaza je kronična upalna bolest kože koju karakteriziraju eritematozni i ljuskavi plakovi te također često zahvaća nokte i vlasište. Manifestacija psorijaze obično prethodi artritisu u prosjeku 10 godina, iako se u 20% slučajeva artritis i psorijaza javljaju istovremeno ili artritis prethodi kožnoj bolesti (Slika 9.) (12). U takvim slučajevima, obiteljska povijest psorijaze važan je pokazatelj. Psorijaza može biti skrivena, pa je važno

tražiti promjene na koži i noktima kod pacijenata s kliničkom slikom kompatibilnom sa spondiloartritisom (SpA).

Klinička slika obično pokazuje asimetrični periferni oligoartritis ili poliartritis s daktilitisom te ukoliko je prisutan, asimetrični sarkoileitis. Iako se na početku mislilo da je PsA benigni poremećaj, podaci iz registra pokazali su progresivnu i destruktivnu prirodu bolesti te narušavanje kvalitete života i funkcionalne sposobnosti slično kao kod reumatoidnog artritisa (engl. *Rheumatoid Arthritis*; RA). Pri razlikovanju psorijatičnoga artritisa od reumatoidnog artritisa postoje niz značajki koje su od pomoći. Kriteriji klasifikacije za psorijatični artritis (engl. *Classification of Psoriatic Arthritis*; CASPAR) uključuju brojne značajke tipične za PsA kao što su psorijaza, bolest noktiju, daktilitis i negativna serologija (13).



**Slika 9.** Psorijaza

(Izvor: Malik F, Haberman R, Scher JU. Psoriatic Arthritis. U: Eftimiou P, urednik. *Absolute Rheumatology Review Cham*: Springer International Publishing; 2020)

PsA je heterogeno stanje koje zahvaća mišićno-koštani sustav, a liječenje je slično liječenju reumatoidnog artritisa. Liječenje PsA uključuje tradicionalne ili konvencionalne antireumatske lijekove koji modificiraju bolest (engl. *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*; DMARD), biološke terapije kao što su inhibitori TNF, inhibitori IL-12/23, inhibitori IL-17 i nova ciljana oralna sredstva uključujući inhibitor fosfodiesteraze-4 i inhibitor Janus kinaze (JAK)/prijenosnika signala i aktivatora transkripcije (STAT) (14). Iako se kliničko liječenje razvilo zahvaljujući konvencionalnim sintetičkim antireumatskim lijekovima koji modificiraju bolest (csDMARD), radiološka oštećenja u intervalu od dvije godine prisutna su u velikom postotku.

### 1.6.2. Povijest

Psorijatični artritis je 1964. godine priznat kao zasebna bolest od strane Američke udruge za reumatologiju, a danas je uključen u skupinu spondiloartropatija. Prvu definiciju PsA dali su Moll i Wright te je ona opisala psorijatični artritis kao „upalni artritis uz prisutnost psorijaze s uobičajenom odsutnošću reumatoidnog faktora“ (13). Njihova najranija klasifikacija uključivala je pet podtipova psorijatičnog artritisa.

### 1.6.3. Epidemiologija

Epidemiološka istraživanja PsA dugo su bila ometana zbog nepostojanja široko prihvaćenog kriterija klasifikacije. Različite studije koristile su različite kriterije u rasponu od Europske skupine za proučavanje spondiloartropadije (engl. *The European Spondylarthropathy Study Group*; ESSG) i Wright & Moll do *ad hoc* kriterija od kojih su svi u određenoj mjeri skloni pogrešnom klasificiranju. ESSG kriteriji imaju nisku stopu osjetljivosti i specifičnosti, dok su Wright & Moll kriteriji sveobuhvatni (14, 15). Nedavni razvoj CASPAR kriterija (CIASsification for Psoriatic Arthritis) omogućio je robusniji okvir za provođenje epidemioloških studija za psorijatični artritis s obzirom na visoku osjetljivost (0.91) i specifičnost (0.99) ovih kriterija (Tablica 3.) (16). Prema CASPAR kriterijima, psorijatični artritis se smatra prisutnim kod pacijenata s upalnim artritisom koji imaju najmanje 3 boda.

Tablica 3. CASPAR kriteriji (17)

KATEGORIJA	OPIS	BODOVI
<b>Psorijaza kože:</b>	-bolest kože potvrđena od strane reumatologa ili dermatologa	- 2 boda
<b>-prisutna</b>		
<b>-prethodno prisutna</b>	- dobivena od bolesnika, obiteljskog liječnika	- 1 bod
<b>-obiteljska anamneza</b>	- prisutnost psorijaze kod rođaka	- 1 bod
<b>Oštećenja noktiju</b>	-oniholiza, udubljenja, hiperkeratoza	- 1 bod
<b>Daktilitis (sadašnji ili prošli)</b>	-oticanje cijelog prsta	- 1 bod

<b>Reumatoidni faktor</b>	-negativan na bilo koju metodu osim na lateks	- 1 bod
<b>Juksta-artikularna formacija kostiju</b>	-različita od osteofita	- 1 bod

Mnoge studije pokazale su da početak psorijaze obično prethodi razvoju artritisa. Otprilike 85% pacijenata razvije psorijazu prije artritisa, dok se u 5-10% pacijenata oba stanja razvijaju istovremeno te u 5-10% slučajeva artritis prethodi psorijazi. Ova varijabilnost PsA posljedica je djelomično nedovoljne dijagnoze (18, 19, 20).

Prevalencija PsA ovisi o populaciji i geografskom području, ali se procjenjuje na 0.3% do 1%. Pregled literature pokazuje da je prevalencija viša u Europi (0.19%, s Norveškom 0.67%) i Sjevernoj Americi (0.13%), a manja na Bliskom Istoku (0.01%), Južnoj Aziji (0.06%), Jugoistočnoj Aziji (0.05%), istočnoj Aziji (0.17%, Japan 0.001%) i Južnoj Americi (0.07%) (21). Najčešće zahvaća pacijente u 30-im i 40-im godinama međutim, može se javiti kasnije. Podjednako se javlja i kod žena kao i muškaraca, dok su bolesnici s kasnijom prezentacijom obično muškarci s psorijazom, prisutnošću HLA-C\*06 i preti lošću. Osim toga, postoje razlike u pogledu prezentacije i spola gdje se muškarcima s ranim početkom PsA javlja aksijalna zahvaćenost, dok je kod žena više prisutna obiteljska anamneza (21).

#### **1.6.4. Etiologija**

##### *1.6.4.1. Genetski čimbenici*

Dugi niz godina, poznato je da genetski čimbenici imaju značajnu ulogu u razvoju psorijaze. Nasljednost psorijaze, što je prvi put opisano prije 200 godina, dokazana je obiteljskim grupiranjem bolesti i kasnijom demonstracijom veće podudarnosti kod jednojajčanih blizanaca u odnosu na dvojajčane blizance. Povećani rizik za pojavu PsA unutar obitelji su zamijetili još Moll i Wright 1973.godine, a u nedavno provedenom istraživanju rekurentni omjer rizika, omjer prevalencije u srodnika prvog koljena i prevalencije u općoj populaciji, za psorijatični artritis je iznosio 30:4, što upućuje na jaku nasljednu komponentu (15).

Da je psorijaza kompleksna bolest s višestrukim utjecajem gena, dodatno je pokrepljeno otkrićem više od 20 lokusa kandidata putem analize povezanosti te odnedavno i korištenjem cijelogenomske asocijacijske studije (engl. *Genome-Wide Association Studies*; GWAS). Ova saznanja doprinijela su boljem razumijevanju genetskih temelja psorijaze i mogućnostima personaliziranog liječenja (22, 23).

Genetski čimbenici uključuju gene unutar HLA-regije, koji se odnose na prezentaciju antigena i imunološki odgovor. Osim HLA gena, postoji nekoliko ne-HLA gena koji također utječu na imunološku reakciju i upalu, kao što je IL-23R gen (21).

Geni kompleksa tkivne podudarnosti imaju glavnu ulogu u genetici psorijatičnog artritisa. Genske povezanosti kod psorijatičnog artritisa uključuju: HLA-B\*08:01, HLA-B\*27:05, HLA-B\*38:01, HLA-B\*39:01, HLA-B\*44:02, HLA-B\*57:01, HLA-B\*06:02 (17). Fenotip PsA povezan je s prisutnošću određenih alela pa je tako HLA-B\*08:01 alel asocijacija za periferni artritis, asimetrični sarkoiliti i oštećenje zglobova. Geni HLA-B\*38 i HLA-B\*39 su povezani s razvojem poliartritisa, a HLA-B27 sa zahvaćenom kralježnicom. Aksijalni oblik PsA obuhvaća bolesnike koji su pozitivni na HLA-B27 te su slični klinički ankilozantnom spondilitisu s ranijom početnom dobi i intezivnijim bolovima u leđima. Za razliku od njih, bolesnici koji su negativni na HLA-B27 pokazuju drugačije kliničke karakteristike. Kod tih bolesnika, bolest se javlja u kasnijoj životnoj dobi, bolovi u leđima su manji te je češća bolest vratne kralježnice (23).

