

# Povezanost sustava HLA i celijakije

---

**Bučević, Nina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:176:785404>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

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



zir.nsk.hr



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKA LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Nina Bučević**

**POVEZANOST SUSTAVA HLA I CELIJAKIJE  
ASSOCIATION OF HLA AND CELIAC DISEASE**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor:

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

Split, 2018.

## **1. UVOD**

1.1. Povijest HLA.....	3
1.2. Glavne značajke MHC.....	4
1.3. Antigeni HLA razreda I.....	6
1.3.1. Građa molekula HLA razreda I.....	6
1.3.2. Funkcija molekula HLA razreda I.....	7
1.4. Antigeni HLA razreda II.....	8
1.4.1. Građa molekula HLA razreda II.....	8
1.4.2. Funkcija molekula HLA razreda II.....	9
1.5. Nazivlje sustava HLA.....	11
1.6. Osnovne karakteristike HLA.....	12
1.7. Određivanje antigena i gena HLA.....	14
1.7.1. Serološko testiranje antigena HLA- MLCT.....	14
1.7.1.1. Izvođenje testa.....	15
1.7.2. Molekularne metode.....	16
1.7.2.1. PCR-SSO.....	16
1.7.2.2. Izvođenje testa PCR-SSO.....	17
1.7.2.3. PCR-SSP.....	20
1.7.2.4. Izvođenje testa PCR-SSP.....	21
1.8. Celijakija.....	23
1.8.1. Epidemiologija.....	23
1.8.2. Patološke promjene.....	24
1.8.3. Etiopatogeneza i dijagnostika.....	24
1.8.4. Klinička slika.....	25
1.8.5. Liječenje i prognoza.....	26
1.9. Povezanost sustava HLA i celijakije.....	26

## **2. CILJ RADA.....32**

<b>3. IZVORI PODATAKA I METODE</b> .....	<b>33</b>
3.1. Ispitanici.....	33
3.2. Metode.....	33
3.2.1. Izolacija DNA.....	33
3.2.2. PCR-SSO.....	33
3.2.3. Statistička obrada podataka.....	34
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>35</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>37</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>42</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>43</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>46</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>48</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>50</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Povijest HLA

Povijest polimorfnog sustava HLA započinje prije nešto manje od devedeset godina s britanskim liječnikom i znanstvenikom Peterom Gorerom. Tijekom svog istraživanja o mogućnostima transplantacije tumora kod miševa, došao je do otkrića da je ista bila uspješna ako su miševi imali jednu istu grupu alela koju je nazvao Antigen II. Miševi koji su se razlikovali po grupama alela, zbog djelovanja imunološkog sustava, odbacili su presadak. U isto vrijeme do sličnog zaključka došao je i George Snell koji je sustav nazvao H lokus (1).

Jean Dausset, Jon van Rood i Rose Payne su 1958. godine objavili tri rada koja su postavila temelje HLA sustava kakvog danas poznajemo. U istraživanju su otkrivena HLA antitijela u serumima politransfundiranih bolesnika i višerotkinja. Za otkriće ovog najsloženijeg sustava kod čovjeka smatra se Jean Dausset kojemu je 1980. uručena i Nobelova nagrada. Van Rood i Payne su ponukani velikim otkrićem nastavili svoja istraživanja aloantigena na humanim leukocitima. Isto je 1963. godine dovelo do saznanja o postojanju dialelnog sustava leukocitnih antigena koje je prof. Rood nazvao alelima 4a i 4b (danas poznati kao HLA-Bw4 i HLA-Bw6). Samo godinu dana kasnije, 1964., Rose Payne je u serumima višerotkinja otkrila do tada nepoznate antigene te njihove lokuse. Brojni znanstvenici su slijedeći ove primjere bili uspješni u otkrivanju ostalih, danas vrlo relevantnih antigena i njihovih alela (2). Tek 1999. godine objavljena je kompletna i kontinuirana HLA sekvenca koja je imala 224 lokusa uključujući kodirajuće i ne kodirajuće segmente (3).

S novim spoznajama i napretkom znanosti razvila se potreba za stvaranjem registara s podacima o tipizacijama HLA pacijenata. Tako je Jon J. van Rood 1967. godine predstavio svoju zamisao o osnivanju neprofitne organizacije Eurotransplantata koja je i pravno utemeljena 12. svibnja 1969. godine. Iz sličnog razloga u mnogim zemljama su danas ustanovljeni nacionalni Registri dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica koji zajedno čine Svjetsku organizaciju darivatelja

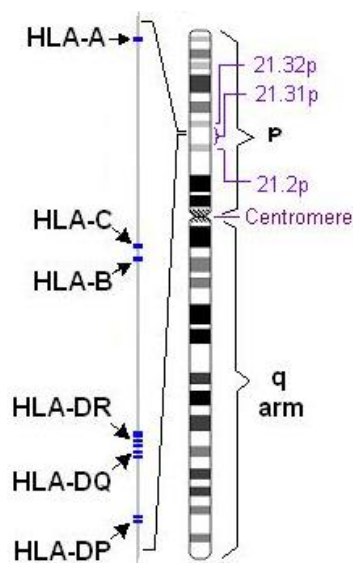
krvotvornih matičnih stanica (*Bone Marrow Donors Worldwide*). Svjetski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica i stanica umbilikalne krvi danas broji više od 31 887 davatelja. Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica osnovan je 1996. godine u Zavodu za tipizaciju tkiva, Klinike za urologiju, KBC Rebro, Zagreb. Ipak, sve do osnivanja Zaklade Ana Rukavina broj darivatelja je bio mali (156). Trenutno Hrvatski registar DDKMS, zahvaljujući radu Zaklade Ana Rukavina, broji 59 605 potencijalnih davatelja (28).

## 1.2. Glavne značajke MHC

Sustav HLA (humani leukocitni antigeni) je glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) u čovjeka. MHC sustav sadrži veliki broj gena čija je primarna uloga prezentiranje patogena imunološkom sustavu, točnije T stanicama. T stanice osim što prepoznaju peptide nastale staničnom obradom primarnog patogena prepoznaju i HLA molekule koje iste prezentiraju. Na ovaj način omogućeno je raspoznavanje vlastitih od stranih antigena što pak predstavlja veliki problem liječnicima prilikom pripreme za transplantaciju organa i/ili matičnih stanica (1).

Humana MHC regija se nalazi na kraćem kraku šestog kromosoma (odsječak p21.3) te se sastoji od nekoliko lokusa koje smo nazvali razredima I, II i III. Geni HLA razreda I su na kromosomu smješteni telomerično, geni HLA razreda II centromerično dok su se geni razreda III smjestili između njih. Geni HLA razreda I i II odgovorni su za sintezu antigena HLA te su ključni u njihovoj preradbi i predočavanju (4). S druge strane, geni HLA razreda III nemaju središnju ulogu, no ipak su od velike značajnosti jer se unutar nje nalaze brojni geni koji sudjeluju u imunološkoj reakciji i pokazuju izrazitu strukturnu i funkcionalnu različitost (komponente komplemента, citokini). Geni C4A i C4B, C2 i Bf kodiraju drugu i četvrtu komponentu komplemента te faktor B, esencijalan za alternativni put aktivacije sustava komplemента. Osim navedenih, u ovoj regiji se nalaze i *TNF-A* i *TNF-B* geni koji kodiraju citokine  $TNF-\alpha$  i  $\beta$ , poznatiji kao geni proteina "toplotnog šoka" (engl. *Heat Shock Proteins*, HSP) te mnogi drugi (1, 10).

Regija MHC je veličine ~4Mb što predstavlja 0.13% ljudskog genoma, no odražava čak 0.5% od 32 000 poznatih protein kodirajućih gena. Odgovorna je za produkciju liganda, receptora, proteina, signalnih molekula i regulatora transkripcije. Osim svoje središnje uloge u regulaciji urođenog i stečenog imunološkog odgovora ima i brojne druge zadaće poput: sinteze komplementa (posreduju upalnom procesu), regulacije proizvodnje specifičnih antitijela te kontrole sinteze tkivnih antigena (tkivna histokompatibilnost). Nadalje, neka nova istraživanja dovela su sustav HLA u svezu s reprodukcijom i socijalnim ponašanjem kao što su održavanje trudnoće i odabir partnera. MHC regija utječe i na živčani sustav, interakciju stanica u mozgu te uzrokuje neke neurološke i psihijatrijske poremećaje (3).



**Slika 1.** Šesti kromosom

*Preuzeto iz: Parham P The Immune system 2005.*

### 1.3 Antigeni HLA razreda I

Antigeni HLA razreda I su heterodimerski glikoproteini vezani za površinu stanice. Organizirani su u više lokusa od kojih su najvažniji HLA-A, HLA-B i HLA-C geni. Ovi geni izrazito su polimorfni, a njihove produkte možemo pronaći na većini tjelesnih stanica u različitim koncentracijama. Prisutne su na svim stanicama s jezgrom, u limfatičnom tkivu i na trombocitima. Osim toga, možemo ih pronaći otopljene u plazmi (kasnije se apsorbiraju se na površinu trombocita) te na eritrocitima čija ekspresija ovisi o specifičnosti antigena. U malom broju se nalaze na spermatozoidima, oocitima, stanicama posteljice, mišićima i stanicama središnjeg živčanog sustava, a manjak ovih molekula na fetomaternalnoj barijeri omogućava preživljavanje fetusa. Osim njih poznajemo još i HLA-E, -F i -G gene koji su nisko polimorfni, ograničena im je zastupljenost u tkivima i kodiraju molekule strukturno vrlo slične molekulama klasičnih gena HLA razreda I.

Imunološka istraživanja pokazuju da je lokus HLA-B najpolimorfniji i time najznačajniji od navedenih (4).

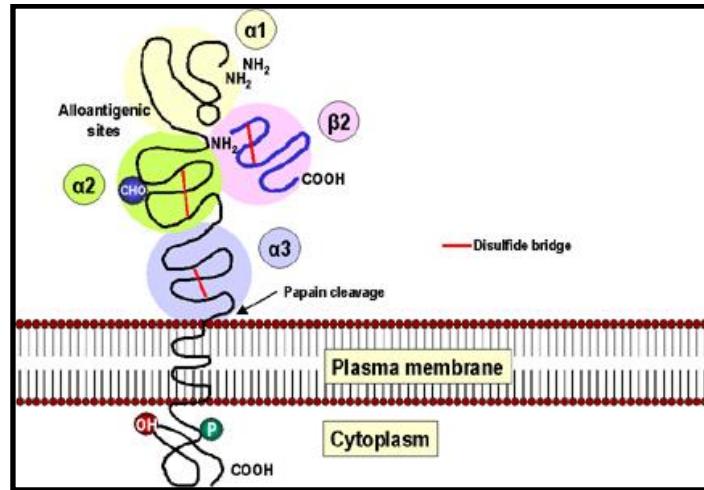
#### 1.3.1. Građa molekula HLA razreda I

Molekule HLA razreda I građene su od dva lanca: polimorfnog alfa lanca ili teškog lanca (43kDa) kojeg kodira regija p21.3 na šestom kromosomu te ne polimorfnog (konstantnog)  $\beta$ 2 mikroglobulina (12kDa). Alfa lanac ima tri dijela citoplazmatski, hidrofobni transmembranski i glikolizirani ekstracelularni. Citoplazmatski dio se sastoji od tri domene  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 i  $\alpha$ 3. Mikroglobulin  $\beta$ 2 nalazi se slobodan u serumu te se nekovalentno veže na  $\alpha$  lanac. On ne sudjeluje u prezentaciji antigena već ima funkciju učvršćivanja molekule.

Proksimalno staničnom zidu nalaze se  $\alpha$ 3 domena i  $\beta$ 2 mikroglobulin, a  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 domene smještene su distalno. Distalne domene slažu se u sekundarnu strukturu  $\beta$ -nabrane ploče koja je sastavljena od osam nabora. Na njihovim karboksilnim krajevima nalazi se struktura alfa heliksa koja ujedno čini i bočne strane lanaca. Ovakav tip strukture stvara žlijeb između  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 lanca gdje se tijekom sinteze



antigena HLA razreda I vežu molekule peptida (8-10 aminokiselina) (1).