Populacijske studije pokazuju da antigeni klase I (HLA-B13, HLA-B39, HLA-B57, HLA-Cw6, HLA-Cw7) pokazuju povezanost s psorijazom i PsA, pri čemu je najveća povezanost bila s HLA-Cw6. Teško je bilo otkriti da li je sami gen HLA-Cw6 povezan s psorijatičnim artritismom jer to primarni marker psorijaze, a većina pacijenata s PsA ima kožnu psorijazu. U studiji koju su proveli Gladman i suradnici, HLA-Cw\*0602 alel je bio povećan među PsA pacijentima te je bio faktor ranije dobi početka artritisa (24). Unatoč tome, još uvijek nije jasno jesu li ovi nalazi povezani s prisutnošću psorijaze kod pacijenata s psorijatičnim artritismom ili predstavljaju stvarnu povezanost s artritismom.

HLA antigeni prepoznati su kao prognostički čimbenici u bolesnika s psorijatičnim artritismom. HLA-B39 sam, HLA-B27 u prisutnosti HLA-DR7 i HLA-DQw3 u odsutnosti HLA-DR7, svaki je donio povećan rizik za progresiju bolesti (25). Iz genomskih studija zaključeno je da su za nastanak bolesti odgovorni ne samo jedan, pojedinačan antigen,

već kombinacija više antigena sustava HLA. Također je utvrđeno da gen HLA-B22 štiti od napredovanja bolesti (26).

Gen za promotor TNF $\alpha$ , koji se nalazi na istom kromosomu kao i gen HLA-B, ima važnu ulogu u razvoju psorijatičnog artritisa. Povišene razine TNF $\alpha$  pronađene su u serumu i sinovijalnoj tekućini pacijenata, što ukazuje na njegovu ulogu u bolesti. Osim toga, pacijenti dobro reagiraju na liječenje TNF $\alpha$  blokatorima, što potvrđuje njegov značaj. Meta-analiza potvrdila je polimorfizam gena TNF $\alpha$ , posebno prisutnost adenina na poziciji -238 ovog gena povećava rizik za razvoj PsA, pa se taj polimorfizam smatra faktorom rizika za razvoj bolesti (22).

Geni koji nisu preko HLA sustava povezani s PsA uključuju IL-23R. Ovi geni proizvode proteine uključene u imunološki posredovanu upalu (22).

#### 1.6.4.2. Okolišni i drugi čimbenici rizika

PsA je složena bolest uzrokovana genetskim faktorima i pod utjecajem okolišnih čimbenika. Iako genetski čimbenici igraju važnu ulogu u određivanju PsA, oni ne objašnjavaju sve uzroke ove bolesti. Predložen je model koji sugerira da pacijenti s psorijazom koji nose gene osjetljivosti na artritis mogu razviti PsA nakon što su bili izloženi okolišnim čimbenicima. Okidači iz okoline uključuju fizičku i emocionalnu traumu, infekciju i hormonalne promjene. Prema istraživanjima, fizička trauma, cijepljenje protiv rubeole, oralne ulceracije, promjena prebivališta, infekcije koje zahtijevaju antibiotike, ozljede te zanimanja koja uključuju nošenje teškog tereta mogu biti povezani s pojavom psorijatičnog artritisa (20).

Novija istraživanja također ističu utjecaj mikrobioma crijeva i upale crijeva na razvoj ove bolesti. Interakcija između imunološkog sustava i mikrobioma regulira mnoge imunološke procese. Disbioza mijenja propusnost barijere, aktivira imunološki sustav i izlučuje upalne citokine, destabilizirajući spojeve između epitelnih stanica. Time se povećava propusnost crijevne ili kožne barijere, omogućujući mikrobima da prođu u tkiva. Obična kožna bakterija *Corynebacterium* obilnija je kod pacijenata s PsA u odnosu na pacijente s psorijazom, što bi moglo biti korisno kao biomarker za prognozu bolesti. Ovi nalazi sugeriraju da, iako mikrobiomi kože kod psorijaze i PsA dijele sličnosti, postoji



i razlika u ključnim vrstama bakterija koje bi mogle poslužiti kao dijagnostički biomarkeri, posebno kod pacijenata s psorijazom kod koji postoji rizik od razvoja PsA (20).

Studija je pokazala da su pacijenti s PsA skloniji pretilosti u usporedbi s pacijentima s reumatoidnim artritisom, psorijazom i općom populacijom. Masno tkivo djeluje kao aktivni endokrini organ, izlučujući proupalne citokine i adipokine. Biomehanički stres uzrokovan prekomjernim opterećenjem pretilošću može potaknuti lokalnu upalu na mjestima gdje se tetive i ligamenti pričvršćuju na kosti. Stoga, smanjenje tjelesne težine može biti potencijalna strategija za smanjenje rizika razvoja bolesti (20).

Pušenje je pozitivno povezano s rizikom od PsA u općoj populaciji, iako su neke studije istaknule mogući paradoksalan učinak pušenja u bolesnika s psorijazom (19).

#### **1.6.5. Patogeneza**

Psorijatični artritis karakterizira kronična upala koja može rezultirati erozijom kostiju i gubitkom koštane mase, ali isto tako može potaknuti stvaranje novih kostiju oko zahvaćenih zglobova. Otkriven je povećani broj osteoklasta u sinoviji kod PsA, sličan onom u reumatoidnom artritisu (RA). Ovaj upalni sinovitis može uzrokovati progresivno oštećenje zglobova, uključujući eroziju zglobne hrskavice, što je vidljivo kao radiološko oštećenje u gotovo polovici pacijenata. Entezitis, upala mjesta vezanja tetiva na kosti, također je važan, a doprinose mu T-stanice koje proizvode IL-17, stanice entezala koje izražavaju IL-23R, kao i faktori poput biomehaničkog stresa, HLA-B27 i specifični mikrobiom (27).

Trenutna paradigma u vezi s PsA ističe ulogu limfocita, posebice CD8<sup>+</sup> T stanica, kao ključnih igrača u razumijevanju patogeneze bolesti. CD8<sup>+</sup> T stanice mogu prepoznati peptide iz proteina koji se nalaze na stanicama u vezivnim tkivima. Ovi peptidi predstavljeni su na površini stanice preko MHC molekula. Jednom aktivirane, CD8<sup>+</sup> T stanice se diferenciraju u memorijske stanice koje imaju sposobnost oštećenja ciljnih stanica i oslobađanja citokina kao što je interferon- $\gamma$ . To može dovesti do promjena u ekspresiji gena susjednih stanica i aktivacije makrofaga kao i vaskularnog endotela, što igra ključnu ulogu u patogenezi (21, 27).

Patogeneza PsA započinje aktiviranjem stanica urođenog imunološkog sustava, tj. stanica prirodnih ubojica (engl. *Natural Killer*; NK), polimorfonuklearnih neutrofila (PMN) i monocita/makrofaga nakon čega se aktiviraju stanice stečenog imuniteta, tj. CD8+ T stanice i CD4+ Th17 što će sigurno pojačati upalni odgovor u zglobovima. Dendritične stanice i makrofagi prezentiraju antigene kroz glavni sustav tkivne histokompatibilnosti T stanicama, uglavnom CD8+ putem Toll-receptora tipa 2 čime se pokreće urođeni i adaptivni imunološki odgovor. IL-12 i IFN $\alpha$  stimuliraju Th1 odgovor, koji oslobađa TNF $\alpha$  i IFN- $\gamma$  dok IL-23, TGF $\beta$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  aktiviraju odgovor Th17 u prisutnosti IL23 što dovodi do otpuštanja IL17 (uglavnom izoforme A), IL22, IL26 i CCL20 (19). Nakon pokretanja imunološkog procesa, pokreću se dvije glavne značajke psorijatičnog artritisa: infiltrat upalnih T stanica i pomoćničkih stanica u entezama i sinoviju, te odgovor sinovijalnog i entezealnog tkiva (20).

#### **1.6.6. Klinička slika**

PsA je klinički heterogeni poremećaj. Pet podtipova psorijatičnog artritisa prvobitno su definirali Moll i Wright: mono- ili oligoartritis, poliartritis, dominantna bolest distalnog interfalangealnog (DIP) zgloba, psorijatični spondilitis i/ili sakroilitis i artritis mutilans. Moll i Wright su u svojoj ključnoj studiji utvrdili da većina pacijenata s PsA ima oligoartritis. S duljim trajanjem PsA, pacijenti obično razvijaju poliartikularni obrazac (18)

Distalni interfalangealni artritis, iako klasičan oblik PsA, javlja se u samo oko 5% slučajeva. Može se pojaviti samostalno ili zajedno s drugim podtipovima. Ovaj oblik artritisa može zahvatiti mnoge ili samo nekoliko zglobova, te može biti asimetričan i simetričan. Često su prisutne psorijatične promjene na noktima u blizini zahvaćenih zglobova (18, 23).

Artritis mutilans javlja se do samo 5% slučajeva, ali je značajan zbog svoje ozbiljnosti. Karakteriziran je osteolizom, što dovodi do razaranja kostiju falangi, metatarzala i metakarpala (18, 23).

Simetrični poliartritis nalikuje reumatoidnom artritisu jer uzrokuje upalu u metakarpalnim proksimalnim interfalangealnim zglobovima. Ipak, nekoliko

karakteristika ga razlikuje od RA uključujući blaži tijek bolesti, rijetke potkožne čvoriće i negativnost pacijenata na reumatoidni faktor (23).

Oligoartritis je najzastupljeniji tip PsA i čini više od polovice slučajeva. U ovom obliku zapaža se nejednaka upala manje od četiri zglobova, pri čemu može biti zahvaćen bilo koji zglob. Prvi znak ovog artritisa može biti upala jednog koljena (18, 23).

Spondilitis i/ili sakroiliitis su oblici bolesti koji podsjećaju na ankilozantni spondilitis, iako se smatraju odvojenim stanjima. Manje je vjerojatno da će biti prisutan human leukocitni antigen HLA-B27, a bolest je općenito manje teška nego kod ankilozantnog spondilitisa. Najčešće je zahvaćen lumbalni dio kralježnice (23).

Psorijatični artritis obično se javlja u četrdesetim godinama života, ali može nastupiti u bilo kojoj dobi. Prvi simptomi uključuju bol i ukočenost zahvaćenih zglobova. Polovina pacijenata osjeća jutarnju ukočenost koja traje najmanje pola sata te se fizičkom aktivnošću smanjuje. Pacijenti mogu također imati opće simptome poput umora, blago povišene tjelesne temperature i gubitka na težini. Psorijatični artritis često uzrokuje destruktivne promjene na zglobovima, što s vremenom može dovesti do deformacija zglobova te kronične funkcionalne nesposobnosti (27).

Kliničke značajke su periferni artritis, aksijalna bolest, entezitis, daktilitis i zahvaćenost kože i noktiju (Slika 10.). Pacijenti s PsA također imaju povećane čimbenike rizika za kardiovaskularne bolesti, poput inzulinske rezistencije, dislipidemije i hipertenzije. Također je utvrđeno da je metabolički sindrom češći kod osoba s psorijazom, posebno kod onih s umjerenim do teškim oblicima kožne bolesti (18).



**Slika 10.** Domene bolesti u PsA

(Izvor: Ogdie A, Weiss P. The Epidemiology Psoriatic Arthritis. Rheum Dis Clin North Am. studeni 2015)

Psorijatični spondilitis, poznat kao i aksijalna spondiloartropatija, javlja se kod 7-32% pacijenata s PsA. Može biti asimptomatski, a faktori poput distrofije noktiju, broja radiografski oštećenih zglobova i periostitisa povećavaju rizik od razvoja aksijalne spondiloartropatije tijekom vremena. Kod pacijenata s psorijatičnim spondilitisom, mlađa dob početka bolesti povezana je s pozitivnošću na HLA-B27, obiteljskom poviješću SpA i entezitisom (17).

Ključna manifestacija PsA je entezitis. Važnost entezitisa u PsA je potvrđena uključivanjem ove kliničke manifestacije u temeljne zahtjeve Klasifikacijskih kriterija za psorijatični artritis (CASPAR) (27). Enteze se obično nalaze izvan zglobova i zahvaćaju periostalnu površinu kosti. Područje iznad zahvaćenih enteza je bolno i osjetljivo, dok otekline može, ali i ne mora biti prisutna, što otežava kliničko prepoznavanje. Najčešće zahvaćene lokacije su hvatišta Ahilove tetive, no mogu biti zahvaćena i druga mjesta poput ramena, epikondila humerusa, kralježnice, kondila femura, zdjelice i koljena. Ključni događaji u razvoju entezitisa su aktivacija proupalnih medijatora poput IL-17 i TNF  $\alpha$ . Nadalje, uz oslabljenu funkciju i bol, glavne strukturne posljedice kroničnog entezitisa su stvaranje nove kosti, što dovodi do koštanih izbočina u aksijalnim i perifernim strukturama (28).

Daktilitis je česta pojava kod PsA, prisutna kod oko 40% pacijenata tijekom tijeka bolesti, a može se javiti na šakama ili stopalima, a klinički se prezentira bolnom, kobasičastom oteklinom i crvenilom cijelog prsta („kobasičasti prsti“) i smanjenom pokretljivošću. To je difuzna upala prstiju te izvanzglobna manifestacija PsA. Daktilitis češće zahvaća nožne prste nego prste na rukama i to uglavnom drugi prst (Slika 11.) (17, 27).



**Slika 11.** Daktilitis

(Izvor: Malik F, Haberman R, Scher JU. Psoriatic Arthritis. U: Efthimiou P, urednik. Absolute Rheumatology Review Cham: Springer International Publishing; 2020)

Kožne lezije tipične su psorijatične promjene koje su u većini slučajeva prisutne prije pojave artritisa. Najčešći tip je vulgarna psorijaza (*psoriasis vulgaris*) koja se javlja u 90% slučajeva i manifestira se kao ovalne eritematozne papule ili plakovi prekriveni srebrnastim ljuskama, najčešće laktovima, vlasištu, koljenima, lumbosakralnom području i oko pupka (17)

Bolesti noktiju, kao što su udubljenje i oniholiza (odvajanje pločice nokta od podloge), povezane su s upalom na entezi i često su povezane sa zahvaćenošću distalnih interfalangealnih zglobova (DIP) (Slika 12) (17).



**Slika 12.** Psorijaza noktiju

(Izvor: Malik F, Haberman R, Scher JU. Psoriatic Arthritis. U: Efthimiou P, urednik. Absolute Rheumatology Review Cham: Springer International Publishing; 2020)

### **1.6.7. Liječenje**

Liječenje psorijatičnog artritisa temelji se na proširenosti bolesti. Glavno načelo je da rano liječenje dovodi do poboljšanih ishoda. Odgode liječenja od samo šest mjeseci mogu dovesti do povećanog radiološkog i kliničkog oštećenja. Liječenje psorijatičnog artritisa uključuje liječenje kože i zglobova te često zahtijeva tim stručnjaka poput reumatologa i dermatologa. Terapija je prilagođena svakom pacijentu, kombinirajući farmakološke i nefarmakološke metode. U uznapredovalim stadijima može biti potrebna kirurška intervencija, poput ugradnje endoproteza. Ciljevi liječenja su smanjenje upale, povećanje pokretljivosti i ublažavanje simptoma (17, 27).

Nove preporuke za liječenje PsA ažurirane od strane Europske lige protiv reumatizma (EULAR) i Grupe za istraživanje i procjenu psorijaze i psorijatičnog artritisa predlažu sličan pristup terapiji. Započinje se jednostavnim terapijama poput nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID), zatim prelazi na lijekove koji modificiraju bolest (DMARD), a završava s biološkim lijekovima ako prethodni tretmani nisu bili učinkoviti (14, 27).

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog završnog rada bio je odrediti zastupljenost pojedinih alela sustava HLA te izdvojiti varijante alela sustava HLA sa najvećom učestalosti kod ispitanika sa psorijatičnim artritismom. Pacijenti sa sumnjom na psorijatični artritis upućeni su od strane liječnika specijalista, najčešće reumatologa, u Laboratorij za tipizaciju tkiva KBC Split kako bi se napravila HLA tipizacija.

Osim utvrđivanja učestalosti i povezanosti alela sustava HLA sa psorijatičnim artritismom, u radu je bio cilj prikazati i raspodjelu bolesti prema spolu i dobi.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. DIZAJN STUDIJE I ISPITANICI**

Ovo istraživanje uključilo je 105 pacijenata s dijagnozom psorijatičnog artritisa na području Splitsko-dalmatinske županije. Svi ispitanici su pacijenti čija je tipizacija napravljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split, u razdoblju od 2020. do 2024. Uključeni su svi pacijenti upućeni od strane liječnika reumatologa ili dermatologa s uputnom dijagnozom za PsA. Iz istraživanja su isključeni pacijenti poslani od strane reumatologa s dijagnozom reumatoidnog artritisa i ankilozantnog spondilitisa s obzirom na učestalost nekih od alela koji nisu povezani sa PsA.

#### **3.2. MATERIJALI I METODE KOJIMA SE ODREĐUJU GENI I ALELI HLA SUSTAVA**

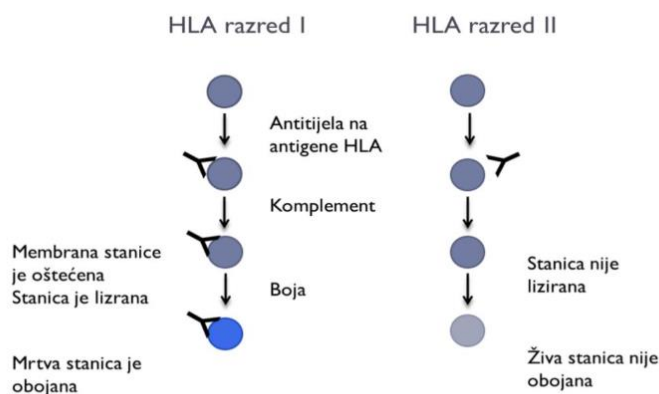
##### **3.2.1. Serološko određivanje**

Drugi naziv za serološki test je test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. *Microlymphocitotoxicity Test*; MLCT). Serološko testiranje temelji se na reakciji poznatih protutijela s antigenima na limfocitima pacijenta. Cilj testiranja je odrediti antigene HLA sustava razreda I i II. U analizi se upotrebljavaju poznata protutijela bilo monoklonska ili poliklonska. Monoklonska protutijela proizvode se imunizacijom miševa dok se za poliklonska koristi serum aloimuniziranih višerotkinja (4).