Slika 2. Shematska građa antigena HLA razreda I

Preuzeto iz: Janeway CA i sur. Immunobiology 2005.

### 1.3.2. Funkcija molekula HLA razreda I

Osnovna funkcija molekula HLA razreda I je prezentiranje intracelularnih peptida T staničnim receptorima smještenima na CD8<sup>+</sup> citotoksičnim T stanicama. Ovim se ostvaruje unutarnji put predočenja stranih antigena (uglavnom virusa) koji su rastavljeni na peptide od oko 9 aminokiselina.

Nakon razgradnje stranog antigena na peptide, oni se preko specifičnih prijenosnih proteina TAP1 i TAP2 transportiraju u endoplazmatski retikulum (ER). U ER, gdje je već ranije započeta sinteza HLA antigena, dolazi do vezanja patogenih peptida i molekula HLA razreda I što zahtjeva preciznu koordinaciju brojnih proteina. U ovom obliku molekula prolazi kroz Golgijev aparat te se eksprimira na površini stanice gdje biva prezentirana citotoksičnim (CD8<sup>+</sup>) T limfocitima. Antigen specifični receptor može prepoznati antigen peptida samo ako je vezan za vlastiti HLA antigen. Uzrok ove restrikcije su specifični receptori- TCR glikoproteini na

limfocitima Tc (1). CD8<sup>+</sup> stanice sada potiču imuni odgovor što rezultira smrću stranog antigena.

Osim navedene, molekula HLA razreda I ima sposobnost reagiranja s različitim NK inhibitorskim receptorima koji na taj način štite zdrave stanice od imunoreakcije posredovane NK stanicama. Prirodno ubilačke stanice (engl. *Natural killer*, NK) prvotno prepoznaju molekule HLA-C (4).

## **1.4. Antigeni HLA razreda II**

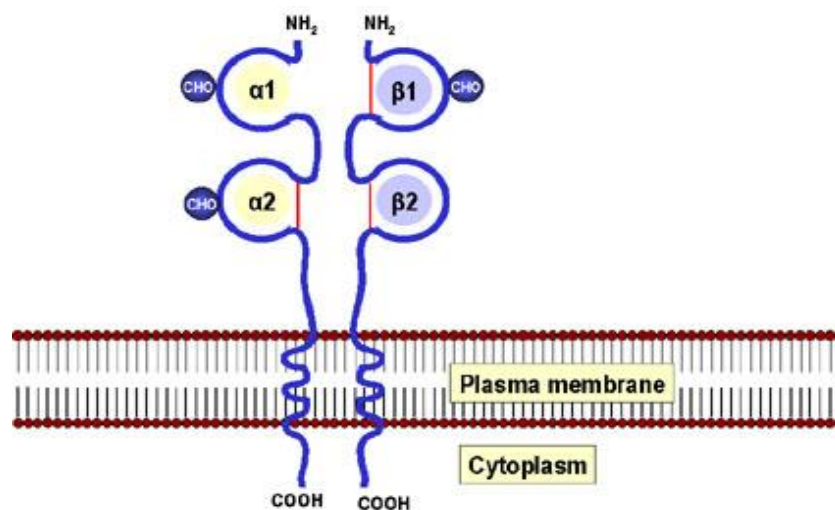
Regija HLA razreda II nalazi se centromerično na šestom kromosomu i zauzima područje veličine 800 kb. Ova regija nosi gene koji kodiraju heterodimerične glikoproteinske molekule HLA razreda II. Kao i HLA razreda I, organizirani su u nekoliko podregija od kojih su najznačajnije: HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP. Zastupljenost molekula razreda II ograničena je na stanice koje aktivno sudjeluju u imunološkom odgovoru zbog čega su prisutne na antigen prezentirajućim stanicama (B-limfocitima, makrofagima i dendritičnim stanicama), epitelnim i endotelnim stanicama te na limfatičnom tkivu. Uloga ovog razreda je poticanje općeg imunog odgovora zbog čega njegova prisutnost nije potrebna na svim tkivima npr. masnom i mišićnom tkivu.

Za razliku od molekula HLA razreda I, molekule razreda II prezentiraju strane antigene T pomagačkim stanicama (CD4<sup>+</sup>) (1).

### **1.4.1. Građa molekula HLA razreda II**

Struktura gena molekula HLA razreda II nalikuje strukturi gena molekula HLA razreda I. Molekule HLA razreda II građene su od dva polimorfna, međusobno vrlo slična lanca,  $\alpha$  (34kDa) i  $\beta$  (29kDa). Oba lanca kodira regija na kratkom kraku šestog kromosoma (6p21.3). Ekstracelularni dio svake od njih sastoji od dvije domene,  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  te  $\beta 1$  i  $\beta 2$ .

Molekula se sastoji od četiri regije. Prva regija se dijeli se na  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  (mjesto vezanja  $CD4+$  limfocita) domene koje su nepromjenjive i strukturno vrlo slične imunoglobulinima. One se nalaze proksimalno staničnoj membrani dok se druga regija s  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  domenama nalazi distalno. To je ujedno i regija s najvećim brojem polimorfizama te mjesto vezanja antigena. Između  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  domena stvara se žlijeb na koji se vežu peptidi obično dulji u odnosu na one HLA I regije. Osim navedenih postoji još i transmembranska regija koja sadrži hidrofobne aminokiseline te citoplazmatska na kojoj se dešava fosforilacija. Citoplazmatska regija je zaslužna i za vezanje molekula za elemente citoskeleta (1).



**Slika 3.** Shematski prikaz molekule antigena HLA razreda II

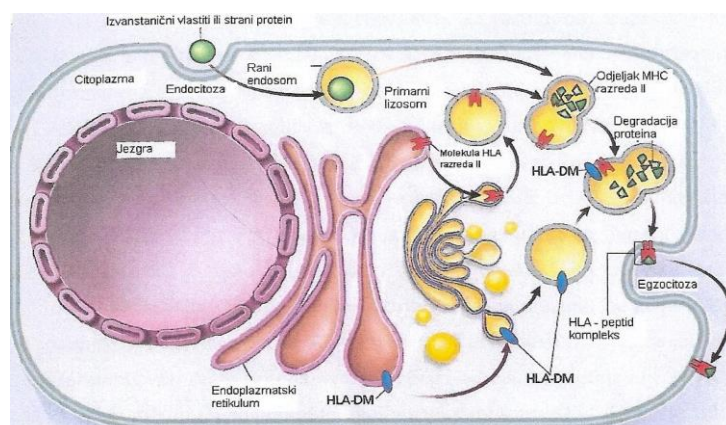
*Preuzeto iz: Janeway CA i sur. Immunobiology 2005.*

### 1.4.2. Funkcija molekula HLA razreda II

Osnovna funkcija molekula HLA razreda II je predočavanje stranih antigena (uglavnom bakterija (4)) nastalih ekstracelularno Th stanicama ( $CD4+$ ). Vezanje peptida i HLA antigena dešava se na mjestu poznatom kao MIIC (*MHC class II containing Compartment*). Pomagački T limfociti pobuđuju imuni odgovor koji

uključuje aktivaciju B limfocita s ciljem stvaranja antitijela te citotoksičnih T limfocita.

S obzirom da se strani antigeni, koje prepoznaju antigeni HLA razreda II primarno izvanstanični, put predočavanja antigena počinje fagocitozom koja se uglavnom dešava u makrofagima i dendritičnim stanicama (24). Nakon ulaska patogena u fagozom isti se spaja s lizozomom tvoreći fagolizozom. U fagolizozomu antigeni se razgrađuju na manje peptide veličine do 30 aminokiselina (25). U isto vrijeme se u ER sintetizira molekula HLA koja sve do spajanja s fagolizozomom sadržava protein poznat kao „invarijantni lanac (Ii)“<sup>1</sup>. On onemogućava preuranjeno vezanje peptida za HLA molekule. Nakon spajanja s peptidom (MIIC regija) i odvajanja invarijantnog lanca, molekula se transportira do površine stanice gdje se prezentira pomagačkim T limfocitima (1).



**Slika 4.** Put vezanja peptida na molekulu HLA razreda II

*Preuzeto s: Klein J., Sato A. (2000): The HLA system. First of two parts. N Engl J Med, 343: 702-709.*

<sup>1</sup> „Ima važnu ulogu u sintezi molekule HLA razreda II jer određuje mjesto na koje će se vezati peptid za antigen molekule HLA razreda II. Sintetizira se u endoplazmatskoj mrežici i veže se na mjesto peptida unutar antigena HLA razreda II te na taj način sprječava vezanje endogenog peptida. U slučaju da se endogeni peptidi vežu na antigen HLA razreda II, tada bi i antigeni HLA razreda I i razreda II predočavali istu vrstu peptida, koji nastaju razgradnjom proteina.“ - Crnić-Martinović, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka.

## 1.5. Nazivlje sustava HLA

Postoji više načina na koje možemo zapisati HLA antigene, no sljedeći način je uvriježen kao najbolji te se najčešće koristi.

Nazivlje HLA (Humani leukocitni antigen) je ime za antigene koje kodira grupa gena na kraćem kraku šestog kromosoma. Nadalje, A, B, C, DR, DQ i DP su oznake za lokuse HLA razreda I tj. razreda II. Nakon naziva lokusa slijedi brojčana oznaka (npr. 3, 17, 03...) koja se referira na specifični antigen kojeg kodira prethodno navedeni lokus. Tako HLA-DR17 (3) označava lokus DR razreda II te antigen 17. Ovaj način zapisivanja temelji se na serološkim laboratorijskim metodama tj. na stvaranju antitijela koji reagiraju na podražaj stranih antigena.

Nakon otkrića PCR-a te razvoja molekularne biologije, provođenje genetskih testova postalo je svakidašnjica. Sada su znanstvenici napokon mogli odrediti položaje gena koji su odgovorni za proizvodnju molekula sustava HLA.

S vremenom je otkriveno da postoji više inačica svakog od kodirajućih gena pa su se isti počeli označavati dodatnim rednim brojem. Uz ime gena dodan je četveroznamenasti broj kod kojeg prva dva označavaju specifičnost gena a druga dva redni broj alela tog gena (ovisno o tome kada je otkriven).

Kao primjer za imenovanje sustava HLA možemo uzeti sljedeći zapis: HLA-B\*13:01 u kojem HLA označava regiju, B određeni lokus, \* oznaku molekularnog testiranja, \*13 grupu alela koja odgovara serološkoj specifičnosti/ antigenu HLA-B13, a :01 redni broj alela (4).

**Tablica 1.** Imenovanje HLA gena i alela

Preuzeto iz: <http://hlaallels.org/nomenclature/naming.html>. *Nomenclature for Factors of the HLA System (29)*

<b>Nomenklatura</b>	<b>Značenje</b>
<b>HLA</b>	Sustav HLA
<b>HLA-B</b>	Oznaka određenog lokusa (B)
<b>HLA-B*13</b>	Grupa alela HLA-B*13 koja odgovara serološkoj specifičnosti/antigenu HLA-B13
<b>HLA-B*13:02</b>	Alel B*13:02
<b>HLA-B*13:02:02</b>	Sinonim za alel koji se razlikuje u mutaciji od alela B*13:02:01
<b>HLA-B*13:02:01:02</b>	Alel koji sadrži mutaciju izvan kodirane regije B*13:01:01
<b>HLA-A*24:09N</b>	„Nul alel“, alel koji nema ekspresiju na staničnoj membrani
<b>HLA-A*30:14L</b>	Alel čija je ekspresija značajno smanjena na površini stanice
<b>HLA-B*44:02:01:02S</b>	Aleli koji su eksprimirani na „skrivenim stanicama“
<b>HLA-A*32:11Q</b>	Alel čija mutacija ima značajan učinak na ekspresiju antigena na površini stanice

## 1.6. Osnovne karakteristike HLA

Projekt humanog genoma (engl. *The Human Genome Project*), uspješno završen 2003. godine, rezultirao je spoznajom o cjelokupnoj sekvenci ljudskog genoma. Sustav HLA je poznat po visokom stupnju raznolikosti njegovih gena. Geni HLA

su najpolimorfniiji geni u čovjeka (posebno HLA-B gen te HLA-DRB1), što znači da se svaki pojedini gen javlja u različitim oblicima koje nazivamo alelima. Kod nekih gena moguće je pronaći čak i do tisuću alela po pojedinom lokusu (4). Za najvažniji čimbenik ovog visokog stupnja polimorfnosti smatra se prirodna selekcija (5)

Glavnu poveznicu s sustavom HLA čini imunološki sustav. Sve klasične HLA molekule prezentiraju epitope (antigenska determinanta) T stanicama. Ipak, one se razlikuju u određenim domenama ovisno o specifičnosti gena (njegovih alela) koji ga kodiraju. Ovi polimorfizmi najprisutniji su u domenama odgovornima za vezanje antigena i interakciju varijabilnih regija s receptorima na T stanicama. Dokazano je da zamjena samo jedne aminokisline može za posljedicu imati velike promjene u afinitetu vezanja antigena te na taj način ubrzati ili usporiti djelovanje imunološkog sustava. Smatra se da je evolucijski smisao varijabilnosti HLA sustava veća vjerojatnost da će osoba biti heterozigotna. Time se pak smanjuje mogućnost da će neki patogeni peptid izbjeći djelovanje imunološkog sustava.

Osim polimorfnosti, sustav HLA ima obilježje kodominantnosti. Dakle, od svakog roditelja se nasljeđuje po jedan haplotip<sup>2</sup>, a dva haplotipa tvore genotip HLA. Nasljeđuju se prema uputama pravilne segregacije što znači da dijete ima 50%-tnu šansu da naslijedi određeni alel od heterozigotnog roditelja.

Jedna od osobina je i niska učestalost crossingover-a koja iznosi 1-2%. *Crossingover* je definiran kao zamjena dijelova kromatida tijekom oogeneze ili spermatogeneze. On se zbog izrazito male udaljenosti između pojedinih lokusa vrlo rijetko pojavljuje u genima sustava HLA.

Sustav HLA karakterizira i križna reaktivnost (*engl. Cross-Reactivity*) koja označava pojavu u kojoj jedno antitijelo reagira s više različitih antigena, najčešće istog lokusa (4).

Nadalje, jedna od značajnijih obilježja je i genska neravnoteža (*engl. Linkage Disequilibrium, LD*). Prema osnovnim zakonima Mendelovog nasljeđivanja

---

<sup>2</sup> Skup specifičnih alela koji se ne rekombiniraju, nemaju svoj par na drugom kromosomu i nasljeđuju se zajedno (33).

frekvencija alela jednog lokusa ne bi trebala utjecati na frekvenciju pojave drugog lokusa. Ipak, u sustavu HLA postoje određeni aleli koji pokazuju snažnu genetsku neravnotežu poput alela DQB1 i DRB1 koji se vrlo često nasljeđuju zajedno. Znanstvenici nagađaju da kombinacija određenih alela ima pozitivan učinak na imunološki sustav tako da povisuje selektivnost i specifičnost molekula sustava HLA (4,6).

## **1.7. Određivanje antigena i gena HLA**

Antigene i gene sustava HLA možemo odrediti na dva načina: serološkim i molekularnim testiranjem. Načini testiranja ovise o potrebama i mogućnostima laboratorija.

### **1.7.1. Serološko testiranje antigena HLA- test mikrolimfotoksičnosti (MLCT)**

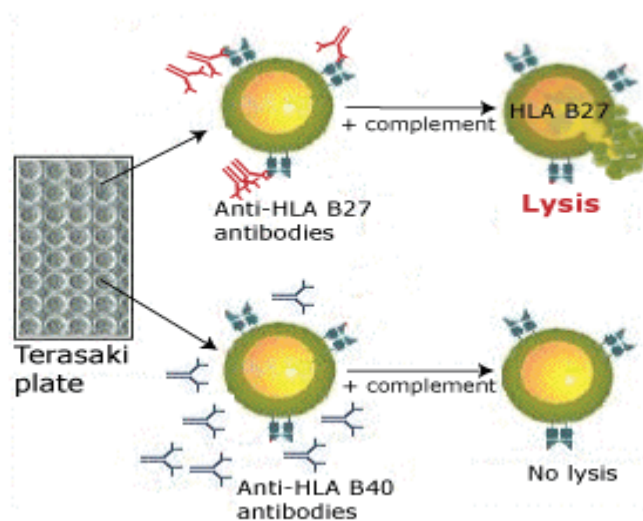
Serološko testiranje (test mikrolimfotoksičnosti) temelji se na principu aktiviranja komplementa tj. na specifičnoj reakciji antigen-antitijelo.

Cilj testa je odrediti nepoznate antigene razreda HLA I i II koji se nalaze na površini leukocita. U analizi se koriste poznata protutijela koja mogu biti poliklonska ili monoklonska. Dok se poliklonska dobivaju iz seruma aloimuniziranih višerotkinja, monoklonska protutijela se proizvode imunizacijom miševa.

Serumu pacijenta (nepoznati antigeni) dodaju se poznata poliklonska ili monoklonska protutijela. Ukoliko se na leukocitima pacijenta nalazi antigen komplementaran dodanom protutijelu, dolazi do reakcije i nastanka kompleksa antigen-antitijelo što se uzima kao pozitivna reakcija. Da bi ta pozitivna reakcija postala vidljiva i da bi se mogla kvantificirati, potrebno ju je na neki način označiti.



To se radi pomoću antihumanog komplementa koji se veže na antitijelo nastalog kompleksa i oštećuje stanicu. U slijedećem koraku dodaje se boja (tripansko modriilo) koja prodire kroz oštećenu membranu (26). Pozitivna reakcija se pod mikroskopom vidi kao obojenje. Ukoliko obojenja nema reakcija je negativna. Ovisno o jačini reakcije označava se brojevima od 1 do 8 gdje 1 predstavlja negativan rezultat, a 8 jaki pozitivitet.



**Slika 5.** Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti

*Preuzeto s:*

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

### 1.7.1.1. Izvođenje testa

Izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti započinje separacijom limfocita iz uzorka pune krvi (7ml, heparin kao antikoagulans) metodom gradijenta gustoće te određivanjem koncentracije. U tu svrhu koriste se Burker-Turk-ove komorice u koje se stavlja 5µL suspenzije limfocita i 5µL boje tj. prethodno pripremljenog tripanskog modrila (tripansko modriilo:MEM= 3:1). Pod mikroskopom se broji

broj stanica po pojedinom kvadratiću. Za tipizaciju antigena sustava HLA po kvadratiću je potrebno izbrojati 5-6 obojanih stanica ili 10-12 neobojanih.

Limfociti u poznatoj koncentraciji se pomoću Hamilton šprice postavljaju na Terasakijeve pločice na kojima se nalaze poznata protutijela. Nakon inkubacije (spajanje Ag-At) dodaje se zečji antihumani komplement. Slijedi ponovna inkubacija tijekom koje, ukoliko je došlo do vezanja antigena i antitijela, dolazi do uništenje stanične membrane limfocita. Kako bi uklonili ostatak komplementa koji se nije vezao Tarasakijeve pločice moramo dobro protresti.

Konačno, u reakciju dodajemo tripansko modriilo koje ulazi samo u mrtve stanice. Jažice u kojima ima dovoljan broj obojenih stanica označavamo kao pozitivnu reakciju (2-8) i zapisujemo u tipizacijske listiće.

**Tablica 2.** Interpretacija rezultata

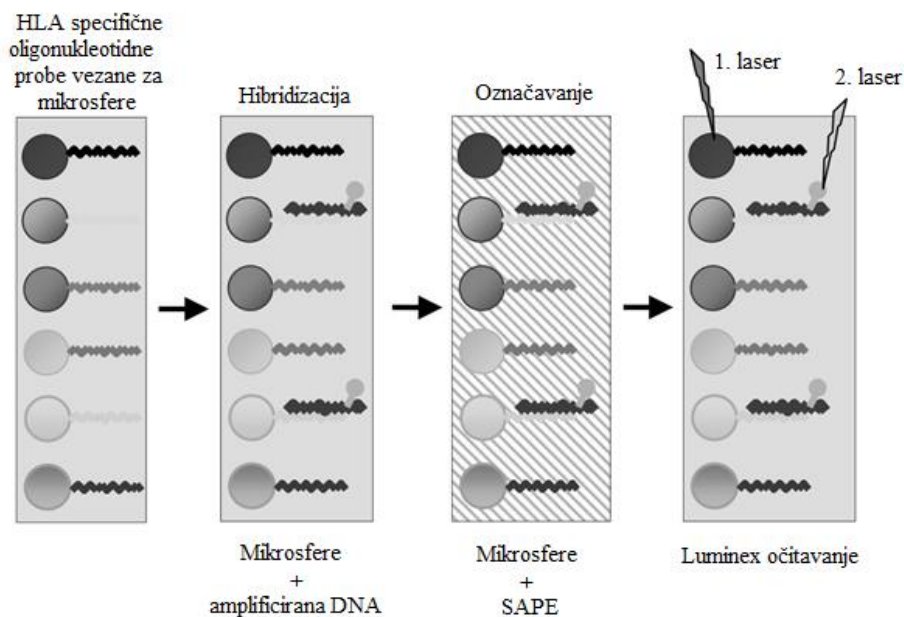
Postotak mrtvih stanica	Rezultat	Interpretacija
<b>0-10</b>	1	Negativno
<b>11-20</b>	2	Pozitivno/negativno (+)
<b>21-50</b>	4	Slabo pozitivno (++)
<b>51-80</b>	6	Pozitivno (+++)
<b>81-100</b>	8	Jako pozitivno (++++)

## 1.7.2. Molekularne metode

### 1.7.2.1. PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*)

PCR-SSO je metoda za određivanje gena HLA koja se temelji na specifičnom vezanju umnoženih fragmenata DNA i oligonukleotidnih proba na površini

mikrosfera. Mikrosfere su sintetski dobivene čestice koje su obojane crvenom i infracrvenom bojom. Različiti intenzitet obojenja očitava se uređajem Luminex (Luminex LX200 Analyser) koji funkcioniра na principu protočne citometrije. Svaka mikrosfera pojedinačno dolazi do dva lasera od kojih jedan kvantificira relativnu količinu vezanih proba, a drugi klasificira mikrosferu i određuje probu koja se vezala. Rezultati se očitavaju pomoću za to predviđenih softvera (7).



**Slika 6.** PCR-SSO metoda

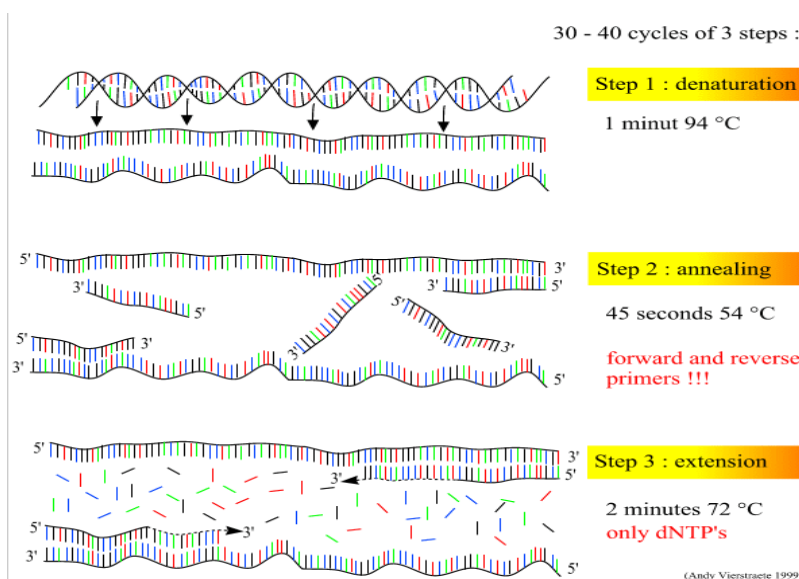
*Heinemann, HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology*

### 1.7.2.2. Izvođenje testa PCR-SSO

Uzorak za izvođenje testa je izolirana DNA koja se umnaža PCR metodom (engl. *Polymerase chain reaction*).