Pacijentovom serumu koji sadrži nepoznate antigene dodaju se poznata protutijela. Ukoliko su antigen i protutijelo komplementarni, stvara se kompleks antigena i protutijela dok se kod nekomplementarnih antigena i protutijela kompleks ne stvara. Nastajanje kompleksa antigen-protutijelo smatra se pozitivnom reakcijom. Da bi se reakcija mogla vizualizirati i kvantificirati, potrebno je označiti protutijela dodavanjem antihumanog komplementa. Komplement se veže na protutijelo te oštećuje membranu stanice



uzrokujući lizu stanice i prodor boje u stanicu što je vidljivo pod mikroskopom i smatra se pozitivnim rezultatom. Ukoliko nije došlo do obojenja reakcija je negativna (Slika 13.) (4).



**Slika 93.** Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti

(Izvor: Crnić-Martinović M. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka, Rijeka, 2005.)

Za izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti potrebno je odvojiti limfocite iz uzorka pune krvi s heparinom kao antikoagulansom. Separacija limfocita iz pune krvi započinje razrjeđivanjem pune krvi fiziološkom otopinom u omjeru 1:1 te dodavanjem Lymphoprep-a u omjeru 1:1 u odnosu na količinu krvi. Nakon centrifugiranja, prsten limfocita se izdvoji u novu staklenu epruvetu te se do vrha napuni fiziološkom otopinom. Ponovnim centrifugiranjem stvori se supernatant koji se odlije te se epruveta s talogom limfocita ponovo napuni fiziološkom otopinom. Nakon treće vrtnje u centrifugi, u talogu na dnu epruvete nalaze se pročišćene stanice (limfociti) koje se mogu zamrznuti na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do izvođenja testa MLCT. U slučaju da se odmah po separaciji nastavlja izvoditi test mikrolimfocitotoksičnosti, nastavlja se s podešavanjem koncentracije limfocita (4).

Koncentracija se podešava uz pomoć Burker- Turk-ove komorice. Preparat se pripremi u omjeru  $5\text{ }\mu\text{l}$  suspenzije limfocita naprema  $5\text{ }\mu\text{l}$  boje (tripansko modrilo). Zatim se preparat stavlja pod mikroskop i brojanjem obojenih stanica se određuje koncentracija. Neophodno je imati 5 do 6 obojenih stanica po kvadratiću ili 10 do 12 neobojenih stanica po kvadratiću za određivanje tipizacije antigena HLA. Koncentracija limfocita može se podešavati razrjeđivanjem ili ponovljenim centrifugiranjem, ukoliko je potrebno.

Pomoću Hamilton šprice uzorak se stavlja uzorak sa pravilno podešenom koncentracijom limfocita se stavlja na Terasakijeve pločice s poznatim protutijelima za određeni razred HLA. Nakon inkubacije od 30 minuta dodaje se komplement nakon čega slijedi jednosatna inkubacija. Poslije inkubacije, Terasakijev pločice potrebno je dobro istresti kako bi se uklonio višak komplementa te dodati tripansko modrilo (4).

Nakon inkubacije limfocita pacijenta sa serumima, komplementom i bojanja tripanskim modrilom, rezultati testa očitavaju se na svjetlosnom mikroskopu. Reakcija na svakoj jažici ocjenjuje se brojevima od jedan do osam ovisno o postotku mrtvih stanica u vidnom polju (Tablica 4.) (4).

**Tablica 4.** Interpretacija rezultata testa MLCT

Postotak mrtvih stanica	Rezultat	Interpretacija
0-10	0	negativno
11-20	2	pozitivno/negativno (+)
21-50	4	slabo pozitivno (++)
51-80	6	pozitivno (+++)
81-100	8	jako pozitivno (++++)

Svaka jažica na tipizacijskoj pločici sadrži serum sa specifičnim antitijelima. Ukoliko pacijentovi limfociti sadrže HLA antigen koji odgovara antitijelu u serumu, dolazi do citotoksične reakcije i prodiranja boje u stanicu. Svaka tipizacijska pločica, na pozicijama 1A i 1B sadrži pozitivnu odnosno negativnu kontrolu.

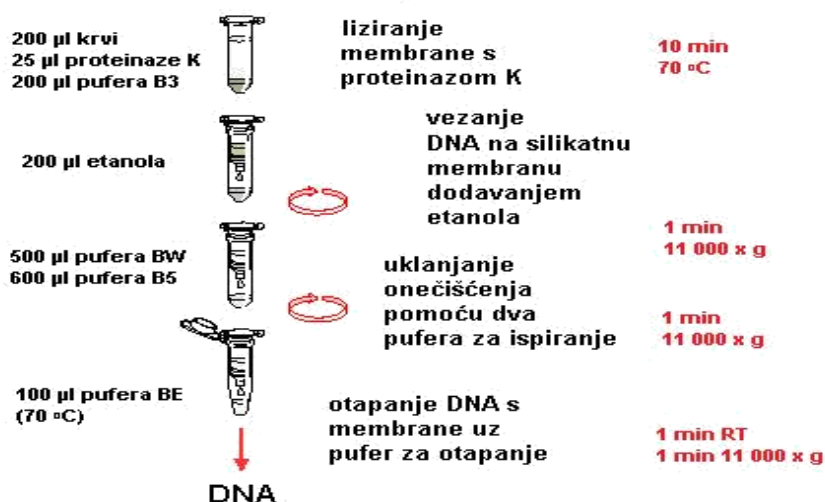
### 3.2.2. Molekularne metode određivanja alela lokusa sustava HLA

U rutinskoj upotrebi za tipizaciju tkiva u dijagnostici autoimunih bolesti koriste se dvije metode molekularnog određivanja alela HLA sustava: PCR-SSO (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*) i PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*) metoda.

U oba testa, početni materijal je izolirana DNA iz uzorka periferne krvi pacijenta.

#### 3.2.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA iz uzorka periferne krvi

Izolacija DNA iz EDTA uzorka periferne krvi u rutinskom radu u laboratoriju koristi se komercijalnim setovima s kolumnama sa silikatnom membranom, koja specifično veže DNA (Slika 14.). Postupak započinje lizom stanica uz dodatak pufera i proteinaze K. Dodavanjem etanola, DNA se veže za membranu kolumne specifično dizajnirane za zadržavanje molekule DNA a propuštanje ostataka liziranih stanica (lipida, proteina ...). Nakon višestrukog niza ispiranja kolonice, nečistoće se uklanjaju, a čista DNA se eluira pomoću elucijskog pufera. Kvaliteta DNA ovisi o specifikacijama seta i može se prilagoditi za molekularne analize, poput HLA tipizacije (4).



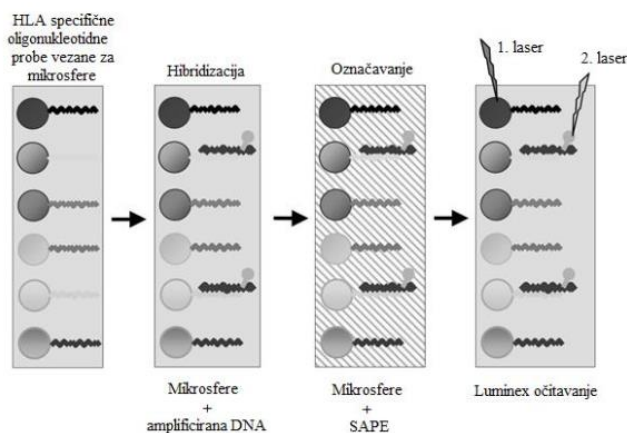
Slika 14. Izolacija DNA iz EDTA uzorka

(Izvor: Crnić-Martinović M. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka, Rijeka, 2005.)

### 3.2.2.2. PCR-SSO (engl. *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*)

Metoda se temelji na principu vezanja amplificiranog DNA produkta HLA lokusa koji promatramo za mikrosfere obložene specifičnim oligonukleotidnim probama. Mikrosfere, obojane crvenom i infracrvenom bojom, omogućuju detekciju specifičnim HLA lokusa (4).

Uređaj Luminex (Luminex® 100/200TM sistem) koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju fluorescentno obilježenih specifičnih mikrosfera nakon hibridizacije sa umnoženim odsječcima DNA. Luminex identificira svaku mikrosferu koristeći dva lasera - jedan laser identificira mikrosferu i vezanu probu, dok drugi mjeri količinu vezane probe, odnosno razinu fluorescencije te na temelju prekoračenja cut-off vrijednosti za svaku probu proglašava ju pozitivnom ili negativnom. Ukupan zbir rezultata za sve korištene probe analizira se dodatnom softvrware paketu za analizu (4).