Prije postavljanja u aparat potrebno je napraviti reakcijsku smjesu ovisno o lokusu HLA kojeg želimo odrediti. Prvo stavljamo destiliranu vodu (8.8 $\mu$ L), a potom Master MIX (6 $\mu$ L) odnosno reakcijski pufer specifičan za određeni lokus (sadrži oligonukleotidne početnice i nukleotide). Konačno, u mješavinu dodamo Taq polimerazu (0.2 $\mu$ L), 5 $\mu$ L izolirane DNA i postavimo u „Thermocycler“ (LXAMPF RAPID).

Umnažanje DNA se odvija u nekoliko koraka. U prvom koraku dešava se denaturacija DNA pri kojoj dolazi do razdvajanja lanaca od kojih svaki služi kao kalup za sintezu novog lanca (3-5min, 94°C). U drugom koraku temperatura se snižava na 50-60°C kako bi se omogućila hibridizacija tj. vezanje oligonukleotidnih primera. Napokon, u trećem koraku, na 72°C počinje djelovanje Taq polimeraze i sinteza komplementarnog lanca. Postupak se ponavlja u 30-40 ciklusa, a kao rezultat dobijemo 68 milijuna kopija DNA.



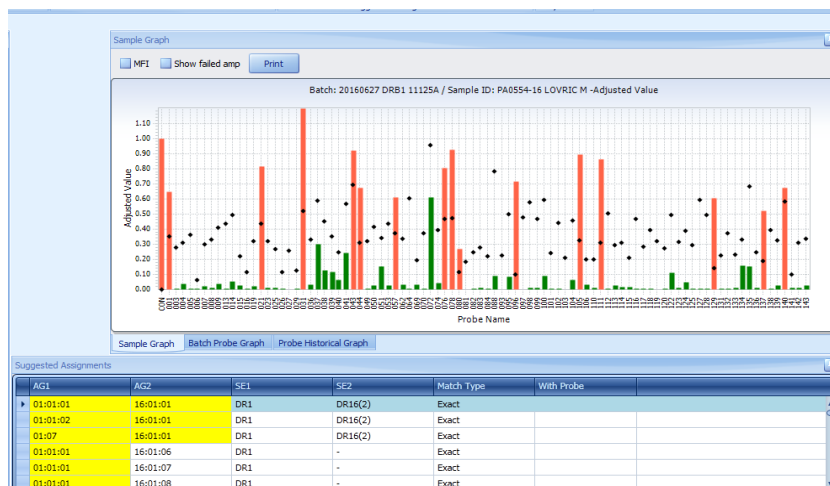
**Slika 7.** Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom

*Preuzeto iz: Andy Vierstraete 1999.*

Nakon amplifikacije fragmenata DNA slijedi proces hibridizacije (Lynx hibrid rapid) za koji je potrebno uzeti 5 $\mu$ L PCR produkta i 15 $\mu$ L suspenzije mikrosfera. Tijekom hibridizacije koja traje 20 minuta, oligonukleotidne sekvence (engl. SSO- *Sequence-Specific Oligonucleotides*) koje se nalaze na površini mikrosfera vežu se za specifična mjesta na umnoženim fragmentima.

U sljedećem koraku reakciji se dodaju pripremljene otopine fluorescentne boje kojima obilježavamo nastali kompleks. Otopina se priprema od 170 $\mu$ L dilucijske otopine i 0.75 $\mu$ L streptavidina (R- fikoeritrin konjugirani streptavidin, engl. *Streptavidin-Phycoerytherin*, SAPE). Spomenuti streptavidin se veže na biotinilizirane djelove (početnice) DNA PCR produkta te na kompleks nastao hibridizacijom. Po završetku hibridizacije, Coster pločica na kojoj se izvodi test stavlja se u Luminex aparat koji analizira uzorak.

Luminex aparat temelji se na principu protočne citometrije. Sastoji se od dva lasera od kojih jedan detektira kombinaciju proba s pozitivnim signalom na osnovu njihove povezanosti s mikrosferama (zeleno), a drugi kvantifikaciju relativne količine amplifikata hibridiziran sa svakom pojedinom mikrosferom (crveno). S obzirom da svaka označena proba fluorescira različitim intenzitetom, aparat ih registrira te povezuje s podacima o probama koje su zapisane u bazi podataka. Nakon detekcije vezanih proba vrši se obrada dobivenih podataka (Match-IT! software) (7).



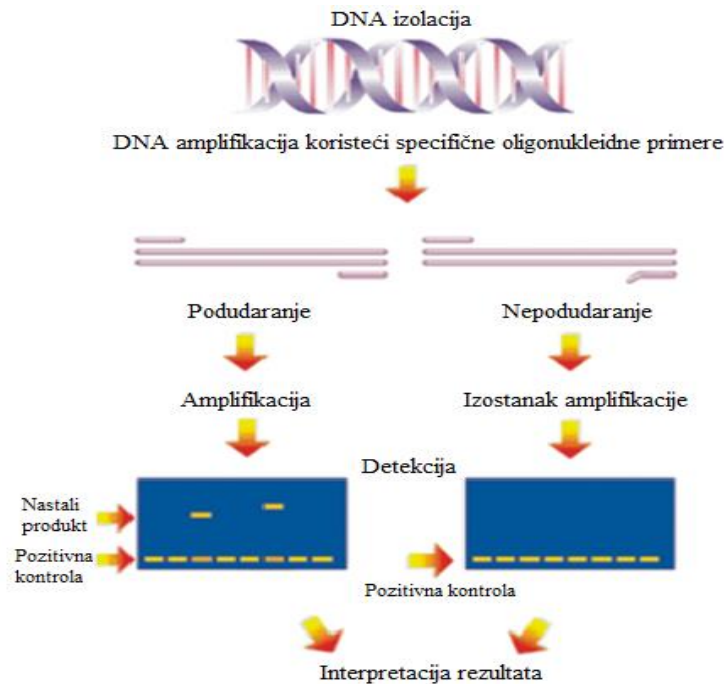
**Slika 8.** Rezultati dobiveni PCR-SSO metodom u MATCH IT DNA

(fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

### 1.7.2.3. PCR-SSP (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Primer*)

PCR-SSP (*PCR-Single Specific Primer*) je metoda koja se također koristi u svrhu određivanja gena HLA. Za razliku od PCR-SSO metode, ona omogućuje tipizaciju visoke rezolucije (4 znamenke). Kao što joj i samo ime kaže, temelji se na lančanoj reakciji polimeraze i specifičnim početnicama za određeni alel ili skupinu alela. Ukoliko specifične početnice ne odgovaraju slijedu nukleotida na ispitivanoj DNA, do umnažanja neće doći i rezultat je negativan.

Provjera umnoženih fragmenata vrši se uz pomoć elektroforeze na obojenom agaroznom gelu. Rezultati se dokumentiraju fotografiranjem reakcije kamerom u tamnoj komori. Reakcija se prema veličini specifičnih produkata PCR-a označava kao pozitivna ili negativna. Pozitivna reakcija mora se slagati s pozitivnom kontrolom. Dobiveni rezultati analiziraju se u za to namijenjenim programima (1).



**Slika 9.** PCR-SSP metoda

*Preuzeto s: <http://www.topdiag.com/top/0,27,tipizare-hla-ssp.html?sLang=en>*

#### 1.7.2.4. Izvođenje testa PCR-SSP

Nakon izolacije DNA iz uzorka pune krvi potrebno je napraviti reakcijsku mješavinu. Za nju nam je ponovo potreban Master Mix koji sadrži Taq polimerazu, destilirana voda te uzorak DNA. Ovakvu mješavinu (10 $\mu$ L) pipetiramo u jažice na Olerup SSP<sup>®</sup> pločici u kojima se već nalazi dehidrirana otopina početnica. Ista se stavlja u termoblok (OLERUP program) u kojem se događa amplifikacija DNA.

Umnožene fragmente potrebno je razdvojiti koristeći gel elektroforezu zajedno s bojom (etidni bromid, Simply Safe) te ih vizualizirati ispod UV svjetla. Osim

pozitivne kontrole kojom određujemo nastale produkte potrebna nam je i negativna kontrola koja upućuje na kvalitetu izvedenog testa. Rezultati se interpretiraju u programu Helmborg SCORE.



**Slika 10.** Vizualizacija rezultata PCR-SSP analize

*Preuzeto s:*

*<http://www.allenex.com/sv/transplantation/olerup-ssp/>*



## **1.8. Celijakija**

Celijakija (GE- glutenska enteropatija) je kronična upalna autoimuna bolest koja primarno utječe na proksimalne dijelove tankog crijeva (5). Bitne karakteristike su trajna (doživotna) nepodnošljivost glutena, različit stupanj oštećenja sluznice tankog crijeva i različit spektar kliničkih simptoma (10). Tipični simptomi uključuju nadutost, dijareju te posebno nenapredovanje (eng. FTT- failure to thrive) zbog malapsorpcije nutrijenata. Na molekularnoj razini, okidač celijakije predstavlja imuna reakcija na gluten u genetski predisponiranih osoba. Gluten je zastupljen u pšenici (žitlu), brašnu, raži, ječmu te u manjoj količini u zobi. Gotovo svi pacijenti s celijakijom imaju barem jednu kopiju ili HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 varijanti humanog leukocitnog antigena (HLA). Ipak ovi antigeni su relativno česti u europeida, a samo 1% osoba razvije bolest. S toga možemo zaključiti da na pojavu bolesti utječu i drugi faktori poput okolišnih čimbenika (9). Između ostalog, dokazana je i povezanost celijakije s drugim autoimunim bolestima poput dijabetesa tipa 1, autoimunog tiroiditisa te Sjögren sindroma, zbog čega ju neki smatraju bolešću cijelog organizma (8). Zlatni standard za dijagnozu celijakije su endoskopska biopsija tankog crijeva te serološka detekcija anti-tkivne transglutaminaze (anti-tTG) i/ili antiendomizijskih protutijela (EMA) (9).

### **1.8.1. Epidemiologija**

Samuel Gee (1839-1911.) je bio liječnik koji je celijakiju opisao kao jednom od rijetkih bolesti djetinjstva koja se pojavljuje u osoba europskog porijekla. Istraživanja iz 1985. godine procijenila su incidenciju celijakije na 0.1% populacije, dok ona danas iznosi ~1% . Simptomi mogu biti vrlo suptilni, a sama bolest može biti i asimptomatska zbog čega je veliki broj ljudi ostao nedijagnosticiran. Osim toga, kao što je prethodno navedeno, bolest je često opisana kao bolest europeida zbog čega se testovi na celijakiju kod drugih rasa rijetko provode. Kako su varijante HLA-DQ2 i HLA-DQ8 prisutne u svim rasama ovaj previd također rezultira netočnim podacima o incidenciji i prevalenciji celijakije (9).

Primjeri koji se uglavnom navode su oni iz 60. godina 20. stoljeća iz Švedske (1:250), Danske (1:5000) te SAD-a (1:3.500- 1:10.000). Velike razlike u incidenciji mogu se pripisati drugačijoj genskoj konstelaciji pojedinih populacija ali i nekim vanjskim čimbenicima poput nejednake koncentracije glijadinskih frakcija u brašnu, različitih prehrambenih navika i različitih dijagnostičkih postupaka.

Sve učestalija istraživanja celijakije posljednjih su godina imala veliki utjecaj na statističke podatke prevalencije i incidencije (10).

### **1.8.2. Patološke promjene**

Morfološke promjene tankog crijeva uglavnom se odnose na promjene na sluznici koje možemo utvrditi jedino uzimanjem bioptata. Uzorci se najčešće obrađuju metodama svjetlosne mikroskopije, no nerijetko se u dijagnostiku moraju uključiti i histokemijske, enzimske i elektronskomikroskopske analize.

Osnovni kriterij dijagnoze očituje se kao vilozna atrofija koja mijenja arhitekturu sluznice tankog crijeva. Resice postaju zadebljane i skraćuju se, a u težim oblicima bolesti dolazi do potpune promjene njihovog izgleda pa se može uočiti i potpuno izravnata površina sluznice.

Za nalaz je neophodno izvršiti mikrometrijsku analizu uzorka bioptata koja nam jedina daje precizne bročane pokazatelje stupnja oštećenja sluznice (10).

### **1.8.3. Etiopatogeneza i dijagnostika**

Glavnu poveznicu između genetskih čimbenika i razvoja celijakije predstavlja prisustvo određenih tipova humanog antigena HLA. U dijagnostici se najčešće analizira veza između gena za HLA-DQ2 i HLA-DQ8 čiji pozitivni rezultat ide u prilog dijagnozi celijakije.

Ipak, kako bi došlo do razvoja bolesti, osim HLA-DQ gena i glutena potreban nam je i treći faktor koji djeluje kao posrednik između genetske predispozicije i same

bolesti (9). Kao najvjerojatniji faktor spominje se autoantigen tkivna transglutaminaza (tTG). Tkivna transglutaminaza je enzim s kojim reagiraju endomizijska protutijela, a isti se najčešće analizira vrlo preciznim testom poznatim kao EMA test. On ima vrlo bitnu ulogu u celijakiji jer katalizira deaminaciju glutaminskih ostataka u glutenskih peptida. Na taj način povećava njihov afinitet za vezanje s HLA molekulama, posljedično ubrzavajući aktivaciju T stanica. Nadalje, tTG također deaminira glijadinsku frakciju glutena čime mijenja njegovu strukturu i omogućava svoje vezanje na njega tvoreći pritom stabilnu strukturu. Istraživanja pokazuju da se tek nakon ovog procesa gluten pojačano veže na DQ2 molekule antigen-prezentirajućih stanica (npr. makrofagi) i stimulira HLA-DQ2 determinirane CD4+ limfocite T lamine proprije. T stanice ne mogu prepoznati „toksični“ dio glijadina ukoliko isti nije vezan na površinu molekule HLA (10).

Celijakija se prezentira brojnim imunološkim poremećajima od kojih se neki koriste i za njegovu dijagnozu. Među jedne od analiza ubraja se nalaz cirkulirajućih antitijela na glijadinske frakcije u serumu bolesnika (AGA). Ipak, 25% pozitivnih nalaza može se povezati i s drugim bolestima probavnog sustava zbog čega se, samostalno, ne može smatrati pouzdanim dijagnostičkim pokazateljem bolesti. Antiretikulinska protutijela (ARA) ne potječu iz hrane, no u aktivnoj celijakiji imaju vrlo visoku specifičnost od čak 96 do 100%, dok im je osjetljivost od 16 do 76%. Već spomenuta antiendomizijska protutijela (EMA) su također visoko specifična te su pozitivna kod gotovo svih neliječenih pacijenata. Ona zajedno s specifičnim anti tTG protutijelima (stvaraju se u crijevnoj sluznici) predstavljaju važnu ulogu u dijagnostici celijakije (9,10).

Ipak, nijedan od navedenih testova ne može zamijeniti biopsiju sluznice tankog crijeva koja ostaje glavni dijagnostički alat.

#### **1.8.4. Klinička slika**

Klinički simptomi variraju od blagih, jedva uočljivih, do vrlo izraženih i teških. Bolest se uglavnom prezentira u ranoj životnoj dobi tj. između 7. i 24. mjeseca života. S obzirom da se tada javljaju za celijakiju vrlo tipični simptomi, dijagnoza

je lakša nego kod osoba čiji se prvi simptomi pojavljuju u sedmom ili osmom desetljeću života. Glavni simptomi kod djece uključuju kronični proljev, povraćanje, abdominalnu distenziju, mršavljenje, anoreksiju, razdražljivost te zaostatak u rastu i razvoju (10). Stariji pacijenti imaju atipične i manje izražene simptome poput manjka energije (uzrokovanog anemijom), deficijencije željeza, folne kiseline, vitamina K, vitamina D i vitamina B12. Manjak ovih elemenata rezultira malapsorpcijom ostalih nutrijenata (9).

Najozbiljnije komplikacije GE su predmaligna stanja i maligne bolesti te karcinomi i limfomi crijeva koji se javljaju većinom u nedijagnosticiranih bolesnika koji s toga ne slijede bezglutensku dijetu (10).

### **1.8.5. Liječenje i prognoza**

Temelj liječenja je doživotna bezglutenska dijeta koja se primjenjuje bez obzira na izraženost kliničkih simptoma (ukoliko je oštećenje sluznice dokazano vezano za konzumaciju glutena). Iako je gluten čimbenik koji nedvojbeno dovodi do GE, osjetljivost varira među bolesnicima, ali i u iste osobe u različitoj životnoj dobi i fazama bolesti. Osim izbjegavanja glutena prehrana mora biti bogata i bjelančevinama, mineralima i proteinima.

Prognoza bolesti je odlična ukoliko se pacijent pridržava propisane dijetu. Već nakon nekoliko tjedana tj. mjeseci dolazi do potpune normalizacije stolice i oporavka crijevne sluznice. Neprovođenje bezglutenske dijetu pak nosi rizik od razvoja malignih bolesti crijeva, a u krajnjem slučaju može rezultirati i smrću (10).

## **1.9. Povezanost sustava HLA i celijakije**

Celijakija je multifaktorska kronična bolest tankog crijeva koja se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi. Simptome uzrokuje netolerancija na gluten koji se nalazi u pšenici, raži i ječmu. S obzirom da se bolest uvriježeno smatra autoimunom, za

njen razvoj potrebna je snažna genska predispozicija. Brojnim istraživanjima najveća je povezanost bolesti dokazana s genima lokusa HLA-DQA1 i HLA-DQB1 koji su odgovorni za produkciju brojnih heterodimera izraženih na površini antigen prezentirajućih stanica. *HUGO- Gene Nomenclature Committee* je navedene gene razreda II imenovao CELIAC1 (11). Objavljeni rezultati navode da bi u budućnosti detekcija HLA haplotipa koji predstavljaju rizik razvoju bolesti bila efektivna za skrining populacije. Posebno zbog njihove visoke negativne predikativne vrijednosti koja je vrlo blizu stopostotnoj osjetljivosti (11–14).

Prvi dokaz povezanosti sustava MHC i celijakije utvrđena je prije nešto manje od 50 godina kada je bolest dovedena u svezu s antigenom lokusa HLA razreda II, HLA-B8. Intenzivnim istraživanjima povezanosti sustava HLA i celijakije, razni autori navode i vezu s antigenima HLA-A1, HLA-DR3, HLA-DR7, HLA-DQ2 te HLA-DQ8. Asocijacija između navedenih antigena objašnjena je neravnotežom udruživanja koja predstavlja jedan od fenomena sustava HLA.

Aleli (HLA-DQA1 i HLA-DQB1) su odgovorni za stvaranje više različitih heterodimera od kojih su glavni predispozicijski HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8. Oni su receptori koji se nalaze na površini antigen prezentirajućih stanica te sudjeluju u patogenezi celijakije (12).

HLA-DQ2 receptor, kao takav, postoji u obliku dvije različite konfiguracije- cis i trans<sup>3</sup>. Cis konfiguraciju označavamo kao HLA-DQ2.5 (ili samo DQ2.5) te se prema njoj još referiramo i kao prema DR3-DQ2 haplotipu kodiranom HLA-DQA1\*05:01- HLA-DQB1\*02:01 alelima. U trans konfiguraciji poznajemo dva haplotipa DQ2.2 (DR7-DQ2<sup>4</sup>) i DQ7.5 (DR5/6-DQ7) koje definiraju aleli: HLA-DQA1\*02:01-HLA-DQB1\*02:02(za DQ2.2) te HLA-DQA1\*05:05- HLA-DQB1\*03:01 (DQ7.5) (13). Primjetno je da su aleli ove dvije konfiguracije skoro identični zbog čega jedinice DR3-DQ2 i DR5-DQ7/ DR7-DQ2 prezentiraju skoro istovjetnu, HLA-DQ molekulu (15).

---

<sup>3</sup> Cis konfiguracija- aleli koji se nalaze na istom kromosomu te se nasljeđuju zajedno

Trans konfiguracija- aleli koji se nalaze na dva homologna kromosoma i nasljeđuju odvojeno (16)

<sup>4</sup> Regije na p kraku šestog kromosoma koje kodiraju DR i DQ haplotipove nalaze se vrlo blizu jedna drugoj te se s toga vrlo često nasljeđuju zajedno (15).

**Tablica 3.** Pregled genetske ovisnosti HLA i celijakije

*Podatci preuzeti iz: (13,15)*

Antigeni	Haplotip		Aleli
HLA-DQ2	Cis	HLA-DQ2.5 (DR3-DQ2)	HLA-DQA1*05:01 HLA-DQB1*02:01
	Trans	HLA-DQ2.2 (DR7-DQ2)	HLA-DQA1*02:01 HLA-DQB1*02:02
		HLA-DQ7.5 (DR5/7- DQ7)	HLA-DQA1*05:05 HLA-DQB1*03:01
HLA-DQ8		HLA-DQ8 (DR-DQ8)	HLA-DQA1*03 HLA-DQB1*03:02

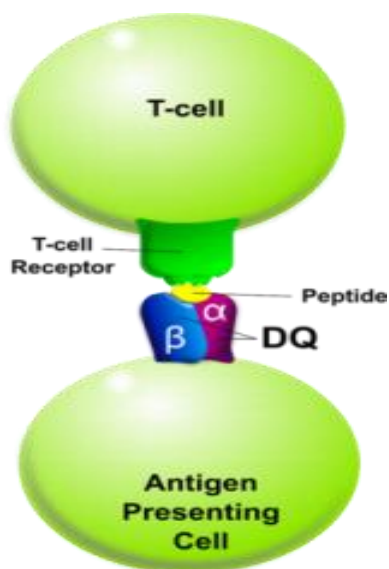
HLA-DQ8 receptor se prezentira kao DQ8 haplotip, poznat i kao DR-DQ8 kojeg kodiraju aleli HLA-DQA1\*03-HLA-DQB1\*03:02. Uzimajući u obzir skoro stopostotnu prisutnost barem jednog od navedenih heterodimera u pacijenata s celijakijom, oko 90% njih nose HLA-DQ2, a većina preostalih 10% HLA-DQ8 (13).

Većina oboljelih od celijakije koji su DQ2./DQ8 negativni stvaraju molekule DQ2.x koje pak kodiraju DQB1\*02 riskantni aleli u odsustvu DQA1\*05 varijante. Vrlo rijetko pacijenti prezentiraju neke druge DQ molekule poput DQX.5 (DQA1\*05 u odsustvu DQB1\*02/\*03:02) te DQX.x koje formira DQA1≠\*05 alfa i DQB1≠\*02/ ≠\*03:02 beta lanac (16).

Osnovna asocijacija HLA-DQ molekula u pacijenata s celijakijom je dokazana testovima provedenima na CD4+ T limfocitima. Antigen prezentirajuće stanice koje na sebi nose heterodimere DQ2.5/DQ8 prikazuju visok afinitet za negativno nabijene aminokiseline (16). Gluten ih pak skoro i ne sadrži pa do otkrića njegove

veze s tTG (engl. *Tissue transglutaminase*) nije bilo jasno na koji način nastaje taj kompleks. Diskrepancija je riješena kada se došlo do saznanja da enzim tTG pretvara glutaminom bogat gluten u glutaminsku kiselinu stvarajući negativni naboj potreban za vezanje s DQ2 molekulama (17). Sve bitne interakcije dešavaju se u centralnoj regiji devet aminokiselinskih ostataka čiji se lateralni lanci vežu na pozicije P1, P4, P6, P7 i P9 DQ molekula. Heterodimer DQ2.5 veže negativno nabijene lance peptida na pozicijama P4, P6 i P7 dok molekula DQ8 isto čini na pozicijama P1 i P9.

Poznato je da osim sigurne povezanosti ovih heterodimera i celijakije na istu utječu i neke druge DQ molekule. Pokrenuta su brojna istraživanja s ciljem objašnjenja točnog mehanizam koji dovodi do razvoja celijakije. Najvažniji korak je prezentacija glutenskih peptida CD4+ T limfocitima koja stimulira kako imuni tako i humoralni odgovor. Istraživanja su dokazala da lučenje citokina (TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) potiče fibroblaste na ekskreciju MMP-1 i MMP-2 enzima. Navedeni enzimi u crijevima uzrokuju atrofiju vila i hiperplaziju kripti. Osim toga sazrijevanje B stanica rezultira stvaranjem autoantitijela protiv TG2 i TG2- gluten kompleksa (16).