**Slika 15.** Princip izvođenja PCR-SSO metode

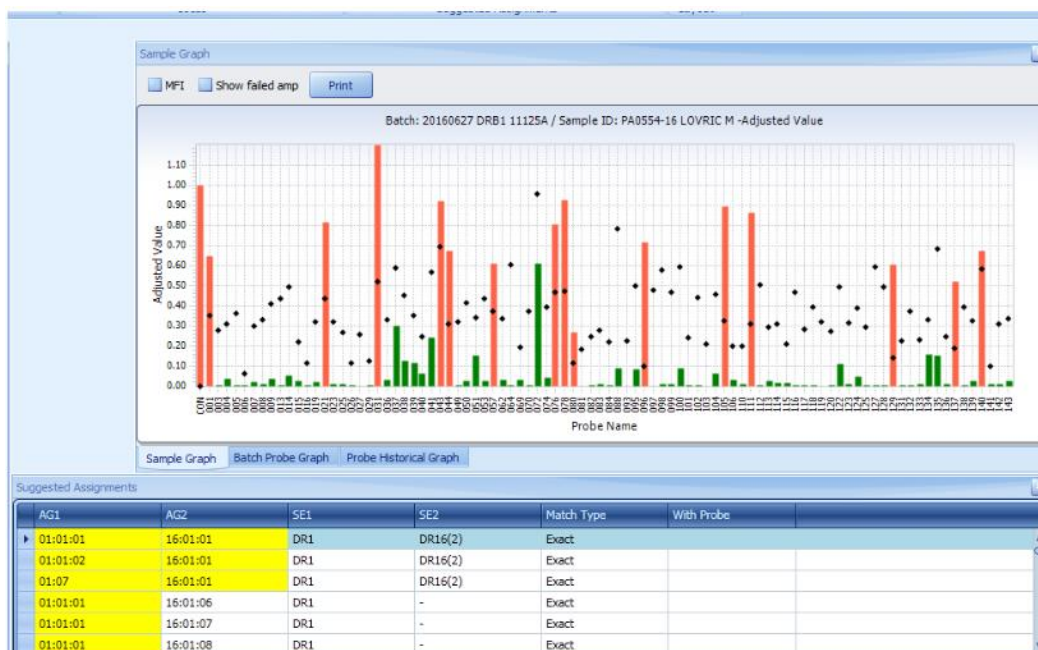
(Izvor: <https://www.omixon.com/wp-content/uploads/2016/07/Luminex.png>)

Iz izolirane cjelokupne genomske DNA potrebno je umnožiti odsječak od interesa. Za to se upotrebljava PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) Metoda PCR-SSO temelji se na umnažanju egzona 2 i 3 za određivanje HLA razreda I, odnosno egzona 2 za određivanje HLA razreda II. Za uspješnost amplifikacije potrebno je napraviti reakcijsku

mješavinu za HLA ispitivani lokus. Reakcijska mješavina sadrži reakcijski pufer odnosno Master Mix (6  $\mu$ L) u kojem se nalaze oligonukleotidne početnice (engl. *Primer* ), Taq polimerazu ( 0,2  $\mu$ L) te destiliranu vodu ( 8,8  $\mu$ L). U PCR tubice koje sadrže reakcijsku mješavinu dodaje se po 5  $\mu$ L DNA pacijenta te se tubice stavljaju u „Thermocycler“ gdje se događa amplifikacija DNA. Program se uobičajeno ponavlja 30 puta. Rezultat PCR-a je dobitak 68 milijuna kopija DNA. Taq polimeraza prepoznaje dijelove DNA na koje su vezane početnice te ih umnaža (4).

Nakon PCR reakcije slijedi hibridizacija. U svaku jažicu Coster pločica stavlja se 5  $\mu$ L PCR produkta i 15  $\mu$ L suspenzije mikrosfera s fluorescentnim probama. Tijekom 20-minutne hibridizacije, PCR produkt se veže za specifične oligonukleotidne probe na mikrosferama. Dio boje veže se za biotin koji je prisutan na početnicama, dok se drugi dio boje veže za nastali kompleks ukoliko je došlo do formiranja istoga. Nakon hibridizacije, uzorak se stavlja u Luminex uređaj, gdje se analiziraju rezultati (4).

Luminex aparat sposoban je razlikovati kombinaciju proba s pozitivnom signalom te kvantificirati relativnu količinu ampfikata koji je hibridiziran. Pomoću programa Match It analiziraju se rezultati (Slika 16.). Program sadrži bazu poznatih gena i antigena sustava HLA koje uspoređuje s dobivenim rezultatima.



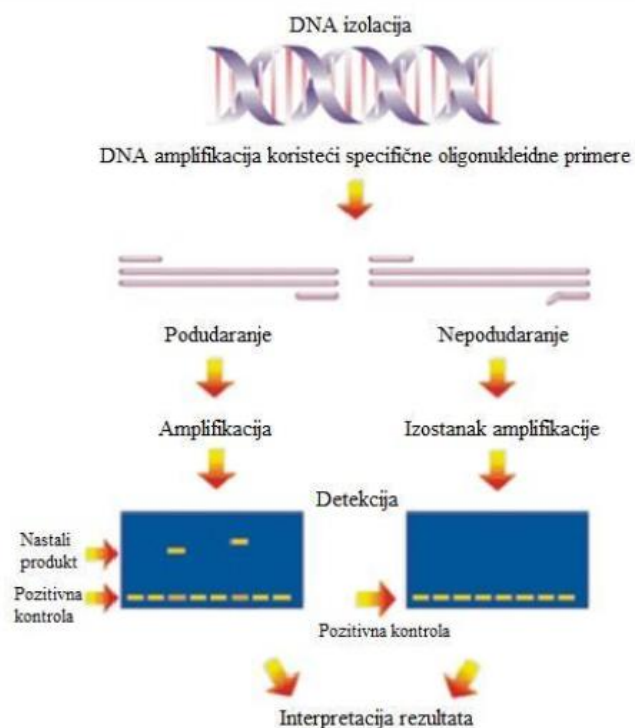
**Slika 16.** Prikaz analize rezultata u Match It programu

(Izvor: Crnić-Martinović M. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka, Rijeka, 2005.)

### 3.2.2.3. PCR-SSP (engl. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer)

PCR-SSP metoda koristi se za određivanje HLA gena visoke rezolucije (četiri znamenke). Ako specifične početnice odgovaraju slijedu nukleotida ispitivane DNA, dolazi do umnožavanja; inače, rezultat je negativan (Slika 17.).

Umnoženi fragmenti odvajaju se elektroforezom na agaroznom gelu u boji. Rezultati se dokumentiraju fotografijom u tamnoj komori. Reakcija se ocjenjuje kao negativna ili pozitivna, ovisno o veličini PCR produkata, a rezultati se analiziraju u za to predviđenim programima.



Slika 17. Prikaz PCR-SSP metode

(Izvor: <http://www.topdiag.com/top/0,27,tipizare-hla-ssp.html?sLang=en> )

Za PCR-SSP metodu reakcijska smjesa se priprema korištenjem Master Mix-a koji sadrži Taq polimerazu i denaturiranu vodu, zajedno s uzorkom izolirane DNA. Zatim se 10 µl smjese pipetira u jažice koje sadrže dehidriranu otopinu početnica. Olerup SSP® pločica se stavlja u „Thermocycler“ (OLERUP program) gdje se amplificira DNA.

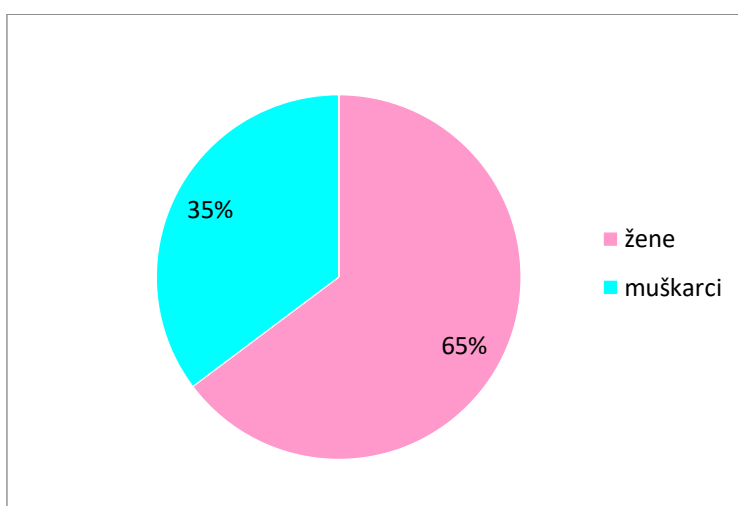
Nakon amplifikacije, dobiveni produkt se postavlja na gel elektroforezu zajedno s bojom (Et-Br, Simply Safe). Nakon 15 minuta elektroforeze, rezultat se vizualizira pomoću UV svjetla. U testu se koristi i negativna kontrola kako bi se provjerila kvaliteta rezultata. Rezultati se tumače na temelju pojave ili izostanka produkta na gelu (4).