**Slika 11.** Prezentacija peptida T staničnim receptorima

Preuzeto iz: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TCELL-APC\\_DQ.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TCELL-APC_DQ.png)

Rezultati istraživanja su suglasni da najveći broj pacijenata s celijakijom nosi HLA-DQ2.5 heterodimer, i to u postotku od 96%. Također, ispostavilo se da najveći rizik kod nosioca navedenog heterodimera predstavlja alel HLA-DQB1\*02 kod homozigota (veća vjerojatnost) ali i heterozigota za heterodimer DQ2.5/DQ2.2 (13,15). Sljedeći najučestaliji haplotip je DQ8 koji se, ako isključimo DQ2.5, javlja u 53% pacijenata. Kod njega su također pronađene razlike između pojave bolesti u homozigota tj. heterozigota koja ide u prilog homozigotima (13,15). DQ2.2 haplotip predstavlja treći najfrekventniji faktor rizika uočen u 37% pacijenata. Nisu pronađene razlike između homozigotnih i heterozigotnih nositelja (13). Povezanost ovog heterodimera (DQ2.2- HLA-DQA1\*02:01- HLA-DQB1\*02:02) i celijakije nije znanstveno prihvaćena. Kao primjer navodi se istraživanje provedeno u Brazilu koje nije pronašlo poveznicu DQ2.2 varijante i razvoja GE. Od 100 oboljelih njih samo 5% je bilo pozitivno na ovaj heterodimer (14).

Jedno istraživanje provedeno u Hrvatskoj, pri Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci, tražilo je povezanost određenih alela s GE. Ispitivanje je uključivalo 110 pacijenata (60 žena i 50 muškaraca) s dijagnosticiranom celijakijom. Rezultati su potvrdili od prije poznate podatke prema kojima su najzaslužniji geni HLA-DQA1 i HLA-DQB1 (svi pacijenti su imali barem jedan alel) s alelima HLA-DQA1\*05 i HL-DQB1\*02 koji kodiraju HLA-DQ2 protein (11). Jedino ti aleli smatraju se dijagnostički relevantnima u potvrdi celijakije (16).

Osim već opisane razlike između homozigota i heterozigota u ovisnosti o alelima, serološkim testiranjima za HLA-DR potvrđeno je da pacijenti koji izražavaju DR3/DR3 te DR3/DR7 proteine nose povećan rizik u odnosu na heterozigote za DR3 (15). Rezultati jednog drugog istraživanja provedenog na 6403 djece s haplotipom DR3-DQ2 i DR4-DQ8 pokazuju da DR3-DQ2 homozigotnost predstavlja čak 2.5 puta veću vjerojatnost za razvoj celijakije od DR3-DQ2 haplotipa (18).

Nadalje, dokazana je i povišena frekvencija, u ovom slučaju, DR3-DQ2 haplotipa kod djece u čijoj se obitelji isti prezentiraju (16,18). Osim obiteljske veze, zanimljivo, vidljive su i asocijacije temeljene na spolu pacijenata- žene koje boluju od celijakije su često pozitivne na DQ2.5 i/ili DQ8 molekule dok su muškarci na



navedene antigene uglavnom negativni. S obzirom da je povezanost evidentnija u bijelaca, istraživanje provedeno u Latinskoj Americi pokazalo je da čak 9% pacijenata negativnih za HLA-DQ2/DQ8 naposljetku ipak razvije celijakiju (14).

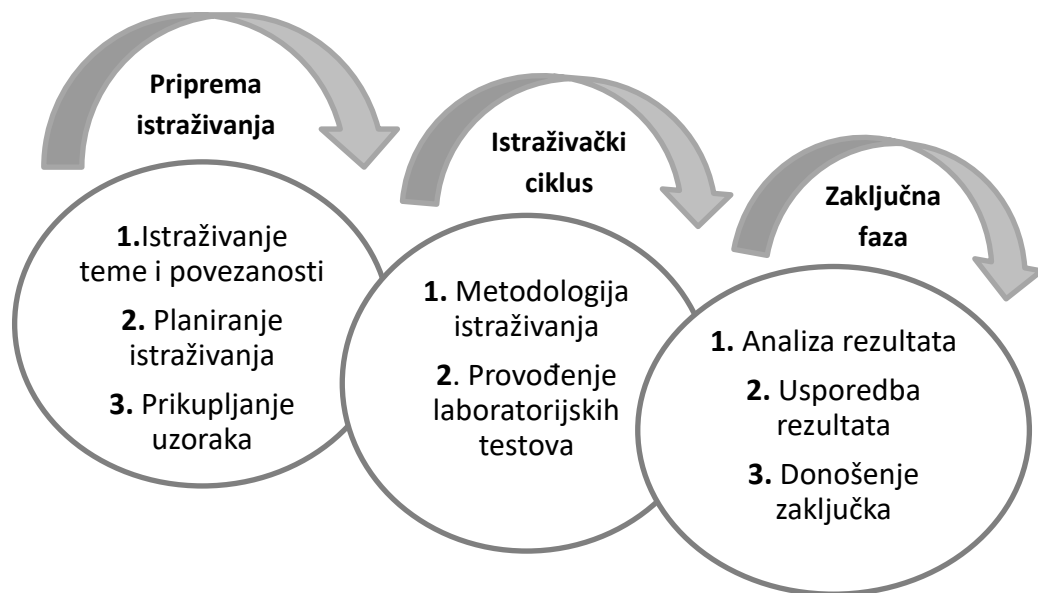
Iz svega navedenog vidljivo je da je povezanost apsolutno potvrđena te se s toga ispravno koristi u dijagnostičke svrhe. U Hrvatskoj se za predispoziciju razvoja celijakije analiziraju HLA-DQB1\*02 te HLA-DQB1\*03:02 visoko specifični aleli. Zbog toga je utvrđivanje istih, te pronalazak povezanosti s navedenom bolešću, postavljen za cilj provedenog istraživanja.

## 2. CILJ RADA

Cilj rada je objasniti povezanost sustava HLA i celijakije te istražiti kolika je učestalost alela lokusa HLA-DQA i DQB kod pacijenata oboljelih od celijakije.

Od istraživanja se očekuje da će najveći broj oboljelih od celijakije prezentirati alele rizične za razvoj upravo te bolesti. Također, da će se postotak osoba referiranih na testiranje zbog sumnje na celijakiju prezentirati statistički značajnu, višu, frekvenciju alela u odnosu na kontrolnu skupinu (HLA-DQB1\*02).

**Tablica 4.** Shema izrade rada



### **3. IZVORI PODATAKA I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

U Laboratoriju za tipizaciju tkiva (Zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Split) provedeno je retrospektivno istraživanje koje je obuhvatilo 249 pacijenata koji čine dvije skupine. Pedeset pacijenata koji su upućeni u laboratorij na tipizaciju tkiva sa sumnjom na celijakiju (dalje u tekstu: prva skupina) u periodu tijekom 2016-2017. godine te kontrolnu skupinu (dalje u tekstu: druga skupina) od 199 ispitanika zdrave populacije Splitsko-dalmatinske županije (dobrovoljni darivatelji krvi).

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Izolacija DNA**

Iz uzoraka pune krvi s EDTA koagulansom svih ispitanika i kontrolne skupine izolirana je DNA. Za izolaciju DNA je korišten komercijalni kit firme Roche Diagnostics (High Pure PCR Template Preparation Kit), a izolirana DNA je pohranjena u frižideru na temperaturi od -20°C do vremena izvođenja testa.

##### **3.2.2. PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*)**

Aleli lokusa razreda II (HLA-DQA1/HLA-DQB1) određeni su pomoću komercijalnih kitova tvrtke Immucor (Lifecodes HLA DQA1/B1 SSO Typing kit, lot. 3004970) po protokolu proizvođača (str. 16-19.). Za očitavanje rezultata koristio se Luminex uređaj (Luminex LX 100/200 Analyser), a rezultati su analizirani na Match-IT DNA software-u (version 1.2, baza podataka 3.29.).

### **3.2.3. Statistička obrada podataka**

Učestalost alela lokusa HLA-DQA1 i HLA-DQB1 sustava HLA određena je direktnim brojanjem. Za usporedbu razlike između ispitivane i kontrolne skupine korištena je 2x2 tablica, a za vrijednosti manje od 5 korišten je Fisher-ov egzaktni test (statistički značajnim rezultatom smatran je svaki kojem je vrijednost  $P < 0,05$ ). Podaci su statistički obrađeni pomoću on-line web alata VassarStats (30).

## 4. REZULTATI

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 249 ispitanika populacije Splitsko-dalmatinske županije koji su podijeljeni u dvije skupine. Prva skupina su pacijenti koji su poslani na tipizaciju zbog sumnje na celijakiju (N=50) dok je druga, kontrolna skupina, sastavljena od 199 nasumično odabranih zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi (N=199). Rađena je analiza HLA-DQA1 i HLA-DQB1 lokusa čija je distribucija i frekvencija fenotipova prikazana u tablici 5. Za rizične alele smatramo HLA-DQB1\*02 i HLA-DQB1\*03:02.

U skupini pacijenata koji su na tipizaciju poslani s sumnjom na celijakiju među HLA-DQB1 alelima najzastupljeniji je HLA-DQB1\*02 (27%), zatim HLA-DQB1\*05 (21%), HLA-DQB1\*03 (20%), te HLA-DQB1\*03:02 (16%) i HLA-DQB1\*06 (16%) koji imaju istu frekvenciju. Alel HLA-DQB1\*04 nije pronađen ni kod jednog pacijenta. Rizični aleli (HLA-DQB1\*02 i HLA-DQB1\*03:02) identificirani su u 43% ispitanih.

U kontrolnoj skupini, među HLA-DQB1 alelima najveću učestalost redom imaju HLA-DQB1\*05 (26.9%), HLA-DQB1\*06 (23.8%), HLA-DQB1\*03 (03:01+03:x)<sup>5</sup> (21.1%), HLA-DQB1\*02 (15.3%), HLA-DQB1\*03:02 (10.1%) te HLA-DQB1\*04 (2.8%). Rizični aleli (HLA-DQB1\*02 i HLA-DQB1\*03:02) pronađeni su u 25.4% ispitanih.

Rezultati tipizacija alela lokusa HLA-DQA1 nisu uključeni u rezultate rada zbog njihove nekompletne tipizacije. Posljedično, isti nisu pokazali statističku značajnost.

---

<sup>5</sup> Svi HLA-DQB1\*03 aleli izuzev HLA-DQB1\*03:01 te HLA-DQB1\*03:02.

**Tablica 5.** Rezultati tipizacije HLA-DQB1 alela

*AF – frekvencija alela, n – broj pojavljivanja određenog alela, N=broj ispitanika (2N=ukupan broj alela u populaciji)*

ALEL	PACIJENTI S KLINIČKOM SLIKOM CELIJAKIJE (N=50)		KONTROLNA SKUPINA (N=199)		p
	BROJ ALELA (n)	FREKVENCIJA (AF)	BROJ ALELA(n)	FREKVENCIJA (AF)	
DQB1*02	27	0.27	61	0.153	0.0083
DQB1*03:02	16 (03:02 +neutvrđeno)	0.166	40	0.101	0.1100
DQB1*03	20	0.2	84 (03:01+03:x)	0.211	0.8909
DQB1*04	-	0.0	11	0.028	0.1318
DQB1*05	21	0.21	107	0.269	0.2512
DQB1*06	16	0.16	95	0.238	0.1067

Nakon analize HLA-DQB1 gena, statističkom analizom izračunata je p vrijednost tj. vjerojatnost točnosti/ netočnosti rezultata i njihove statističke značajnosti ( $p < 0.05$ - statistički značajan rezultat). Statistički značajne razlike utvrđene su za rizični alel HLA-DQB1\*02 ( $p = 0.0083$ ) dok je za alel HLA-DQB1\*03:02 primjetna viša frekvencija u skupini pacijenata s kliničkom slikom celijakije (AF=0.166) u odnosu na kontrolnu grupu (AF=0.101), no ona ipak nije statistički značajna ( $p = 0.1100$ ).

Očekivano, kod drugih alela p vrijednost je  $> 0.05$  što rezultate čini statistički neznačajnima tj. povezanost istih nije pronađena među dvima skupinama. Alel HLA-DQB1\*03 imao je p vrijednost od 0.8909, HLA-DQB1\*04 od 0.1318, HLA-DQB1\*05 od 0.2512 te HLA-DQB1\*06 od 0.1067.

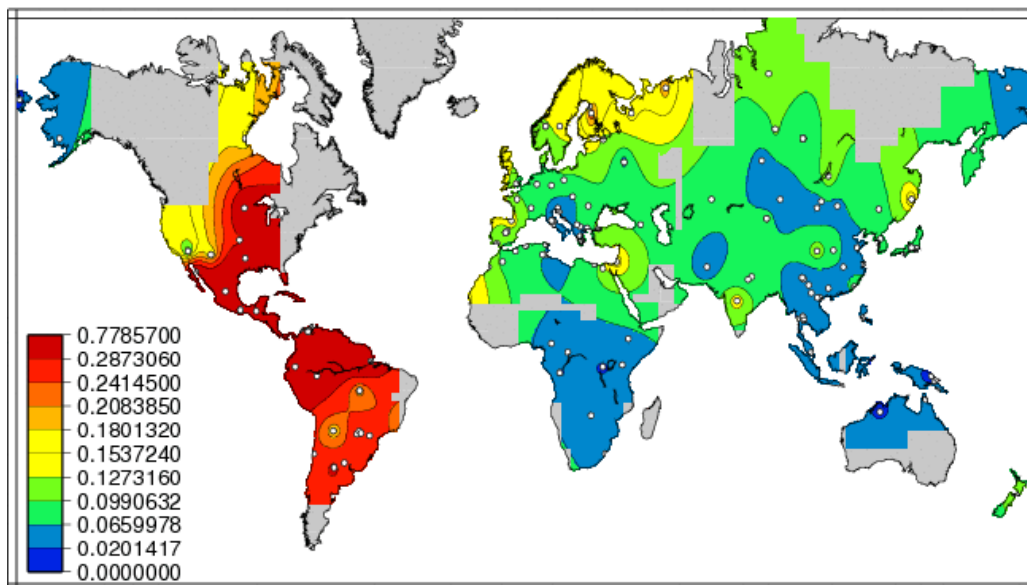
## 5. RASPRAVA

Prva poveznica između HLA i celijakije opisana je još 1970-ih godina. Ipak u to vrijeme, zbog nedovoljno napredovalih tehničkih mogućnosti veza nije mogla biti detaljnije opisana. Tek je 2012. godine uloga HLA u dijagnozi celijakije široko priznata te se danas koristi u svrhu odbacivanja dijagnoze (visoka negativna predikativna vrijednost) ili u svrhu dokazivanja genetske predispozicije za istu (13).

Velika većina istraživanja dala su iste rezultate. Genotipovi za HLA-DQ2 (HLA-DQB1\*02:01) i HLA-DQ8 (HLA-DQB1\*03:02) najprisutniji su u pacijenata s celijakijom (11,19). Dva navedena heterodimera su prema rezultatima jednog istraživanja bila prisutna u čak 98.4% oboljelih od celijakije (19). Pri nedostatku istih preporučeno je u obzir uzeti i alele koji kodiraju DQ2.5 (HLA-DQA1\*05 ili HLA-DQB1\*02) (20). Ipak, frekvencija pojave navedenih genotipova i njihovih pripadajućih alela znatno se razlikuje u populaciji. Već je opisana razlika učestalosti između Europe i Južne Amerike, sjeverne i južne Europe ali čak i među susjednim državama (11,14,20,21). Tako je jedno istraživanje provedeno na hrvatskoj populaciji odredilo prisutnost HLA-DQ2 heterodimera u 92.7% te HLA-DQ8 u 20.9% pacijenata. S druge strane u talijanskih pacijenata frekvencija HLA-DQ2 iznosila je 83.8% dok je istraživanje provedeno u Nizozemskoj, Velikoj Britaniji i Irskoj za rezultat dobilo frekvenciju HLA-DQ8 od 10% (11).

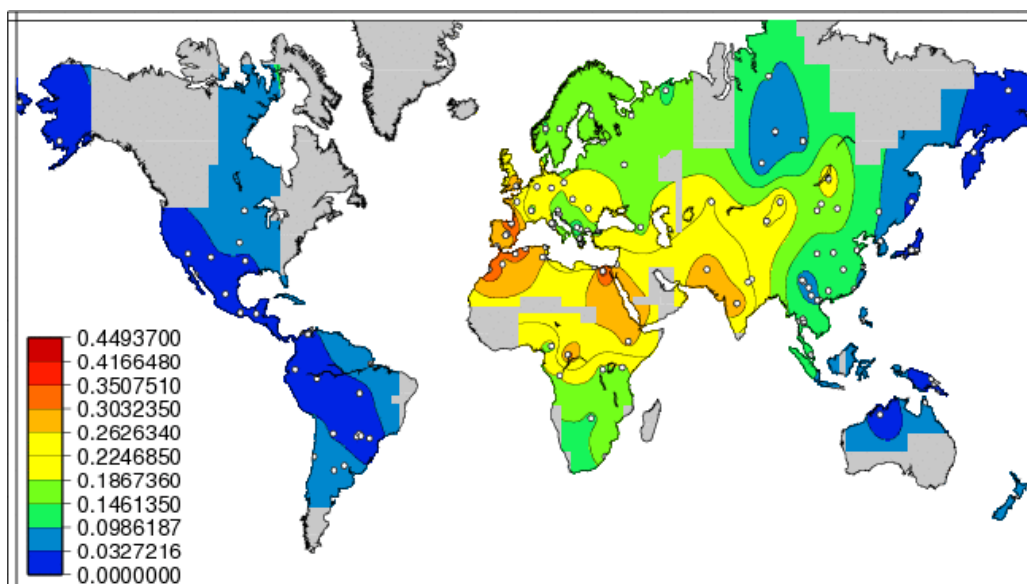
Nadalje, istraživanje provedeno u Siriji također potvrđuje opisanu vezu. Velika većina pacijenata s simptomima indikativnima za celijakiju prezentirala su ili HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 heterodimere. Svi su pak pacijenti s teškim simptomima celijakije bili homozigoti za alele koji kodiraju dva navedena heterodimera. Čak 87.8% pacijenata bili su nosioci ili DQB1\*02:01 ili DQB1\*03:02 alela (21).

U prilog velike disproporcije u rasprostranjenosti alela ide i istraživanje provedeno na saudijskoj populaciji u kojoj čak 52.7% populacije nosi HLA-DQ genotipove povezane s razvojem celijakije (22). Ipak, taj postotak u europskoj populaciji iznosi 25-30% (31).



**Slika 12.** Rasprostranjenost HLA-DQB1\*03:02 alela u svijetu

*Preuzeto s: <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DQ.php.html> (32)*



**Slika 13.** Rasprostranjenost HLA-DQB1\*02:01 alela u svijetu

*Preuzeto s: <http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-DQ.php.html> (32)*



Rasprostranjenost HLA-DQB1\*03:02 u svijetu se, očekivano, znatno razlikuje u različitim populacijama. Frekvencija je vidljivo najviša u Latinskoj Americi a najniža u južnim dijelovima Afrike te na jugoistoku Azije. Ipak, istraživanja pokazuju da je u Južnoj Americi povezanost alela koji se smatraju za predispoziciju celijakije niža od prosjeka (<1%) te s toga veći broj (9%) pacijenata negativnih na rizične alele razvije bolest (14%). Velika je razlika i u rasprostranjenosti u Europi pa je tako frekvencija viša na sjeveru nego na jugu što potvrđuju brojni izvori ali i ovo provedeno istraživanje (10,11) Ako usporedimo frekvenciju koja obuhvaća Hrvatsku (prema prikazanim podacima) s frekvencijom kontrolne skupine rada, primjećujemo da je učestalost HLA-DQB1\*03:02 nešto viša od prosječne. Ovaj podatak možemo objasniti malom obuhvaćenosti populacije u provedenom istraživanju (slika 12). Osim toga, prema prosjeku, Hrvatska se nalazi na visokom petom mjestu prema učestalosti HLA-DQB1\*03:02 alela (slika 14)

Rasprostranjenost HLA-DQB1\*02:01 je u Južnoj Americi pak niža negoli u Europi u kojoj je frekvencija, kao i u HLA-DQB1\*03:02 viša na sjeveru (slika 13).

HLA > Allele Frequency Search > Classical

Please specify your search by selecting options from boxes. Then, click "Search" to find HLA allele frequencies that match your criteria. **Remember at least one option must be select**

Locus: [All loci] Starting Allele: DQB1\*03:02 Ending Allele: DQB1\*03:02 > (Type your allele e.g. A\*01:01, etc. or leave both empty to include all alleles)

Select specific alleles (If you want to pick specific alleles, make sure your alleles are within the Start-End range above)

Select specific populations

Population: [All populations] Country: [All countries] Source of dataset: [All Sources]

Region: [Europe] Ethnic Origin: Type of Study: Sort by: Population, Highest to Lowest Frequency

Sample Size: Sample Year: Level of resolution: (Click here for further details)

Population standard:  Gold only  Gold and Silver  All Show frequencies:  All  Only positives  Only negatives

Displaying 1 to 87 (from 87) records Pages: 1 of 1

Line	Allele	Population	% of individuals that have the allele	Allele Frequency (in decimals)	Sample Size	IMGT/HLA <sup>1</sup> Database	Distribution <sup>2</sup>	Haplotype <sup>3</sup> Association	Notes <sup>4</sup>
1	DQB1*03:02	Austria	13.5	0.0720	200	See			
2	DQB1*03:02	Azores Terceira Island		0.0970	130	See			
3	DQB1*03:02	Belgium	21.2	0.1110	99	See			
4	DQB1*03:02	Belgium pop 2	14.0	0.0730	715	See			
5	DQB1*03:02	Croatia Gorski Kotar Region		0.0890	63	See			

**Slika 14.** Učestalost HLA-DQB1\*03:02 alela u Europi

*Preuzeto s: <http://www.allelefreqencies.net/default.asp>*

Osim same poveznice između HLA-DQ genotipova i celijakije opisane su i razlike u vjerojatnosti pojave i težine same bolesti u heterozigota i homozigota. Homozigoti dokazano nose povećan rizik u odnosu na heterozigote. Nadalje, pronađena je i obiteljska veza te asocijacije temeljene na spolu pacijenta (15,16,18).

Istraživanje provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama, na pacijentima s potvrđenom dijagnozom celijakije, tražilo je povezanost te bolesti s alelima HLA-DQA1\*05 i HLA-DQB1\*02. Čak 79 od 84 pacijenta s celijakijom prezentiralo je jedan od dva navedena alela dok je iz kontrolne grupe iste alele imao 1 ispitanii od ukupno 102. Osim toga istraživanje je pokazalo da pojava HLA-DQB1\*02 alela u obliku heterozigota predstavlja čak pet puta veću opasnost za razvoj celijakije od heterozigota istog alela. Ovi rezultati potvrđuju sve prethodno opisane rezultate dobivene drugim istraživanjima. Upućuje na visoku negativnu predikativnu vrijednost kojim se sa skoro stopostotnom vjerojatnošću može odbaciti dijagnoza celijakije (23).

Tipizacija HLA se ne koristi kao potvrda dijagnoze jer pozitivan nalaz na rizične alele nije apsolutno povezan s razvojem bolesti. Brojni drugi faktori utječu na isto, poput činjenice da nisu otkriveni svi aleli niti sve njihove kombinacije koje stvaraju genetsku predispoziciju. Osim toga, navedeni aleli se povezuju i s drugim bolestima poput dijabetesa tipa I snižavajući specifičnost primjene ovakvog načina dijagnoze.

Cilj rada bio je usporediti rezultate provedenog istraživanja s rezultatima objavljenim u brojnim znanstvenim člancima koji se bave ovom tematikom. Rezultati koji su pokazali statistički značajnu razliku između dvije ispitivane skupine idu u prilog svemu navedenom u ovom radu. Dokazana je povezanost HLA-DQB1\*02 alela ( $p=0.0083$ ), koji kodira serološki ekvivalent DQ2, s razvojem celijakije u populaciji Splitsko- dalmatinske županije. Iako statistički nije potvrđena značajna razlika za alel HLA-DQB1\*03:02 ona je ipak vidljiva pri usporedbi frekvencija.