### **3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Učestalost alela lokusa HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-DRB1 sustava HLA utvrđena je izravnim brojanjem. Za usporedbu rezultata između ispitivane skupine, odnosno pacijenata sa psorijatičnim artritisom i kontrolne skupine, odnosno zdravih ispitanika; korištena je 2x2 tablica. Test koji se koristi za ispitivanje značaja povezanosti između dvije skupine ispitanika je Fisher-ov egzaktni test. Fisher-ov egzaktni test određuje P vrijednost koja predstavlja statističku značajnost podataka. Test statistički značajan rezultat smatra svaki kojemu je P vrijednost  $<0,05$ . Za obradu podataka korišten je on-line web alat VassarStats (<http://vassarstats.net/>).

## 4. REZULTATI

Od 105 pacijenata koji su u Laboratorij za tipizaciju tkiva, KBC Split poslani od strane reumatologa s dijagnozom psorijatičnog artritisa, ispitano je 68 žena (64,76%) i 37 muškaraca (35.24%) (Slika 18.).

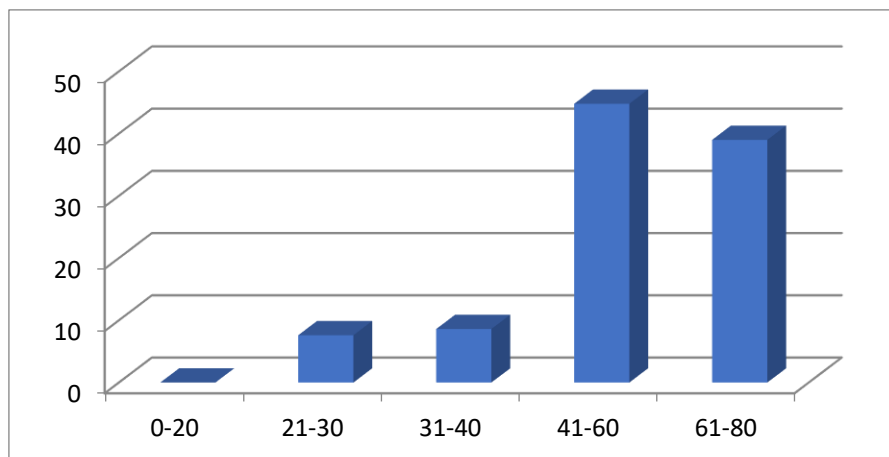


**Slika 18.** Grafički prikaz odnosa spolova ispitanika sa PsA

Podjela prema dobnim skupinama pokazala je da najčešće obolijevaju ljudi srednje životne dobi, odnosno pacijenti između 40 i 60 godina (44,8%) (Slika 19.).

Prosjek dobi kod ženskih ispitanika je 53.97, dok je kod muškaraca nešto veći (57 godina).





**Slika 19.** Zastupljenost ispitanika sa PsA prema dobi

Analizom alela lokusa HLA-A kod pacijenata sa psorijatičnim artritismom pronađeno je 13 različitih alela. Od toga su najzastupljeniji alel HLA-A\*01 (12.86%), HLA-A\*02 (39.52%) i HLA-A\*03 (10%). Usporedba učestalosti pojedinih alela između skupine bolesnika sa psorijatičnim artritismom i kontrolne skupine zdrave populacije pokazala je učestalost alela HLA-A\*32 (7.14% vs 3%;  $p=0,0453$ ) i HLA-A\*02 (39.52% vs 24.5%;  $p=0.0008$ ) značajno veća u pacijenata, dok su HLA-A\*11 (3.81%) i HLA-A\*24 (6.67%) značajno manje zastupljeni (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Zastupljenost alela lokusa HLA-A u pacijenata sa PsA

HLA-A lokus	Broj alela kod ispitanika (N=105)	%	Broj alela kod kontrolne skupine (N=100)	%	p vrijednost
<b>*01</b>	27	12.86%	19	9.5%	0.1789
<b>*02</b>	83	39.52%	49	24.5%	<b>0.0008*</b>
<b>*03</b>	21	10%	27	13.5%	0.1715
<b>*11</b>	8	3.81%	20	10%	<b>0.0105*</b>
<b>*23</b>	7	3.33%	3	1.5%	0.1986
<b>*24</b>	14	6.67%	34	17%	<b>0.0009*</b>
<b>*25</b>	3	1.43%	4	2%	0.4731
<b>*26</b>	11	5.24%	12	6%	0.4516
<b>*30</b>	3	1.43%	4	2%	0.4731
<b>*31</b>	4	1.9%	4	2%	0.6109
<b>*32</b>	15	7.14%	6	3%	<b>0.0453*</b>
<b>*33</b>	3	1.43%	7	3.5%	0.1496
<b>*68</b>	11	5.24%	11	5.5%	0.5397
<b>UKUPNO</b>	<b>210</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>	

\*statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine ispitanika,  $p < 0.05$

Analiza alela lokusa HLA-B pokazala je 22 različita alela. Aleli HLA-B\*08 (10%), HLA-B\*35 (14.29%) i HLA-B\*51 (9.52%) pokazali su se kao najčešći aleli u skupini ispitanika. Usporedbom s kontrolnom skupinom, uočeno je da aleli HLA-B\*08 (10% vs 4%;  $p=0.0138$ ), HLA-B\*13 (6.19% vs 0.5%;  $p=0.0008$ ) i HLA-B\*57 (6.19% vs 2%;  $p=0.0282$ ) pokazuju statistički značajnu učestalost kod pacijenata sa psorijatičnim artritisom (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Zastupljenost alela lokusa HLA-B u pacijenata sa PsA

HLA-B lokus	Broj alela kod ispitanika (N=105)	%	Broj alela kod kontrolne skupine (N=100)	%	p vrijednost
<b>*07</b>	13	6.19%	16	8%	0.3010
<b>*08</b>	21	10%	8	4%	<b>0.0138*</b>
<b>*13</b>	13	6.19%	1	0.5%	<b>0.0008*</b>
<b>*14</b>	3	1.43%	6	3%	0.2280
<b>*15</b>	7	3.33%	6	3%	0.5363
<b>*18</b>	11	5.24%	14	7%	0.2951
<b>*27</b>	9	4.29%	13	6.5%	0.2192
<b>*35</b>	30	14.29%	34	17%	0.2673
<b>*37</b>	4	1.90%	1	0.5%	0.2016
<b>*38</b>	14	6.67%	11	5.5%	0.3879
<b>*39</b>	11	5.24%	11	5.5%	0.5397
<b>*40</b>	7	3.33%	5	2.5%	0.4193
<b>*41</b>	3	1.43%	2	1%	0.5230
<b>*44</b>	9	4.29%	14	7%	0.1638
<b>*45</b>	0	0%	2	1%	0.2373
<b>*47</b>	1	0.48%	1	0.5%	0.7383
<b>*48</b>	0	0%	2	1%	0.2373
<b>*49</b>	4	1.90%	7	3.5%	0.2446
<b>*50</b>	3	1.43%	1	0.5%	0.3301
<b>*51</b>	20	9.52%	26	13%	0.1690
<b>*52</b>	7	3.33%	4	2%	0.3000
<b>*53</b>	2	0.95%	0	0%	0.2617
<b>*55</b>	0	0%	1	0.5%	0.4878
<b>*56</b>	5	2.38%	7	3.5%	0.3525
<b>*57</b>	13	6.19%	4	2%	<b>0.0282*</b>
<b>*58</b>	0	0%	3	1.5%	0.1152
<b>UKUPNO</b>	<b>210</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>	

\*statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine ispitanika,  $p < 0.05$

Određivanjem alela lokusa HLA-C kod pacijenata uočeno je 15 različitih alela od kojih su najzastupljeniji HLA-C\*06 (25.24%), HLA-C\*07 (14.29%) i HLA-C\*12 (16.19%). Usporedbom s kontrolnom skupinom uočen je povećan broj alela HLA-C\*06 (25.24%) te smanjen broj alela HLA-C\*07 (14.29%) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7.).

**Tablica 7.** Zastupljenost alela lokusa HLA-C u pacijenata sa PsA

HLA-C lokus	Broj alela kod ispitanika (N=105)	%	Broj alela kod kontrolne skupine (N=100)	%	p vrijednost
<b>*01</b>	14	6.67%	16	8%	0.3711
<b>*02</b>	15	7.14%	21	10.5%	0.1487
<b>*03</b>	11	5.24%	9	4.5%	0.4541
<b>*04</b>	28	13.33%	36	18%	0.1219
<b>*05</b>	5	2.38%	9	4.5%	0.1819
<b>*06</b>	53	25.24%	8	4%	<b>0.0000*</b>
<b>*07</b>	30	14.29%	42	21%	<b>0.0487*</b>
<b>*08</b>	4	1.9%	8	4%	0.1675
<b>*11</b>	1	0.48%	0	0%	0.5122
<b>*12</b>	34	16.19%	33	16.5%	0.5192
<b>*14</b>	1	0.48%	5	2.5%	0.0967
<b>*15</b>	9	4.28%	7	3.5%	0.4393
<b>*16</b>	2	0.95%	4	2%	0.3199
<b>*17</b>	1	0.48%	2	1%	0.4817
<b>*18</b>	2	0.95%	0	0%	0.2617
<b>UKUPNO</b>	<b>210</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>	

\*statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine ispitanika,  $p < 0.05$

Analizom alela lokusa HLA-DRB1 u skupini ispitanika sa psorijatičnim artritismom uočeno je 13 različitih alela, od kojih su najzastupljeniji HLA-DRB1\*16 i HLA-DRB1\*04. Kod pacijenata sa PsA zabilježena je statistički značajno veća učestalost alela HLA-DRB1\*13 u usporedbi s kontrolnom skupinom (10% vs 16.5%; p=0.051869). Također, alel HLA-DRB1\*16 pokazuje p vrijednost graničnu sa 0.05 (p=0.078292) (Tablica 8.) te se može smatrati statistički značajnim, odnosno da se učestalost alela HLA-DRB1\*16 značajno razlikuje između dvije skupine.

**Tablica 8.** Zastupljenost alela lokusa HLA-DRB1 u pacijenata sa PsA

HLA-DRB1 lokus	Broj alela kod ispitanika (N=105)	%	Broj alela kod kontrolne skupine (N=100)	%	p vrijednost
<b>1</b>	24	11.43%	21	10.5%	0.764177
<b>3</b>	15	7.14%	16	8%	0.740144
<b>4</b>	27	12.86%	24	12%	0.791337
<b>7</b>	21	10%	17	8.5%	0.603332
<b>8</b>	7	3.33%	5	2.5%	0.617075
<b>9</b>	1	0.48%	0	0%	
<b>10</b>	3	1.43%	0	0%	
<b>11</b>	23	10.95%	29	14.5%	0.281466
<b>12</b>	5	2.38%	6	3%	0.698535
<b>13</b>	21	10%	33	16.5%	<b>0.051869*</b>
<b>14</b>	9	4.28%	5	2.5%	0.319742
<b>15</b>	22	10.48%	25	12.5%	0.52197
<b>16</b>	32	15.24%	19	9.5%	<b>0.078292*</b>
<b>UKUPNO</b>	210	100%	200	100%	

\*statistički značajna razlika između kontrolne skupine i skupine ispitanika, p<0.05

## 5. RASPRAVA

Analizom alela lokusa HLA-A u skupini ispitanika pronađeno je 13 različitih alela. Od toga su najzastupljeniji aleli HLA-A\*01 (12,86%) i HLA-A\*02 (39,52%), što je u skladu sa istraživanjem provedenim u Republici Hrvatskoj 2014. gdje su Grubić i suradnici, korištenjem molekularnih metoda PCR-SSO i PCR-SSP, također prikazali alele HLA-A\*01 i HLA-A\*02 kao najučestalije (29). Usporedba učestalosti pojedinih alela između skupine bolesnika sa psorijatičnim artritisom i kontrolne skupine zdrave populacije pokazala je učestalost alela HLA-A\*32 (7.14% vs 3%;  $p=0,0453$ ) i HLA-A\*02 (39.52% vs 24.5%;  $p=0.0008$ ) značajno veća u pacijenata, dok su HLA-A\*11 (3.81%) i HLA-A\*24 (6.67%) značajno manje zastupljeni. Pregledom literature uočeno je da većina objavljenih publikacija koje su se bavile povezanosti sustava HLA i PsA nije uključivala analizu HLA-A alela u pacijenata. Ipak, u publikaciji iz 1980. godine gdje su Murray i suradnici analizirali učestalosti HLA-A lokusa u američkoj populaciji pronađena je povećana učestalost alela HLA-26, za razliku od našeg istraživanja (30). Ovaj podatak može upućivati da se radi o populacijskoj specifičnosti između te dvije populacije.

Promatrajući učestalost alela lokusa HLA-B pronađena su 22 različita alela od kojih su se najzastupljenijim pokazali aleli HLA-B\*08 (10%), HLA-B\*35 (14.29%) i HLA-B\*51 (9.52%), što je u skladu s prethodnim istraživanjima u RH (Grubić 2014.) Usporedbom s kontrolnom skupinom, uočeno je da aleli HLA-B\*08 (10% vs 4%;  $p=0.0138$ ), HLA-B\*13 (6.19% vs 0.5%;  $p=0.0008$ ) i HLA-B\*57 (6.19% vs 2%;  $p=0.0282$ ) pokazuju statistički značajnu učestalost. Naši rezultati su u skladu s istraživanjima provedenim u irskoj populaciji gdje su Haroon i suradnici kao i Fitzgerald i suradnici pokazali statistički značajnu učestalost alela HLA-B\*08 i HLA-B\*57 kod pacijenata sa psorijatičnim artritisom (31, 32). Winchester i suradnici su u istraživanju objavljenom 2012 također pokazali povećanu učestalost haplotipa C\*06 koji je u neravnoteži udruživanja s B\*57 (33). U istraživanju provedenom na 158 ispitanika sa PsA, Gladman i suradnici dobili su veće frekvencije alela HLA-B\*07 i HLA-B\*13 koje su korelirale s blažom bolesti u bolesnika sa psorijatičnim artritisom (34). Za razliku od pacijenata čiju smo tipizaciju proučavali u ovom radu, u publikaciji iz 2017. godine, Bowes i suradnici pokazali su veću učestalost alela HLA-B\*27 kod ispitanika sa PsA u Irskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu u Australiji (35). PsA je klinički heterogena bolest, te je

HLA-B\*27 alel povezan s određenim kliničkim slikama poput ranije dobi početka psorijaze, muškom populacijom i bilateralnim sakroilitisom što nam pokazuje kompleksnost bolesti (36). Različite proporcije kliničkih podskupina mogu objasniti ovu razliku, kao i nedostatak i potreba za točnim kliničkim fenotipiziranjem slučajeva PsA.

Pronađeno je 15 različitih alela HLA-C u skupini ispitanika te je alel HLA-C\*06 najučestaliji (25.24% vs \$%; p=0.000). Proučavajući druga istraživanja, kao što su proveli Okada i suradnici te Murray i suradnici, također se alel HLA-C\*06 pokazao kao faktor rizika za psorijatični artritis što je slučaj i kod našeg istraživanja (37, 38).

Promatrajući učestalost alela lokusa HLA-DRB1 uočeno je 13 različitih alela među kojima se alel HLA-DRB1\*13 pokazao najzastupljenijim. Dobiveni rezultat je u skladu s istraživanjem provedenim od strane Querio i suradnika gdje je antigen HLA-DRB1\*13 djelovao kao neovisni čimbenik rizika povezan s pojavom uveitisa u bolesnika sa PsA (40). Ostala dostupna istraživanja pokazuju veću učestalost alela lokusa HLA-DRB1\*04 kao i HLA-DRB1\*08 (35, 38). Različiti rezultati u zastupljenosti alela HLA-DRB1 mogu biti relevantni za modulaciju kliničke ekspresije kao i faktori pri klasifikaciji PsA u podskupine.

Još uvijek postoji potreba za daljnjim i većim genetskim studijama, unutar i izvan HLA regije, kako bi se došlo do čvršćih zaključaka u vezi psorijatičnog artritisa.

## 6. ZAKLJUČAK

1. HLA sustav povezan je s brojnim bolestima, posebice autoimunim
2. Analizom alela lokusa HLA-A u skupini ispitanika pronađeno je 13 različitih alela, a usporedbom učestalosti pojedinih alela između skupine bolesnika s psorijatičnim artritisom i kontrolne skupine zdrave populacije pokazala je učestalost alela HLA-A\*32 i HLA-A\*02 značajno veća u pacijenata, dok su HLA-A\*11 i HLA-A\*24 značajno manje zastupljeni u pacijenata.
3. Promatrajući učestalost alela lokusa HLA-B pronađena su 22 različita alela, a usporedbom s kontrolnom skupinom, uočeno je da aleli HLA-B\*08, HLA-B\*13 i HLA-B\*57 pokazuju statistički značajnu učestalost kod pacijenata sa psorijatičnim artritisom.
4. Pronađeno je 15 različitih alela HLA-C u skupini ispitanika te je alel HLA-C\*06 najučestaliji, što je u skladu sa dosad objavljenom literaturom koja također navodi HLA-C\*06 kao faktor rizika za psorijatični artritis.
5. Promatrajući učestalost alela lokusa HLA-DRB1 uočeno je 13 različitih alela među kojima se alel HLA-DRB1\*13 pokazao najzastupljenijim, za razliku od ostalih dostupnih istraživanja koja pokazuju veću učestalost alela lokusa HLA-DRB1\*04 kao i HLA-DRB1\*08 u pacijenata sa PsA. Različiti rezultati u zastupljenosti alela HLA-DRB1 lokusa mogu biti relevantni za modulaciju kliničke ekspresije kao i faktori pri klasifikaciji PsA u podskupine.
6. Zahvaljujući najnovijim metodama molekularne biologije (PCR, NGS) omogućeno je određivanje podtipova pojedinog alela na visokoj rezoluciji, a već sad neka od istraživanja u složenoj lepezi reumatskih bolesti, ističu važnost određivanja podtipova alela pojedinih gena koji govore u prilog genetske predispozicije za navedene bolesti.
7. Na kraju možemo zaključiti da složenost sustava HLA nije samo temelj i glavna karika u području transplantacijske medicine već glavno polazište u određivanju genetske predispozicije za niz bolesti, u našem radu povezanost sustava HLA i psorijatičnog artritisa svakako se pokazala kao jedan od najvažnijih parametara u području dijagnostike.