Kao nedostatak rada može se navesti relativno mali broj ispitanih u odnosu na populaciju. Iz ovog razloga nije dokazana statistički značajna razlika između dviju tipiziranih skupina za alel HLA-DQB1\*03:02. Kako bi rezultati bili što točniji i

precizniji potrebno je proširiti istraživanje na veću skupinu ljudi. Osim toga, u radu smo za istraživanu skupinu uzeli osobe s kliničkom slikom karakterističnom za celijakiju no nemamo podatke o broju pacijenata kojima je bolest u konačnici i dijagnosticirana. Unatoč navedenom, rad ima nesumnjiv značaj jer daje podatke o HLA genotipovima hrvatskih pacijenata s sumnjom na celijakiju.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Dobiveni rezultati pokazali su da su najzastupljeniji aleli među pacijentima oboljelima od celijakije HLA-DQB1\*02 i HLA-DQB1\*03 (HLA-DQB1\*03:02), dok je u kontrolnoj skupini zdravih darivatelja krvi Splitsko-dalmatinske županije najučestaliji alel HLA-DQB1\*05.
2. Učestalost alela lokusa HLA-DQB1\*02 kod ispitanika oboljelih od celijakije na području SDŽ je statistički značajno veća od učestalosti u kontrolnoj skupini, dok je alel HLA-DQB1\*03:02 nešto učestaliji u populaciji pacijenata, no ne statistički značajno.
3. Ovi rezultati ukazuju na povezanost alela HLA-DQB1\*02 i celijakije te su u skladu s istraživanjima provedenima kako u hrvatskoj tako i u europskim populacijama.

## 7. LITERATURA

1. Fuggle S V., Taylor CJ. Histocompatibility and Immunogenetics. Handb Ren Pancreat Transplant. 2012. 55–75.
2. Thorsby E. A short history of HLA. Tissue Antigens. 2009. 74(2):101–16.
3. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. J Hum Genet 2009. 54(1):15–39
4. Shankarkumar U. The Human Leukocyte Antigen ( HLA ) System. 2004. 4(2):91–103.
5. Jin P, Wang E. Polymorphism in clinical immunology - From HLA typing to immunogenetic profiling. J Transl Med. 2003. 1:1–11.
6. Costantino PR, Zeck SC, da Silva WA, Bicalho M da G. Human leukocyte antigen allele linkage disequilibrium and haplotype structure in volunteer bone marrow donors of Paraná State. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2017;39(3):229-236.
7. Jacek Nowak, Renata Mika-Witowska, Elzabieta Graczyk-Pol. Genetic Methods of HLA Typing. In: Michal Witt, Tomasz Szczepanski, Malgorzata Dawidowska. Molecular Aspects of Hematologic Malignancies. Springer Science+Business Media; 2012. 325-339.
8. Troncone R, Discepolo V. Celiac disease and autoimmunity. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014. 59(1):9–11.
9. Byrne G., Feighery C.F. (2015) Celiac Disease: Diagnosis. In: Ryan A. (eds) Celiac Disease. Methods in Molecular Biology, vol 1326. Humana Press, New York, NY
10. Votava-Raić A, Tješić-Drinković D, Omerza L. CELIJAKIJA Coeliac Disease. 2006. 2(2):133–53.

11. Sinčić BM, Čizmarević NS, Licul V, Crnić-martinović M, Ristić S, Kapović M. HLA-DQA1 i HLADQB1 geni u pacijenata s celijakijom HLA-DQA1 and HLADQB1 genes in celiac disease. 2016. 52(1):87–94.
12. Díaz-redondo A, Miranda-bautista J, García-lledó J, Gisbert JP, Menchén L. The potential usefulness of human leukocyte antigen typing for celiac disease screening : A systematic review and meta-analysis. 2015. 107:423–9.
13. Martínez-Ojinaga E, Molina M, Polanco I, Urcelay E, Núñez C. HLA-DQ distribution and risk assessment of celiac disease in a Spanish center. *Rev Esp Enferm Dig* . 2018.;110.
14. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC de, Pratesi CB, Nobrega YK de M, Gandolfi L. Prevalence of Celiac Disease Predisposing Genotypes, Including Hla-Dq2.2 Variant, in Brazilian Children. *Arq Gastroenterol* 2018. 55(1):82–5.
15. Sollid LM. The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. *Immunogenetics*. 2017. 69(8–9):605–16.
16. Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: Practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci*. 2012.19(1):1–5.
17. Stepniak D, Wiesner M, de Ru AH, Moustakas AK, Drijfhout JW, Papadopoulos GK, i ostali. Large-scale characterization of natural ligands explains the unique gluten-binding properties of HLA-DQ2. *J Immunol*. 2008.180(5):3268–78.
18. Ph D, Koletzko S, Ph D, Rewers MJ, George S. and Country. 2015. 371(1):42–9.
19. Cecilio La, Bonatto Mw. The Prevalence of Hla DQ2 and DQ8 in patients with Celiac disease, in family and in general population. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva : ABCD = Brazilian Archives of Digestive Surgery*. 2015;28(3):183-185.
20. Núñez C, Garrote JA, Arranz E, Bilbao JR, Fernández Bañares F, Jiménez J, i ostali. Recommendations to report and interpret HLA genetic findings in coeliac disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2018.;

21. Murad H, Jazairi B, Khansaa I, Olabi D, Khouri L. HLA-DQ2 and -DQ8 genotype frequency in Syrian celiac disease children: HLA-DQ relative risks evaluation. *BMC Gastroenterol.* 2018.;18(1):2–5.
22. Abdulrahman Al-Hussaini, Hanan Alharthi, Awad Osman, Nezar Eltayeb-Elsheikh, Aziz Chentoufi. Genetic susceptibility for celiac disease is highly prevalent in the Saudi population. 2018.
23. Joseph A. Murray, S. Breannndan Moore, Carol T. Van Dyke, Brian D. Lahr, Ross A. Dierkhising, Alan R. Zinsmeister, L. Joseph Melton, Cynthia M. Kroning, Mounif El-Yousseff, MD, and Albert J. Czaja. HLA DQ Gene Dosage and Risk and Severity of Celiac Disease
24. Parham P. *The Immune system*; W. W. Norton & Company; 4th edition. 2014.
25. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Lukinović-Škudar V i sur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
26. J. Tinckam. *Basic Histocompatibility Testing Methods* in: A. Chandraker et al. *Core Concepts in Renal Transplantation*. Springer Science+Business Media, 2012
27. Klein J., Sato A. (2000): The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343: 702-709.
28. <http://www.zaklada-ana-rukavina.hr/>
29. <http://hlaallels.org/nomenclature/naming.html>. Nomenclature for Factors of the HLA System
30. <http://vassarstats.net/>
31. [www.saudijgastro.com/preprintarticle.asp?id=235582](http://www.saudijgastro.com/preprintarticle.asp?id=235582)
32. <http://pypop.org/popdata/index.html>
33. <http://struna.ihjj.hr/naziv/haplotip/25542/>
34. [http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA\\_typing/serology.php](http://medweb4.unige.ch/immunologie/home/HSC/donor/HLA_typing/serology.php)

## 8. SAŽETAK

### Cilj rada

Cilj rada je objasniti povezanost sustava HLA i celijakije te istražiti kolika je učestalost alela lokusa HLA-DQA i DQB kod pacijenata oboljelih od celijakije. U provedenom istraživanju cilj je bio opisati vezu između alela HLA-DQB1\*03:01 i HLA-DQB1\*03:02.

### Materijali i metode

Ovo istraživanje provedeno je u Laboratoriju za tipizaciju (Zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Split) te je obuhvatilo 249 pacijenata podijeljenih u dvije skupine. Ciljnu skupinu s 199 pacijenata s sumnjom na celijakiju te kontrolnu skupinu od 50 ispitanika zdrave populacije Splitsko-dalmatinske županije. U svrhu genetskog testiranja korištene su metode izolacije DNA vršene pomoću komercijalnog kita firme Roche Diagnostics (High Pure PCR Template Preparation Kit), te metoda PCR-SSO (engl. *Polymerase chain reaction-Sequence Specific Oligonucleotids*). Učestalost alela lokusa HLA-DQA1 i HLA-DQB1 sustava HLA određena je direktnim brojanjem. Za usporedbu razlike između ispitivane i kontrolne skupine korištena je 2x2 tablica a za vrijednosti manje od 5 korišten je Fisher-ov egzaktan test (statistički značajnim rezultatom smatran je svaki kojem je vrijednost  $P < 0,05$ ).



## **Rezultati**

Testirani lokus HLA-DQB1 u skupini pacijenata s kliničkom slikom celijakije pokazuje najvišu frekvenciju alela HLA-DQB1\*02 (27%) za koji je ujedno i dokazana statistički značajna razlika ( $p=0.0083$ ). S druge strane, za rizični alel HLA-DQB1\*03:02 prisutan u svega 16% ispitanih spomenute grupe dokazana je viša frekvencija u odnosu na kontrolnu grupu no ne i njena statistička značajnost ( $p=0.1100$ ). Oba navedena alela su u prvoj skupini identificirana u 43% ispitanih a u kontrolnoj u 25.4%

## **Zaključci**

Frekvencija HLA-DQB1\*03:02 je rezultatski viša od očekivane prosječne, očekivane vrijednosti za Hrvatsku. Radom je dokazana povezanost određenih HLA alela i predispozicije za razvoj celijakije. HLA tipizacija ima značajan utjecaj u dijagnozi celijakije ali i u kliničkoj praksi općenito.

## 9. SUMMARY

### **Bachelor Thesis Title**

Association of HLA and Celiac disease

### **Objective**

To explain the association of HLA and celiac disease and to determine the frequency of HLA-DQA/ HLA-DQB loci in patients with celiac disease. The aim of the short research was to explore the connection between HLA-DQB1\*03:01 and HLA-DQB1\*03:02 loci and GE.

### **Materials and methods**

The study was conducted at the Laboratory for tissue typing in KBC Split. It involved 249 patients which were split into two groups. The first group was comprised of 199 patients with the suspicion of Celiac disease while the second group was formed with 50 healthy individuals residing in the region of Dalmatia and was considered to be a control group. For the purpose of genetic testing a technique of DNA isolation was used (commercial kit provided by Roche Diagnostics- High Pure PCR Template Preparation Kit) after which the PCR-SSO method was applied. The frequency of alleles in HLA-DQA1 and HLA-DQB1 loci was determined by direct counting of results. For the analysis of the association between the two groups a 2x2 table was used. If the value was presented as less than 5 a Fisher's exact test was applied (a value of  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant).

## **Results**

The highest frequency of HLA-DQB1 locus in patients with a clinical presentation of Celiac disease was presented by the HLA-DQB1\*02 allele (27%). When compared to the control group the results were found to be of statistical significance ( $p=0.0083$ ). On the contrary, the HLA-DQB1\*03:02 allele was present in only 16% of patients. Even though the frequency was greater in the first group compared to the control one, statistical significance was not proven ( $p=0.1100$ ). Both alleles were identified in 43% of the first group subjects and in 25.4% individuals in the control group.

## **Conclusions**

The frequency of HLA-DQB1\*03:02 is higher than the expected average value for Croatia. With this thesis the connection between specific HLA alleles and the predisposition for the onset of Celiac disease was proven. HLA typing has a momentous impact in the diagnosis of Celiac disease as well as in general clinical practice.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

**Ime i prezime:** Nina Bučević

**Datum rođenja:** 26.10.1996.

**Mjesto rođenja:** Split, Hrvatska

**Državljanstvo:** Hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Pujanke 24a, 21 000 Split

**Kontakt broj:** +385 98 977 6137

**E-mail adresa:** [nina.bucevic@gmail.com](mailto:nina.bucevic@gmail.com)

### Školovanje:

**2015- 2018.** Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Smjer: Medicinska laboratorijska dijagnostika

**2011-2015.** Prirodoslovno- matematička gimnazija, Split

**2003- 2018.** Osnovna škola Pujanki, Split

### Strani jezici:

**Engleski-** napredna razina

**Španjolski-** osnovna razina

**Njemački-** osnovna razina