## 7. LITERATURA

1. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Walport M, Shlomchik MJ (2001) The major histocompatibility complex and its functions. U: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edn. Garland Science, New York
2. Dausset J (1958) [Iso-leuko-antibodies]. Acta Haematol 20: 156–166.
3. Fuggle S V., Taylor CJ. Histocompatibility and Immunogenetics. Handb Ren Pancreat Transplant. 2012. 55–75.
4. Crnić-Martinović M. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka, Rijeka, 2005.
5. Medhasii N., Chantratita N. Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections - PMC 2022.
6. Fuggle S V., Taylor CJ. Histocompatibility and Immunogenetics. Handb Ren Pancreat Transplant. 2012. 55–75.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2018) Cellular and Molecular Immunology. 9th edn. Philadelphia, PA , Elsevier
8. Martinez N, Usporedba analize seruma i gena sustava HLA u senzibiliziranih trudnica (magistarski rad), 2000, PMF, Zagreb
9. Janeway C. A., Travers P., Walport M. i sur. (2005): Immunobiology – The immune system in health and disease. Garland Publishing, New York.
10. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, ... Trowsdale J (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Tissue Antigens 75:291–455
11. Kanevskiy L, Erokhina S, Kobyzeva P, Streltsova M, Sapozhnikov A, Kovalenko E. Dimorphism of HLA-E and Its Disease Association. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(21):5496.
12. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya JM. HLA Association with Autoimmune Diseases. U: Autoimmunity: From Bench to Bedside El Rosario University Press; 2013

13. Egeberg A, Kristensen LE, Thyssen JP, Gislason GH, Gottlieb AB, Coates LC, i ostali. Incidence and prevalence of psoriatic arthritis in Denmark: a nationwide register linkage study. *Ann Rheum Dis.* rujanj 2017.;76(9):1591–7
14. Coates LC, Helliwell PS. Psoriatic arthritis: state of the art review. *Clin Med (Lond).* veljača 2017.;17(1):65–70.
15. Egeberg A, Kristensen LE, Thyssen JP, Gislason GH, Gottlieb AB, Coates LC, i ostali. Incidence and prevalence of psoriatic arthritis in Denmark: a nationwide register linkage study. *Ann Rheum Dis.* rujanj 2017.;76(9):1591–7.
16. Executive Summary. U: Clinical Review Report: Ixekizumab (Taltz): (Eli Lilly Canada Inc): Indication: Treatment of adult patients with active psoriatic arthritis who have responded inadequately to, or are intolerant to one or more disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) Taltz can be used alone or in combination with a conventional DMARD (e.g, methotrexate) Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health;
17. Malik F, Haberman R, Scher JU. Psoriatic Arthritis. U: Efthimiou P, urednik. *Absolute Rheumatology Review Cham: Springer International Publishing; 2020* str. 153–73.
18. Ogdie A, Weiss P. The Epidemiology Psoriatic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* studeni 2015.;41(4):545–68.
19. Catanoso M, Pipitone N, Salvarani C. Epidemiology of psoriatic arthritis. *Reumatismo* 64(2):66-70 64(2):66-70, June 2012
20. Azuaga AB, Ramírez J, Cañete JD. Psoriatic Arthritis: Pathogenesis and Targeted Therapies. *Int J Mol Sci.* 03. ožujak 2023.;24(5):4901.
21. Tiwari V, Brent LH. Psorijatični artritis. U: StatPearls Otok s blagom (FL): StatPearls Publishing; 2024. siječnja-.
22. Duffin KC, Chandran V, Gladman DD, Krueger GG, Elder JT, Rahman P. Genetics of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Update and Future Direction (GRAPPA 2007). *J Rheumatol.* srpanj 2008.;35(7):1449–53.
23. Krueger GG. Clinical features of psoriatic arthritis. *Am J Manag Care* 2020
24. Chandran V, Schentag CT, Brockbank JE, Pellett FJ, Shanmugarajah S, Toloza SMA, et al. Familial aggregation of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(5):664–7

25. Queiro R, Gonzalez S, López-Larrea C, Alperi M, Sarasqueta C, Riestra JL, i ostali. HLA-C locus alleles may modulate the clinical expression of psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 13. prosinac 2006.;8(6):R185.
26. Gladman DD, Antoni C, Mease P, *et al* Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005;64:ii14-ii17.
27. Handa R. *Clinical Rheumatology India*, 2021 SpringerLink
28. Araujo EG, Schett G. Enthesitis in psoriatic arthritis (Part 1): pathophysiology. *Rheumatology (Oxford)*. ožujak 2020.;59(Suppl 1):i10–4.
29. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *Int J Immunogenet*. 2014 Jun;41(3):211-21.
30. Murray C, Mann DL, Gerber LN, Barth W, Perlmann S, Decker JL, i ostali. Histocompatibility alloantigens in psoriasis and psoriatic arthritis. Evidence for the influence of multiple genes in the major histocompatibility complex. *J Clin Invest*. 01. listopad 1980.;66(4):670–5.
31. Haroon M, Winchester R, Giles JT, Heffernan E, FitzGerald O. Certain class I HLA alleles and haplotypes implicated in susceptibility play a role in determining specific features of the psoriatic arthritis phenotype. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):155-62.
32. FitzGerald O, Haroon M, Giles JT, Winchester R. Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Res Ther*. 2015 May 7;17(1):115.
33. Winchester R, Minevich G, Steshenko V, Kirby B, Kane D, Greenberg DA, FitzGerald O. HLA associations reveal genetic heterogeneity in psoriatic arthritis and in the psoriasis phenotype. *Arthritis Rheum*. 2012 Apr;64(4):1134-44.
34. Gladman DD, Anhorn KA, Schachter RK, Mervart H. HLA antigens in psoriatic arthritis. *J Rheumatol*. 1986 Jun;13(3):586-92.
35. Bowes J, Ashcroft J, Dand N, Jalali-Najafabadi F, Bellou E, Ho P, Marzo-Ortega H, Helliwell PS, Feletar M, Ryan AW, Kane DJ, Korendowych E, Simpson MA, Packham J, McManus R, Brown MA, Smith CH, Barker JN, McHugh N,

- FitzGerald O, Warren RB, Barton A. Cross-phenotype association mapping of the MHC identifies genetic variants that differentiate psoriatic arthritis from psoriasis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Oct;76(10):1774-1779.
36. Queiro R, Sarasqueta C, Belzunegui J, Gonzalez C, Figueroa M, Torre-Alonso JC. Psoriatic spondyloarthritis: a comparative study between HLA-B27 positive and HLA-B27 negative disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2002 Jun;31(6):413-8.
37. Murray C, Mann DL, Gerber LN, Barth W, Perlmann S, Decker JL, et al. Histocompatibility antigens in psoriasis and psoriatic arthritis. Evidence for the influence of multiple genes in the major histocompatibility complex. *J Clin Invest.* 01. listopad 1980.;66(4):670-5.
38. Okada Y, Han B, Tsoi LC, Stuart PE, Ellinghaus E, Tejasvi T, Chandran V, Pellett F, Pollock R, Bowcock AM, Krueger GG, Weichenthal M, Voorhees JJ, Rahman P, Gregersen PK, Franke A, Nair RP, Abecasis GR, Gladman DD, Elder JT, de Bakker PI, Raychaudhuri S. Fine mapping major histocompatibility complex associations in psoriasis and its clinical subtypes. *Am J Hum Genet.* 2014 Aug 7;95(2):162-72.
39. Queiro-Silva R, Torre-Alonso JC, Tintur -Eguren T, L pez-Lagunas I. The effect of HLA-DR antigens on the susceptibility to, and clinical expression of psoriatic arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2004;33(5):318-22.
40. Queiro R, Torre JC, Belzunegui J, Gonz lez C, de Dios JR, Unanue F, et al. Clinical features and predictive factors in psoriatic arthritis-related uveitis. *Semin Arthritis Rheum* 2002;31:264 – 70.

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

Ime i prezime: Matea Radić

Datum rođenja: 22.05.2002.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

E-mail: [radicmatea04@gmail.com](mailto:radicmatea04@gmail.com)

### Obrazovanje:

2009.-2013. Osnovna škola Sirobuja

2013.-2017. Osnovna škola Kamen-Šine

2017.-2021. Opća gimnazija Marko Marulić, Split

2021.-2024. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Split, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

### Osobne vještine:

Strani jezici: engleski, njemački

Digitalne vještine: Internet, MS Office

Vozačka dozvola: B kategorija